



HAL
open science

Effets de la photoactivation par irradiation synchrotron sur la micro vascularisation et sur les tissus cérébraux chez la souris saine ou porteuse d'un gliome : développements en microscopie biphotonique et essais précliniques.

Clément Ricard

► **To cite this version:**

Clément Ricard. Effets de la photoactivation par irradiation synchrotron sur la micro vascularisation et sur les tissus cérébraux chez la souris saine ou porteuse d'un gliome : développements en microscopie biphotonique et essais précliniques.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00375818

HAL Id: tel-00375818

<https://theses.hal.science/tel-00375818>

Submitted on 16 Apr 2009

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

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

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Discipline : Neurosciences - Neurobiologie

Thèse soutenue publiquement par

Clément RICARD
le 24 juin 2008

Effets de la photoactivation par irradiation synchrotron
sur la microvascularisation et sur les tissus cérébraux
chez la souris saine ou porteuse d'un gliome.

Développements en microscopie biphotonique et essais
précliniques.

Directeurs de thèse : Dr. Boudewijn van der Sanden et Dr. Christoph Segebarth

Composition du jury

| | |
|--------------------------------|--------------------|
| Pr. Claude le Sech | Rapporteur |
| Dr. Marie-Claire Schanne-Klein | Rapporteur |
| Pr. François Berger | Examineur |
| Pr. Michel Robert-Nicoud | Examineur |
| Dr. Georges Wagnieres | Examineur |
| Dr. Boudewijn van der Sanden | Directeur de thèse |
| Dr. Christoph Segebarth | Directeur de thèse |

INSERM U836 – Grenoble Institut des Neurosciences

Les tumeurs intracrâniennes font partie des pathologies les plus fréquentes en neurologie après les accidents vasculaires cérébraux et les démences. On estime leur incidence à 10 nouveaux cas par an pour 100000 personnes. Les glioblastomes en sont la forme la plus virulente et malgré les avancées médicales des dernières années leur pronostic demeure très pessimiste. En effet, la médiane de survie est de l'ordre de 12 mois et le taux de survie à 5 ans est seulement de 2%.

L'un des enjeux actuels de la recherche en neuro-oncologie est de mettre au point de nouveaux traitements à visée curative. C'est le cas de la thérapie de photoactivation du platine par irradiation synchrotron (PAT-Plat), technique qui a été développée au cours des dernières années et qui a montré des effets curatifs chez des rats porteurs du gliome F98.

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à mieux caractériser les effets de la PAT-Plat et de ses différentes modalités (chimiothérapie à base de cisplatine et radiothérapie synchrotron) sur les tissus et la vascularisation cérébrale saine ainsi que sur le gliome F98. La microscopie biphotonique intravitale a été utilisée comme méthode d'observation et notre étude a donné lieu au développement de plusieurs méthodes (observation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), imagerie de la vascularisation tumorale, marquage des astrocytes et des fibres élastiques en intravitale).

Nous avons ainsi démontré qu'une irradiation synchrotron (15Gy/79keV) n'entraînait pas d'effets secondaires à court terme (rupture de la BHE, diminution de la perfusion, gliose, ...) dans le cortex pariétal de souris nude. Nous avons également mis en évidence qu'un effet de synergie entre le cisplatine et l'irradiation était à l'origine des effets spectaculaires de la PAT-Plat. Enfin, nous avons souligné qu'outre son action sur les cellules tumorales, la thérapie entraînait une diminution de la perfusion des vaisseaux angiogéniques.

Mots-clés : Thérapie de photoactivation du platine par irradiation synchrotron ; Microscopie biphotonique, Neuro-oncologie, Microvascularisation cérébrale et tumorale, Histologie intravitale.

Brain tumors are the third most frequent pathology encountered in neurology following stroke and dementia. Approximately 10 new cases are encountered each year in a population of 100.000. Glioblastoma are the most aggressive among brain tumors and despite medical progress they suffer of a poor prognosis (median survival time is 12 months; five years survival rate is 2%).

One of the challenges in neuro-oncology is the development of new curative treatments against glioblastoma. One of them, the photoactivation therapy of platinum with synchrotron X-rays (PAT-Plat) was developed during the last years and has shown curative effects in rats bearing the F98 glioma.

In the present study, we have attempted to characterize the effects of the PAT-Plat and its different modalities (chemotherapy with cisplatin and synchrotron radiotherapy) on healthy brain tissue and microvasculature as well as on the F98 glioma. Intravital multiphoton microscopy was used as the main imaging tool to investigate the effects of the PAT-Plat and many methodologies were developed (assessment of blood-brain-barrier (BBB) disruption, imaging of tumor microvasculature, staining of astrocytes and elastic fibers).

We have shown that a 15Gy/79keV synchrotron irradiation does not induce short term side effects (BBB disruption, diminution of the perfusion, gliosis, ...) in the parietal cortex of nude mice. We have also demonstrated that a synergistic effect between cisplatin and irradiation is at the origin of the effects of the PAT-Plat. Finally, we have shown that the action of the PAT-Plat is not restricted to tumor cells; a decrease in the angiogenic vessels perfusion was also observed in the peritumoral area of the F98 glioma.

Keywords: Photoactivation of platinum using synchrotron X-rays ; Multiphoton microscopy ; Neuro-oncology, Brain and tumor microvasculature, Intravital histology.

Avant propos - Remerciements

Qu'est-ce qu'une thèse de doctorat ?

Voilà une question à laquelle tous les chercheurs se sont un jour confrontés car définir une thèse revient en quelque sorte à définir une partie de soi. Il y a maintenant près de huit ans, lorsque j'ai franchi pour la première fois les portes d'un amphithéâtre de l'Université Joseph Fourier, mon choix était déjà fait, la mission était claire, celle d'obtenir un doctorat 8 ans plus tard afin de faire de la recherche scientifique mon métier. Aussi quand j'évoque ma thèse, il s'agit en réalité des 8 dernières années.

Une thèse, c'est une remise en question permanente, des incertitudes et des galères qui aident à acquérir une méthode basée sur l'observation, la logique et l'analyse.

Une thèse, c'est vivre à 100 à l'heure dans un monde où les idées se succèdent, s'annulent ou se combinent pour découvrir et comprendre des phénomènes. Cette exploration, c'est celle d'un domaine si vaste que ses limites sont seulement définies par l'imagination. Chercher c'est prendre le risque de découvrir ; découvrir c'est prendre le risque de se questionner et se questionner c'est prendre le risque encore plus grand de comprendre. Une thèse c'est donc prendre des risques.

Une thèse c'est également des rencontres, un travail d'équipe, des rires et des moments mémorables qui resteront à jamais ancrés dans sa mémoire. Ces moments peuvent paraître simples ou insignifiants mais ils ont une valeur inestimable quand on les vit. Qu'il s'agisse d'un long monologue métaphysique déclamé devant une souris en plein milieu de la nuit lors d'une expérience à l'ESRF ; d'un échange de goûts musicaux à fort volume la même nuit pour ne pas s'endormir dans la salle de contrôle ou du sentiment indéfinissable que l'on ressent quand sur l'écran du microscope apparaît une image traduisant un phénomène dont on est le premier à découvrir.

Une thèse c'est donc un morceau de vie, l'adolescence du chercheur, une période riche en bouleversements, en découvertes, en choix. Le moment où l'on affirme sa personnalité en temps que Scientifique et plus particulièrement dans mon cas en tant que Biologiste.

Justement, pourquoi avoir choisi la Biologie ? Sans me livrer à de vastes élucubrations psychologiques, disons que ma décision a eu lieu lors de mes années lycée mais qu'elle puise ses racines beaucoup plus profondément. Très jeune, j'ai été rapidement intéressé de comprendre comment toutes les choses qui m'entouraient fonctionnaient. Cependant, bien qu'adorant la nature et notamment les animaux, la Biologie a longtemps demeuré un sujet mêlant mystère et peur. La principale cause de la peur est due à l'inconnu. La meilleure façon de ne pas avoir peur de quelque chose est de chercher à le comprendre ; voilà comment d'une peur naît l'interrogation et par la suite la fascination. J'ai découvert au lycée que la Biologie était sûrement la Science où il restait

le plus à découvrir et que les connaissances actuelles n'étaient que les fondations d'un monde beaucoup plus vaste. Explorer ce monde, c'est repousser ses peurs et découvrir chaque jour un peu plus ce que l'on est réellement, au sens propre comme au sens figuré.

Mes 8 années passées à l'Université ont confirmé mes choix et ont répondu à mes attentes, je ne regrette pas une seule seconde de ma formation ni aucun de mes choix. Je suis conscient que mon désir de réaliser une thèse de doctorat s'est souvent transformé en une obsession ; je sais que par moments j'ai du paraître bizarre, perdu dans mes pensées. Si mes actes ou mes choix ont fait souffrir certaines personnes, je m'en excuse sincèrement.

Une thèse de doctorat ne se vit pas et ne se réalise pas seule, je tiens donc à remercier chaleureusement tous ceux qui de près ou de loin m'ont apporté leur aide et leur soutien.

Mes parents, Brigitte et Clément, pour leur présence et leur soutien au cours des 26 dernières années. Pour avoir supporté mes discussions détaillées et pas forcément appétissantes lors des repas ! Pour avoir cru en moi, pour la liberté qu'ils m'ont accordé et pour la lueur qu'ils avaient dans leur regard le 24 juin dernier.

Toute ma famille ; mes 2 grands-mères que j'adore ; mes 2 grands-pères malheureusement disparus mais dont la présence brille au fond de mon cœur ; mon oncle/parrain et ma cousine ; merci également pour votre soutien et pour tous les bons moments.

Un immense merci au Dr. Boudewijn van der Sanden, mon directeur de thèse, qui m'a fait confiance dès mon stage de Master 2. Merci pour m'avoir appris énormément, pour ta bonne humeur, pour toutes les heures de manip passées ensemble et pour m'avoir transmis ton expérience.

Merci au Dr. Christoph Segebarth, également mon directeur de thèse, pour avoir participé activement à la re-lecture de mes manuscrits ainsi que pour tous les conseils et la disponibilité.

Merci au Dr. Jean-Claude Vial pour m'avoir initié à l'optique et m'avoir montré tout l'intérêt des travaux à l'interface de la Biologie et de la Physique. Merci pour ta bonne humeur légendaire, tes conseils et pour m'avoir fait découvrir la Physique d'une façon passionnante.

Cette thèse a été réalisée entre 3 laboratoires : l'unité INSERM U594 « Neuroimagerie Fonctionnelle et Métabolique » et l'unité INSERM U647 « Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale » devenues en 2007 les équipes 5 et 6 du Centre de Recherche INSERM U836 « Grenoble Institut des Neurosciences » ainsi que le Laboratoire de Spectrométrie Physique (CNRS UMR 5588). Je tiens donc à remercier chaleureusement tous les membres de ces différents laboratoires et plus particulièrement :

- Régine Farion (merci pour ton aide précieuse et pour m'avoir appris à maîtriser de nombreuses techniques), Marie-Claude Zaroni (la plus sympa des gestionnaires) et Emmanuelle Grillon : U594 puis U836 - équipe 5.

- Catherine Massart, Manuel Fernandez, Jérôme Gastaldo, Herwig Requardt, Christian Nemoz (from Marseille !), Hélène Elleaume, Anne-Marie Charvet et François Estève : U647 puis U836 - équipe 6 ainsi que l'ESRF.
- Julien Douady et Patrice Baldeck : Laboratoire de Spectrométrie Physique.

Je tiens également à remercier les différents membres du jury ayant accepté de juger ce travail : le Pr. Michel Robert Nicoud, le Pr. Claude Le Sech, le Pr. François Berger, le Dr. Marie-Claire Schanne-Klein ainsi que le Dr. Georges Wagnières.

Au cours de mes années de thèse, j'ai également eu l'opportunité d'enseigner au travers d'un poste de moniteur. Cette expérience a été extrêmement enrichissante et ne m'a apporté que des satisfactions. Je tiens à remercier chaleureusement mon tuteur de monitorat, le Pr. François Boucher qui a su me communiquer sa passion pour l'enseignement et qui m'a fait découvrir le formidable métier d'enseignant-chercheur dans une super ambiance. Merci pour les conseils, pour les franches rigolades lors des séances de TP de Licence Pro et pour toute ton aide. Merci également au Dr. Catherine Ghezzi et au Pr. Joël de Leiris pour leurs conseils et pour m'avoir fait confiance en me confiant notamment des cours en amphithéâtre.

Ces années de thèse auront également été l'occasion de m'impliquer dans la mise en place et le développement de l'Institut des Neurosciences de Grenoble en étant représentant des doctorants au conseil de l'institut et en étant un des membres fondateurs de NeuroDocs, le comité des doctorants. Merci au directeur du centre, le Pr. Claude Feuerstein ainsi qu'à tous mes collègues doctorants.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Véronique Sgambato-Faure qui m'avait accueilli lors de mon stage de Master 1 et qui m'avait fait découvrir les études comportementales ainsi que la maladie de Parkinson.

Enfin, je tiens à remercier mes amis et plus particulièrement Géraldine Vélo pour leur sympathie et leurs encouragements.

8 ans, soit 2922 jours : le dixième d'une vie. Une durée qui peut paraître immense mais qui en réalité est très courte. Une multitude de souvenirs, une multitude d'images, de choix, de découvertes, de doutes mais aussi de certitudes. Il est impossible de résumer en quelques phrases ce que peut générer une telle expérience.

Obtenir une thèse de doctorat en Biologie m'a fait prendre conscience de plusieurs choses :

- La Recherche est la plus stimulante des activités, elle apporte la réponse à de nombreux questionnements tout en en soulevant d'autres. La Recherche s'alimente de recherches et elle ne peut compter que sur ce cycle pour progresser.
- L'Enseignement est la plus enrichissante des activités, elle permet de garder une immense ouverture d'esprit, d'être à l'écoute et de perpétuer les connaissances.

- La Vie est la chose la plus précieuse qu'il existe. Apprendre à la comprendre, c'est apprendre à la protéger.

Au travers de mes travaux de thèse, j'espère avoir apporté la réponse à certaines questions, avoir transmis des connaissances. La fin d'une époque annonce la naissance d'une nouvelle, j'espère me montrer digne de l'expérience que j'ai acquise, j'espère me montrer digne du grade de docteur qui m'a été remis. La Recherche et l'Enseignement font plus que jamais partie de ma vie et la Vie est l'une des seules choses en laquelle je crois.

Clément Ricard, PhD
Grenoble, été 2008

Table des Matières

| | |
|---------------------------------|----|
| Table des Matières | 11 |
|---------------------------------|----|

| | |
|--|----|
| Définitions et Abréviations | 17 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Introduction et Objectifs | 19 |
|--|----|

Première partie : Base de Connaissances

| | |
|---|----|
| Système Nerveux et Tumeurs Intracrâniennes | 25 |
|---|----|

| | | |
|-------|---|----|
| 1.1 | Quelques Eléments de Neuroanatomie. | 25 |
| 1.1.1 | Composition du système nerveux. | 25 |
| 1.1.2 | Neuroanatomie générale..... | 26 |
| 1.1.3 | Quelques éléments d’anatomie cérébrale | 27 |
| 1.1.4 | Vascularisation cérébrale | 30 |
| 1.1.5 | Barrière hémato-encéphalique..... | 31 |
| 1.2 | Imagerie Médicale du Système Nerveux | 32 |
| 1.2.1 | Angiographie cérébrale par rayons X..... | 33 |
| 1.2.2 | Scanner X (Tomodensitométrie) | 33 |
| 1.2.3 | Tomographie par émission de positrons..... | 34 |
| 1.2.4 | Imagerie par Résonance Magnétique | 35 |
| 1.3 | Tumeurs Intracrâniennes | 36 |
| 1.3.1 | Epidémiologie | 36 |
| 1.3.2 | Sémiologie médicale | 37 |
| 1.3.3 | Classification des tumeurs intracrâniennes | 38 |
| 1.3.4 | Description des principaux types de tumeurs intracrâniennes | 39 |
| 1.3.5 | Caractéristiques histologiques des astrocytomes | 43 |
| 1.3.6 | Angiogenèse | 43 |
| 1.4 | Modélisation Animale en Neurosciences | 45 |
| 1.4.1 | Considérations éthiques..... | 45 |
| 1.4.2 | Choix de l’espèce | 45 |
| 1.4.3 | Modélisation des tumeurs intracrâniennes | 46 |
| 1.4.4 | Lignées cellulaires fréquemment utilisées | 49 |
| 1.5 | Conclusions | 52 |

| | |
|--|----|
| Thérapies Anti-Tumorales | 55 |
| 2.1 Exérèse Chirurgicale..... | 55 |
| 2.2 Chimiothérapie..... | 57 |
| 2.2.1 Particularités de système nerveux..... | 57 |
| 2.2.2 Pharmacocinétique..... | 58 |
| 2.2.3 Méthodes améliorant la délivrance des drogues..... | 58 |
| 2.2.4 Perspectives..... | 60 |
| 2.3 Radiothérapie..... | 61 |
| 2.3.1 Généralités..... | 61 |
| 2.3.2 Bref historique de la radiothérapie externe..... | 61 |
| 2.3.3 Notion de dose et de fractionnement..... | 62 |
| 2.3.4 Radiothérapie des gliomes..... | 64 |
| 2.4 Combinaison de plusieurs thérapies..... | 65 |
| 2.5 Protocoles Courants en Clinique..... | 66 |
| 2.5.1 Gliomes de bas grade..... | 66 |
| 2.5.2 Gliomes de haut grade..... | 67 |
| 2.5.3 Méningiomes..... | 67 |
| 2.5.4 Métastases..... | 67 |
| 2.6 Nouvelles thérapies..... | 68 |
| 2.6.1 Immunothérapie..... | 68 |
| 2.6.2 Thérapie génique..... | 68 |
| 2.6.3 Thérapies anti-angiogénique..... | 69 |
| 2.7 Conclusions..... | 69 |
| | |
| Thérapies par Irradiation Synchrotron | 71 |
| 3.1 Interactions Rayonnement - Matière..... | 71 |
| 3.1.1 Diffusion..... | 72 |
| 3.1.2 Absorption..... | 73 |
| 3.1.3 Domaines de prédominance..... | 75 |
| 3.1.4 Interaction des électrons avec la matière..... | 75 |
| 3.2 Quelques Définitions Utiles en Radiobiologie..... | 76 |
| 3.3 Effets des Rayonnements Ionisants sur le Vivant..... | 77 |
| 3.3.1 Etape Physico-chimique..... | 77 |
| 3.3.2 Etape biologique..... | 79 |
| 3.3.3 Conséquences Biologiques..... | 80 |
| 3.3.4 Implications pour la radiothérapie..... | 81 |
| 3.4 Rayonnement Synchrotron..... | 82 |
| 3.4.1 Généralités..... | 82 |

| | | |
|--------------------------|--|------------|
| 3.4.2 | Description générale de l'ESRF..... | 82 |
| 3.4.3 | Production du rayonnement synchrotron à l'ESRF..... | 83 |
| 3.4.4 | Lignes de lumière..... | 84 |
| 3.4.5 | Présentation de la ligne médicale ID17..... | 85 |
| 3.5 | Radiothérapie par Microfaisceaux (MRT)..... | 86 |
| 3.6 | Thérapie par Photoactivation du Platine..... | 87 |
| 3.6.1 | Généralités..... | 87 |
| 3.6.2 | Cisplatine..... | 89 |
| 3.6.3 | Historique des radiochimiothérapies des gliomes utilisant le cisplatine..... | 92 |
| 3.6.4 | Radiochimiothérapies à l'ESRF : état de l'art..... | 94 |
| 3.7 | Conclusions..... | 99 |
| Microscopies..... | | 101 |
| 4.1 | Aux origines de la microscopie..... | 101 |
| 4.1.1 | Des premières lentilles au microscope..... | 101 |
| 4.1.2 | Les premiers microscopes..... | 102 |
| 4.1.3 | La naissance de l'histologie..... | 104 |
| 4.1.4 | Vers la théorie cellulaire..... | 104 |
| 4.1.5 | Les descriptions des cellules du système nerveux..... | 105 |
| 4.1.6 | La microscopie de fluorescence et la microscopie électronique..... | 106 |
| 4.1.7 | Une explosion de nouvelles méthodes de microscopie..... | 106 |
| 4.2 | Quelques notions d'optique..... | 107 |
| 4.2.1 | Nature de la lumière..... | 107 |
| 4.2.2 | Propriétés de la lumière..... | 108 |
| 4.2.3 | Les lentilles..... | 111 |
| 4.3 | Microscopie à fond clair..... | 112 |
| 4.3.1 | Anatomie et principe optique d'un microscope..... | 113 |
| 4.3.2 | Caractéristiques d'un objectif..... | 114 |
| 4.3.3 | Résolution..... | 115 |
| 4.4 | Microscopie à fluorescence..... | 116 |
| 4.4.1 | Principe de la fluorescence..... | 116 |
| 4.4.2 | Anatomie d'un microscope à fluorescence..... | 117 |
| 4.4.3 | Méthodes de coloration..... | 119 |
| 4.4.4 | Avantages et Inconvénients..... | 121 |
| 4.5 | Microscopie confocale..... | 122 |
| 4.5.1 | Anatomie d'un microscope confocal..... | 122 |
| 4.5.2 | Résolution..... | 124 |
| 4.5.3 | Avantages et Inconvénients..... | 125 |
| 4.6 | La microscopie biphotonique..... | 125 |
| 4.6.1 | Bases physiques..... | 126 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.6.2 | Anatomie d'un microscope biphotonique | 128 |
| 4.6.3 | Acquisition du signal..... | 129 |
| 4.6.4 | Méthodes de coloration et d'observation | 130 |
| 4.6.5 | Paramètres influant sur la profondeur d'observation | 133 |
| 4.6.6 | Microscopie Biphotonique, Neurosciences et Neuro-oncologie..... | 134 |
| 4.6.7 | Avantages et Inconvénients..... | 143 |
| 4.7 | Conclusions | 143 |

Seconde partie : Etude

Développements en Microscopie Biphotonique..... 147

| | | |
|-------|---|-----|
| 5.1 | Description du Microscope Biphotonique..... | 148 |
| 5.1.1 | Laser d'excitation..... | 150 |
| 5.1.2 | Modulation de la puissance laser | 150 |
| 5.1.3 | Caractéristiques des objectifs | 152 |
| 5.1.4 | Acquisition du signal..... | 152 |
| 5.1.5 | Interface informatique | 153 |
| 5.2 | Imagerie des Tissus Cérébraux | 153 |
| 5.2.1 | Microvascularisation cérébrale | 153 |
| 5.2.2 | Perméabilité de la BHE | 155 |
| 5.2.3 | Marquage des astrocytes | 159 |
| 5.2.4 | Conclusions | 167 |
| 5.3 | Imagerie de la Vascularisation Tumorale..... | 167 |
| 5.3.1 | Greffe orthotopique du gliome F98..... | 168 |
| 5.3.2 | Greffe hétérotopique du gliome F98 sous fenêtre dorsale | 169 |
| 5.3.3 | Greffes hétérotopiques du gliome F98 en sous-cutané | 173 |
| 5.4 | Imagerie des Fibres Élastiques..... | 176 |
| 5.4.1 | Généralités sur les fibres élastiques | 176 |
| 5.4.2 | Matériels & Méthodes | 177 |
| 5.4.3 | Résultats | 179 |
| 5.4.4 | Discussions..... | 185 |
| 5.4.5 | Etude morphologique de la crosse aortique du rat | 188 |
| 5.4.6 | Etude des effets de la MRT sur la paroi artérielle..... | 192 |
| 5.5 | Essais de Nouveaux Colorants et Méthodes | 195 |
| 5.6 | Conclusions | 195 |

Effets d'une Irradiation Tomographique Synchrotron sur la Vascularisation et les Tissus Cérébraux 197

| | | |
|-----|---|-----|
| 6.1 | Objectifs et Mise en Place de l'Etude. | 198 |
|-----|---|-----|

| | | |
|---|--|------------|
| 6.2 | Etude des Effets sur les Tissus Sains | 200 |
| 6.2.1 | Matériel & Méthodes | 200 |
| 6.2.2 | Résultats | 206 |
| 6.2.3 | Discussions..... | 209 |
| 6.3 | Etude des Effets sur le Gliome F98..... | 213 |
| 6.3.1 | Matériels & Méthodes | 214 |
| 6.3.2 | Résultats | 216 |
| 6.3.3 | Discussions..... | 219 |
| 6.4 | Conclusions | 221 |
| | | |
| Caractérisation des Effets de la PAT-Plat sur un Modèle de Gliome Heterotopique..... | | 223 |
| 7.1 | Objectifs et Mise en Place de l'Etude..... | 224 |
| 7.2 | Etude des Effets sur la Croissance Tumorale..... | 226 |
| 7.2.1 | Matériels & Méthodes | 226 |
| 7.2.2 | Résultats | 230 |
| 7.2.3 | Discussions..... | 235 |
| 7.3 | Etude des Effets sur la Vascularisation | 238 |
| 7.3.1 | Matériel & Méthodes | 239 |
| 7.3.2 | Résultats | 240 |
| 7.3.3 | Discussions..... | 242 |
| 7.4 | Conclusions | 245 |
| | | |
| Conclusions et Perspectives | | 247 |
| | | |
| Références | | 259 |

Définitions et Abréviations

Notion d'étude *in vivo*, *in situ* et en intravital

Il existe un débat entre biologistes sur la définition de la locution *in vivo*. Certains considèrent en effet que des travaux réalisés sur des prélèvements de tissus maintenus en vie sont des études *in vivo* ; d'autres pas. Afin de simplifier le problème, nous utiliserons l'adjectif « intravital » pour des observations ayant été faites sur des animaux vivants. La locution « *in situ* » sera utilisée pour des études réalisées dans les mêmes conditions qu'en intravital mais sur des animaux euthanasiés juste avant l'expérimentation. Enfin, le terme « explant » sera réservé à des organes ou tissus ayant été prélevés sur des animaux et observés par la suite (qu'ils aient été maintenus en conditions physiologiques ou qu'ils aient été fixés).

Abréviations

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BOLD : Blood Oxygen Level Dependant

BSA : Bovine Serum Albumin

CDDP : Cis-DiamineDichloroPlatinum (Cisplatine)

CED : Convection-Enhanced Delivery

CT-Scan : Computed Tomography (= Scanner X ; = Tomodensitométrie)

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DSB : Double Strand Break

EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein

ENU : N-ethyl-N-nitrosourea

ESRF : European Synchrotron Radiation Facility

FDA : Food and Drug Administration

FDM : Fragments d'ADN migrants hors du gel

FITC : Fluorescein Isothiocyanate
FWHM : Full Width at Half Maximum (largeur à mi-hauteur)
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP : Green Fluorescent Protein
HE : Hematoxyline Eosine
HIF : Hypoxia Inducible Factor
IMRT : Intensity Modulated Radiation Therapy
INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
ip : injection intra-péritonéale
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
iv : injection intra-veineuse
MNU : Methylnitrosourea
MRT : Microbeam Radiation Therapy
NA : Numerical Aperture (Ouverture Numérique)
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAT-Plat : PhotoActivation Therapy with Platinum
PBS : Phosphate Buffered Saline (Tampon Phosphate)
PET : Positron Emission Tomography (Tomographie par Emission de Positons)
PMT : Photo Multiplier Tube (Tube Photomultiplicateur)
ROI : Region Of Interest (Région d'intérêt)
SHG : Second Harmonic Generation (Génération de Seconde Harmonique)
siRNA : small interfering RiboNucleid Acid
SMC : Smooth Muscle Cells (Cellules Musculaires Lisses)
Souris KO : Souris Knock-Out (souris possédant un gène invalidé)
Souris SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
SRB : Sulforhodamine B
SR-XRF : Synchrotron Radiation Induced X-ray Fluorescence
SSB : Single-Strand Break
SVF : Serum de Veau Foetal
TDM : Tomodensitométrie
TEL : Transfert d'Energie Linéique
TRITC : Tetra methyl Rhodamine IsoThioCyanate
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction et Objectifs

Chaque jour en France, un peu plus de 400 personnes décèdent des suites d'un cancer. Il s'agit de la seconde cause de mortalité après les maladies cardio-vasculaires. Bien que la prise en charge des patients et les traitements aient évolué au cours des dernières décennies, certaines formes de tumeurs demeurent d'un pronostic très pessimiste.

C'est le cas notamment des tumeurs intracrâniennes et plus particulièrement des glioblastomes qui en sont la forme la plus virulente. A ce jour, le traitement de ce type de tumeur est essentiellement palliatif et le pourcentage de survie à 5 ans est de l'ordre de 2%.

L'un des enjeux de nombreuses équipes de recherche est le développement de nouvelles thérapies en vue d'établir un traitement curatif ainsi que le développement de nouveaux outils de diagnostic. C'est le cas de plusieurs équipes installées dans le centre de recherche INSERM U836 (Grenoble Institut des Neurosciences) où s'est déroulé ce travail de thèse.

Au début des années 2000, un nouveau type de traitement a vu le jour en partenariat avec le European Synchrotron Radiation Facility. Cette thérapie baptisée PAT-Plat pour « PhotoActivation Therapy with Platinum » combine chimiothérapie à base de drogues platinées et radiothérapie utilisant les propriétés exceptionnelles du rayonnement synchrotron. En 2004, les effets curatifs de la PAT-Plat furent démontrés sur des rats porteurs du gliome F98¹. Devant ces résultats prometteurs, des essais cliniques de phase I sont en cours d'élaboration et devraient voir le jour d'ici fin 2008 / début 2009.

En parallèle, un autre institut de recherche Grenoblois, le « Laboratoire de Spectrométrie Physique » installa en partenariat avec l'équipe 5 « Neuroimagerie Fonctionnelle et Métabolique » de l'Institut des Neurosciences une plateforme de microscopie biphotonique intravitale, une nouvelle technique de microscopie très prometteuse pour ses applications biomédicales.

Une première « génération » de doctorants (Pascale Vérant² et Raphaël Serduc³) s'appliqua à développer l'imagerie de la microvascularisation cérébrale par microscopie biphotonique intravitale et à l'appliquer à l'étude des effets sur les tissus sains d'un protocole de radiothérapie synchrotron nommé « radiothérapie par microfaisceaux ». Devant le succès de

ce travail d'interface entre physique, biologie et médecine, un sujet de thèse fut proposé afin d'étudier les effets de la PAT-Plat en utilisant ce type de microscopie.

Ce travail de thèse intitulé « Effets de la photoactivation par irradiation synchrotron sur la microvascularisation et sur les tissus cérébraux chez la souris saine ou porteuse d'un gliome : développements en microscopie biphotonique et essais précliniques » s'articule donc autour de 3 grands axes :

- une pathologie : les tumeurs intracrâniennes et plus particulièrement les glioblastomes.
- une thérapie : la thérapie par photoactivation du platine par rayonnement synchrotron (PAT-Plat).
- une méthode d'imagerie : la microscopie biphotonique.

Les objectifs de ce travail se sont révélés multiples et s'articulent autour de deux grands thèmes : le développement de méthodologies d'observation en microscopie biphotonique et l'étude des effets de la PAT-Plat. Concrètement, le but de ce travail a été :

- 1) de développer de nouvelles méthodologies en microscopie biphotonique intravivante permettant d'étudier les effets de la PAT-Plat. Il s'agit principalement de l'amélioration de la méthode d'étude de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et la mise en place de l'imagerie de la vascularisation tumorale.
- 2) de développer de nouveaux protocoles de coloration en microscopie biphotonique intravivante comme le marquage des astrocytes et des fibres élastiques avec la sulforhodamine B. Le transfert de ces protocoles à l'étude des radiothérapies synchrotron est également proposé.
- 3) d'étudier les effets d'une irradiation synchrotron seule sur la vascularisation et les tissus cérébraux en conditions PAT-Plat (c'est-à-dire avec une dose de 15Gy et une énergie de 79keV).
- 4) d'étudier les effets de la PAT-Plat et de ses différentes modalités sur la croissance tumorale.
- 5) d'étudier les effets de la PAT-Plat sur la vascularisation tumorale.

Si les points 1, 3, 4 et 5 étaient bien définis au commencement de ce travail de thèse, le point 2 s'est rajouté en cours de travail. La spécificité du marquage des astrocytes et des fibres élastiques par la sulforhodamine B a été découverte de façon fortuite. Un marquage inattendu, considéré initialement comme parasite, nous a emmené à nous poser de nombreuses questions qui ont abouti à la caractérisation de la spécificité du marquage et à la découverte de nouvelles techniques de coloration. L'un des objectifs principaux de ce travail de thèse étant le développement de méthodologies en microscopie biphotonique, il nous est apparu tout à fait opportun d'inclure la description de ces deux méthodes dans ce manuscrit.

Ce manuscrit se divise en 7 chapitres répartis en deux grands thèmes :

- La Base de connaissances comprenant 4 chapitres :
 - o le premier chapitre présente quelques généralités en neurosciences avant de s'intéresser aux différents aspects épidémiologiques et cliniques des tumeurs intracrâniennes. Il se conclut par une discussion sur les différentes méthodes de modélisation animale en oncologie.
 - o le second chapitre s'intéresse aux différentes thérapies mises en place pour lutter contre les tumeurs intracrâniennes : exérèse chirurgicale, chimiothérapie, radiothérapie et nouvelles thérapies. Les aspects cliniques des traitements sont également abordés.
 - o le troisième chapitre présente plus en détail la radiothérapie en s'attardant sur les interactions rayonnement / vivant. La lumière synchrotron est également décrite et la PAT-Plat est présentée en détail.
 - o le quatrième chapitre est consacré à la microscopie. Son étude est d'abord réalisée de façon chronologique en rappelant de nombreux phénomènes physiques de base. Le fonctionnement de la microscopie de fluorescence, de la microscopie confocale et biphotonique est également détaillé. Les applications de cette dernière dans le domaine des neurosciences et de la neuro-oncologie sont enfin développées.
- L'Étude comprend 3 chapitres :
 - o le cinquième chapitre qui décrit tous les développements en microscopie biphotonique qui ont été mis au point lors de ce travail de thèse. L'installation

utilisée est tout d'abord présentée puis les méthodes d'observation des tissus cérébraux (imagerie de la vascularisation, perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, imagerie des astrocytes) sont présentées. Dans un second temps, la mise au point de l'imagerie de la vascularisation tumorale est précisée. Enfin, une méthode de marquage des fibres élastiques par la sulforhodamine B est décrite et des exemples d'application sont développés.

- le sixième chapitre s'intéresse à la description des effets d'une irradiation synchrotron en mode tomographique avec une dose de 15Gy et une énergie de 79keV sur la vascularisation et les tissus cérébraux sains.
- Le septième chapitre décrit les effets de la PAT-Plat et de ses différentes modalités sur la croissance du gliome F98 implanté en hétérotopique. Une étude des effets de la thérapie complète sur la vascularisation tumorale est également présentée.

Ce manuscrit se termine par une section « Conclusions et Perspectives » qui rappelle et conclut sur les différentes avancées et découvertes faites lors de ce travail de thèse. Quelques pistes sont émises sur la mise en place d'essais cliniques de phase I pour la PAT-Plat. Les formidables perspectives de la microscopie biphotonique pour des applications biomédicales sont également soulignées.

Ce manuscrit a été rédigé dans l'optique de pouvoir être accessible au plus grand nombre. C'est pour cela que des sujets aussi variés que le fonctionnement d'un microscope, la radiolyse de l'eau ou encore l'histopathologie des glioblastomes sont traités dans la première partie. Cette « base des connaissances », assez longue se veut être une référence dans laquelle on peut venir chercher des données nécessaires à la compréhension de certains résultats présentés par la suite.

Bien que certains points puissent paraître simplistes pour le spécialiste, cette thèse se trouvant à l'interface de plusieurs matières, il nous a paru nécessaire de rappeler quelques bases de biologie aux physiciens et inversement.

Base de Connaissances

Chapitre 1

Systeme Nerveux et Tumeurs Intracrâniennes

La connaissance de l'environnement physiologique dans lequel se développe une tumeur est nécessaire pour mieux comprendre son origine, sa progression ainsi que pour mieux la caractériser. L'ensemble des informations recueillies sur l'environnement et la tumeur elle-même permettront de poser un meilleur diagnostic et surtout d'élaborer le traitement qui sera le plus adapté.

Dans ce chapitre, nous verrons tout d'abord quelques généralités sur le système nerveux ; une brève étude anatomique permettra de définir et de mieux situer les différents éléments que nous évoquerons dans la suite de cette étude. Dans un second temps, nous nous intéresserons aux différentes méthodes de neuroimagerie clinique permettant d'observer le système nerveux mais aussi de détecter, de classifier et de suivre le traitement des pathologies qui peuvent le toucher. Dans un troisième temps, quelques données épidémiologiques des tumeurs intracrâniennes seront abordées avant de se pencher en détail sur leur classification ainsi que leurs caractéristiques. Enfin, nous nous intéresserons à la modélisation des tumeurs intracrâniennes chez le rongeur.

1.1 Quelques Eléments de Neuroanatomie.

1.1.1 Composition du système nerveux.

Le système nerveux est le centre de communication de l'organisme, il permet de percevoir l'environnement, de l'analyser et de produire une réponse (pouvant être motrice ou non)^{4,5}.

Fonctionnellement, il peut être divisé en deux grandes parties : le système nerveux somatique associé au contrôle volontaire et le système nerveux autonome (ou végétatif) qui intervient dans la régulation des fonctions vitales.

A l'échelle microscopique, le système nerveux est composé de 2 grands types cellulaires :

- les neurones : cellules excitables qui conduisent et transmettent l'information
- les cellules gliales, elles mêmes divisées en plusieurs sous-groupes parmi lesquels on trouve les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules de Schwann, les cellules microgliales⁶ et les cellules épendymaires.

1.1.2 Neuroanatomie générale

1.1.2.1 Divisions du système nerveux

Du point de vue anatomique, le système nerveux peut être divisé en deux grandes parties : le système nerveux central et le système nerveux périphérique.

Le système nerveux central également appelé névraxe est composé du cerveau et de la moelle épinière. Il est entouré par une protection osseuse (boite crânienne et colonne vertébrale respectivement). Cependant, il n'est pas en contact direct avec la paroi osseuse ; les méninges, une enveloppe fibreuse et spongieuse, assurent la frontière. Il baigne également dans un liquide particulier appelé liquide cérébro-spinal.

Le système nerveux périphérique est constitué de l'ensemble des nerfs reliant les différentes parties du corps au névraxe. Ce sont les nerfs crâniens (12 paires) qui ont pour origine le tronc cérébral et les nerfs spinaux (31 paires) qui ont pour origine la moelle épinière.

1.1.2.2 Grandes structures.

Comme nous venons juste de le voir, le névraxe est constitué du cerveau et de la moelle épinière. Le cerveau, peut également être subdivisé en différentes structures (Figure 1.1) : le tronc cérébral, le cervelet, le diencephale et le télencéphale (hémisphères cérébraux).

On différencie également la substance grise (zones contenant les corps cellulaires des neurones) de la substance blanche (axones myélinisés).

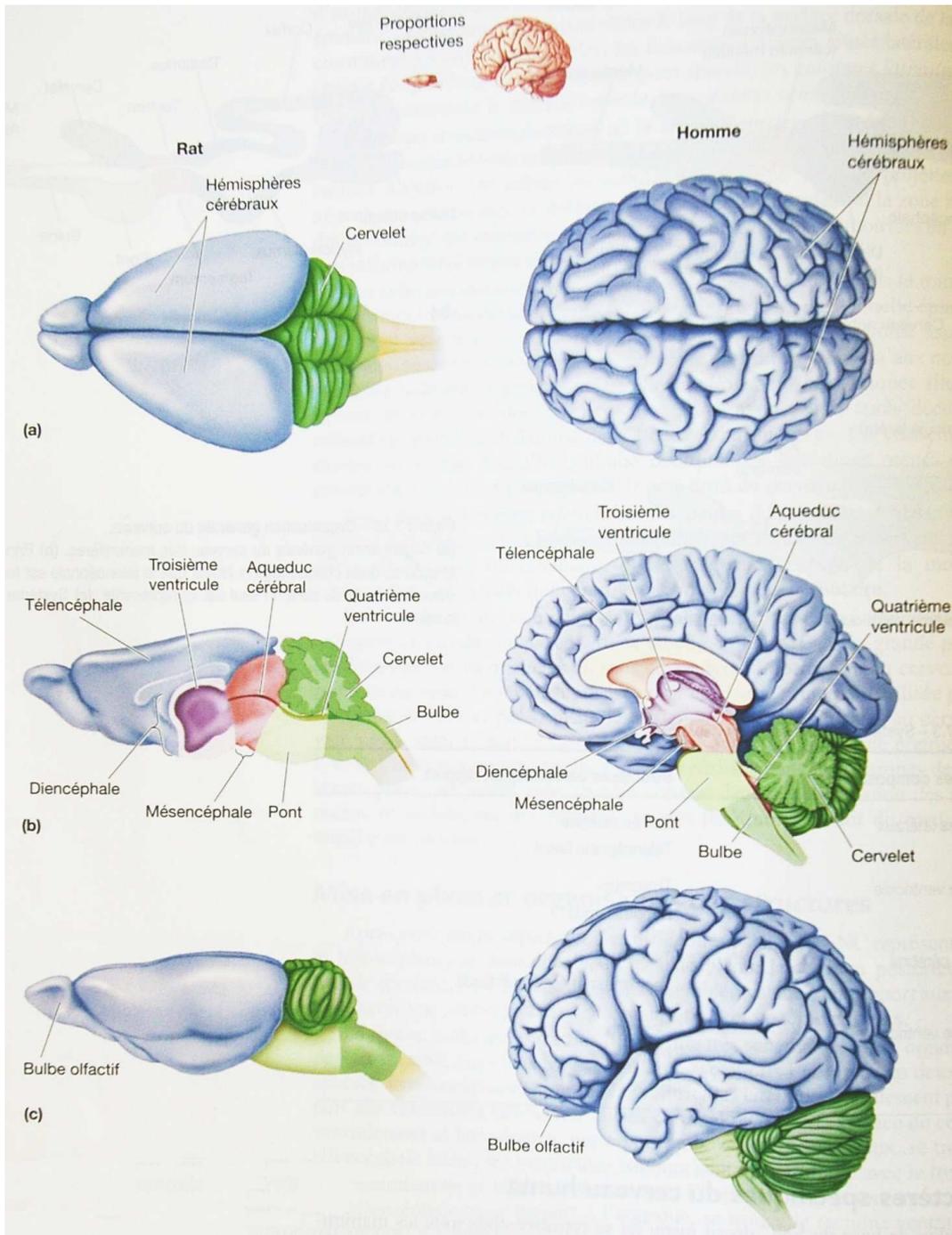


Figure 1.1 : Neuroanatomie comparée rat/homme (Modifié d'après ⁴)

1.1.3 Quelques éléments d'anatomie cérébrale

1.1.3.1 Méninges

Nous avons vu précédemment que les méninges entourent le névraxe, histologiquement, elles peuvent être divisée en trois couches (Figure 1.2) :

- la dure-mère, feuillet épais et résistant qui adhère au périoste du crâne. Elle contient les sinus veineux qui drainent les veines cérébrales (voir 1.1.4).
- l'arachnoïde qui tapisse la face interne de la dure-mère et qui envoie des travées conjonctives vers la troisième couche.
- la pie-mère, feuillet très fin et transparent qui adhère à la surface du cerveau.

On définit également plusieurs espaces dont l'espace sous-arachnoïdien (entre l'arachnoïde et la pie-mère) où circule le liquide cérébro-spinal.

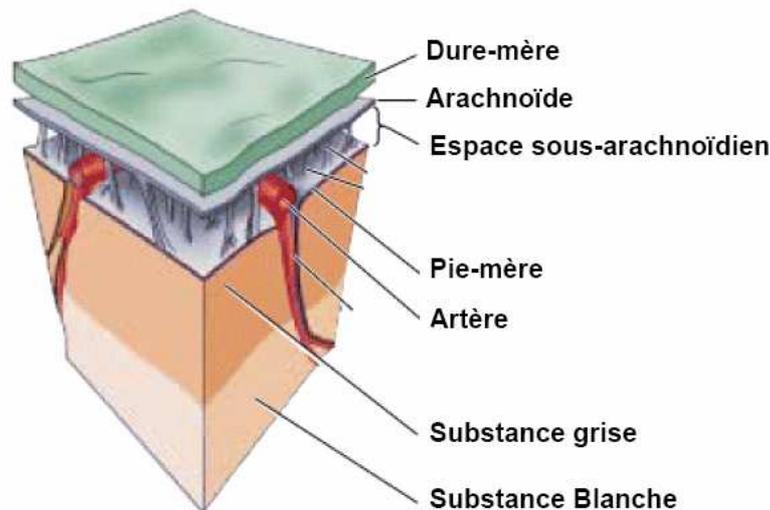


Figure 1.2 : Organisation des méninges (modifié d'après Purves⁵)

1.1.3.2 Hémisphères cérébraux

Les hémisphères cérébraux se trouvent dans la partie sus-tentorielle et peuvent être divisés en quatre lobes : frontal, pariétal, temporal et occipital (Figure 1.3).

A leur surface, se trouve une mince couche de substance grise, le cortex cérébral, marqué par de nombreux sillons qui délimitent des circonvolutions. On note également la présence de commissures qui sont des faisceaux de fibres nerveuses reliant les différentes parties du cerveau entre elles. Le corps calleux, par exemple, relie les deux hémisphères cérébraux.

Plus en profondeur se trouvent les noyaux gris centraux parmi lesquels le noyau caudé et le putamen. Nous n'entrerons pas dans les détails anatomiques et fonctionnels de ces différents noyaux ni dans la classification des aires cérébrales. La figure 1.3 permet de donner quelques repères sur l'organisation des hémisphères cérébraux ; pour une étude plus approfondie, les références ^{4; 7; 5} traitent en détail les différents aspects neuroanatomiques.

1.1.3.3 Cortex cérébral

Le cortex cérébral est la partie la plus évoluée du cerveau. La surface corticale totale est de l'ordre de 2000 à 2500cm² chez un humain adulte. D'un point de vue histologique, le cortex est composé de six couches notées I à VI (de la plus externe à la plus interne) (Figure 1.4):

- I : couche moléculaire. Elle comporte très peu de cellules (essentiellement des astrocytes. Il s'agit d'une zone riche en synapses.
- II : couche granulaire externe. Cette couche est riche en neurones granulaires également appelés « stellate cells », le diamètre de leur soma est en général inférieur à 10 µm.
- III : couche pyramidale externe. Composée de neurones pyramidaux effecteurs.
- IV : couche granulaire interne. Composée de neurones granulaires impliqués dans les voies de la sensibilité.
- V : couche pyramidale interne. Elle abrite les neurones pyramidaux géants, également appelés cellules de Betz¹ dont le diamètre peut atteindre 70µm. Ce sont des neurones moteurs.
- VI : couche polymorphe (également nommée fusiforme)

Les couches superficielles établissent des connections régionales, les couches profondes sont en rapport avec des structures plus distantes⁷.

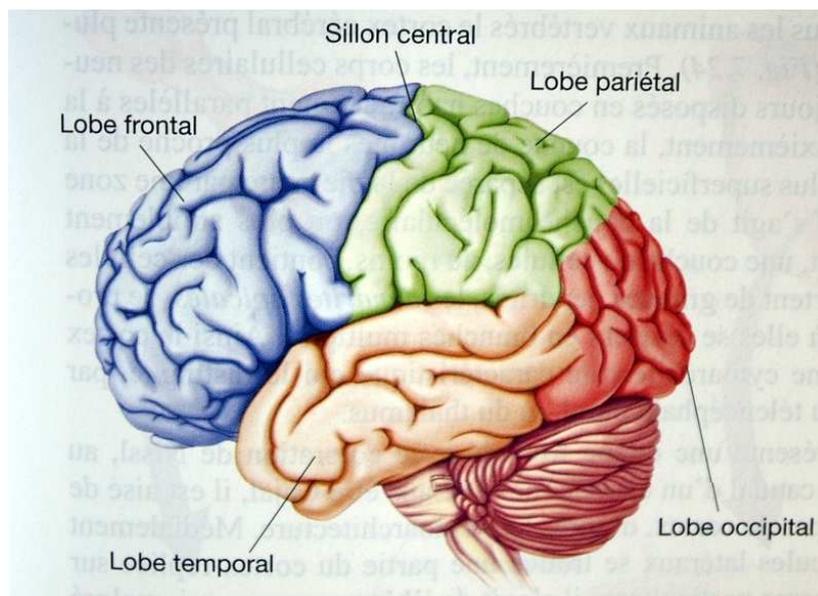


Figure 1.3 : Représentation des différents lobes du cerveau (Modifié d'après⁵)

¹ Du nom de l'anatomiste Vladimir Betz (1834 – 1894) qui les découvrit.

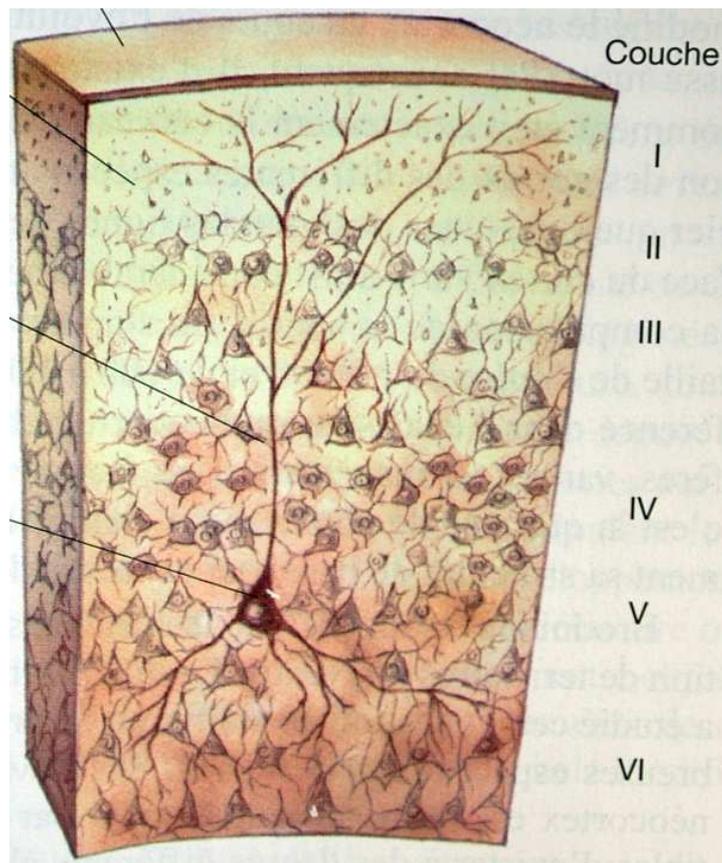


Figure 1.4 : Les différentes couches du cortex cérébral (Modifié d'après ⁵)

1.1.4 Vascularisation cérébrale

Le cerveau ne représente que 2% du poids total du corps mais consomme 20% de l'oxygène inspiré⁸. Il est irrigué par 3 artères : les deux artères carotides internes et l'artère basilaire. Ces 3 artères s'anastomosent sur la face inférieure du cerveau pour donner une structure baptisée polygone de Willis². Chaque hémisphère cérébral va être vascularisé par 3 principales artères : l'artère cérébrale antérieure, l'artère cérébrale moyenne et l'artère cérébrale postérieure. Ces artères se divisent ensuite en artérioles et en capillaires ; la régulation locale du débit sanguin est réalisée par les pericytes situés autour de ces vaisseaux. Le tissu cérébral est fortement vascularisé par un grand nombre de capillaires, on évalue sa longueur à 650km chez l'homme adulte. La surface d'échange est donc considérable (de l'ordre de 20m²).

Les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral s'effectuent au travers d'une structure particulière : la barrière hémato-encéphalique (voir 1.1.5 pour plus de détails). Le sang est

² Du nom de l'anatomiste Thomas Willis (1621 – 1675).

ensuite drainé par des veinules puis par des veines jusqu'aux sinus veineux se trouvant dans le bord des expansions (faux du cerveau et tente du cervelet) de la dure-mère. Les sinus veineux se jettent ensuite dans la veine jugulaire interne.

1.1.5 Barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière physique séparant le volume intravasculaire du parenchyme cérébral⁹⁻¹². Elle joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie du parenchyme cérébral en régulant les échanges avec le sang. La BHE est composée de trois parties bien distinctes (Figure 1.5) :

- une couche de cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées (tight junctions). Ces jonctions empêchent le passage de molécules par des voies paracellulaires et imposent donc un transport transcellulaire.
- une lame basale riche en collagène de type IV.
- des pieds astrocytaires recouvrant la lame basale.

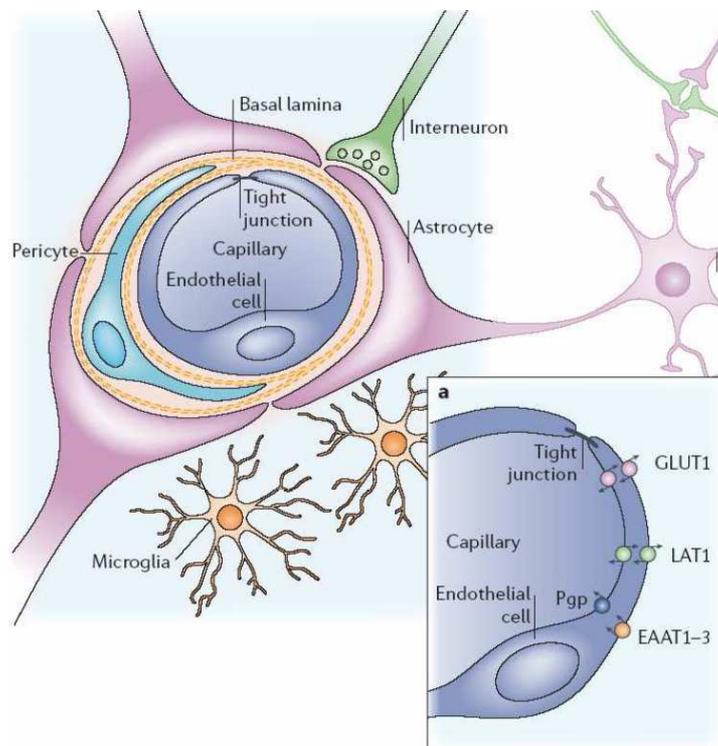


Figure 1.5 : Représentation de la Barrière Hémato-encéphalique

Les 3 grands constituants de la BHE sont visibles sur ce schéma : jonctions serrées entre les cellules endothéliales, astrocytes et lame basale. On note également la présence de pericytes à proximité de certains capillaires (cependant, les pericytes ne participent pas à la BHE). La partie encadrée du schéma donne quelques exemples de transporteurs (GLUT1, LAT1, ...). D'après ¹⁰.

Le transport de molécules au travers de la BHE est fortement limité et peut se faire par l'intermédiaire de différents systèmes¹⁰ :

- diffusion simple : c'est le cas de l'oxygène, du dioxyde de carbone, de certaines drogues dont l'alcool mais aussi des anesthésiques volatils.
- transporteurs : c'est le cas du glucose via le transporteur GLUT1 et des acides aminés.
- transcytose : elle peut se faire de deux manières :
 - o par l'intermédiaire d'un récepteur. La molécule se fixera alors à son récepteur, sera endocytée, traversera la cellule endothéliale pour être relarguée sur la face abluminale. Ce mécanisme hautement spécifique est utilisé pour transporter des protéines de haut poids moléculaire comme la vasopressine.
 - o par l'intermédiaires de protéines polycationiques. Ce système est utilisé pour faire rentrer des protéines chargées. Il est moins spécifique que le précédent.

Les échanges sang / parenchyme cérébral sont donc parfaitement régulés et toute modification de la perméabilité de la BHE peut avoir de lourdes conséquences pour le fonctionnement du système nerveux.

1.2 Imagerie Médicale du Système Nerveux

L'imagerie du système nerveux central a beaucoup évolué depuis que Wilhelm Röntgen a découvert les rayons X en 1895³. Les premières observations radiographiques ne permettaient que d'observer le crâne. La nécessité d'améliorer le contraste pour faire ressortir des structures d'intérêt s'est peu à peu développée. On assiste à la première utilisation d'un agent de contraste dans les années 1920 en injectant de l'air dans les ventricules avant de réaliser un cliché radiographique. Cette technique d'imagerie, baptisée ventriculographie, fut abandonnée dans les années 1960 à cause des effets secondaires et des risques lors de l'examen.

De nombreuses méthodes furent ensuite développées au cours du siècle dernier. Dans ce chapitre nous nous intéresserons essentiellement à deux méthodes basées sur l'absorption des rayons X (Angiographie cérébrale par rayons X et Scanner X) ; à une méthode basée sur l'utilisation de substances radioactives (la Tomographie par Emission de Positrons) et à la méthode de référence en matière d'imagerie anatomique (l'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire)¹³.

³ Pour plus de renseignements sur les rayons X, voir chapitre 3 et figure 4.3.

1.2.1 Angiographie cérébrale par rayons X

L'angiographie cérébrale par rayons X consiste en l'injection d'un agent de contraste radio-opaque, généralement dans l'artère carotide⁴, puis en l'acquisition rapide de plusieurs clichés radiographiques à des temps très courts après l'injection¹⁴. Il est alors possible d'obtenir des images de l'arrivée de l'agent de contraste dans les différents vaisseaux du cerveau et de repérer ainsi d'éventuelles sténoses ou anévrismes. D'un point de vue pratique, le patient est placé sous anesthésie locale et le cathéter d'injection est introduit dans l'artère fémorale au niveau de l'aîne puis remonté jusqu'à la carotide. Le produit de contraste (souvent iodé) est ensuite injecté. La phase d'imagerie commence juste avant l'injection.

Sur les clichés obtenus (généralement la rapidité d'acquisition permet d'obtenir une vidéo montrant la progression de l'agent de contraste), on distinguera tout d'abord un temps artériel puis un temps veineux. Entre les deux, l'agent de contraste transite par les capillaires en donnant une image dont le signal est très diffus.

Cette technique invasive n'est actuellement utilisée qu'en cas de nécessité absolue et présente certains risques.

1.2.2 Scanner X (Tomodensitométrie)

Le Scanner X également nommé CT-Scan (pour Computed Tomography) ou TDM (pour Tomodensitométrie) est une méthode d'imagerie basée sur l'absorption des rayons X par les tissus. Le premier prototype remonte à 1971⁵. Il s'agit d'une méthode permettant de calculer une reconstitution tridimensionnelle des tissus à partir d'une analyse tomographique obtenue en soumettant le patient au balayage d'un faisceau de rayons X¹⁵.

En pratique, le patient est allongé sur une table et un faisceau de rayons X va tourner autour de lui. Des récepteurs placés à l'opposé de la source récupèrent le rayonnement n'ayant pas été absorbé par les tissus. Les données sont ensuite traitées par ordinateur afin de reconstruire une image (une coupe). Il est ensuite possible en traitant plusieurs coupes d'obtenir des images tridimensionnelles observables sous tous les angles.

⁴ Il est également possible d'injecter le produit dans une autre artère. Une injection dans l'une artère des deux artères vertébrales permettra de mieux observer l'artère basilaire et certaines parties du polygone de Willis.

⁵ Godfrey Hounsfield et Allan MacLeod Cormack furent récompensés par le prix Nobel de Médecine en 1979 pour cette invention.

Afin d'améliorer le signal et la détection de structures d'intérêt, des agents de contraste (en majorité iodés) sont souvent utilisés. Ils peuvent par exemple mettre en évidence une rupture de la barrière hémato-encéphalique ou permettre de classifier une tumeur (voir 1.3.4).

Cette technique présente un grand intérêt en première intention pour le diagnostic d'une tumeur intracrânienne. Cependant l'Imagerie par Résonance Magnétique sera souvent préférée à cause de la meilleure qualité des images obtenues pour les tissus mous. De même à cause de la nocivité des rayons X, l'examen ne peut pas être trop souvent répété.

1.2.3 Tomographie par émission de positons

La tomographie par émission de positons (PET⁶) est une méthode d'imagerie nucléaire qui permet d'obtenir des images de phénomènes physiologiques et métaboliques¹⁶. En pratique, un traceur radioactif est synthétisé à partir d'un cyclotron. Ce traceur est physiologiquement indiscernable de la molécule étudiée mais possède un atome radioactif émetteur de positons. Le ¹⁸F-FDG (Fluorodeoxyglucose) est une molécule semblable au glucose sur lequel a été greffé un atome de fluor rendu radioactif et dont la demi-vie est de 120 min. Une fois injecté en intraveineuse, le traceur va s'accumuler en grandes quantités dans les cellules ayant un fort métabolisme énergétique. Après être entré dans la cellule, le ¹⁸F-FDG est phosphorylé par une hexokinase et ne peut plus sortir. Il ne peut également pas être métabolisé à cause de la molécule d'oxygène qui a été retirée pour y greffer l'atome de fluor radioactif à la place. Le traceur s'accumule donc en intracellulaire.

Les positrons émis vont s'annihiler au contact d'un électron proche du site d'émission (on considère le libre parcours moyen d'un positon à peu près égal à 1mm). L'annihilation va produire deux photons γ de 511keV qui vont être émis dans des directions opposées. Le patient est placé à l'intérieur d'un anneau équipé de capteurs qui vont enregistrer les photons d'annihilation en coïncidence, c'est-à-dire ceux qui arrivent en même temps. Un traitement informatique va ensuite permettre de reconstituer des images bi- et tridimensionnelles.

Cette méthode d'imagerie apporte donc des informations sur la physiologie et la pathophysiologie des organes. Elle permet entre autres de mieux caractériser le métabolisme des tumeurs et d'apporter des informations sur leur malignité. Les cellules tumorales sont très actives métaboliquement et elles accumulent de façon importante le ¹⁸F-FDG. De même, il est

⁶ PET : Positron Emission Tomography en anglais.

possible d'observer à l'intérieur d'une même tumeur des zones présentant un métabolisme différent.

Enfin, de nombreux traceurs radioactifs sont développés et peuvent permettre de réaliser des études fonctionnelles afin de mieux déterminer les zones du cerveau actives lors de la réalisation de certaines tâches. Il est également possible de détecter les zones d'hypoxie dans une tumeur en utilisant un traceur adapté¹⁷.

Le principal inconvénient à cette technique est sa faible résolution spatiale (supérieure à un millimètre) et son coût (les traceurs radioactifs ayant une demi-vie très courte, la présence d'un cyclotron à proximité du centre de médecine nucléaire est indispensable).

1.2.4 Imagerie par Résonance Magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique qui fut développée dans le courant des années 1970⁷ et dont les premières applications cliniques en routine remontent aux années 1980¹⁸. Elle est basée sur le principe de résonance magnétique nucléaire.

En pratique, le patient est allongé sur une table et une antenne radiofréquence (RF) va être disposée autour de la partie du corps que l'on souhaite imager (pour observer le cerveau, on utilisera une antenne volumique de tête). Le patient est ensuite placé dans un aimant possédant un fort champ magnétique B_0 (les appareils utilisés en clinique ont des champs compris entre 0.5 et 3 Tesla). Au point de vue nucléaire, les spins des noyaux d'hydrogène vont s'orienter selon le champ B_0 , on appelle ce phénomène la polarisation. Une onde radiofréquence va ensuite être émise par l'antenne et va entraîner le basculement de l'aimantation ; c'est l'excitation. Enfin, l'aimantation évoluera vers sa valeur d'équilibre thermique, orientée selon B_0 , c'est la relaxation longitudinale. L'onde de radiofréquence associée à la précession de l'aimantation pourra être recueillie par l'antenne. Pour localiser le signal dans l'espace, on superpose au champ magnétique principal un gradient de champ constant.

Le signal est ensuite traité par informatique et les images sont reconstruites. Il est possible d'obtenir des coupes orientées dans les 3 directions de l'espace ainsi que des reconstitutions tridimensionnelles.

En faisant varier les paramètres d'acquisition, notamment le temps de répétition (temps entre deux excitations RF) et le temps d'écho (temps entre l'excitation et l'acquisition de l'« echo

⁷ Peter Mansfield et Paul Lauterbur obtinrent le prix Nobel de Médecine en 2003 pour leurs découvertes concernant l'imagerie par résonance magnétique.

de spin ») il est possible de modifier la pondération de l'image et obtenir des informations différentes sur un même tissu. On définit alors par exemple les pondérations de type T1 ou T2. Dans le cadre d'une imagerie du cerveau, des images pondérées T1 donneront un grand nombre d'informations anatomiques en permettant entre autres d'avoir un très bon contraste entre la substance blanche et la substance grise. Des images pondérées T2 feront ressortir l'eau et donc les oedèmes en hypersignal.

Les agents de contraste sont également souvent utilisés lors d'examens IRM, ils sont souvent à base de Gadolinium. Dans le cas d'une tumeur intracrânienne, une prise de contraste et l'analyse de la vitesse de captation permettront de mieux localiser et caractériser la tumeur (voir 1.3.4).

L'IRM peut aussi être appliquée pour des études fonctionnelles en se basant sur la mesure de l'effet BOLD (Blood Oxygen Level Dependent). Il est possible d'observer les zones du cerveau activées lors de la réalisation d'une tâche¹⁹.

L'IRM est donc une méthode de référence en neuroimagerie de par sa bonne résolution spatiale (de l'ordre du mm³), la qualité des contrastes obtenus et de par l'innocuité de l'examen (contrairement au scanner X qui utilise des radiations ionisantes). Elle peut être répétée de façon régulière afin de réaliser le suivi d'une pathologie et les effets des traitements.

1.3 Tumeurs Intracrâniennes

1.3.1 Epidémiologie

Les tumeurs intracrâniennes représentent une pathologie fréquente en neurologie dont l'incidence suit celle des accidents vasculaires cérébraux et des démences. Le terme « tumeurs intracrâniennes » englobe à la fois les tumeurs cérébrales mais également certaines tumeurs qui n'ont pas pour origine le tissu cérébral (méningiomes et lymphomes par exemple). Elles représentent 2% des cancers chez l'adulte²⁰⁻²⁴.

L'American Cancer Society a estimé en 2006 à 18820 le nombre de personnes porteuses d'une tumeur intracrânienne aux Etats-Unis. La même année, on estime à 12820 le nombre de personnes ayant succombées à cette pathologie.

On distingue deux types de tumeurs intracrâniennes : les tumeurs primitives et les métastases de cancer systémiques.

L'incidence des tumeurs primitives chez l'adulte varie de 10 à 12 nouveaux cas par an pour 100000 habitants. Des statistiques de la Mayo Clinic portant sur la période de 1950 à 1989 indiquent une incidence de 19,1/100000. Cette différence s'explique par une incidence de 11,8/100000 pour les tumeurs symptomatiques et 7,3/100000 pour les tumeurs asymptomatiques. Ces chiffres sont proches de ceux proposés par le Central Brain Tumor Registry of the United States qui donne une valeur de 11,47/100000.

A ce jour 3 facteurs de risques ont été établis avec certitude :

- l'exposition aux rayonnements ionisants. L'irradiation du crâne même à faibles doses peut augmenter l'incidence de l'apparition d'un méningiome d'un facteur 10. Cependant, la période de latence entre l'exposition et l'apparition des symptômes peut dépasser 20 ans.⁸
- les prédispositions génétiques, liées à certaines anomalies identifiées comme la neurofibromatose.
- la carcinogénèse chimique, notamment pour les personnes en contact régulier avec des substances potentiellement cancérigènes.

1.3.2 Séméiologie médicale

Les tumeurs intracrâniennes peuvent causer des symptômes neurologiques focaux ou généralisés²⁵. Parmi eux, on recense généralement :

- un syndrome d'hypertension intracrânienne, lié à l'expansion du néoplasme dans la boîte crânienne bloquant ainsi l'écoulement du liquide cérébro-spinal⁹. Les symptômes les plus visibles seront des céphalées matinales, essentiellement du côté où se trouve la tumeur. Dans la moitié des cas, des nausées seront également observées. La progression tumorale peut entraîner par la suite une évolution vers un engagement¹⁰.
- l'apparition de crises comitiales partielles ou généralisées (= crises d'épilepsie). La survenue d'une première crise chez un patient adulte doit conduire à un examen d'imagerie afin de vérifier la possible présence d'une tumeur. Les crises apparaissent dans 15 à 95% des patients présentant une tumeur intracrânienne en fonction de son

⁸ Aucune étude n'a encore pu mettre en évidence un lien entre téléphonie mobile et augmentation de l'incidence des tumeurs intracrâniennes.

⁹ Le blocage des voies d'écoulement du liquide cérébro-spinal peut être à l'origine d'une hydrocéphalie.

¹⁰ Un engagement est le refoulement de certaines parties du cerveau à travers un orifice (trou occipital par exemple).

type (de 65 à 95% des cas pour des gliomes de bas grade ; de l'ordre de 40% pour les méningiomes).

- l'apparition de manifestations déficitaires focales. Elles sont liées à la compression (méningiome) ou l'infiltration (gliome) de zones fonctionnelles par la tumeur. Un œdème vasogénique péri-tumoral lié à une rupture de la BHE est un facteur aggravant. L'apparition du déficit est plus ou moins rapidement progressif en fonction de la localisation de la tumeur ainsi que son grade.

Le diagnostic est le plus souvent posé après réalisation d'un scanner ou d'une IRM (voir 1.2) ; cependant la classification de la tumeur peut se révéler plus complexe et nécessiter la réalisation d'une biopsie en conditions stéréotaxiques²⁶.

1.3.3 Classification des tumeurs intracrâniennes

Les tumeurs intracrâniennes sont classifiées en fonction du type cellulaire à l'origine du néoplasme^{20; 21}. En plus des métastases de cancers systémiques, on distingue les gliomes (ayant pour origine un astrocyte ou un oligodendrocyte), les méningiomes (ayant pour origine une cellule de la couche méningée), les neurinomes (se développant à partir d'une cellule de Schwann), les épendymomes (ayant pour origine une cellule épendymaire), certaines formes d'adénomes (notamment au niveau de l'hypophyse) et de lymphomes (Figure 1.6).

On peut également classer les tumeurs intracrâniennes en fonction de leur localisation, on distinguera alors :

- les tumeurs intracérébrales (gliomes et métastases de cancers systémiques)
- les tumeurs des structures limitantes (méningiomes, neurinomes, adénomes de l'hypophyse)
- les tumeurs intraventriculaires (épendymomes).

Outre le type cellulaire à l'origine de la tumeur, le classement des tumeurs prend également en compte la malignité. On distingue alors les tumeurs de bas grade (dites bénignes) des tumeurs de haut grade (malignes).

La gradation des tumeurs intracrâniennes se fait sur la base d'une classification établie par l'Organisation Mondiale pour la Santé¹¹ (OMS)²⁷.

¹¹ Il existe d'autres classifications comme celle de l'hôpital St Anne à Paris qui se base sur des critères différents (corrélations entre imagerie et anatomopathologie notamment).

Tumeurs Intracrâniennes

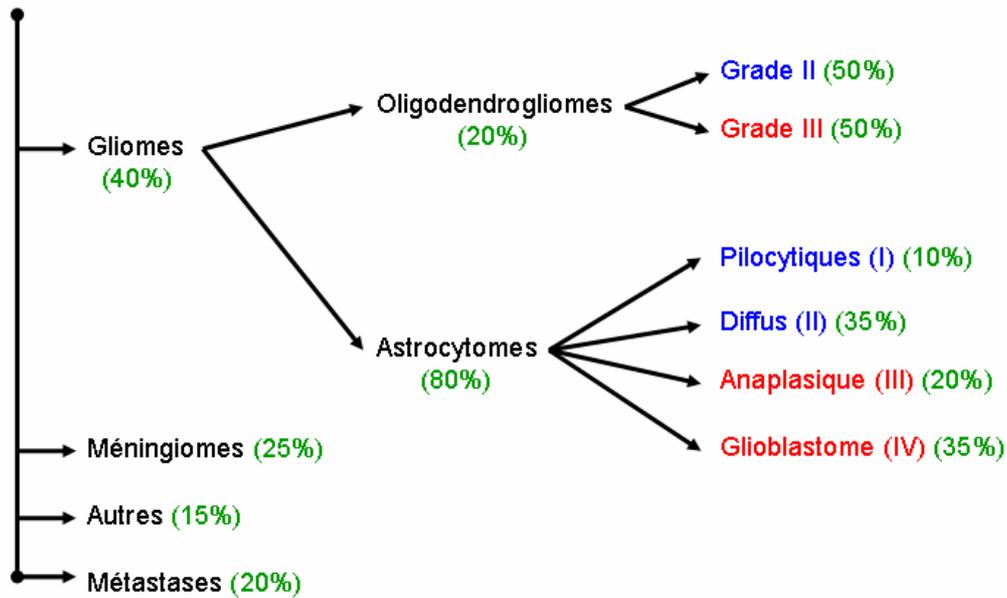


Figure 1.6 : Distribution des principales tumeurs intracrâniennes

(Autres : ependymomes, adénomes hypophysaires, lymphomes du système nerveux central, neurinomes, craniopharyngomes, ...); (bleu : tumeurs bénignes, rouge : tumeurs malignes – la malignité n’est indiquée que pour les gliomes).

1.3.4 Description des principaux types de tumeurs intracrâniennes

1.3.4.1 Gliomes

Les gliomes représentent 40% des tumeurs intracrâniennes et peuvent être subdivisés en deux grands groupes : les astrocytomes, ayant pour origine un astrocyte et les oligodendrogliomes, ayant pour origine un oligodendrocyte^{26; 28}. Ils sont également classés en fonction de leur malignité, on distingue donc :

- les gliomes de bas grade :
 - o astrocytomes pilocytiques (grade I)
 - o astrocytomes diffus (grade II)
 - o oligodendrogliomes
- les gliomes de haut grade
 - o astrocytomes anaplasiques (grade III)
 - o glioblastomes multiformes (grade IV)
 - o oligodendrogliomes anaplasiques

La proportion relative de ces différentes catégories est indiquée dans la figure 1.6.

1.3.4.1.1 Astrocytomes de bas grade

Les astrocytomes de bas grade surviennent en général chez le jeune adulte entre 35 et 45 ans. Le premier signe clinique est souvent la survenue d'une crise comitiale accompagnée ou suivie par d'autres symptômes neurologiques²⁵.

A l'examen IRM (Figure 1.7), la tumeur apparaît comme une masse diffuse ne prenant pas le contraste. Bien que les astrocytomes soient infiltrants, les bordures tumorales sont bien définies sur l'image obtenue et la lésion n'est pas entourée par un œdème. Les astrocytomes de bas grade évoluent dans la majorité des cas vers l'anaplasie.

La médiane de survie des patients présentant un astrocytome de bas grade est de l'ordre de 5 ans. Cependant, elle est extrêmement variable : certains patients peuvent ainsi survivre plus de 10 ans.

1.3.4.1.2 Astrocytomes de haut grade

Les astrocytomes de haut grade sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes de l'adulte. Leur incidence annuelle est de 3 à 4 nouveaux cas par an pour 100000 habitants. Ils surviennent en général entre 40 et 50 ans pour les astrocytomes anaplasiques et après 55 ans pour les glioblastomes^{20; 26; 21}.

La plupart sont sporadiques mais ils peuvent également survenir suite à une complication d'un syndrome génétique comme la neurofibromatose ou avoir pour origine un astrocytome de bas grade.

Le pronostic est très pessimiste puisque la médiane de survie ne dépasse pas 3 ans pour les astrocytomes anaplasiques avec 22% de survivants à 5 ans et 1 an pour les glioblastomes avec 2% de survivants à 5 ans.

Le diagnostic est généralement réalisé suite à un examen par IRM. Les astrocytomes malins prennent le contraste de façon hétérogène et présentent souvent une structure en anneau dont le foyer est d'allure nécrotique. La lésion est entourée par un œdème, souvent très important. La tumeur peut également traverser le corps calleux pour aller coloniser le second hémisphère cérébral.

Bien qu'il soit possible de délimiter la bordure de la tumeur lors de l'examen IRM (Figure 1.7), celle-ci est hautement infiltrante et à l'échelle microscopique des cellules tumorales peuvent se trouver à plusieurs centimètres de la lésion.

Malgré leur fort caractère infiltrant et leur malignité, les glioblastomes ne donnent pas lieu à une dissémination métastatique systémique.

1.3.4.1.3 Oligodendrogliomes

D'un point de vue radiologique, il est assez difficile de les différencier d'un astrocytome de bas grade bien qu'ils présentent des calcifications dans 90% des cas²⁵.

La médiane de survie est de l'ordre de 10 ans, donc plus élevée que pour des patients portant un astrocytome.

Les oligodendrogliomes de haut grade peuvent apparaître *de novo* ou peuvent résulter du passage à l'anaplasie d'oligodendrogliomes de bas grade. La médiane de survie est de 3 ans avec 30% de survivants à 5 ans.

1.3.4.2 Méningiomes

Les méningiomes représentent approximativement 20 à 25% des tumeurs intracrâniennes. On estime leur incidence réelle à 7,8 nouveaux cas par an pour 100000 habitants, cependant la majorité sont asymptomatiques et découverts accidentellement à l'autopsie²¹. L'incidence symptomatique est proche de 2/100000. Les méningiomes apparaissent plus fréquemment chez les femmes avec un ratio de 3:2. On retrouve également une augmentation de la fréquence des méningiomes chez les patientes souffrant d'un cancer du sein.

Leur croissance est lente et on note très peu d'œdème dans le parenchyme cérébral se trouvant sous le néoplasme. En règle générale, les symptômes observés sont causés par la compression de zones fonctionnelles dans le tissu cérébral sous-jacent à la lésion.

Le diagnostic est effectué par IRM (Figure 1.7). Sur les images le méningiome est adjacent à l'os. La prise de contraste est diffuse.

Histologiquement, 95% des méningiomes sont bénins, seulement 5% sont atypiques et 2% présentent une malignité.

1.3.4.3 Métastases cérébrales de cancers systémiques

Les métastases cérébrales compliquent environ 25% des cancers systémiques mais un tiers reste asymptomatique.

Elles ont pour origine un cancer bronchopulmonaire dans 33% des cas, un cancer du sein dans 25% des cas et un cancer digestif, du rein ou un mélanome dans respectivement 7% des cas²⁵.

Le diagnostic peut être effectué soit à l'aide d'un scanner X qui révèle les lésions après injection d'un agent de contraste soit par IRM qui est plus sensible. On estime de 10 à 20%

les patients sur lesquels n'a été détecté qu'une seule métastase après examen au scanner X mais qui en réalité en présentent plusieurs après examen approfondi par IRM. Cette dernière méthode d'imagerie présente donc une plus grande sensibilité pour la détection des métastases.

On note également la présence d'un œdème autour de la lésion.

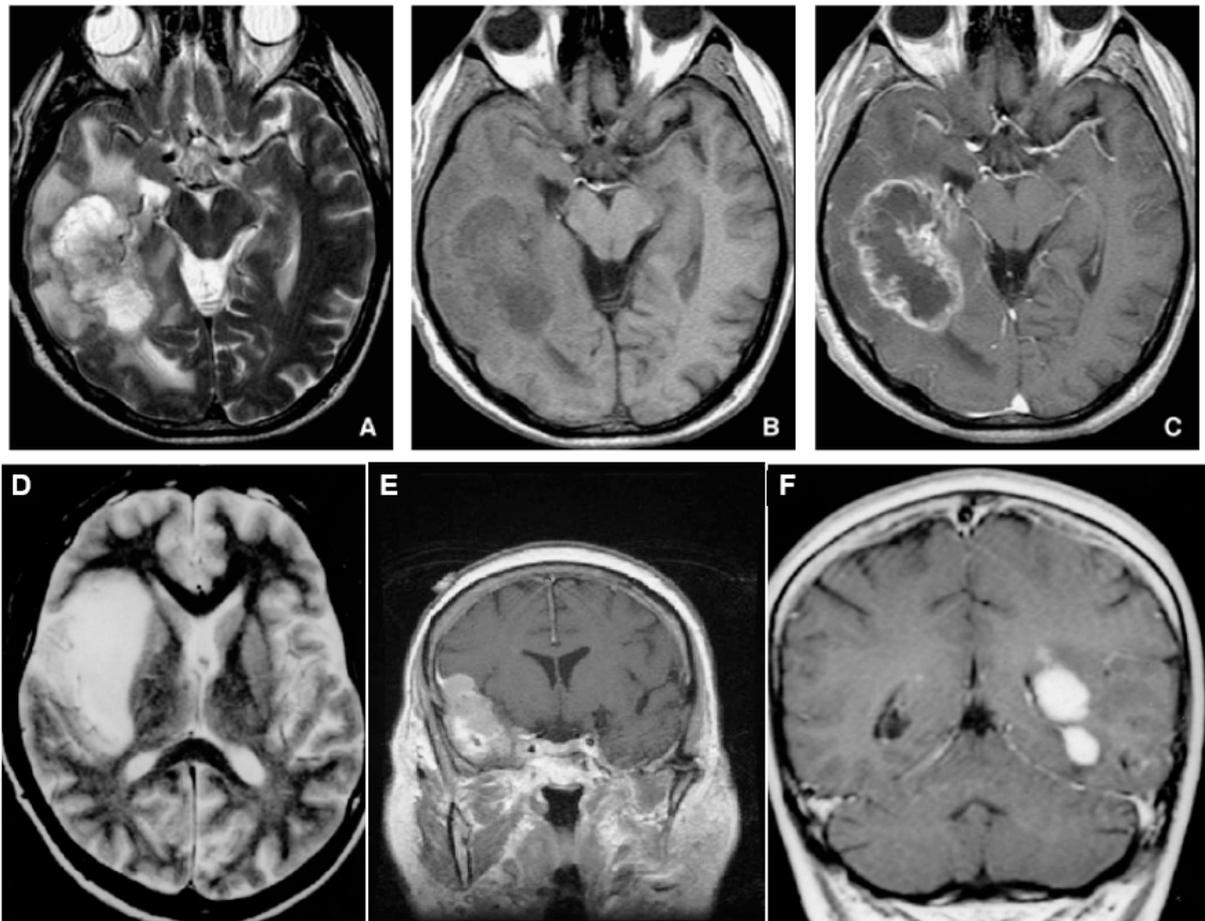


Figure 1.7 : Imagerie par Résonance Magnétique de différentes tumeurs intracrâniennes

A,B,C : Glioblastome observé en pondération T2 pour visualiser l'œdème peritumoral (A) ; en pondération T1 avant (B) et suite (C) à l'injection d'un agent de contraste contenant du Gadolinium. D'après ²⁶.

D : Astrocytome de bas grade en pondération T2 (d'après ²⁰).

E : Méningiome en pondération T1 après injection de Gadolinium (d'après ²¹).

F : Lymphome en pondération T1 après injection de Gadolinium(d'après ²⁰).

1.3.4.4 Autres tumeurs

Parmi les tumeurs intracrâniennes se trouvent également les lymphomes cérébraux primitifs qui ne représentent que 1% des tumeurs cérébrales primaires²¹. Une immunosuppression

congénitale ou acquise¹² augmente le risque d'apparition de ce type de tumeur. A l'IRM, les lésions sont souvent periventriculaires et présentent une prise de contraste homogène et diffuse (Figure 1.7).

Les neurinomes sont également observés. Dans la majorité des cas, ils apparaissent au niveau du nerf auditif et portent alors le nom de neurinome de l'acoustique.

Les adénocarcinomes apparaissent au niveau de l'hypophyse. D'autres lésions comme les craniopharyngiomes ou les épendymomes font également partie des tumeurs intracrâniennes mais ne seront pas détaillées ici.

1.3.5 Caractéristiques histologiques des astrocytomes

Au cours de cette étude, nous nous intéresserons particulièrement au traitement des gliomes et plus particulièrement des astrocytomes^{26; 28}. Comme nous avons pu le voir précédemment la gradation d'un gliome est réalisée à partir de l'examen d'imagerie médicale mais également par une étude anatomopathologique réalisée sur des biopsies. Les principales caractéristiques des quatre grades d'astrocytomes sont :

- Astrocytome pilocytique (I) : densité cellulaire faible avec absence de mitose, de nécrose et de prolifération vasculaire.
- Astrocytomes diffus (II) : densité cellulaire faible avec quelques atypies cellulaires et nucléaires ; pas plus de une mitose dans le champ ; pas de nécrose ni de prolifération vasculaire. Parfois, présence de foyers microkystiques.
- Astrocytomes anaplasiques (III) : densité cellulaire plus élevée ; atypies cellulaires évidentes avec mitoses plus nombreuses ; absence de nécrose et de prolifération vasculaire.
- Glioblastome (IV) : très forte densité cellulaire avec des cellules astrocytaires indifférenciées et pléiomorphes ; activité mitotique très élevée ; prolifération vasculaire importante et présence de plages de nécrose au centre de la tumeur.

1.3.6 Angiogenèse

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants^{29; 30}. Elle est contrôlée par des facteurs anti- et pro-angiogéniques. Il est important de

¹² Une infection par le Virus Immunosuppresseur Humain (VIH) augmente le risque d'apparition d'un lymphome cérébral primaire.

la différentier de la vasculogénèse où les vaisseaux sont formés *de novo* au cours du développement et qui a pour origine des précurseurs de cellules endothéliales (angioblastes). Une tumeur qui n'est pas vascularisée ne dépasse guère 1mm³ de volume. Elle demeure dormante et son volume ne varie pas car les cellules se multiplient approximativement au même rythme que celui de l'apoptose. Si le rythme de la division cellulaire augmente, où si le nombre de cellules entrant en apoptose diminue, les cellules se trouvant au centre de la tumeur ne vont plus recevoir assez d'oxygène. Elles deviennent alors hypoxiques. Ces cellules vont entre autres sécréter le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Induced Factor) qui lui-même va entraîner l'expression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Sous l'action du VEGF, les cellules endothéliales des vaisseaux avoisinant la tumeur vont produire des enzymes protéolytiques (matrix-metalloproteinases, collagénases) afin de dégrader la lame basale. Les cellules endothéliales vont ensuite proliférer pour former un nouveau vaisseau ; on appelle ce phénomène le « sprouting » (bourgeonnement en français). De nouveaux vaisseaux vont ainsi être formés pour irriguer la tumeur dont la capacité proliférative s'accroît (Figure 1.8)²⁹.

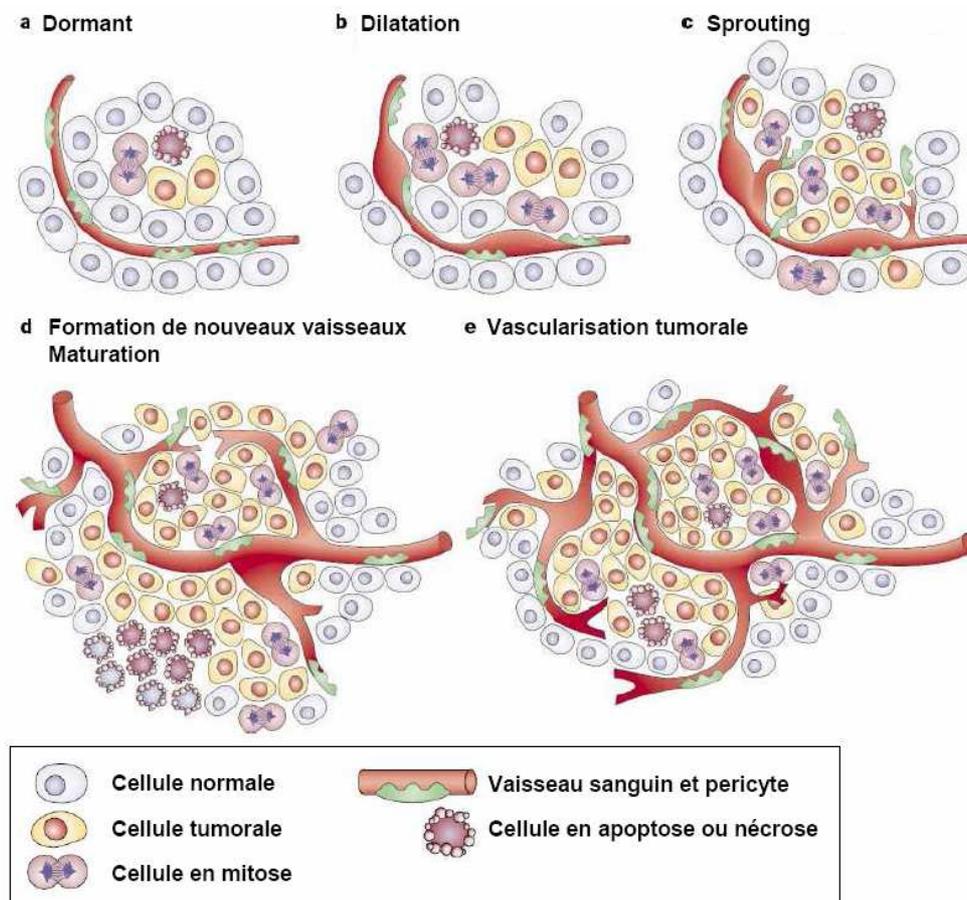


Figure 1.8 : Déroulement de l'angiogénèse (Modifié d'après ²⁹).

Dans le cas d'un glioblastome, l'angiogénèse est très active en bordure de la tumeur (on la note tout particulièrement dans l'anneau caractéristique observé en IRM suite à l'injection d'un agent de contraste). Le cœur du glioblastome n'est quasiment pas vascularisé et présente une forte nécrose (Figure 1.5 A,B,C).

De manière générale, l'observation d'une angiogénèse dans une tumeur est un signe de malignité et conduit à un pronostic pessimiste.

1.4 Modélisation Animale en Neurosciences

1.4.1 Considérations éthiques

Le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de la recherche biomédicale est indispensable dans l'étude de nouvelles thérapies applicable à l'homme ; on appelle d'ailleurs cette étape : essais précliniques.

L'ensemble des expérimentations animales réalisées au cours de ce travail de thèse a été mené dans le respect de la réglementation française (décret 87-848 du 19 octobre 1987).

Nous nous sommes efforcés de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. La nécessité ainsi que l'impact des actes pratiqués sur l'animal ont été évalués et discutés avant toute expérimentation. Des méthodes alternatives (travail sur cellules, caractérisation de colorants *in vitro*, ...) ont été mises en place chaque fois que possible.

1.4.2 Choix de l'espèce

Les rongeurs sont les animaux les plus utilisés en expérimentation animale. Il se reproduisent rapidement, atteignent vite l'âge adulte et l'on bénéficie d'un grand nombre de données à la fois sur leur physiologie et leur patrimoine génétique.

D'un point de vue neuroanatomique, ils bénéficient d'un système nerveux proche de celui de l'homme (voir Figure 1.1).

Les rats sont particulièrement utilisés, notamment pour les études comportementales, pour l'étude de la maladie de Parkinson (après lésion de la substance noire à la 6-OHDA³¹), pour l'étude des épilepsies (rats GAERS³² ou WAG/Rij) ainsi que pour l'étude des tumeurs intracrâniennes^{33; 34; 1}.

Les souris sont également très utilisées, notamment grâce à la possibilité d'obtenir des animaux transgéniques. La transgénèse permet en effet de modéliser certaines maladies mais également d'observer l'expression de certaines protéines en plaçant une protéine fluorescente, la Green Fluorescent Protein (GFP) par exemple, sous le contrôle du promoteur de la protéine à étudier (voir 4.4.3.2). De même, il est possible de créer différents modèles de tumeurs intracrâniennes chez ces animaux. Nous allons voir dans la partie suivante quelles sont les modalités de cette modélisation.

1.4.3 Modélisation des tumeurs intracrâniennes

1.4.3.1 Les 3 grands types de modèles

Il existe 3 façons de modéliser une tumeur chez l'animal de laboratoire :

- par l'injection de molécules alkylantes ayant la faculté de générer des mutations. L'injection d'ENU (Ethyl-Nitrosourée) chez des rates gestantes entraîne l'apparition de tumeurs modèles des oligodendrogliomes chez les rats de la portée³⁵. Ce modèle est assez long à mettre en place et la localisation ainsi que le nombre de tumeurs sont difficilement maîtrisables.
- par transgénèse. Il est possible de créer des souris transgéniques surexprimant certains oncogènes. De même, il est possible de créer des souris KO (Knock Out ; souris sur laquelle un gène a été inactivé) avec un gène suppresseur de tumeur inactivé (par exemple p53). Des KO conditionnels permettent également de réaliser cette inactivation uniquement dans certains tissus. Bien qu'apportant un grand nombre d'informations du point de vue génétique ces modèles sont longs à mettre en place, peu prédictifs et difficiles à suivre.
- par xénogreffe. La xénogreffe consiste à greffer des cellules ou des explants tumoraux dans un animal hôte. Nous allons discuter en détail de cette méthode utilisée au cours de notre étude dans la partie suivante.

1.4.3.2 Modélisation par xénogreffes

Pour faire développer une tumeur, il faut dans un premier temps greffer les cellules tumorales ou les explants dans un animal hôte et faire en sorte qu'il ne soient pas rejetés.

Les premières expériences menées il y a plus d'un demi siècle ont été réalisées sur des animaux possédant un statut immunitaire normal. Cependant, afin d'éviter les rejets, la réponse immunitaire à médiation cellulaire devait être supprimée. La diminution de la réponse des lymphocytes T était alors réalisée soit par l'utilisation de molécules comme la cyclosporine soit par une irradiation totale de l'animal. Ces méthodes lourdes créaient un grand nombre de biais et d'artefacts dans les expérimentations et ne permettaient pas d'avoir un modèle proche de la pathophysiologie humaine³⁶.

La meilleure alternative consiste à utiliser des animaux congénitalement athymiques ; on retrouve ce type d'animaux dans deux espèces : les souris et les rats. Les rats nude sont actuellement peu utilisés dans les laboratoires en raison de leur coût élevé et de la plus grande difficulté de développement observé pour certains greffons³⁶.

Les souris sont les plus utilisées, parmi elles se trouvent deux types de mutantes : les souris SCID (Severe Combined Immuno Deficient) qui présentent une anomalie fonctionnelle des lymphocytes et les souris athymiques congénitales mieux connues sous le nom de souris nude. L'ensemble de nos expérimentations a été réalisé avec ces dernières.

1.4.3.2.1 Les souris nude

En 1962, Grist du laboratoire de virologie de l'hôpital Ruchill de Glasgow découvre quelques souris sans poils dans une portée de souris non consanguines. Après les avoir croisées plusieurs fois entre-elles, une étude anatomique fut entreprise et il fut découvert qu'elles étaient dépourvues de thymus (on retrouve dans de rares cas un minuscule résidu thymique)³⁶.

Flanagan caractérisa au cours des années 1960, l'origine génétique responsable de l'absence de thymus. Il s'agit d'une mutation autosomique récessive d'un gène baptisé *nu*. Une souris *nu/+* aura un phénotype sauvage ; une souris homozygote *nu/nu* sera athymique.

L'absence de thymus implique la non différenciation des lymphocytes T en cellules immunocompétentes. Ces animaux auront donc un important déficit de l'immunité à médiation cellulaire. De même la réponse immunitaire humorale sera affectée par l'impossibilité d'activation des lymphocytes B par des antigènes T-dépendants. Il a cependant été noté que les cellules Natural Killer (NK) sont présentes sans altération de leur activité. On trouve également des macrophages.

Les souris nude demeurent sans poil à l'âge adulte et leur poids est inférieur d'un tiers à celui d'une souris normale (25g vs 45g). Leur peau ridée ainsi que l'absence de poil est un avantage supplémentaire lors de la réalisation d'interventions chirurgicales. Leur durée de vie moyenne est de l'ordre de 1 à 1 an et demi.

Ces souris sont de par leur statut immunitaire beaucoup plus sensibles que les autres aux infections. Leur stabulation est donc réalisée dans des meubles spéciaux isolés des souris d'autres lignées pouvant créer un risque accru de transmission de bactéries et virus.

1.4.3.2.2 Greffes orthotopiques

On appelle greffes orthotopiques, les cellules ou explants greffés dans leur environnement (patho)physiologique. Dans le cas de la modélisation d'un gliome, les cellules seront greffées dans le parenchyme cérébral. Le principal avantage de cette méthode est de permettre à la tumeur de se développer dans le microenvironnement qui est le plus proche de la pathophysiologie. Ce paramètre peut être très important notamment si l'on considère la matrice extracellulaire du milieu, sa richesse en facteurs de croissance ou encore sa vascularisation. Cependant, le suivi de la croissance tumorale peut s'avérer beaucoup plus difficile. Les conditions ainsi que les modalités pratiques de la mise en place de ce modèle sont présentées en 6.3.1.1.

1.4.3.2.3 Greffes hétérotopiques

On appelle greffes hétérotopiques les greffes qui ne sont pas réalisées dans l'environnement (patho)physiologique de la tumeur. La localisation peut varier mais pour avoir un maximum de chances que la greffe prenne, elle doit être réalisée dans une zone bien vascularisée. Parmi les différentes localisations ou méthodes possibles, il faut noter :

- l'injection de cellules tumorales en sous-cutané au niveau du membre inférieur. Cette méthode permet de réaliser facilement un suivi de la croissance tumorale par des mesures répétées à l'aide d'un pied à coulisse. L'efficacité d'un traitement peut alors être évalué (les modalités de la mise en place de cette méthode sont discutées en 5.3.3 et 7.2.1.1).
- La pose d'une fenêtre dorsale qui permet de réaliser un suivi longitudinal de l'angiogénèse. La mise en place de ce modèle est assez lourde d'un point de vue chirurgical, cependant, il est possible d'observer directement la tumeur positionnée sous la lamelle de quartz (les modalités de la mise en place de cette méthode sont discutées dans le chapitre 5.3.2).

D'autres sites sont également possibles, notamment au niveau du pédicule épigastrique à proximité péritoine. La greffe hétérotopique présente de gros avantages en neuro-oncologie, notamment dans le suivi de la croissance (possible uniquement à l'aide d'équipements lourds tel que l'IRM ou le scanner X en conditions orthotopiques et peu adapté quand l'étude

comporte un grand nombre d'animaux) ou dans le suivi de l'apparition d'évènements comme l'angiogénèse. Malgré tout cette modélisation présente le biais de ne pas proposer un microenvironnement proche de la réalité.

1.4.3.2.4 Choix du greffon

La nature du greffon utilisé et l'espèce dont il provient peuvent varier. Parmi les types de greffons, on recense :

- les cellules tumorales de lignées établies (F98, C6 par exemple pour les gliomes) ou issues de cultures primaires (elles peuvent provenir d'une pièce d'exérèse chirurgicale par exemple).
- les sphéroïdes qui sont un amas de cellules cultivées dans de l'agarose.
- les explants qui sont des petites pièces de tumeurs.

Le choix du greffon lors de la modélisation doit être fonction du site d'implantation. Il est assez difficile par exemple de greffer un explant en intracérébral. De même, l'origine du type cellulaire injecté doit être pris en considération. Travailler avec une lignée établie permettra de mieux comparer les études entre elles ; cependant, travailler avec des lignées issues de cultures primaires peut permettre de mieux se rapprocher de la pathologie observée chez l'humain.

Les expérimentations présentées dans notre étude ont été réalisées avec la lignée F98 qui est un modèle de glioblastome. La partie suivante va détailler quelques caractéristiques de cette lignée ainsi que de quelques autres fréquemment utilisées en neuro-oncologie.

1.4.4 Lignées cellulaires fréquemment utilisées

Les greffes hétérotopiques de cellules humaines sont très souvent pratiquées chez la souris nude. Ces cellules peuvent provenir de cultures primaires ou de lignées humaines établies comme U87.

Il existe également un certain nombre de lignées tumorales développées à l'origine chez le rat. Certaines de ces lignées sont syngéniques, c'est-à-dire que leur implantation chez des rats de la même souche n'entraîne qu'une faible réaction immunitaire. L'avantage de travailler sur des rats est principalement d'avoir un modèle plus facilement manipulable d'un point de vue chirurgical. Cependant, bien que réduites, les réactions immunitaires ne peuvent pas être totalement supprimées et certaines méthodes d'investigation pour suivre les effets des

différentes thérapies anti-cancéreuses sont beaucoup plus efficaces chez la souris. En microscopie biphotonique intravitale par exemple, la profondeur d'observation maximale sera beaucoup plus élevée chez la souris que chez le rat³⁷.

C'est pour cela que nous avons choisi de travailler sur le gliome F98 implanté chez la souris nude, afin d'une part utiliser une lignée cellulaire bien caractérisée notamment dans l'étude de radio-chimiothérapies synchrotron ; et d'autre part utiliser pleinement toutes les possibilités de la microscopie biphotonique intravitale pour observer les effets de la thérapie au plus profond des tissus. De part l'absence de lymphocytes T, les lignées développées chez le rat ne seront pas rejetées chez la souris nude.

1.4.4.1 Caractéristiques d'un bon modèle de gliome

Il est tout d'abord important de noter qu'aucun modèle animal ne mime actuellement à la perfection les caractéristiques d'un astrocytome anaplasique ou d'un glioblastome humain. Afin d'obtenir une modélisation au plus proche de la réalité (patho)physiologique, Rolf Barth³⁸ a proposé huit critères permettant de valider un bon modèle tumoral de gliome de haut grade :

- 1) Il doit être dérivée de cellules gliales.
- 2) Il doit être possible de le maintenir en culture et de l'implanter *in vivo*.
- 3) La croissance tumorale doit être prévisible et reproductible.
- 4) Il doit avoir les caractéristiques d'un gliome de haut grade comme l'apparition d'une angiogenèse, une altération de la BHE et un caractère invasif.
- 5) La survie de l'animal hôte doit être suffisante pour permettre une thérapie et la détermination de son efficacité.
- 6) Il doit être faiblement ou non immunogénique dans son hôte.
- 7) Il ne doit pas pousser dans l'espace épidual (espace se situant au niveau de la dure-mère).
- 8) Sa réponse (ou son absence de réponse) à la thérapie doit simuler celle qui serait observable chez l'humain.

En se basant sur ces critères, un certain nombre de lignées cellulaires modèles ont été développées chez le rat. Nous allons rapidement voir les caractéristiques de trois parmi les plus utilisées.

1.4.4.2 Gliosarcome 9L

Le gliosarcome 9L a été développé chez le rat Fischer suite à l'injection i.v. de MNU (N-methylnitrosourée) pendant 26 semaines³⁸. Il a l'apparence d'un sarcome et présente peu d'infiltration dans le parenchyme cérébral. Il est également fortement immunogénique et de nombreux biais ont été observés lors de l'étude de nouveaux traitements à cause de ce caractère. Il est cependant radio-résistant et chimio-résistant (la thérapie détruit également les cellules effectrices de la réponse immunitaire). Sa modélisation est donc plus proche de celle d'une lésion métastatique.

1.4.4.3 Gliome C6

Le gliome C6 a été développé chez le rat Wistar après huit mois d'injections répétées de MNU³⁸. Il produit la protéine S100 (retrouvée chez les astrocytes) et présente des caractéristiques histopathologiques proches de celles d'un astrocytome de haut grade. Cependant, ce modèle est fortement immunogénique et il est déconseillé de l'utiliser pour des études dont le endpoint (point limite) est la survie. Malgré cela, il reste un modèle très utilisé en neuro-oncologie.

1.4.4.4 Gliome F98

Le gliome F98 a été développé par l'injection unique d'une dose d'ENU (50mg/kg) chez une ratte Fisher au 20ème jour de gestation³⁸. Histologiquement ce modèle est proche d'un gliome de haut grade ; un cœur nécrotique, un fort caractère infiltrant (avec des colonies de cellules se trouvant à distance de la tumeur) ont été observées. Il est faiblement immunogénique et réfractaire à un grand nombre de thérapies. De même, une injection de seulement dix cellules en intracérébral suffit pour être létale.

Mathieu et al.³⁹ ont caractérisés en détail le gliome F98 chez le rat Fisher. Leurs observations cliniques ont montré qu'après implantation, la tumeur entraînait une léthargie progressive avec apparition d'une hémiplégie controlatéralement par rapport à la lésion. A l'examen anatomopathologique, un grand nombre de caractéristiques d'un glioblastome ont été observées : figures mitotiques, distorsion de l'architecture cérébrale, prolifération vasculaire (angiogénèse). Une analyse immunohistochimique a montré que la plupart des cellules F98 expriment la GFAP (elles ont donc bien un astrocyte pour origine). De même, un fort

marquage GFAP a été observé dans le parenchyme cérébral entourant la tumeur, indiquant une gliose réactive.

Une forte quantité d'albumine a également été retrouvée dans l'espace extracellulaire, à la périphérie de la tumeur, signifiant une augmentation de la perméabilité de la BHE. Enfin, une étude en tomographie par émission de positrons a montré une accumulation de ^{18}F -FDG dans les cellules tumorales.

1.4.4.5 Comparaison entre lignées

Les 3 lignées précédemment décrites font partie des plus utilisées. D'un point de vue morphologique et (patho)physiologique, le modèle F98 est le plus proche du glioblastome humain. Son faible caractère immunogénique en fait également un modèle de choix pour l'étude de différentes thérapies. Le gliome C6, bien que possédant les caractéristiques d'un gliome de haut grade, présente le handicap majeur d'être immunogénique. Cette particularité peut poser problème dans le cas d'une implantation chez le rat ; cependant, chez la souris nude, tout risque de rejet ou de réaction immunitaire est écarté. Bien qu'utilisé dans de nombreuses études, le gliosarcome 9L est à écarter dans le cadre d'une modélisation d'un glioblastome à cause de sa morphologie et de son immunogénicité.

Une étude de Bencokova et al.⁴⁰ a également permis de classer ces trois lignées comme radiorésistantes. On notera cependant que 9L est plus radio-résistant que C6, qui lui-même est plus radio-résistant que F98.

Pour cette étude, notre choix s'est porté sur la lignée F98 présentant le double avantage d'être un bon modèle de glioblastome et d'avoir déjà été utilisé pour d'autres études de radiochimiothérapie synchrotron^{41; 33; 1; 42}.

1.5 Conclusions

Au cours de ce chapitre, nous avons posé quelques bases neuroanatomiques pour comprendre certains termes qui seront utilisés dans ce manuscrit, puis nous avons évoqué les différents types de tumeurs intracrâniennes en s'attardant sur les gliomes de haut grade. Nous avons également vu les différentes méthodes pour modéliser au plus proche de la réalité un glioblastome chez le rongeur et plus particulièrement la réalisation de xénogreffes chez la souris nude. La mise en place de ce modèle sera détaillée dans les chapitres 5 (greffes

hétérotopiques), 6 (greffes orthotopiques) et 7 (greffes heterotopiques avec mesure de volume).

Il est également important de définir au mieux les modalités des traitements à tester ainsi que les méthodes permettant de caractériser les effets de ces traitements. Dans les deux chapitres suivants, nous verrons quelles sont les différentes thérapies actuellement utilisées contre les tumeurs intracrâniennes avant de s'attarder sur l'objet de notre étude : la PAT-Plat.

Chapitre 2

Thérapies Anti-Tumorales

Les tumeurs intracrâniennes sont une pathologie très lourde à traiter. En fonction du type de tumeur, de sa localisation et de l'état général du patient, il est possible de mettre en œuvre trois différentes thérapies que l'on peut combiner entre elles éventuellement. Ces thérapies peuvent être mises en place à titre palliatif, c'est-à-dire que le but n'est pas de guérir le patient mais de faire en sorte d'augmenter sa survie ainsi que sa qualité de vie ; ou à titre curatif, l'objectif est alors d'éradiquer la tumeur.

Dans ce chapitre, nous verrons tout d'abord quels sont les trois types de traitements envisageables : exérèse chirurgicale, chimiothérapie et radiothérapie. Dans un second temps, nous verrons qu'il est possible de combiner ces différentes modalités et nous analyserons brièvement quels sont les protocoles utilisés actuellement en clinique. Enfin, nous nous intéresserons aux nouvelles thérapies développées dans les laboratoires de recherche.

2.1 Exérèse Chirurgicale.

La neurochirurgie est au centre du processus diagnostique et thérapeutique lors de la prise en charge d'une tumeur intracrânienne^{26;25}. On lui attribue en général trois objectifs :

- obtenir des prélèvements qui permettront d'affiner le diagnostic posé à partir des examens d'imagerie médicale. Ces prélèvements peuvent être obtenus à partir d'une biopsie en conditions stéréotaxiques, par une biopsie dite « à ciel ouvert¹³ » ou à partir d'un acte d'exérèse.
- améliorer l'état clinique du patient en réduisant l'expression symptomatique de la lésion. La masse tumorale peut être à l'origine d'une augmentation de la pression intracrânienne, d'une compression de certaines zones fonctionnelles importantes, ou obstruer l'écoulement du liquide cérébro-spinal. La résection peut donc apporter une augmentation de la qualité de vie pour le patient.

¹³ Le prélèvement est fait après une craniotomie mettant la surface du cerveau à l'air libre.

- supprimer la masse tumorale et notamment les zones faiblement vascularisées qui pourraient être moins sensibles aux radiations et plus difficilement accessibles aux molécules chimiothérapeuthiques.

De nouvelles techniques de nano neurochirurgie sont également en cours de développement, notamment le dépôt in situ d'implants chargés d'agents chimiothérapeuthiques à relargage retardé ou de molécules chimères⁴³.

De même, la neuronavigation, l'échographie peropératoire, l'intervention sur sujet éveillé permettent de mieux évaluer les zones fonctionnelles dans les parties saines et donc d'accroître l'exérèse au maximum²⁶.

Cependant, la résection n'est pas toujours complète, ce phénomène peut être attribué à deux facteurs principaux :

- la proximité ou l'infiltration dans des zones fonctionnelles vitales.
- le geste chirurgical en lui-même. Bien que l'exérèse soit visuellement complète, certains foyers peuvent persister. Cela peut être dû, entre autres, aux mouvements des structures cérébrales après l'ouverture de la dure-mère et par conséquent au décalage avec les clichés radiologiques servant de guide au chirurgien et ayant été effectués avant l'intervention. L'IRM peropératoire est une méthode récemment mise en place qui permet la réalisation d'exérèses plus précises (sans toutefois atteindre une résolution spatiale à l'échelle cellulaire).

Après l'intervention, un examen d'IRM est généralement pratiqué dans les 48 heures afin de mieux pouvoir qualifier l'exérèse (complète ou partielle) mais également pour pouvoir déterminer les champs d'irradiation pour la radiothérapie.

L'efficacité de l'exérèse chirurgicale en tant que thérapie a été évaluée. Il a ainsi été mis en évidence une corrélation entre délai de la récurrence, survie et qualité de l'exérèse. Un gain de 8 à 14 semaines a été attribué à l'acte chirurgical^{44; 45}.

Enfin, la chirurgie peut également être envisagée en cours de traitement pour installer une dérivation ventriculaire en cas de blocage ou lors d'une récurrence pour effectuer une seconde exérèse.

La chirurgie est donc importante pour le diagnostic, l'amélioration de la qualité de vie, et l'augmentation de la survie. Elle peut être curative pour des tumeurs bénignes, mais dans le cadre du traitement d'un glioblastome, elle demeure uniquement palliative, la récurrence ayant dans la majeure partie des cas lieu sur les bords de la résection.

2.2 Chimiothérapie

La chimiothérapie est l'utilisation de certaines substances chimiques pour traiter une maladie. Dans le langage courant, le terme « chimiothérapie » est maintenant utilisé pour désigner des traitements à base de substances chimiques contre le cancer.

Contrairement à certains types de tumeurs systémiques qui répondent bien à la chimiothérapie, l'efficacité de ce traitement sur les tumeurs intracrâniennes est faible.

2.2.1 Particularités du système nerveux

La distribution de molécules chimiothérapeuthiques dans le système nerveux central dépend d'un grand nombre de facteurs⁴⁶. De manière générale, la BHE limite le passage d'un grand nombre d'entre elles dans le parenchyme cérébral. Les facteurs contribuant à ce faible passage sont :

- la liaison de la molécule avec les protéines du plasma sanguin. Des drogues comme la vincristine ou le paclitaxel se fixent à plus de 90% aux protéines du plasma sanguin. La proportion de molécules libres pouvant traverser la BHE est donc considérablement réduite⁴⁷.
- le poids moléculaire. La BHE bloque le passage des molécules avec un poids moléculaire supérieur à 180 Da. La plupart des drogues de chimiothérapie (vincristine, vinblastine, paclitaxel) ont un poids moléculaire supérieur à 400 Da⁴⁸.
- le transport actif d'efflux. La BHE présente un grand nombre de pompes permettant d'extraire certaines drogues hors du parenchyme cérébral. L'inhibition de ces voies de transport augmente le flux de ces drogues au travers de la BHE^{49; 50}.

L'intégrité de la BHE peut être compromise au niveau des tumeurs. Les neo-vaisseaux issus de l'angiogénèse tumorale sont souvent très perméables. Cependant, dans le cas des glioblastomes, qui sont hautement infiltrants, la vascularisation en périphérie est souvent celle des tissus cérébraux, donc avec une BHE intacte. La perméabilité des vaisseaux varie donc spatialement dans la tumeur. Les vaisseaux se trouvant dans le cœur de la tumeur seront très perméables alors que ceux se trouvant en zone peritumorale seront imperméables aux molécules chimiothérapeuthiques.

Même dans le cas où les vaisseaux sont perméabilisés par une rupture de la BHE, l'accumulation de drogues dans la tumeur est compromise à cause des gradients de pression

interstitielle. La pression du fluide interstitiel peut être supérieure à 50 mmHg dans les zones peritumorales en comparaison des 2 mmHg dans le parenchyme cérébral sain⁵¹. Cette forte pression réduit la diffusion des drogues au cœur du volume tumoral et augmente sa propagation dans les tissus cérébraux sains avoisinants.

2.2.2 Pharmacocinétique

La concentration des molécules chimiothérapeutiques dans les tumeurs intracrâniennes peut également varier en fonction de la voie d'administration.

Une injection intra-artérielle (carotide interne) de cisplatine augmente de deux fois la délivrance de la drogue dans les gliomes en comparaison d'une injection intraveineuse (iv)⁵².

Cependant, une voie intra-artérielle n'apporte pas toujours un meilleur apport de la drogue à la tumeur. C'est le cas par exemple pour la vincristine et la vinblastine dont la pénétration dans les tumeurs intracrâniennes est faible même après injection intra-artérielle à cause du transport d'efflux⁵³.

Les modalités d'injection en intraveineuse peuvent également influencer. Une injection iv d'un bolus de methotrexate est trois fois plus efficace en terme de délivrance de la drogue en comparaison d'une infusion iv lente⁵⁴.

Le type de tumeur peut aussi avoir des conséquences sur la pharmacocinétique. Il a par exemple été montré que les niveaux de calcium, la composition en acide gras des membranes ainsi que les antécédents thérapeutiques pouvaient influencer la concentration de cisplatine dans les tumeurs^{55;56}.

Le métabolisme systémique est également à prendre en compte car il peut diminuer la quantité de molécules disponible sur le site de la tumeur.

Enfin, les injections subarachnoïdiennes ou intraventriculaires dans le liquide cébrospinal sont également pratiquées et permettent de s'affranchir en partie de la BHE⁴⁶.

2.2.3 Méthodes améliorant la délivrance des drogues

Afin d'augmenter la délivrance des drogues au niveau de la tumeur, plusieurs méthodes ont déjà été mises en place ou sont en cours d'évaluation.

2.2.3.1 Convection-Enhanced Delivery

La Convection-Enhanced Delivery (CED) permet la distribution par convection de larges concentrations de drogues dans le parenchyme cérébral. Le volume de distribution de la molécule est fonction du volume et du débit d'infusion, du poids moléculaire de la drogue, de sa concentration, de sa polarité, de son affinité pour sa cible, de la viscosité et de la densité du tissu. Le facteur limitant demeure la neurotoxicité de la molécule⁵⁷.

Un grand nombre d'études concernant la CED ont été réalisées dans le cerveau d'animaux sains^{58: 59}. L'injection en intratumoral a révélé une hétérogénéité de distribution, due vraisemblablement aux variations de pression interstitielle⁵¹. Dans ce cas, les molécules chimiothérapeutiques sont rapidement évacuées de la tumeur. Une méthode envisagée afin d'augmenter les concentrations dans la tumeur est d'augmenter l'affinité des molécules pour leur cible (Tumor cell targeting).

La CED a également été testée lors d'essais cliniques mettant en avant certaines difficultés techniques (placement des cathéters, propriétés physiques de la canule d'injection, ...)⁵⁸. L'origine de l'inefficacité des traitements par CED chez l'humain n'est pas encore élucidée.

2.2.3.2 Perméabilisation de la BHE par les ultrasons

Cette méthode permet de perméabiliser localement la BHE en utilisant des ultrasons. Le stress mécanique sur la paroi des vaisseaux sanguins est réalisé suite à une injection iv de petites bulles de gaz juste avant l'application des ultrasons. Des études histologiques ont montré que cette ouverture de la BHE était temporaire et n'entraînait pas de dommages neuronaux, pas d'apoptose, d'ischémie ou de dégâts vasculaires à long terme⁶⁰.

2.2.3.3 Perméabilisation de la BHE par des agents osmotiques

La perméabilisation de la BHE peut être réalisée par injection intra-artérielle d'agents hyperosmotiques comme le mannitol. La BHE est rendue perméable de façon réversible suite au rétrécissement des cellules endothéliales et à l'ouverture des jonctions serrées. Des études pharmacocinétiques chez l'animal ont montrées que la perméabilité de la BHE pour le methotrexate était maximale quinze minutes après l'infusion de mannitol avec un retour à la normale en deux heures⁶¹.

Le principal problème de cette méthode réside dans sa neurotoxicité. Suite à l'injection de l'agent osmotique, la BHE n'est pas perméabilisée qu'au niveau de la tumeur et de sa périphérie. La BHE des parties saines est également touchée et de hautes concentrations d'agents chimiothérapeutiques sont alors délivrées dans ces zones.

Le cisplatine, la doxorubicine et les taxanes présentent une neurotoxicité après perméabilisation de la BHE par agents osmotiques même si par ailleurs, ils sont bien tolérés en systémique⁶². Des molécules comme le methotrexate et le carboplatine sont beaucoup mieux tolérées.

La technique de perméabilisation seule est cependant sûre et la formation d'oedème cérébral suite à l'injection de mannitol est rare. Cette méthode a montré cliniquement un apport significatif en terme d'efficacité⁴⁶.

2.2.4 Perspectives

La chimiothérapie appliquée au traitement des tumeurs cérébrales se heurte aux particularités du système nerveux central. Deux méta-analyses ont mis en avant un bénéfice significatif de la chimiothérapie en terme d'augmentation de la médiane de survie chez les patients porteurs d'un astrocytome anaplasique. Cependant ce bénéfice est faible^{26; 46}.

Actuellement, la chimiothérapie n'est jamais envisagée seule dans le traitement des tumeurs intracrâniennes et fait toujours partie d'un protocole incluant soit l'exérèse chirurgicale, soit la radiothérapie, soit les deux. Son utilisation n'est souvent mise en place qu'au moment de la récurrence.

L'utilisation de nouvelles drogues passe par la mise en place d'études poussées en matière de pharmacocinétique, données qui ne sont actuellement pas complètes pour certaines molécules déjà utilisées. Le second point clé est la méthode de délivrance de la drogue dans la tumeur mais également dans les zones où les cellules tumorales infiltrent le parenchyme cérébral sain. L'administration par des voies classiques telles que les injections intraveineuse n'est pas assez efficace et des méthodes telles que la CED et la perméabilisation de la BHE doivent être affinées.

2.3 Radiothérapie

2.3.1 Généralités

La radiothérapie consiste à utiliser les propriétés des rayonnements ionisants pour le traitement des affections tumorales⁶³.

A l'heure actuelle, on en distingue trois types :

- la radiothérapie externe. La source du rayonnement est située à l'extérieur de l'organisme du patient.
- la curiethérapie (également appelée brachytherapie) qui consiste à placer la source de rayonnement à l'intérieur de l'organisme du patient.
- la radiothérapie métabolique. Très peu utilisée de nos jours, elle consiste en l'injection de radioéléments qui vont aller se fixer préférentiellement au niveau des cellules tumorales. La molécule la plus utilisée est l'iode 131 dans le traitement des tumeurs de la thyroïde.

2.3.2 Bref historique de la radiothérapie externe

C'est en 1895 que Wilhelm Conrad Röntgen¹⁴ découvrit les rayons X et réalisa quelques semaines plus tard le premier cliché radiologique de la main de sa femme. Moins de 60 jours après cette découverte, la radiothérapie clinique naquit par le biais d'Emil Grubbé qui traita une tumeur du sein avec des rayons X à Chicago⁶³.

Les quarante premières années du XX^{ème} siècle furent essentiellement consacrées à améliorer les générateurs de rayons X. Le rayonnement produit était alors de faible énergie (de 10 à 50 keV) et seules les lésions tumorales non profondes pouvaient être traitées. Pour les tumeurs plus profondes, les tissus sains se trouvant entre la source de rayonnement et la tumeur absorbaient une grande partie du rayonnement. De même pour les lésions se trouvant à proximité des os, la dose se trouvait atténuée et la distribution hétérogène.

L'arrivée de radionucléides artificiels tel que le Cobalt 60 dans les années 1950 permit le développement de nouveaux appareils de radiothérapie baptisés Télécobalts (ou bombe à Cobalt) permettant de délivrer un rayonnement de haute énergie. Les tumeurs situées plus en profondeur pouvaient alors être traitées plus efficacement et la durée du traitement fut

¹⁴ Il obtint le prix Nobel de physique en 1901.

également réduite à quelques minutes. Les Télécobalt furent progressivement abandonnés à cause notamment de la nécessité de remplacer régulièrement les sources d'irradiation. Cependant, ils sont encore en activité de nos jours dans certains centres.

C'est également au cours des années 1950 que les premiers accélérateurs linéaires (LINAC) furent développés. Ils sont aujourd'hui installés dans la majorité des centres et permettent de délivrer un rayonnement de haute énergie. De même, des collimateurs furent développés afin de réduire les fuites et de proposer un faisceau avec un profil bien défini.

A la fin des années 1970, les nouvelles méthodes d'imagerie mises en place (Scanner X puis IRM) permirent d'obtenir des images détaillées autorisant une meilleure définition de la zone tumorale à irradier. La radiothérapie tomographique vit également le jour. Cette méthode permet de réduire la dose délivrée aux tissus sains entourant la tumeur en faisant tourner la source du rayonnement. L'axe de rotation est défini comme étant le centre du volume tumoral.

L'Intensity-Modulated Radiotherapy (IMRT) fut également développée. Cette méthode permet de délivrer une irradiation dont la géométrie adopte celle de la tumeur. Elle est rendue possible grâce à une imagerie précise ainsi que par le développement de collimateurs multicouches permettant de modifier la forme du faisceau pendant la phase d'irradiation du patient⁶⁴.

2.3.3 Notion de dose et de fractionnement

Lorsqu'un protocole de radiothérapie en clinique est discuté, plusieurs paramètres sont pris en compte. Il faut dans un premier temps définir la dose qui sera utilisée. La dose, exprimée en Gray¹⁵, varie en fonction de la radiosensibilité des tissus sains avoisinant la tumeur ainsi que de la tumeur elle-même. La dose maximale recommandée pour le tronc cérébral est de 54Gy, pour la moelle épinière elle est de 45Gy. La dose recommandée pour le traitement d'un glioblastome est comprise entre 60 et 70Gy.

Le fractionnement de la dose est également un paramètre à discuter afin d'épargner au maximum les tissus sains et générer un maximum de dommages au niveau des cellules tumorales.

La première mise en évidence de l'intérêt du fractionnement fut apportée en 1927 par Claude Regaud qui observa qu'il était impossible de stériliser un bélier par irradiation en dose unique

¹⁵ En hommage à Louis Harold Gray (1905 – 1965).

des testicules sans causer une nécrose de la peau au niveau du scrotum. Il remarqua également qu'en fractionnant l'irradiation en donnant de petites doses, chaque jour, pendant plusieurs semaines, la stérilisation était possible sans aucun dommage tissulaire au niveau de la peau⁶³.

L'utilisation du fractionnement se répandit rapidement mais ce n'est que dans les années 1960 que Ellis émit l'hypothèse que la dose maximale qu'un tissu peut tolérer sans perte de fonction est lié à la fois au nombre de fractions et à la durée sur laquelle ces fractions sont administrées⁶³.

Le fractionnement permet aux tissus sains où la prolifération cellulaire est lente d'avoir le temps de mettre en place des mécanismes de réparation avant la réplication. Dans le cas de cellules tumorales dont l'activité mitotique est élevée, la réparation de certains dommages léthaux n'a pas le temps d'avoir lieu.

Un des principes fondamentaux de la radiobiologie est mis en évidence ici : la « règle des quatre R » : Réparation, Redistribution, Reoxygénation et Repopulation :

- Réparation ; les cellules saines auront le temps de mettre en route des systèmes de réparation avant de rentrer dans un cycle de division. Ce n'est pas le cas des cellules tumorales.
- Redistribution ; les cellules se trouvant en phase S du cycle mitotique sont plus radio-résistantes. Après irradiation, il faudra donc attendre que les cellules qui se trouvaient en phase S et qui ont survécues se redistribuent dans le cycle cellulaire avant de commencer une seconde irradiation.
- Reoxygénation ; la mort cellulaire engendrée par l'irradiation va entraîner une réoxygénation des cellules se trouvant dans les zones hypoxiques. Leur radiosensibilité va donc augmenter (voir 3.3.1.3).
- Repopulation ; une repopulation accélérée par les cellules tumorales survivantes peut avoir lieu après l'irradiation. Il convient donc de ne pas laisser de délai trop long entre deux irradiations.

Le fractionnement de la dose pour ne pas léser les tissus sains et pour tuer les cellules tumorales a donné naissance au concept d'index thérapeutique (Figure 2.1). Le fractionnement est intéressant uniquement si la réponse de la tumeur a lieu à une dose totale cumulative qui n'entraîne pas de dommages sévères pour les tissus sains.

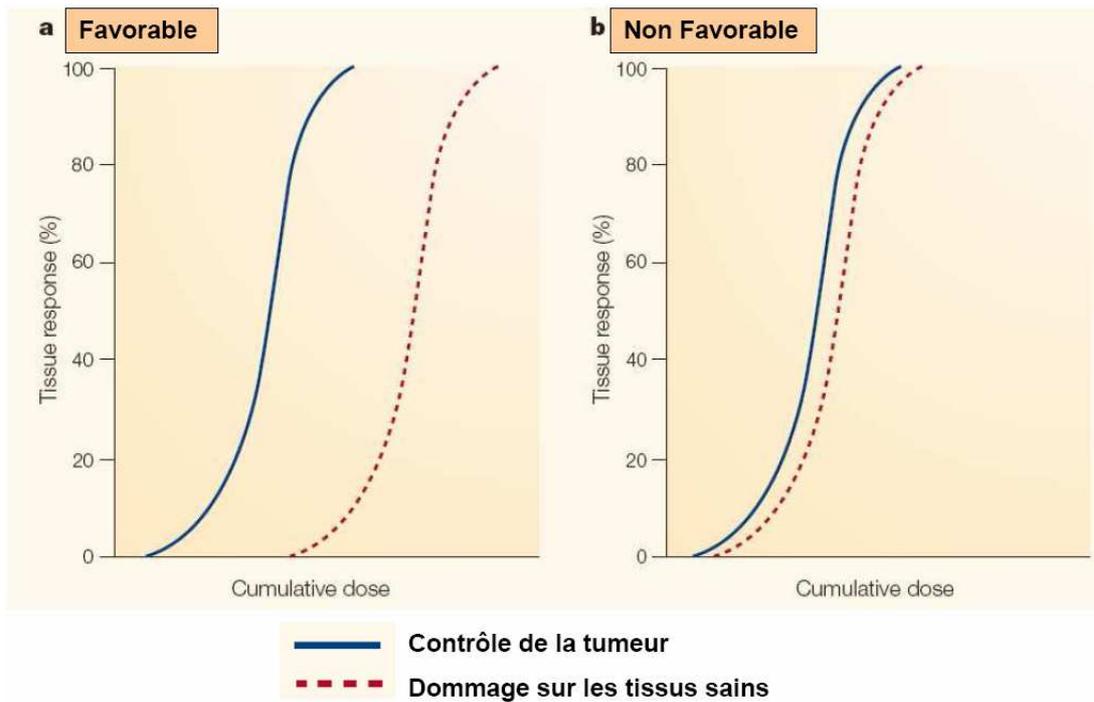


Figure 2.1 : Notion d'index thérapeutique Réponse du tissu (%) en fonction de la dose cumulée. D'après ⁶³.

2.3.4 Radiothérapie des gliomes

La radiothérapie fait partie du traitement de la grande majorité des gliomes de haut grade. Bien que la radiothérapie externe augmente significativement la médiane de survie, la réponse n'est que de courte durée et la récurrence est quasiment inévitable.

Ces résultats transitoires peuvent avoir plusieurs explications :

- l'index thérapeutique est très étroit ; le parenchyme cérébral sain autour de la tumeur a une radiosensibilité proche de celle du gliome.
- les gliomes de haut grade ont des marges mal définies.
- les cellules tumorales des gliomes de haut grade ont des systèmes de réparation efficaces qui augmentent leur radiorésistance.
- on trouve au cœur du gliome ainsi que dans les zones d'infiltration des cellules en hypoxie qui sont plus radiorésistantes.

2.3.4.1 Protocole d'irradiation classique

Le protocole d'irradiation externe classique utilise un LINAC.

Le volume cible d'irradiation prend en compte le volume tumoral et deux centimètres de marge. Sa détermination est beaucoup plus aisée dans le cadre du traitement de gliomes de bas grade où l'infiltration est moins importante que pour les gliomes de haut grade.

La dose délivrée lors du traitement d'un glioblastome est comprise entre 60 et 70Gy délivrés en fractions quotidiennes de 2Gy, 5 jours par semaine, pendant 6 à 7 semaines. L'index thérapeutique étant faible, il est difficile de délivrer une dose totale plus élevée sans risquer de lourds effets secondaires^{26; 65}.

2.3.4.2 Effets secondaires

L'apparition d'effets secondaires peut être observée dans trois périodes distinctes²⁶ :

- court terme (semaines au début du traitement) ; l'apparition d'un œdème est le principal effet secondaire pouvant être observé à court terme. Une corticothérapie permet de diminuer ses effets.
- moyen terme (trois premiers mois après la fin du traitement) ; il s'agit essentiellement de céphalées avec état de somnolence vraisemblablement dues à l'expression de la démyélinisation. Il s'agit de manifestations transitoires.
- long terme ; trois phénomènes peuvent être observés :
 - o une radionécrose pouvant apparaître plusieurs années après le traitement. Ce phénomène est irréversible.
 - o une atrophie cérébrale qui peut être à l'origine d'une détérioration intellectuelle. Il est cependant important de vérifier si les symptômes observés sont dus à l'irradiation ou à une éventuelle récurrence.
 - o des troubles neuroendocriniens, notamment si la zone hypothalamo-hypophysaire a reçu une dose élevée lors de l'irradiation.

2.4 Combinaison de plusieurs thérapies

Le traitement des tumeurs intracrâniennes est rarement basé sur l'utilisation d'une seule des thérapies proposées précédemment. Elles peuvent être utilisées en combinaison ou de façon séquentielle.

La chirurgie est souvent considérée en première intention. Cependant, la radiothérapie peut avoir lieu avant l'exérèse afin de réduire une lésion se situant dans une région trop proche de

zones fonctionnelles. Elle peut également être mise en place après l'intervention, notamment si la résection n'a pas été complète.

La chimiothérapie peut être envisagée à différents moments du traitement ; cependant, elle est rarement administrée avant l'acte chirurgical.

On définit plusieurs périodes où la chimiothérapie peut être administrée par rapport à une radiothérapie²⁶, elle sera alors qualifiée de :

- néoadjuvante, si elle est réalisée avant la radiothérapie.
- concomitante, si elle est réalisée en même temps que la radiothérapie. Un effet radiosensibilisateur de la chimiothérapie est recherché. Le principal inconvénient demeure la toxicité pour les tissus sains.
- adjuvante, si elle est réalisée juste après la radiothérapie.

Elle peut être également envisagée après récurrence ou en traitement de seconde ligne (par exemple après une première chimiothérapie).

Nous retiendrons l'avantage que peut présenter une chimiothérapie concomitante, notamment pour les effets additifs mais également pour l'éventuelle mise en place d'un effet de synergie entre les deux thérapies. Ce concept est d'ailleurs à la base de ce travail de thèse.

De nombreuses études ont été menées afin de déterminer le planning de traitement le mieux adapté aux tumeurs intracrâniennes. Une étude exhaustive de la littérature se révélerait assez fastidieuse tant les essais sont nombreux et les éléments de comparaison difficiles à établir. Malgré cela, un consensus émerge sur l'efficacité de la combinaison de plusieurs modalités de traitement^{26; 25; 66; 67}.

2.5 Protocoles Courants en Clinique

Le choix du protocole de traitement en neuro-oncologie dépend tout d'abord du type de tumeur. Les paragraphes suivants donnent un bref aperçu des protocoles les plus utilisés²⁵. Nous n'aborderons pas les traitements symptomatiques qui consistent à soulager les symptômes et améliorer les fonctions neurologiques du patient.

2.5.1 Gliomes de bas grade

Le traitement des gliomes de bas grade est essentiellement chirurgical. Si la résection est complète, la radiothérapie ne sera pas envisagée.

La chimiothérapie est peu utilisée sauf dans le cas des oligodendrogliomes qui semblent mieux y répondre. Les astrocytomes de bas grade touchant des sujets jeunes, les effets secondaires du traitement doivent être pris en compte au moment de la mise en place du protocole.

2.5.2 Gliomes de haut grade

Le traitement des gliomes de haut grade est essentiellement palliatif. La chirurgie est proposée dès que possible afin de réduire l'effet de masse de la tumeur. Une seconde intervention pourra également être discutée en cas de récurrence. La radiothérapie fait également partie de l'arsenal classique puisqu'elle permet d'augmenter de façon significative la survie du patient. L'utilisation de la chimiothérapie ainsi que son mode d'administration (adjuvante, concomitante ou néoadjuvante) doit également être pris en compte.

Une étude de Stupp et al. a ainsi mis en évidence une augmentation significative de la survie de 2,5 mois chez des patients dont la radiothérapie était associée à la prise de temozolomide⁶⁸.

2.5.3 Méningiomes

Le traitement des méningiomes est essentiellement chirurgical. L'ablation dépend de la localisation et des tumeurs de fort volume peuvent être retirées sans trop de difficultés. La radiothérapie n'est envisagée que si l'exérèse n'a pas été totale. En cas de récurrence un nouvel acte chirurgical peut être programmé.

2.5.4 Métastases

La chirurgie est envisagée pour les patients présentant une lésion accessible avec peu de risques fonctionnels.

En cas de métastases multiples, la radiothérapie peut également être mise en place²⁶.

On notera ici l'utilité de la radiochirurgie (également appelée gamma-knife) qui consiste à délivrer une très forte dose à la tumeur en combinant de nombreuses doses unitaires axées différemment sur la tumeur afin de ne pas léser les tissus sains.

Une radiothérapie encéphalique totale peut également être envisagée.

La chimiothérapie est aussi intéressante car il sera possible de toucher toutes les métastases. La réponse est fonction de la pharmacocinétique de l'agent utilisé mais aussi du type cellulaire qui est à l'origine des métastases.

2.6 Nouvelles thérapies

2.6.1 Immunothérapie

L'immunothérapie consiste à stimuler les moyens de défense immunitaire de l'organisme contre les cellules tumorales²⁶. On distingue trois méthodes d'immunothérapie :

- l'immunothérapie adoptive (vaccination anti-tumorale) qui consiste en l'injection de cellules immunitaires ayant une activité anti-tumorale.
- la stimulation de la réponse immunitaire par l'injection intratumorale de molécules comme les interleukines ou les interférons.
- l'administration d'anticorps monoclonaux qui peuvent soit bloquer un récepteur, soit, s'ils sont couplés à une molécule d'intérêt chimiothérapeutique, servir à une meilleure vectorisation. Le passage des anticorps au travers de la BHE est cependant difficile. Des anticorps visant le VEGF comme le bevacizumab ont malgré tout montré qu'ils étaient capables d'induire une diminution de la pression interstitielle et ainsi permettre une meilleure entrée de drogues dans la tumeur⁶⁹.

L'immunothérapie n'est pour l'instant qu'au stade expérimental et n'est donc pas une pratique courante en clinique.

2.6.2 Thérapie génique

La thérapie génique consiste à transférer les cellules tumorales avec du matériel génétique qui pourra leur être délétère²⁶. La transfection en elle-même est une étape assez complexe et il est actuellement difficile d'arriver à cibler les cellules d'une tumeur de façon homogène. Les vecteurs utilisés sont en général des virus (virus de l'herpes par exemple). Le but de la transfection pourra être :

- d'apporter un gène suppresseur de tumeur (p53 par exemple qui est muté dans un grand nombre de gliomes).
- l'introduction d'un gène suicide comme celui de la thymidine kinase.

- l'induction de gènes pro-apoptotiques.
- l'apport d'un gène permettant de stimuler l'activité immunologique (par exemple par surexpression de l'interleukine 2).

Les siRNA (small interfering RiboNucleic Acid) font également partie de l'arsenal disponible en matière de thérapie génique. Il s'agit de petites séquences qui vont pouvoir se fixer sur leur ARNm cible et ainsi inhiber la traduction.

La thérapie génique n'en est pour l'instant qu'au stade de la recherche et son arrivée en pratique clinique courante demandera encore de nombreuses années de développement.

2.6.3 Thérapies anti-angiogénique

Les thérapies anti-angiogéniques visent à réduire l'angiogénèse et donc la prolifération tumorale. Elles peuvent être réalisées par des molécules ciblant le VEGF. Parmi ces molécules, citons la thalidomide¹⁶ ou l'avastine. La cible des thérapies anti-angiogéniques peut également être d'autres protéines comme les matrix-metalloprotéinases. La thérapie génique peut aussi être envisagée comme une option en ciblant les gènes régulateurs de la prolifération endothéliale.

De nombreux essais cliniques sont en cours et certains paraissent prometteurs malgré qu'ils présentent parfois des résultats en deçà de ceux obtenus lors des phases de recherches précliniques²⁶.

2.7 Conclusions

Le traitement des tumeurs intracrâniennes et plus précisément celui des gliomes de haut grade demeure essentiellement palliatif malgré les nombreux protocoles et les nombreuses méthodes mises en place.

La recherche de nouvelles modalités de traitement est donc un enjeu important dans la politique de lutte contre les lésions tumorales. Dans le chapitre suivant, nous allons nous intéresser aux développements de nouvelles thérapies en cours d'expérimentation à la European Synchrotron Radiation Facility.

¹⁶ La thalidomide était également utilisée à la fin des années 1950 comme antiémétique (anti-nauséux) chez les femmes enceintes. Son effet tératogène a été démontré au début des années 1960. Il a été responsable de conséquences désastreuses sur près de 12000 enfants.

Chapitre 3

Thérapies par Irradiation Synchrotron

Les thérapies développées au European Synchrotron Radiation Facility à Grenoble utilisent les propriétés du rayonnement synchrotron pour traiter les tumeurs intracrâniennes. Deux types de thérapies sont actuellement à l'étude : la radiothérapie par microfaisceaux (MRT) et la thérapie par photoactivation : PhotoActivation Therapy (PAT).

Les expérimentations menées sur ces deux thérapies sont pour l'instant réalisées à l'échelle préclinique. Cependant, les premiers essais cliniques de la PAT sont prévus pour 2009.

Dans ce chapitre, nous approfondirons les effets du rayonnement sur la matière ainsi que ses effets biologiques. Dans un second temps, nous nous intéresserons au fonctionnement d'une installation synchrotron ainsi qu'aux propriétés des photons qu'elle génère. Nous verrons ensuite brièvement quelques caractéristiques de la MRT avant de discuter en détail de la thérapie par photoactivation du platine (PAT-Plat) qui est étudiée au cours de ce travail de thèse.

3.1 Interactions Rayonnement - Matière.

Dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement aux interactions entre les photons et la matière (les interactions électrons-matière seront très brièvement évoqués). La nature et les propriétés de la lumière seront détaillées dans le chapitre 4. Cependant, avant d'envisager les différentes interactions, il est important de définir certains points que nous utiliserons par la suite⁷⁰ :

- l'énergie des photons est exprimée en électronvolts (eV). L'électronvolt est une unité d'énergie égale à l'énergie acquise par une particule de charge égale à la charge élémentaire accélérée par une différence de potentiel de 1 volt ($1\text{eV} = 1,6 \cdot 10^{-19}\text{J}$).

- on appelle rayonnement ionisant, tout rayonnement transportant une énergie suffisante pour arracher un électron à la matière. Le seuil minimal pour qu'un photon soit ionisant est 35 eV.
- l'énergie et la longueur d'onde d'un photon sont reliées par la formule : $E = h \cdot (c / \lambda)$; pour le détail de la formule voir 4.2.2.2.
- lorsqu'un rayonnement interagit avec la matière, il peut être soit diffusé, soit absorbé.

3.1.1 Diffusion

3.1.1.1 Diffusion élastique

Elle est observée pour des photons de basse énergie. Le photon va interagir avec un électron fortement lié à l'atome de façon à ce que ce soit l'ensemble de l'atome qui absorbe le recul. Le photon ne va pas perdre de son énergie mais va être diffusé selon une trajectoire différente de sa trajectoire d'origine. On qualifie également ce type d'interaction de diffusion de Rayleigh.

3.1.1.2 Diffusion inélastique

Le photon incident va interagir avec un électron faiblement lié (son énergie doit être négligeable en comparaison de celle du photon) et entraîner son éjection. Le photon diffusé aura donc une énergie inférieure au photon incident. L'électron sera éjecté dans le demi-espace au-delà du point d'impact alors que le photon sera diffusé dans l'importe quelle direction de l'espace. Ce phénomène est également appelé « effet Compton » (Figure 3.1).

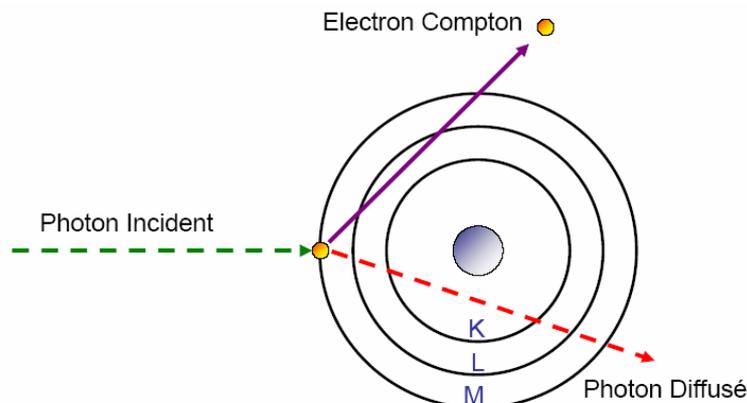


Figure 3.1 Effet Compton

3.1.2 Absorption

3.1.2.1 Effet photoélectrique

L'effet photoélectrique a lieu lorsqu'un photon interagit avec un électron fortement lié du cortège électronique de l'atome. L'énergie du photon va être absorbée par l'électron qui va être éjecté. Une lacune va donc être créée dans le cortège électronique et l'atome aura donc subi une ionisation (Figure 3.2).

L'électron éjecté, baptisé photoélectron, a une énergie égale à celle du photon incident moins l'énergie de liaison de l'électron à l'atome.

$$E_{\text{photoelectron}} = E_{\text{photon incident}} - E_{\text{liaison}}$$

Sa direction est liée à la direction et l'énergie du photon incident.

L'énergie d'excitation E_{liaison} va pouvoir être dispersée de deux manières :

- par émission de fluorescence (le processus est qualifié de radiatif). Un électron d'une couche supérieure va venir combler la lacune. L'énergie du photon de fluorescence sera égale à la différence d'énergie de liaison entre la couche où se trouve la lacune et la couche qui va donner l'électron. Par exemple, si un électron de la couche L vient combler un électron de la couche K, l'énergie du photon de fluorescence sera égale à $E_K - E_L$.
- par cascade d'Auger (le processus est qualifié de non radiatif). Si le photon de fluorescence émis est réabsorbé par un électron d'une couche plus périphérique, cet électron va alors être éjecté (on l'appelle alors électron Auger). Les vacances ainsi créées vont pouvoir donner lieu à une cascade d'électrons Auger. L'atome se retrouvera dans un état de multi-excitations.

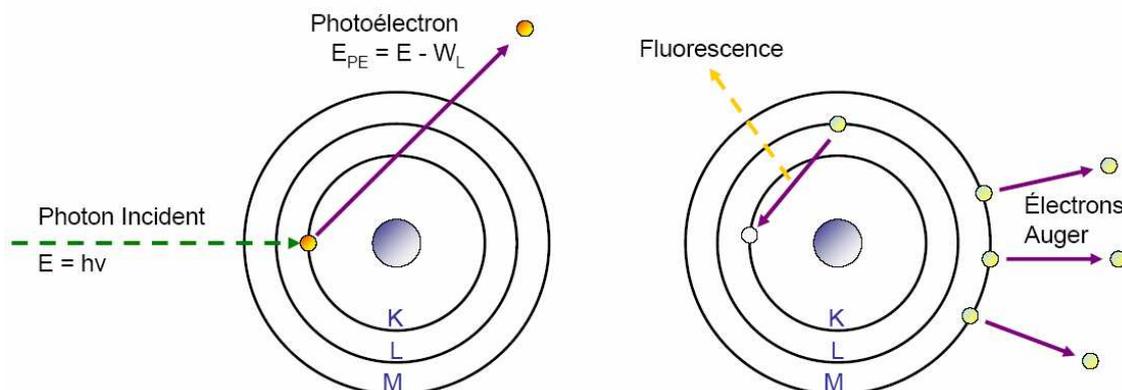


Figure 3.2 : Effet Photoélectrique (à droite phénomènes permettant le retour à l'état initial).
Légende : E_{PE} (énergie du photoélectron) ; E (énergie du photon incident) ; W_L (énergie de liaison de l'électron).

Il est également important de noter que les probabilités d'interaction entre le photon incident et les électrons liés à l'atome ne sont pas linéaires. Elles seront beaucoup plus élevées pour des photons ayant une énergie proche de l'énergie de liaison de l'électron avec l'atome. On définit alors le K-edge d'un élément comme l'énergie de liaison d'un électron de la couche K de cet élément⁷⁰.

3.1.2.2 Absorption simple

Si le photon incident n'a pas une énergie suffisante pour générer un effet photoélectrique, son absorption va entraîner le changement d'orbite de l'électron. Le retour à l'état de repos va donner lieu à l'émission d'un photon de fluorescence. Etant donné que ce phénomène se produit avec des photons incidents de basse énergie, le photon de fluorescence sera souvent émis dans le visible. C'est ce phénomène qui est à la base de la microscopie de fluorescence (voir 4.4).

3.1.2.3 Création de paires

La création de paires correspond à la création d'un couple particule-antiparticule (dans le cas qui nous intéresse, il s'agit d'un couple positron-électron) à partir d'un photon. Si le photon d'une énergie supérieure ou égale à 1,02 MeV est absorbé au voisinage du noyau d'un atome, un couple positron-électron va être formé. Le positron va rapidement interagir avec un électron du milieu et s'annihiler pour donner deux photons de 511 keV qui vont être émis dans des directions opposées¹⁷ (Figure 3.3).

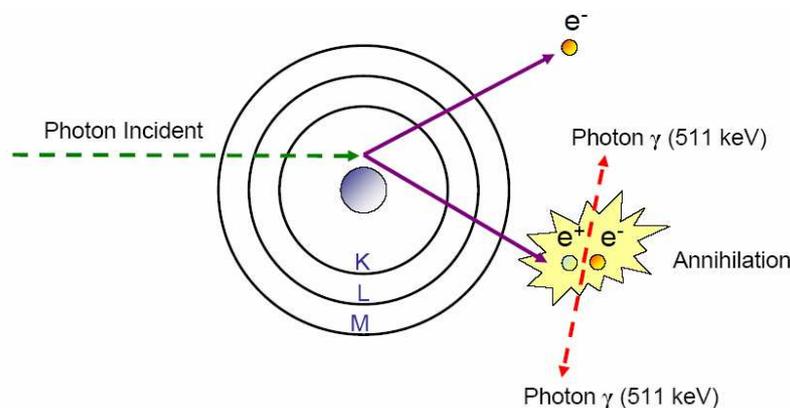


Figure 3.3 : Création de paires

¹⁷ L'annihilation est un principe également à la base de la tomographie par émission de positrons (voir 1.2.3).

3.1.2.4 Effet photonucléaire

L'effet photonucléaire n'a lieu que si le photon incident possède une très haute énergie ($>10\text{MeV}$). Le photon va alors être absorbé par le noyau et entraîner l'émission d'un ou plusieurs nucléons. L'atome va donc devenir radioactif. La désexcitation du noyau se fait par l'émission d'un rayonnement γ .

3.1.3 Domaines de prédominance

La figure 3.4 résume le type d'interaction qui sera observé en fonction du numéro atomique de l'atome et de l'énergie des photons incidents. Notons que dans le cadre de élément lourd comme le Platine ($Z=78$) et avec un rayonnement synchrotron monochromatique réglé au K-edge de cet élément ($78,39\text{keV}$), le mode d'interaction prédominant est l'effet photoélectrique (point rouge sur la figure 3.4).

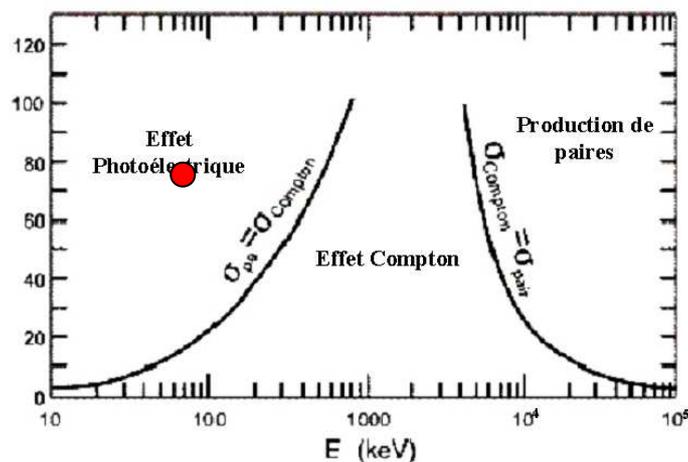


Figure 3.4 : Domaine de prédominance des différents types d'interactions. Modifié d'après⁷¹.

3.1.4 Interaction des électrons avec la matière

Nous venons de voir que l'effet photoélectrique ainsi que l'effet Compton entraînent l'émission d'un électron secondaire qui va également pouvoir interagir avec la matière. Cette interaction va pouvoir se faire selon différentes manières :

- par diffusion élastique : l'électron incident va être dévié dans sa trajectoire par des structures atomiques de masse plus grande que la sienne. Cette interaction ne se fait

avec quasiment aucune perte d'énergie. La trajectoire de l'électron subit de nombreuses déviations au fil des interactions.

- par collision électron-électron : la collision entre l'électron incident et un électron périphérique peut entraîner l'excitation ou l'ionisation de l'atome (en fonction du transfert d'énergie). La désexcitation se fera par émission d'un photon de fluorescence.
- par rayonnement de freinage : si l'énergie de l'électron est suffisante pour qu'il puisse arriver à proximité du noyau, l'électron va être dévié de sa trajectoire et freiné. La perte d'énergie due au freinage va donner lieu à l'émission d'un rayonnement dit de freinage. Ce type d'interaction est utilisé dans un grand nombre de générateurs X ainsi que la production du rayonnement synchrotron (voir 3.4).

Le trajet des électrons secondaires dans la matière n'est pas une ligne droite. A chaque interaction, les électrons secondaires vont être déviés, leur parcours va se terminer par une grappe d'ionisations⁷⁰.

3.2 Quelques Définitions Utiles en Radiobiologie

Afin de mieux appréhender les effets des radiations ionisantes sur le vivant, il est nécessaire de définir plusieurs grandeurs⁷⁰ :

L'unité de dose absorbée est définie par l'énergie perdue par les radiations ionisantes dans une unité de masse de tissu traversé. La dose est exprimée en Gray (Gy) et correspond à l'absorption d'un Joule (J) par kilogramme.

Tous les types d'irradiation aboutissent à une perte d'énergie sur leur trajet. On définit le transfert linéique d'énergie (TEL) comme la quantité d'énergie perdue par unité de longueur. Elle est généralement exprimée en keV/ μ m.

Comme une même dose d'irradiation peut avoir un effet biologique variable en fonction de son TEL, on définit l'équivalent de dose⁷⁰. L'équivalent de dose correspond à la dose absorbée multipliée par le facteur d'efficacité biologique Q propre à chaque type de rayonnement. Ce facteur est fonction de la valeur du TEL de la particule ; il est par exemple

égal à 1 pour un rayonnement électromagnétique (rayons X et γ) et à 20 pour une particule α . L'unité de l'équivalent de dose est le Sievert (Sv) : Equivalent de dose (Sv) = Dose (Gy) x Q.

3.3 Effets des Rayonnements Ionisants sur le Vivant

Dans les derniers paragraphes, nous avons pu avoir une idée des phénomènes qui se déroulent lorsqu'une particule est diffusée ou absorbée par la matière. L'interaction entre un rayonnement électromagnétique ionisant et le vivant va entraîner un certain nombre de conséquences au niveau moléculaire, cellulaire, tissulaire ainsi qu'au niveau de l'organisme. La chronologie de ces événements s'étale des premières 10^{-15} s jusqu'à de nombreuses années après l'irradiation. Elle comprend trois étapes : l'étape physique, chimique et enfin biologique.

3.3.1 Etape Physico-chimique

Le transfert énergétique réalisé au moment de l'étape physique est très bref (de l'ordre de 10^{-14} s). C'est au cours de ce laps de temps que le rayonnement va interagir avec les atomes selon les modes que nous avons vu précédemment.

Considérons une dose de 10Gy qui correspond à 10^{-2} Joules par gramme de tissu. Cette dose ne va générer que $2 \cdot 10^{15}$ ionisations par gramme et ses effets thermiques seront négligeables (de l'ordre de $2 \cdot 10^{-3}$ °C). Malgré cela, une irradiation de 10Gy en corps entier est létale pour un être humain alors que seules 2 molécules d'eau sur 10^7 seront concernées par ces ionisations.

Il existe donc un phénomène d'amplification qui va conduire à l'observation d'effets biologiques^{72; 73}.

3.3.1.1 Effets directs et indirects

Les effets des radiations ionisantes sur les molécules peuvent être directs (20%) ou indirects (80%) (Figure 3.5). Un effet direct est caractérisé par une excitation ou une ionisation d'une molécule biologique par un électron secondaire. Cette interaction peut entraîner une rupture d'une liaison covalente et donner naissance à deux radicaux extrêmement réactifs selon l'équation :



Cependant, le corps humain est constitué d'approximativement 70% d'eau. Les radiations ionisantes vont pouvoir par un phénomène appelé radiolyse de l'eau donner également naissance à des espèces réactives de l'oxygène.

On qualifie d'effets indirects, les effets causés par ces espèces réactives issues de la radiolyse de l'eau sur des molécules biologiques.

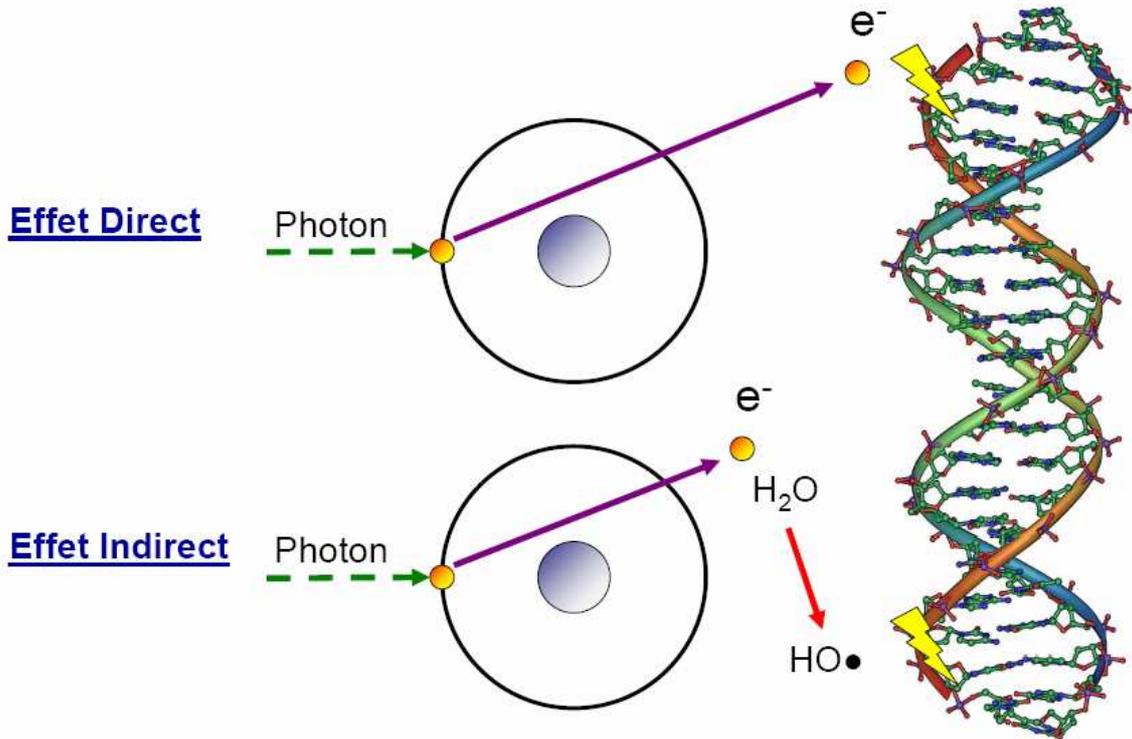


Figure 3.5 : Effet direct et indirect des radiations ionisantes sur la molécule d'ADN.

3.3.1.2 Radiolyse de l'eau

La figure 3.6 illustre le phénomène de la radiolyse de l'eau. Les radicaux H• et HO• générés par ce phénomène vont interagir avec les molécules biologiques^{72; 73}.

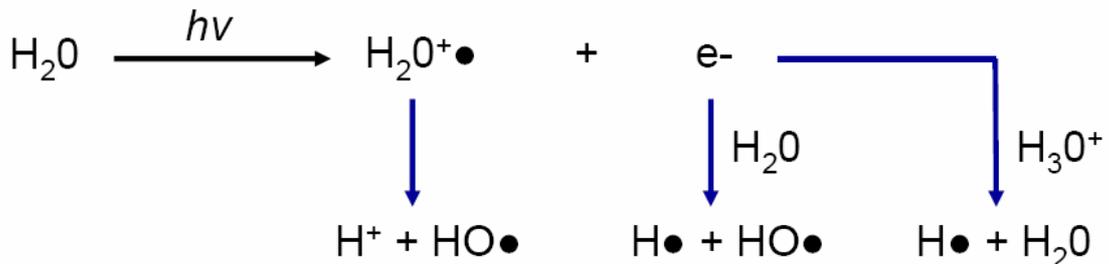
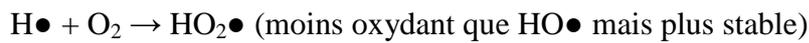


Figure 3.6 : Radiolyse de l'eau.

3.3.1.3 Rôle de l'oxygène

L'oxygène est un radiosensibilisateur puissant qui augmente les effets de l'irradiation. On définit l'Oxygen Enhancement Ratio (OER), le rapport des doses nécessaires pour obtenir le même effet selon des conditions d'anoxie ou d'oxygénation normale^{74; 73}.

Un exemple de réaction pouvant expliquer ce phénomène est donné par les équations suivantes :



La plus grande stabilité des radicaux créés entraîne un effet beaucoup plus durable.

3.3.2 Etape biologique

Bien que les radiations ionisantes puissent interagir avec toutes les molécules biologiques et notamment au niveau des mitochondries et des membranes, nous nous intéresserons principalement à leurs effets sur la molécule d'ADN. Les principaux dommages causés par l'irradiation sont^{72; 74} :

- les cassures simple brin de l'ADN (SSB¹⁸) : elles correspondent à la rupture d'une colonne sucre-phosphate. Elles sont en général rapidement réparées par un mécanisme d'excision – re-synthèse. On en dénombre en moyenne 1000 par Gray et par cellule.
- Les cassures double brin de l'ADN (DSB¹⁹) : elles correspondent à deux cassures simple brin sur des brins opposés de la molécule à moins d'une dizaine de paires de bases de distance. Leur réparation est plus longue et peut conduire à la perte de l'information génétique se trouvant dans la zone lésée. On en dénombre en moyenne 40 par Gray et par cellule.
- Les altérations de bases : les bases, et notamment la thymine peuvent être hydroxylées par un radical OH•. D'autres altérations comme des pertes de bases ou des pontages sont également observés. Leur réparation est en général rapide. On en dénombre en moyenne 1500 par Gray et par cellule.

¹⁸ SSB : Single-Strand Break.

¹⁹ DSB : Double-Strand Break.

3.3.3 Conséquences Biologiques

Les dégâts générés par l'irradiation sur l'ADN de manière directe ou indirecte vont pouvoir être réparés par plusieurs types de mécanismes⁷⁴. Malgré cela, toutes les lésions, notamment les DSB ne vont pas pouvoir être réparées ou une partie de l'information génétique va être perdue lors de la phase de réparation. Si la zone touchée se trouve dans une partie non codante ou si la lésion a lieu dans un gène qui n'est pas vital, les conséquences seront faibles. Cependant, si les lésions se trouvent dans des gènes vitaux ou si elle entraîne des aberrations chromosomiques, la cellule peut entrer dans un processus de mort cellulaire. On distingue plusieurs types de mort cellulaires radioinduits⁷⁵, parmi les plus courants, on trouve :

- la mort mitotique. Elle est la plus fréquente et consiste en l'accumulation d'aberrations chromosomiques et de mutations entraînant l'incapacité pour la cellule de finir une mitose. Une cellule en état de mort mitotique ne pourra pas engendrer de colonies. Leur morphologie est assez caractéristique puisque leur taille est souvent très importante et elles peuvent présenter des micronoyaux (morceaux d'ADN expulsés hors du noyau).
- l'apoptose. Il s'agit d'une mort cellulaire « programmée ». Elle est caractérisée par une succession de processus visant à « digérer » la cellule.
- la nécrose. Phénomène anarchique pouvant générer de l'inflammation.
- la mort cellulaire immédiate. Encore mal expliqué, ce phénomène est essentiellement observé après des irradiations à très hautes doses.

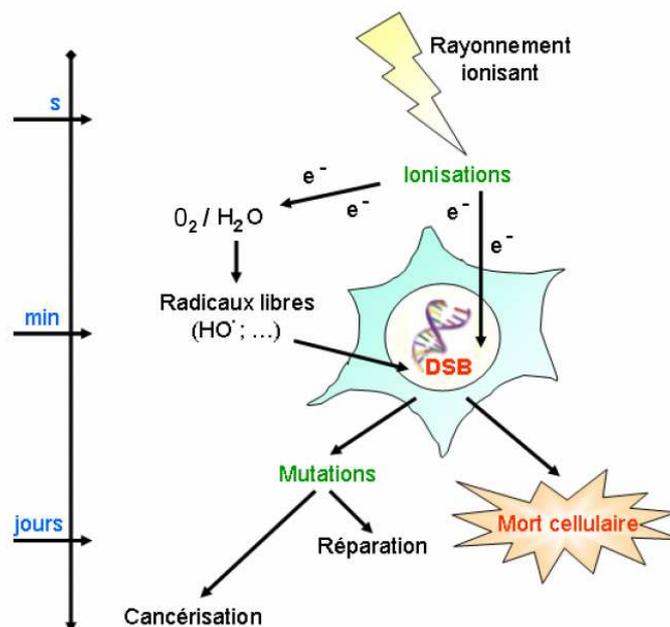


Figure 3.7 : Chronologie des effets biologiques d'une irradiation.

Les effets de l'irradiation peuvent également être observés après plusieurs années. Des mutations générées dans certains gènes suppresseurs de tumeurs par exemple peuvent entraîner une cancérisation à long terme (Figure 3.7).

3.3.4 Implications pour la radiothérapie

L'objectif de la radiothérapie va donc être de réaliser un maximum de dégâts au niveau du volume tumoral sans léser les tissus sains.

La dose déposée au niveau des cellules tumorales devra donc être maximale mais la dose déposée au niveau des tissus sains devra être la plus faible possible. Le fractionnement de l'irradiation discuté en 2.3.3 apparaît comme une bonne solution ; cependant, d'autres approches comme l'irradiation en mode tomographique, la curiethérapie ou l'IMRT présentent un potentiel intéressant.

Comme nous venons de le voir, les effets des radiations ionisantes sur le vivant peuvent être directs ou indirects. La prédominance des effets indirects a d'ailleurs été avérée tout comme le rôle du niveau d'oxygénation des tissus. Ces deux paramètres sont de première importance dans la mise en place de tout nouveau protocole expérimental :

- l'oxygénation du tissu tumoral n'est pas homogène. Dans les gliomes de haut grade notamment, on peut retrouver des zones hypoxiques dans la tumeur mais également au niveau des infiltrations dans le parenchyme cérébral, c'est-à-dire au niveau des marges actives. Les cellules hypoxiques sont beaucoup plus radiorésistantes que des cellules en conditions normoxiques.
- les effets indirects, via les espèces réactives de l'oxygène, peuvent être améliorés, notamment par l'utilisation de molécules radiosensibilisantes pouvant se fixer au plus près de l'ADN afin que les espèces réactives de l'oxygène soient produites en quantité à proximité de leur cible. Cette radiosensibilisation ciblée permettra d'augmenter les effets de l'irradiation dans les cellules tumorales sans avoir à augmenter la dose qui touche également les tissus sains.

3.4 Rayonnement Synchrotron

3.4.1 Généralités

Le rayonnement Synchrotron a été mis en évidence pour la première fois en 1947 aux Etats-Unis. Ce type de rayonnement a dans un premier temps été considéré comme parasite, responsable d'une perte d'énergie des électrons lors de la construction d'accélérateurs circulaires. Cependant, il s'est vite imposé comme une méthode de choix pour de nombreuses applications.

Considérons des électrons relativistes ; lorsque ces électrons vont être déviés de leur trajectoire par un champ magnétique intense, ils vont émettre un rayonnement électromagnétique tangentiellement à leur trajectoire : c'est le rayonnement synchrotron.

Parmi ses propriétés les plus remarquables, notons un spectre qui s'étend des UV aux rayons X durs ; une très forte brillance (nombre de photons émis par seconde par mm^2 par mrad) ainsi qu'une faible divergence.

Une cinquantaine d'installations synchrotron ont vu le jour dans le monde depuis le début des années 1960. Il existe actuellement trois générations de synchrotrons²⁰. Les synchrotrons de troisième génération offrant la plus forte brillance. Parmi les trois plus puissants, l'on trouve l'*Advanced Photon Source* aux Etats-Unis, le *Spring 8* au Japon et la *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) à Grenoble. C'est dans cette dernière installation que les expériences décrites dans ce travail de thèse ont été réalisées.

3.4.2 Description générale de l'ESRF

L'idée d'un synchrotron européen remonte à 1975. Cependant ce n'est qu'en 1984 que le site de Grenoble fut choisi pour un début des travaux effectué en 1988. Le premier faisceau d'électrons fut injecté dans l'anneau de stockage en 1992 et c'est au terme de deux années de tests que l'ESRF ouvrit ses portes aux utilisateurs en 1994.

A l'origine, douze pays européens participèrent au financement annuel de l'ESRF, ce nombre fut ensuite porté à 18 quelques années plus tard. Les contributeurs les plus importants sont la

²⁰ Par abus de langage, on appelle également synchrotron l'installation responsable de la production de ce type de rayonnement.

France (27,5%), l'Allemagne (25,5%), l'Italie (15%) et le Royaume-Uni (14%). En 2007, le budget annuel était de 80 millions d'euros.

Les expériences pratiquées à l'ESRF sont en grande majorité réalisées par des utilisateurs. Le temps de faisceau (durée d'utilisation du rayonnement synchrotron pour réaliser une expérience) est obtenu suite à la soumission d'un *proposal* (présentation du projet et justification de la demande de temps de faisceau). On estime à 6000 le nombre de chercheurs venant réaliser chaque année des expériences à l'ESRF.

3.4.3 Production du rayonnement synchrotron à l'ESRF

Les électrons sont produits par un canon à électrons puis accélérés par un LINAC (LiNear ACcelerator) long de 16m qui permettra aux électrons d'atteindre une énergie de 200 MeV. Les électrons sont ensuite transférés dans le booster synchrotron, un accélérateur circulaire de 300m de circonférence leur permettant d'atteindre l'énergie de 6 GeV. Enfin les électrons sont injectés dans l'anneau de stockage de 844m de circonférence où ils vont tourner pendant plusieurs heures dans le vide (Figure 3.8).

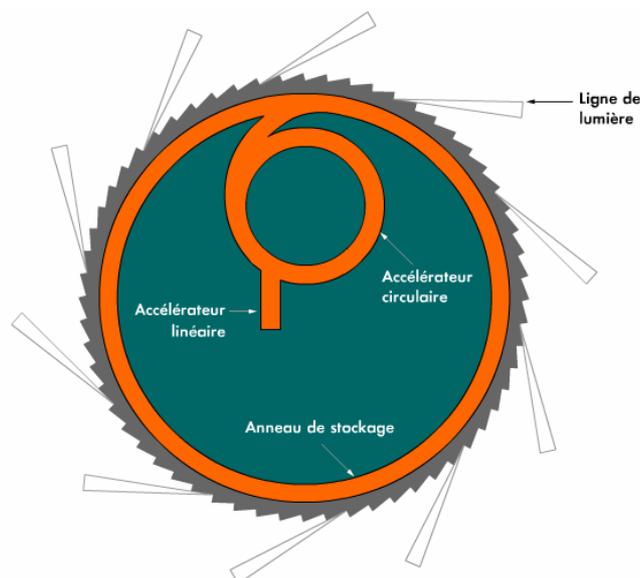


Figure 3.8 : Représentation simplifiée d'un synchrotron. Les électrons sont accélérés une première fois par un accélérateur linéaire (LINAC), avant d'être accélérés à nouveau par un accélérateur circulaire (booster synchrotron) afin d'atteindre une énergie de 6 GeV avant d'être injecté dans l'anneau de stockage. Schéma extrait de www.esrf.eu.

L'anneau de stockage n'est pas circulaire, il s'agit en réalité d'un polygone à 64 cotés. Au cours d'un tour complet, les électrons sont déviés de leur trajectoire par 64 aimants de courbure induisant chacun une déviation du faisceau de $5,625^\circ$. Au niveau de chaque aimant

de courbure, la déviation induite par le champ magnétique donne naissance au rayonnement synchrotron, émis tangentiellement à la courbure. Sur les sections droites, entre deux aimants de courbure se trouvent des dispositifs d'insertion responsables de la forte brillance des synchrotrons de troisième génération. Ils sont constitués d'une succession de petits aimants dont la polarité est alternée. Les électrons vont donc avoir un mouvement d'oscillation tout en conservant une trajectoire globale rectiligne. Les cônes de rayonnement émis vont se superposer et donc augmenter la brillance. Il existe deux types d'éléments d'insertion :

- les wigglers avec lesquels les cônes de rayonnement émis vont se superposer (les intensités s'additionnent).
- Les onduleurs avec lesquels le cône de rayonnement émis sera plus fin donnant naissance suite à un phénomène d'interférences (voir 4.2.2.4) à une augmentation de la brillance pour certaines longueurs d'onde (Figure 3.9).

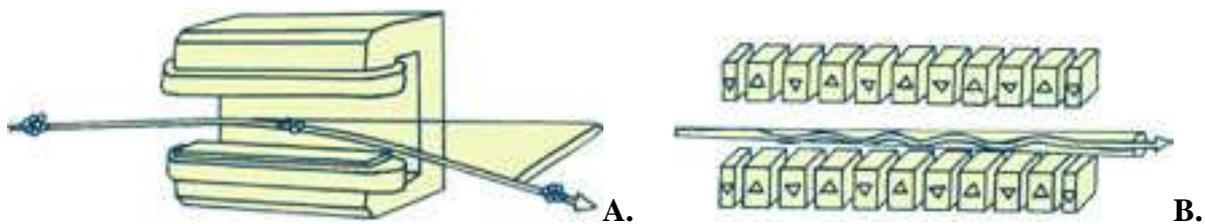


Figure 3.9 : A. Schéma d'un aimant de courbure ; B. Onduleur. Schéma extrait de www.esrf.eu.

Enfin, il existe différents modes de remplissage de l'anneau de stockage correspondant aux nombres de paquets d'électrons envoyés dans l'anneau de stockage. Le flux maximal est obtenu en mode multi-bunch (992 paquets d'électrons sont envoyés dans l'anneau de stockage, le courant maximum est alors de 200 mA et la durée de vie approximativement égale à 70 heures.

Il faut également noter que l'énergie perdue par les électrons lors de l'émission du rayonnement est compensée par 6 cavités radiofréquences.

3.4.4 Lignes de lumière

Les faisceaux de rayonnement synchrotron émis suite à la déviation des électrons se dirigent vers les lignes de lumière se trouvant tout autour de l'anneau de stockage. Chaque ligne de lumière est spécialisée soit sur un type d'expérience, soit sur une spécialité de recherche.

Une ligne de lumière peut être divisée en 3 parties (Figure 3.10) :

- la cabine optique, accolée à l'anneau de stockage, elle comprend un grand nombre d'instruments optiques permettant de donner au faisceau les caractéristiques nécessaires pour l'expérience.
- la cabine expérimentale (hutch), lieu de l'expérience, elle comprend l'échantillon ainsi qu'un certain nombre d'appareils servant à effectuer les mesures.
- la cabine de contrôle, salle où les chercheurs contrôlent et pilotent leur expérience.

A l'heure actuelle, il existe une quarantaine de lignes de lumières à l'ESRF. L'intégralité des expériences réalisées au cours de ce travail de thèse s'est déroulée sur la ligne médicale ID17.

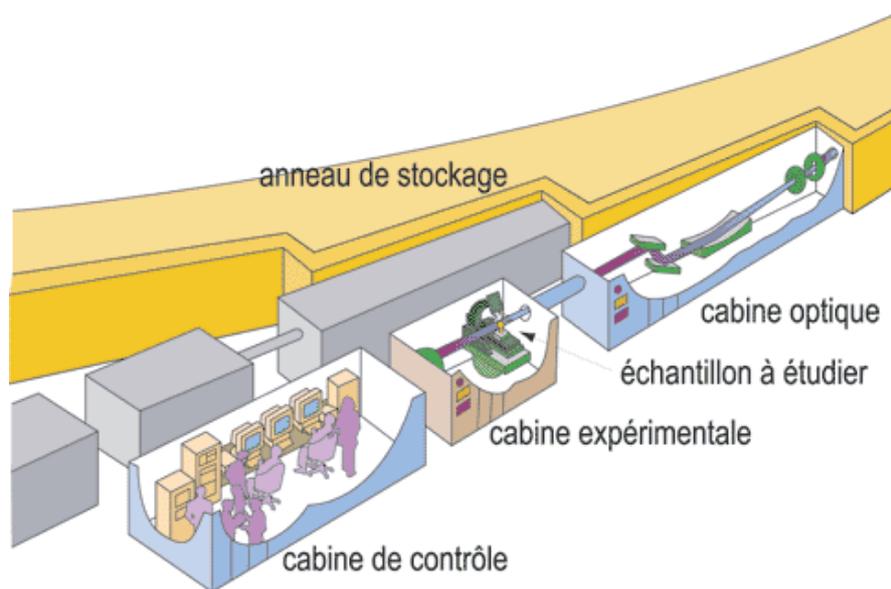


Figure 3.10 : Schématisation d'une ligne de lumière. Schéma extrait de www.esrf.eu.

3.4.5 Présentation de la ligne médicale ID17

La ligne médicale est dédiée à un grand nombre d'applications biomédicales de la lumière synchrotron parmi lesquelles l'angiographie, la bronchographie et la thérapie des tumeurs intracrâniennes (PAT-Plat, Tomotherapie et Radiotherapie par Microfaisceaux).

La source du rayonnement synchrotron est un wiggler composé de 21 pôles magnétiques. Le faisceau produit par ce wiggler est très faiblement divergent (3mrad en horizontal, 0.1mrad en vertical)

ID17 possède deux cabines expérimentales, la première se trouve à proximité de la source (30m) sert au développement de la radiothérapie par microfaisceaux (voir 3.5). La seconde se situe à 150m de la source et permet d'utiliser un rayon de plus grandes dimensions (150mm de large ; 10mm de haut). On trouve également en amont de cette seconde salle un

monochromateur permettant de transformer le rayonnement incident en un rayonnement monochromatique. C'est au niveau de cette seconde salle qu'on a été réalisées les expérimentations sur la PAT-Plat. Nous discuterons plus en détail du réglage et des paramètres du faisceau dans le chapitre 6.

3.5 Radiothérapie par Microfaisceaux (MRT)

La Radiothérapie par Microfaisceaux (MRT) a été développée à partir du milieu des années 1990 (la première publication relative aux applications biomédicales de la MRT remonte à 1995⁷⁶). Son principe repose sur l'effet dose-volume ; plus le volume d'irradiation est petit, plus la dose utilisée pourra être élevée (Figure 3.11).

La MRT consiste donc en un fractionnement spatial de la dose avec dépôt de très hautes doses. Le volume tumoral est irradié à l'aide d'un faisceau de rayonnement synchrotron traversant un collimateur multi fentes et créant ainsi une série de microfaisceaux d'épaisseur et de distance pic à pic réglables. Les tissus se trouvant dans les pics d'irradiation reçoivent l'intégralité du rayonnement alors que les tissus se trouvant dans les zones vallées, c'est-à-dire entre les microfaisceaux, reçoivent une dose beaucoup moindre. Afin d'être réalisée dans des conditions optimales, l'irradiation doit être très rapide et le faisceau bien défini. Des mouvements au moment de la phase d'irradiation peuvent entraîner de lourdes conséquences, c'est pourquoi la dose doit être déposée très rapidement (dans l'idéal en moins d'une seconde) ; de même le faisceau doit être très faiblement divergent. Le faisceau synchrotron produit à l'ESRF présente ces deux qualités : très fort débit de dose et faible divergence.

De nombreuses études ont été menées à la fois sur des animaux sains pour quantifier les effets secondaires de l'irradiation mais aussi sur des animaux porteurs de tumeurs intracrâniennes⁷⁷;

⁷⁸; 3; 79

Les effets observés varient principalement en fonction de la largeur des microfaisceaux, de la distance pic à pic (c'est-à-dire de la distance entre le centre de deux microfaisceaux), de la dose déposée ainsi que du nombre de microfaisceaux. Il est également possible de croiser les microfaisceaux afin de déposer une dose plus élevée dans des tumeurs.

Les dégâts observés chez les animaux sains sont dans la majorité des cas restreints au passage des microfaisceaux. Serduc et al. ont par exemple montré en utilisant la microscopie biphotonique intravitale qu'une irradiation en mode MRT de 312Gy (18 faisceaux de 25 μ m, distance pic à pic de 211 μ m) n'entraînait pas de rupture de la BHE pour des molécules de

poinds moléculaire supérieur ou égal à 560 Da dans les douze jours qui suivent l'irradiation^{3; 79}. D'autres expériences ont été menées et la régénération rapide des vaisseaux sanguins se trouvant sur le passage des microfaisceaux par des extensions cytoplasmiques des cellules endothéliales se trouvant dans les zones vallées est une hypothèse avancée pour expliquer le peu d'effets secondaires de ce type de radiothérapie.

Les expériences menées sur des rats porteurs du gliosarcome 9L par Laissie et al. en 1998 ont montré que la médiane de survie des animaux a augmenté de façon significative suite au traitement⁷⁸. Le croisement des microfaisceaux au cœur du volume offre des résultats encore plus spectaculaires.

Le développement de la MRT est actuellement en cours sur la ligne médicale de l'ESRF ainsi qu'au *National Synchrotron Light Source* à Brookhaven aux Etats-Unis. Les essais précliniques se poursuivent avec l'objectif de mettre en place des essais cliniques aux alentours de 2011. Dans ce travail de thèse, la MRT n'a été utilisée que pour valider une application développée en microscopie biphotonique (nous verrons en 5.4.6 une imagerie de la paroi artérielle suite à cette thérapie).

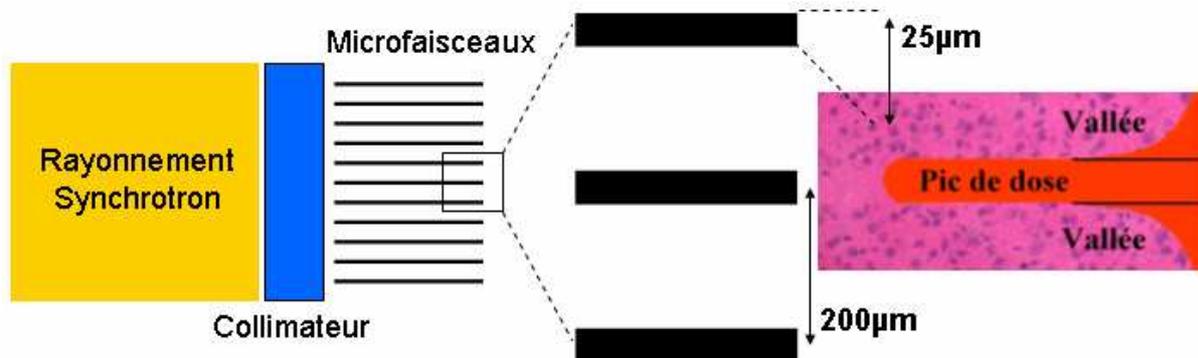


Figure 3.11 : Principe de la Radiothérapie par Microfaisceaux. Le rayonnement synchrotron traverse un collimateur multi-fentes afin de donner naissance à des microfaisceaux de largeur et de distance pic à pic réglables. La dose déposée est maximale sur le passage des microfaisceaux et faible en zone vallée⁸⁰.

3.6 Thérapie par Photoactivation du Platine

3.6.1 Généralités

La thérapie par photoactivation (PAT) consiste à incorporer un élément lourd dans les cellules tumorales et à renforcer l'effet photoélectrique sur cet élément en soumettant le volume

tumoral à un rayonnement dont l'énergie est réglée juste au-dessus du seuil d'absorption d'une de ses couches électroniques.

Théoriquement, si l'on irradie un élément comme le platine ($Z = 78$) avec des photons dont l'énergie se situe juste au dessus du seuil d'absorption de sa couche K (baptisé K-edge ; 78,39 keV pour le platine), on obtiendra un effet photoélectrique ainsi que des cascades Auger permettant de déposer une grande quantité d'énergie à proximité de l'élément. On appelle alors cette thérapie la PAT-Plat.

La PAT-Plat est différente de la tomothérapie^{81; 41; 33} (également testée à l'ESRF) qui consiste à injecter par voie vasculaire un agent de contraste iodé qui va sortir du volume vasculaire au niveau de la tumeur et qui va baigner les cellules tumorales. Cependant, l'agent de contraste reste en extracellulaire, la cible est donc différente (membrane, matrice extracellulaire) puisqu'en PAT-Plat on vise essentiellement l'ADN. La seconde étape de la tomothérapie consiste alors à irradier le volume tumoral avec des photons à 50 keV.

La mise en place d'un protocole PAT demande de définir trois grands points :

- 1) choisir une molécule contenant un élément lourd photoactivable qui pourra aller se fixer au plus près d'une cible comme l'ADN.
- 2) déterminer l'énergie et la dose à utiliser lors de l'irradiation afin d'obtenir un maximum d'effets.
- 3) choisir une méthode de délivrance de la molécule qui permettra d'avoir de fortes concentrations dans les cellules tumorales.

Le rayonnement synchrotron se prête parfaitement à la PAT. Il est en effet possible d'obtenir un faisceau monochromatique dont l'énergie pourra être réglée juste au-dessus du K-edge de l'élément. Une irradiation monochromatique juste au-dessus du seuil d'absorption de la couche K permettra d'augmenter les probabilités d'obtenir des cascades Auger.

L'élément lourd que nous avons choisi pour cette étude et qui a déjà donné lieu à de nombreuses expérimentations à l'ESRF est le platine^{82; 1; 83; 84; 58; 42}(Figure 3.12). Certaines molécules chimiothérapeuthiques comme le cisplatine contiennent du platine et ont la capacité d'aller former des adduits sur l'ADN (voir paragraphe suivant).

La thérapie par photoactivation du platine (PAT-Plat) développée à l'ESRF présente plusieurs avantages notables :

- une molécule chimiothérapeuthique déjà utilisée en clinique qui va former des adduits au niveau de l'ADN.

- l'utilisation d'un rayonnement synchrotron dont le faisceau est monochromatisé à 78,39 keV (K-edge du platine) ; une énergie assez élevée pour pénétrer les tissus et donc envisager par la suite une application en clinique.
- une irradiation en mode tomographique, centrée sur la tumeur afin de réduire la dose déposée dans les tissus sains.

Différents modes d'administration de la molécule ont été proposés mais devant la difficulté d'obtenir des concentrations élevées en cisplatine dans les tumeurs cérébrales suite à une injection systémique, le choix d'une injection intratumorale s'est révélé le mieux adapté. Cette injection peut être réalisée manuellement¹ ou par CED^{42; 85}.

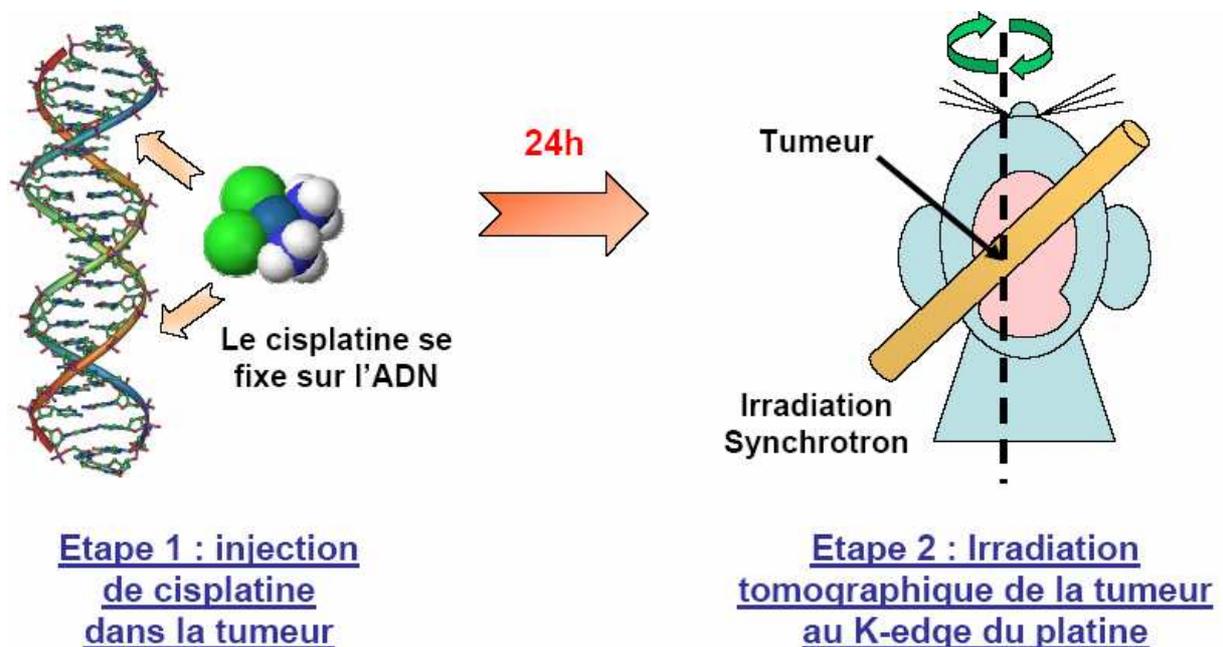


Figure 3.12 : Principe de la PAT-Plat.

3.6.2 Cisplatine

3.6.2.1 Historique

Le cisplatine (cis-diamminedichloroplatinum (II)) a été synthétisé pour la première fois dans les années 1840 et fut nommé « sel de Peyrone ». Ce n'est qu'en 1965 que son action anti-tumorale fut mise en évidence pour la première fois de façon tout à fait fortuite. Barnett Rosenberg qui travaillait sur la bactérie *Escherichia coli* remarqua que si son milieu de

culture contenait du chlorure d'ammonium et qu'il générât un courant entre deux électrodes de platine, la croissance bactérienne se trouvait inhibée⁸⁶.

Un grand nombre de recherches et le développement de grandes quantités de molécules furent ensuite entrepris et ce n'est qu'en 1978 que le cisplatine reçut l'agrément de la Food and Drug Administration (FDA)²¹.

Seules deux autres molécules dérivées du cisplatine montrèrent des effets anti-tumoraux potentiellement intéressants et reçurent également un agrément : le carboplatine et l'oxaliplatine.

3.6.2.2 Action de la molécule

Le cisplatine possède deux groupes amine en position *cis* ainsi que deux groupes chlorures⁸⁷. Une représentation de la molécule ainsi qu'un certain nombre de ses caractéristiques sont données sur la figure 3.13.

Il est également important de noter que seule la forme *cis* de la molécule a une activité anti-tumorale. L'isomère *trans* présente une toxicité mais aucune action sur les tumeurs.

Le cisplatine va pouvoir rentrer dans les cellules par diffusion passive. Cependant cette molécule est instable dans l'eau et si la concentration en chlore est faible dans son milieu (ce qui est le cas dans le cytosol), elle va subir des réactions d'hydrolyse. Les molécules de chlore vont donc être remplacées par des molécules d'eau. La molécule hydrolysée sera alors sous la forme *aqua*. Le diaquo-diamine-platinum est une espèce beaucoup plus réactive que sous la forme chlorure. L'hydrolyse est donc un phénomène fondamental dans l'acquisition de la toxicité.

La molécule va pouvoir ensuite interagir avec l'ADN pour former des adduits²².

²¹ La FDA est l'agence américaine délivrant les agréments notamment en matière de médicaments.

²² L'interaction avec d'autres composés cellulaires (mitochondries notamment) est possible mais plus faible que celle observée avec l'ADN.

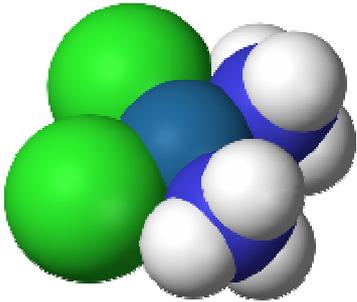
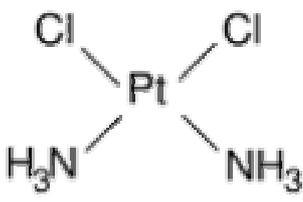
| Représentation de la molécule | Formule | Formule chimique | Masse moléculaire |
|---|---|--|---------------------|
|  |  | $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ | 300,05 g/mol |

Figure 3.13 : Caractéristiques de la molécule de cisplatine.

3.6.2.3 Interaction avec l'ADN

La formation d'adduits va essentiellement avoir lieu avec les bases puriques (adénine et guanine). On distingue plusieurs types d'adduits⁸⁷ :

- les adduits interbrins, entre deux bases ne se trouvant pas sur le même brin.
- les adduits intrabrins, les bases se situent sur le même brin. Plusieurs cas sont alors possibles :
 - o entre deux guanines adjacentes (60 à 65% des cas)
 - o entre une guanine et une adénine (20 à 25% des cas)
 - o entre deux guanines séparées par une base (5 à 10% des cas)
- les adduits monofonctionnels, plus rares, ils sont souvent un état intermédiaire dans la formation d'adduits bifonctionnels.

Les conséquences de la formation des adduits sont une modification de la structure secondaire de l'ADN qui serait à l'origine du blocage de la réplication et de la transcription. Ces phénomènes peuvent donc amener à la mort cellulaire. Plus le nombre d'adduits formés sera important, plus l'effet anti-tumoral sera marqué.

3.6.2.4 Utilisation en clinique

Le cisplatine est un agent chimiothérapeutique couramment utilisé en clinique. Ses principales indications sont le traitement des cancers de l'ovaire, de l'utérus, des testicules, de la vessie, de la sphère ORL, de l'œsophage, de l'estomac ainsi que certaines formes de cancer pulmonaires⁸⁷. La voie d'administration peut être intraveineuse ou intrapéritonéale.

Cependant sa toxicité est assez importante notamment au niveau rénal (une hyperhydratation est souvent pratiquée en prévention afin d'éviter ce type d'effet secondaire), au niveau du tube digestif, de l'hématopoïèse et également au niveau du système nerveux. Des études ont ainsi démontrées une ototoxicité²³ suite à l'administration de cisplatine⁸⁸.

Une résistance peut également être développée ; elle peut être médiée par une détoxification cellulaire par le glutathion par exemple ou par une augmentation du taux de réparation des adduits⁸⁹. Le cisplatine est souvent proposé en polychimiothérapie avec d'autres molécules telle que la carmustine par exemple.

L'utilisation du cisplatine pour le traitement des tumeurs intracrâniennes se heurte à la BHE (voir 2.2.1) qui empêche la diffusion de la molécule dans le parenchyme cérébral. C'est pourquoi les expériences réalisées dans ce travail de thèse ont été réalisées par injection intratumorale.

3.6.2.5 Carboplatine

Le carboplatine est également utilisé en clinique dans un grand nombre d'indications telles que les cancers de la sphère ORL, des ovaires, de l'utérus, de la vessie et dans certains types de cancers pulmonaires. Sa toxicité sur le rein et le système nerveux est moindre que celle du cisplatine, cependant sa toxicité hématologique est assez élevée (la greffe de moëlle osseuse peut être envisagée).

Du fait de sa structure chimique, son hydrolyse est plus lente et il est nécessaire d'utiliser des concentrations supérieures à celles du cisplatine pour avoir un nombre d'adduits égal⁵⁸.

3.6.3 Historique des radiochimiothérapies des gliomes utilisant le cisplatine

C'est en 1971 qu'une étude de Zak et al. a mis en évidence une interaction entre le cisplatine et l'irradiation chez la souris⁹⁰. Les radiochimiothérapies utilisant le cisplatine pour le traitement des gliomes furent l'objet de quelques études précliniques, nous allons ici détailler les plus significatives avant de s'intéresser à quelques études cliniques.

²³ Toxicité au niveau du système auditif entraînant une perte de l'audition.

3.6.3.1 Etude de Douple et al. (1977)

L'étude fut réalisée sur des rats CD-Fisher porteur du gliome RTB⁹¹. Les animaux furent soumis à une injection intrapéritonéale de 4mg/kg de cisplatine puis à une irradiation 24 heures après (rayons X, dose de 15Gy, 140kVp). Une augmentation significative de la survie fût observée ; la médiane de survie étant passée de 30 jours pour les animaux non traités à 44 jours pour les animaux ayant reçu la thérapie complète. Les auteurs suggèrent que cette augmentation de la survie pourrait être due à un effet synergétique entre cisplatine et rayonsX⁹¹.

3.6.3.2 Etude de Kaneko et al. (1983)

Cette étude fut menée sur des rats CD-Fisher porteurs du gliome F98. Les animaux reçurent une injection de 5mg/kg de cisplatine par voie intrapéritonéale puis furent irradiés par trois fractions de 7.5Gy chacune (rayons X, 300kVp).

La médiane de survie est passée de 31 jours pour les animaux non traités à 55 jours pour ceux ayant reçus la thérapie complète. Les auteurs suggèrent également un effet combiné des deux thérapies⁹².

3.6.3.3 Etude de Kimler et al. (1993)

L'étude menée par Kimler et al. a porté sur des rats CD-Fisher porteurs du gliome 9L. La particularité de cette étude repose sur la méthode d'administration de la drogue par injection intracérébrale. Cette méthode permet de s'affranchir de la BHE et donc d'apporter de plus hautes concentrations de cisplatine. Cependant la toxicité étant très élevée, la mortalité fut très importante. Les auteurs déterminèrent que 3µg de cisplatine délivrés dans un volume de 5µl était un bon compromis. L'irradiation fut réalisée 2h après l'injection avec une source de Césium 137 (dose de 16Gy, 514 keV).

La médiane de survie passa de 23 jours (animaux non traités) à 40 jours (animaux ayant reçus la thérapie complète). Il fut également démontré que la chimiothérapie seule n'entraînait qu'une augmentation du pourcentage de survie (ILS) de 6% et que la radiothérapie seule entraînait une augmentation de 44%⁹³.

3.6.3.4 Etudes cliniques

Plusieurs études cliniques ont été menées pour évaluer les effets de la combinaison radiothérapie / cisplatine. Une étude de l'EORTC menée en 1991 sur des patients porteurs de gliomes de haut grade n'a mis en évidence aucun effet du cisplatine (cisplatine : 50mg/m², administré aux jours 1, 7, 15, 22 ; radiothérapie : 58Gy en fractions de 1.8 à 2Gy par jour, 5 jours par semaine)⁹⁴.

Plus récemment une étude de Freeman et al. est arrivée aux mêmes conclusions (cisplatine : 100mg/m², administré aux semaines 1, 3, 5 ; radiothérapie : jusqu'à 76.5 Gy en fractions de 1.26Gy, 2 fois par jour, 5 jours par semaine)⁹⁵.

Les meilleurs résultats furent obtenus en combinant plusieurs molécules. L'association carmustine / cisplatine combinée à une radiothérapie a montré son efficacité en terme d'augmentation de la survie⁹⁶.

Il est cependant important de noter que ces protocoles utilisent des radiothérapies fractionnées. Les études précliniques précédemment citées appliquaient soit une dose unique, soit une dose fractionnée mais avec des doses élevées délivrées sur une faible durée.

3.6.4 Radiochimiothérapies à l'ESRF : état de l'art

Les premiers travaux sur la PAT-Plat par irradiation synchrotron remontent à moins d'une dizaine d'années. Nous allons nous attarder quelques instants sur les différents travaux menés sur cette thérapie ainsi que leurs conclusions.

3.6.4.1 Travaux de Stéphanie Corde (thèse soutenue en 2002)

Les premiers travaux sur la PAT-Plat n'ont pas été réalisés sur des gliomes mais sur la lignée cellulaire SQ20B, un carcinome humain du larynx^{83; 84; 97}.

La survie clonogénique de cette lignée cellulaire (sans la mise en présence avec le cisplatine) ne présente pas de différences significatives entre une irradiation avec une énergie juste en-dessous (78 keV) ou juste au dessus (78.8 keV) du K-edge du platine.

La toxicité du cisplatine s'avère également un facteur important puisqu'on note une survie de seulement 17% après une exposition à 1µM de cisplatine pendant 12h (Table 3.1)

| Exposition au cisplatine | Survie spécifique (%) | Nombre d'atomes de platine par cellule |
|-------------------------------------|-----------------------|--|
| 0.1 μM pendant 48 heures | 66 | 0.07×10^6 |
| 3 μM pendant 6 heures | 25 | 4.0×10^6 |
| 1 μM pendant 12 heures | 17 | 4.5×10^6 |
| 10 μM pendant 6 heures | 0.8 | 7.5×10^6 |
| 3 μM pendant 12 heures | 0.4 | 9.0×10^6 |

Table 3.1 : Survie spécifique et quantité de platine par cellule après différents paramètres d'exposition au cisplatine. On notera que plus la concentration en cisplatine est élevée dans le milieu, plus la cellule incorporera de molécules ; de même la durée d'exposition entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en platine. Extrait de ⁸³.

Si l'on normalise les courbes de survie avec la toxicité intrinsèque du cisplatine obtenue sans irradiation, on n'observe aucune augmentation de la radiotoxicité induite par le rayonnement que ce soit en dessous ou en dessus du K-edge du platine. L'une des explications possible pourrait être le trop faible nombre d'atomes de platine liés à l'ADN. Il est également précisé que la lignée n'est peut être pas la plus adaptée pour ce type d'étude, notamment à cause de sa radiorésistance et à son statut génétique.

Enfin, il a aussi été vérifié par une méthode de *Synchrotron Radiation induced X-Rays Fluorescence* (SR-XRF) que les atomes de platine étaient bien localisés au niveau du noyau cellulaire.

Dans un second temps, le nombre de cassures de l'ADN a été quantifié dans différentes conditions.

Il n'a ainsi été montré aucune différence significative en terme de SSB entre des cellules traitées sans cisplatine ou avec $3\mu\text{M}$ pendant 6h et irradiés au-dessus ou en-dessous du K-edge du platine. Cependant, pour des cellules incubées avec $30\mu\text{M}$ de cisplatine pendant 6h, le nombre de SSB est 4 fois supérieur après une irradiation de 16Gy au dessus du K-edge (78,8keV) qu'en dessous (78keV).

Des conclusions similaires ont été obtenues lors de l'étude des DSB. Aucune différence significative en terme de DSB n'a pu être observé après une incubation avec 0 ou $3\mu\text{M}$ de cisplatine pendant 6h que ce soit en dessus ou en dessous du K-edge. Par contre 3 fois plus de DSB ont été dénombrées au dessus du K-edge après une incubation avec $30\mu\text{M}$ de cisplatine pendant 6h et une irradiation de 16Gy.

Enfin, il fut également montré que la PAT-Plat entraînait une inhibition de l'activité de la protéine DNA-PK. La réparation des DSB n'aura donc pas lieu par des sutures non-

homologues (NHEJ). Cependant, il est important de noter que cette inhibition est uniquement due au cisplatine.

Une relocalisation de RAD51 dans le noyau a également pu être observée après PAT-Plat, le mode de réparation par recombinaison homologue est donc favorisé. Une augmentation de l'activité de BRCA1 par hyperphosphorylation a également été décrit.

Des tumeurs mutées pour BRCA1 (ce qui est le cas de F98 par exemple) répondront donc mieux à la PAT-Plat. L'inhibition de la réparation des DSB par suture non homologue (DNA-PK) et par recombinaison homologue (mutation de BRCA1) favorisant la mort cellulaire.

3.6.4.2 Thèse de Marie-Claude Biston (thèse soutenue en 2004)

Les travaux de thèse de Marie-Claude Biston ont poursuivi les études menées sur cellules par Stephanie Corde puis ont apporté les premières données précliniques sur l'efficacité de la PAT-Plat^{82; 1}.

3.6.4.2.1 Etude sur cellules F98

Contrairement aux travaux précédemment cités, les études furent ici réalisées sur la lignée de gliome F98. Le taux de DSB fut mesuré en terme de fragments d'ADN migrant en dehors du gel (%FDM) ; pour plus de détails sur la méthode voir ^{82; 1}. Le %FDM est proportionnel aux DSB. Plus le nombre de DSB sera élevé, plus le pourcentage sera grand.

Sur des cellules traitées uniquement avec du cisplatine, aucune DSB ne fut détectée. Une irradiation seule de 30Gy induit approximativement une fraction de 10% d'ADN migrant, quelle que soit l'énergie utilisée (30, 40, 78, 78.8 et 85 keV).

En réalisant la même expérience en présence de 30 μ M de cisplatine, on observa une augmentation de la FDM, quelle que soit l'énergie. Cependant, l'augmentation était deux fois moins élevée pour les cellules irradiées à 30, 40 et 85 keV que pour celles irradiées à 78 keV et trois fois moins élevée que pour celles irradiées à 78.8keV.

Il a également été montré que les cassures générées à 78.8keV sont réparées 1.3, 1.5 et 2 fois plus lentement que celles induites à 78, 85 et 30 ou 40 keV, respectivement.

Les conclusions de ces travaux stipulent qu'une irradiation au voisinage du K-edge du platine entraîne une augmentation du nombre de DSB et un temps de réparation plus important. Une irradiation située juste en dessus du K-edge (78.8keV) semble avoir plus d'effet. Un renforcement de l'effet photoélectrique est mis en avant.

3.6.4.2.2 Etude sur rats porteurs du gliome F98 en orthotopique

L'étape suivante fut de réaliser les premiers essais précliniques de la PAT-Plat afin d'estimer les effets de la thérapie en terme de survie.

Mille cellules F98 furent implantées dans le striatum de rats CD-Fisher et 14 jours après l'inoculation, une tumeur de l'ordre de 20mm³ était clairement visible en tomographie. Les animaux furent répartis en différents groupes et les moyennes de survie furent calculées (Figure 3.14).

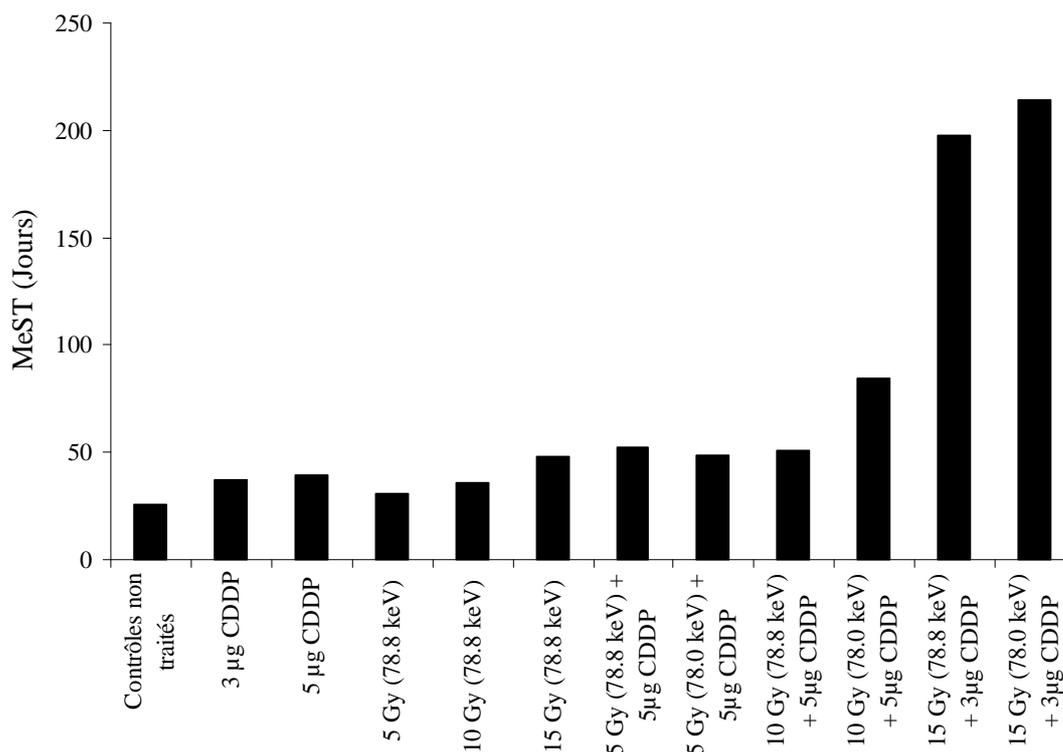


Figure 3.14 : Médiane de survie des rats traités avec différentes modalités. Les médianes sont exprimées en nombre de jours après inoculation de la tumeur. Les effets les plus significatifs ont été obtenus avec une combinaison d'une injection de 3µg de cisplatine et une irradiation de 15Gy avec un rayonnement dont l'énergie est située juste en-dessous ou juste au-dessus du K-edge du platine. Extrait de ⁸².

Il est intéressant de noter que le cisplatine seul ou l'irradiation seule n'entraînent que de faibles pourcentages d'augmentation de survie. Cependant, la combinaison 3µg cisplatine / irradiation (15Gy) donne des résultats spectaculaires, que l'irradiation ait eu lieu juste en dessous ou juste au-dessus du K-edge (médiane de survie de 214 et 194 jours, respectivement, en comparaison des 26 jours pour le groupe contrôle non traité). Trente-trois pourcent des animaux traités étaient encore en vie un an après l'irradiation.

Des analyses histopathologiques menées sur les rats ayant survécu montrèrent que l'hémisphère ayant abrité la tumeur présentait une cavité acellulaire entourée par une marge fibreuse.

D'autres essais précliniques furent menés afin de déterminer le rôle de l'énergie du rayonnement, de la dose ainsi que de la concentration en cisplatine injecté. Globalement, il en ressort que :

- une injection de 3µg de cisplatine est une quantité acceptable en terme de toxicité. Kimler et al. évaluèrent à 13% le taux de morts précoces pour les animaux injectés avec 3µg de cisplatine⁹⁸. Les essais en PAT-Plat avec une quantité de 5µg de cisplatine (et une dose de 15Gy) ont montré 40% de morts précoces attribuables à la molécule. Cependant 70% des rats ayant survécu à la toxicité du cisplatine ont survécu à long terme (à comparer aux 33% ayant reçu 3µg). La concentration de platine dans la tumeur est donc un facteur primordial pour la réussite de la thérapie mais elle demeure limitée à cause de la toxicité.
- l'énergie du rayonnement joue également un rôle important. Bien qu'aucune différence significative en terme de survie n'a été observée entre des énergies se situant juste en-dessous ou juste au-dessus du K-edge du platine ; une irradiation à 40keV et une irradiation réalisée sur un irradiateur médical de 6MV ont montré une diminution de la médiane de survie.
- Les doses ayant montré les meilleurs résultats en terme de survie sont 15 et 20Gy. La tolérance des tissus sains doit cependant être prise en considération.

En conclusion de ces expériences, on retiendra que le protocole le plus porteur en terme de survie est une injection de 3µg de cisplatine et une irradiation avec une dose de 15Gy et une énergie proche du K-edge du platine. Nous nous sommes servis de ces constatations lors de l'élaboration du protocole que nous utilisons dans notre travail de thèse.

Enfin les expérimentations menées par Marie-Claude Biston ont également permis de vérifier la localisation du cisplatine à l'aide de la méthode SR-XRF. Vingt-quatre heures après l'injection, la molécule se situe bien au niveau de la zone d'intérêt. Aucune diffusion dans l'hémisphère controlatéral n'a été observée.

Les travaux de Marie-Claude Biston ont montré les meilleurs résultats en terme de survie pour le modèle F98. Un grand nombre de paramètres utilisés lors de la réalisation du présent travail

de thèse se basent sur les études brièvement décrites précédemment. Bien que l'espèce que nous utilisons (souris nude) soit différente, nous discuterons en détail et comparerons notre étude avec celle-ci dans le chapitre 7.

3.6.4.3 Thèse de Julia Rousseau (thèse soutenue en 2007)

Ce travail de thèse s'est penché dans un premier temps sur l'optimisation de la CED comme méthode d'injection de la drogue chimiothérapeutique⁸⁵. Cependant, nous ne présenterons brièvement ici que les conclusions des essais précliniques réalisés sur rats CD-Fisher implantés avec le gliome F98^{58; 42}.

Plusieurs agents chimiothérapeutiques dont le cisplatine et le carboplatine ont été testés. Le rôle de l'énergie du rayonnement a également été éclairci. Il apparaît que le traitement combiné (drogue + irradiation) présente une efficacité identique, qu'il soit réalisé avec une énergie se trouvant juste au dessus du K-edge du platine ou avec de hautes énergies (rayonnement délivré par un irradiateur médical 6MV). Dans les conclusions de ce travail, l'efficacité du traitement complet semble être étroitement corrélé à l'efficacité de la chimiothérapie seule.

Il est également important de noter que le mode d'irradiation fractionnée ainsi que l'utilisation de pompes osmotiques pour délivrer les drogues ont été testés dans ce travail.

Cependant, l'une des questions restées en suspens demeure la caractérisation de la nature des effets de la PAT-Plat : additifs ou synergétiques ?

Nous discuterons plus tard de certains de ces résultats, parfois contradictoires avec ceux des études réalisées par Marie-Claude Biston. Une comparaison avec les résultats de notre étude sera également entreprise, notamment sur le rôle de la chimiothérapie.

3.7 Conclusions

D'essais menés *in vitro*, la PAT-Plat a rapidement donné lieu à de nombreux essais précliniques en vue de mieux cerner le rôle de la radiothérapie, de la chimiothérapie ainsi que de la combinaison des deux modalités. Des travaux ont également été menés avec d'autres éléments lourds tel que le plomb^{99; 100} ou sur la radiosensibilité de certaines lignées cellulaires⁴⁰.

Une partie de ce travail de thèse s'inscrit dans cette continuité. Après avoir caractérisé les effets de la PAT-Plat en terme de survie, il apparaît nécessaire de mieux appréhender ses effets biologiques, notamment en termes de ralentissement de la croissance tumorale et d'effets sur la vascularisation. L'un des outils les mieux adaptés pour ce type d'étude est la microscopie intravitale que nous allons décrire dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Microscopies

Certaines parties de ce chapitre ont été publiées dans la « New Encyclopedia of Neuroscience » sous la référence : *Two-Photon Imaging ; Clément Ricard, Jonathan A. Coles, Raphaël Serduc, Boudewijn van der Sanden, Pascale Vérant & Jean-Claude Vial ; New Encyclopedia of Neuroscience ; Elsevier ; 2008.*

Afin d'étudier au mieux les effets de thérapies anti-cancéreuses sur les différents modèles animaux, il est nécessaire d'utiliser une méthode d'imagerie dont les résolutions spatiales et temporelles sont optimales. L'étude des effets de la PAT-Plat au niveau des tissus et de la vascularisation cérébrale requiert une méthode d'imagerie donnant accès à des informations à l'échelle (sub)cellulaire en un laps de temps très court (de l'ordre de la seconde). La microscopie apparaît comme la méthode la plus adaptée à cette étude.

Dans ce chapitre, nous verrons comment la microscopie a évolué au cours des siècles et a permis de mieux cerner le vivant d'un point de vue morphologique et fonctionnel. Dans un second temps, nous verrons quelles sont les différentes techniques développées au cours du siècle dernier, leur fonctionnement, leur utilisation ainsi que leurs applications en biologie. Finalement, nous discuterons des nouvelles méthodes optiques ayant émergé au cours des années 1990, notamment la microscopie biphotonique qui a ouvert la voie à une toute nouvelle façon d'étudier le vivant à une échelle (sub)cellulaire.

4.1 Aux origines de la microscopie

4.1.1 Des premières lentilles au microscope.

Ethymologiquement, le mot « microscope » vient du grec « mikros » qui signifie petit et « skopein » qui signifie observer. Un microscope est donc un « instrument permettant d'observer ce qui est petit ».

Il est assez difficile de dater précisément l'invention du microscope et donc de la microscopie. Les premières traces de l'existence d'une lentille remontent à -700, une lentille plan convexe ayant été découverte lors de fouilles dans les ruines de Ninive (Assyrie ; nord de l'Iraq aujourd'hui).

Au cours de l'Antiquité, on retrouve plusieurs références sur l'existence de lentilles. Aristophane mentionne les « sphères ardentes » dans sa pièce « les Nuées » en -423. La lentille y est alors décrite comme un « verre à feu ». Sénèque le jeune (-3 – 65) décrit l'effet grossissant d'un globe de verre rempli d'eau.

La première utilisation d'une lentille pour corriger la vue est rapportée par Pline l'Ancien (23 – 79) qui décrit l'empereur Néron utilisant une lentille d'émeraude pour observer les combats de gladiateurs (vraisemblablement pour corriger une myopie).

Au cours des 10 siècles suivants, peu de développements ou de découvertes sont rapportés avant que le mathématicien arabe Alhazen (965 – 1038) ne publie le premier traité d'optique qui décrit entre autres le pouvoir grossissant des lentilles. Son ouvrage ne sera traduit en latin qu'en 1270 et inspirera de nombreux scientifiques.

A la fin du XIII^{ème} siècle, l'anglais Roger Bacon propose l'utilisation de lentilles pour corriger les défauts de l'œil. Bien que la paternité de cette invention demeure encore controversée, des portraits des cardinaux Nicolas de Rouen et Hughes de Provence peints par Thomas de Modène en 1352 attestent de son existence.

4.1.2 Les premiers microscopes.

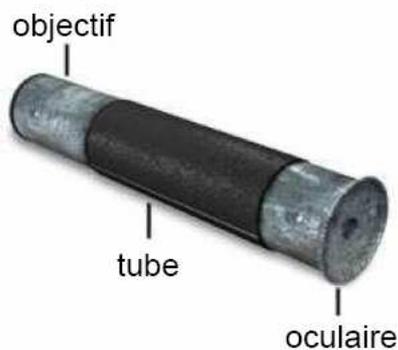
La question de l'inventeur du microscope est encore à ce jour débattue. Il faut en effet différencier deux types de microscope :

- le microscope simple constitué d'une lentille unique, la mise au point se fait par un déplacement de la lentille entre l'œil et l'objet.
- le microscope composé constitué de plusieurs lentilles. La première est nommée l'objectif et sert à grossir l'objet, la seconde nommée l'oculaire sert à grossir l'image de l'objet.

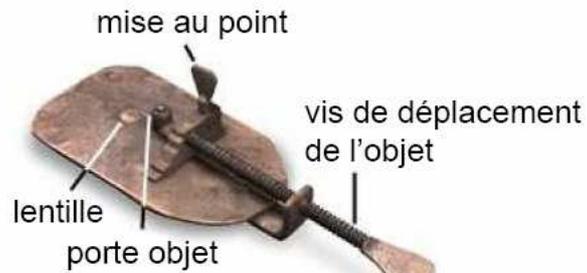
Beaucoup considèrent que Hans et Zacharias Janssen, deux opticiens néerlandais, fabriquèrent le premier microscope composé aux alentours de 1590. Pendant près d'un demi siècle, l'invention ne reçut que peu d'attention avant que l'anglais Robert Hooke (1635 – 1703) ne commence à réaliser de nombreuses observations. Il publia *Micrographia* en 1664, un

ouvrage présentant des descriptions ainsi que des schémas de ses observations. Hooke utilisa principalement un microscope composé, cependant il indiqua qu'un microscope simple pourrait permettre d'obtenir un grossissement plus important.

Le néerlandais Antoni van Leeuwenhoek (1632 – 1723), inspiré par les travaux de Hooke, est considéré comme l'un des fondateurs de la microscopie appliquée à la biologie. Il construisit près de 400 microscopes dont certains avaient un grossissement de 275x et une résolution de 1,4 μ m. La grande majorité de ses instruments étaient des microscopes simples (Figure 4.1). Il réalisa de nombreuses observations d'animalcules (petits animaux que l'on ne peut voir qu'à l'aide d'un microscope), décrivit certains protozoaires, découvrit les spermatozoïdes et fut un adversaire de la théorie de la génération spontanée. On lui doit également la description des globules dans le sang ainsi que de nombreuses observations d'insectes.



Microscope de Janssen
(début du XVII^{ème} siècle)



Microscope de Leeuwenhoek
(fin du XVII^{ème} siècle)



Milieu du XVIII^{ème} siècle)



Microscope Zeiss (1880)

Figure 4.1 : Evolution des microscopes entre 1600 et 1880.

On notera le microscope simple de Leeuwenhoek composé d'une seule lentille ainsi que le microscope composé de Janssen composé d'un oculaire et d'un objectif. Au cours du XVIII^{ème} siècle, le microscope devient un objet d'art. A la fin du XIX^{ème} siècle, Carl Zeiss commence à produire des microscopes à grande échelle (images : www.wikipedia.com).

4.1.3 La naissance de l'histologie.

Le développement de la microscopie a également permis l'avènement de nouvelles sciences et l'ouverture d'immenses perspectives dans la compréhension du fonctionnement des organismes. L'anatomie microscopique mieux connue sous le nom d'histologie fut développée par Marcello Malpighi (1628 – 1694) qui décrivit la structure de nombreux organes et apporta la réponse à un grand problème physiologique. L'année de la naissance de Malpighi, William Harvey (1578 – 1657) rendit publique sa théorie sur la circulation sanguine. Cependant, il n'avait pas pu expliquer comment le sang passait des artères aux veines. En étudiant le poumon à l'aide d'un microscope, Malpighi découvrit les capillaires en 1661 permettant ainsi de compléter les travaux de Harvey.

4.1.4 Vers la théorie cellulaire.

La microscopie ne connaît que peu de développements au cours du XVIIIème siècle, les microscopes sont souvent considérés comme des objets d'art (Figure 4.1) et la microscopie comme une activité de salon. Pour le confort de l'observation, quelques améliorations sont apportées au niveau de la mécanique mais la qualité de l'image reste limitée notamment à cause des aberrations chromatiques des microscopes composés. Le microscope simple reste le plus apprécié par les observateurs.

Au début du XIXème siècle, de nombreux physiciens tels que Brewster, Amici et Barlow s'intéressent au problème. On met alors au point le premier objectif achromatique.

La cellule déjà signalée par Hooke est précisée par Purkinje en 1825. 6 années plus tard, Brown²⁴ découvre le noyau. Cependant la théorie cellulaire n'apparaît qu'en 1838. Elle est introduite par Matthias Jakob Schleiden et Theodor Schwann qui en donnèrent le premier axiome : « la cellule est l'unité constitutive des organismes vivants ». Le second axiome « toute cellule provient d'une autre cellule » sera énoncé par Virchow en 1855.

En 1847, Amici met au point le microscope à immersion. En parallèle, la microscopie permet de faire progresser la bactériologie et la parasitologie. Hansen découvre les bacilles de la lèpre en 1874, Koch ceux de la tuberculose en 1882 et Yersin ceux de la peste en 1894. En 1880,

²⁴ On doit également à Brown, le terme mouvement Brownien

c'est Laveran qui découvre le parasite responsable du paludisme. Cette découverte lui vaudra en 1907 d'être le premier français à obtenir le prix Nobel de médecine.

Le XIXème siècle aura apporté de nombreuses améliorations dans le domaine de la microscopie, aussi bien au niveau des lentilles que dans l'optimisation de l'éclairage. Le condenseur mis au point par Abbe en 1872 en est un parfait exemple. L'ensemble de ces améliorations a permis d'affiner les observations histologiques.

4.1.5 Les descriptions des cellules du système nerveux

L'un des plus gros « challenge » en histologie consiste à obtenir un bon contraste afin de permettre une observation plus approfondie des structures d'intérêt. C'est pour cela que de nombreuses techniques de coloration ont été mises au point. La description précise des différentes cellules constituant le système nerveux n'a été possible que par la découverte d'une technique d'imprégnation des tissus nerveux par l'Italien Camillo Golgi. Cette technique, mieux connue de nos jours sous le nom de coloration de Golgi, résulte en un dépôt noir sur le soma, l'axone et les dendrites des neurones et permet d'obtenir des images avec un excellent contraste (Figure 4.2).

L'espagnol Ramon y Cajal¹⁰¹, utilisant la méthode mise au point par Golgi, émit l'hypothèse que le système nerveux était composé de milliards de neurones communiquant entre eux par des jonctions spécialisées nommées synapses²⁵. Les deux hommes s'opposèrent sur ce dernier point, Golgi soutenant que les neurones formaient un réticulum de cellules interconnectées. Ils partagèrent le prix Nobel de médecine en 1906.

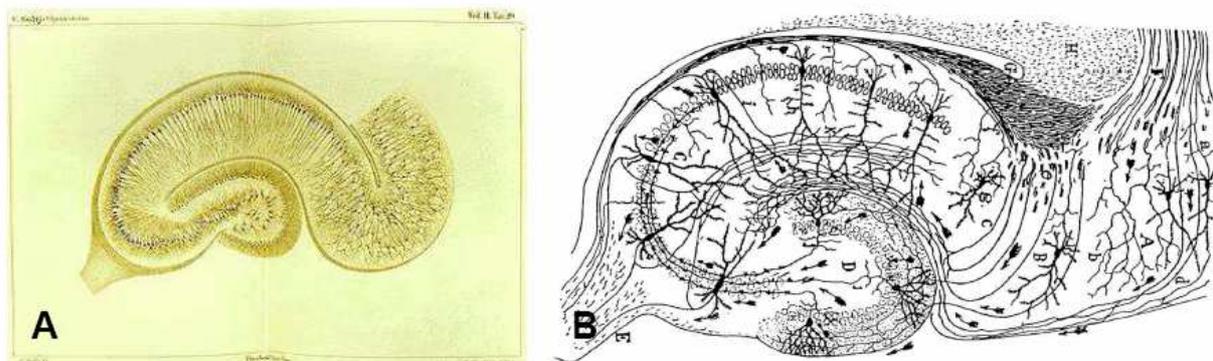


Figure 4.2 : Représentation Schématique de l'hippocampe par Camillo Golgi (A) et Ramon Cajal (B). (Images : www.wikipedia.com)

²⁵ La paternité du terme synapse est attribué à Charles Scott Sherrington en 1897.

4.1.6 La microscopie de fluorescence et la microscopie électronique.

On considère qu'un microscope a une résolution maximale théorique qui est approximativement la moitié de la longueur d'onde de la source de rayonnement (d'après le critère de Rayleigh). Si l'on considère que la lumière visible a une longueur d'onde moyenne de 550nm, le pouvoir de résolution d'un microscope est alors limité à 0,275 μ m. Afin d'augmenter la résolution, Köhler met au point en 1904 le premier microscope avec un éclairage dans l'ultraviolet. La résolution n'est pas améliorée mais certains éléments subcellulaires absorbant différemment le rayonnement cela conduisit au développement de la microscopie de fluorescence de manière directe en 1908 par Reichert puis par l'utilisation de fluorochromes, 3 ans plus tard, par Haittinger.

Cependant tous les objets ne sont pas visibles en microscopie optique, notamment s'ils ne présentent pas de variation d'absorption ou de réflexion, on les appelle des objets de phase. La microscopie de contraste de phase mise au point par Frederik Zernike²⁶ en 1933 a permis l'observation de cellules en cultures sans l'aide de techniques de coloration. On notera également la mise au point de la microscopie interférentielle dans les années 1950 par Georges Nomarski.

Malgré ces nombreux développements, la limite de résolution définie par Rayleigh ne pouvant être dépassée, un nouveau type de microscopie à haute résolution n'utilisant pas la lumière vit le jour : la microscopie électronique. L'électron fut découvert en 1897 par Joseph John Thomson. En 1922, Louis de Broglie mit en évidence que l'on pouvait associer une onde à un électron en déplacement, tout comme à la lumière. La longueur d'onde d'un faisceau d'électrons étant beaucoup moins élevée que pour un faisceau de lumière visible, la résolution s'en trouve augmentée. Ernst Ruska²⁷ construisit le premier microscope électronique au début des années 1930 qui arrivait à une résolution de 60nm. Au fil des années, la technique fut perfectionnée pour atteindre une résolution de 0,4 nm que l'on retrouve assez couramment dans la plupart des microscopes électroniques aujourd'hui.

4.1.7 Une explosion de nouvelles méthodes de microscopie.

Les cinquante dernières années virent l'apparition d'un grand nombre de nouvelles techniques telles que la microscopie à effet tunnel ou encore la microscopie de force atomique permettant

²⁶ Il reçut le prix Nobel de physique en 1953 pour l'invention du microscope à contraste de phase.

²⁷ Ernst Ruska reçut le prix Nobel de physique en 1986.

d'observer la surface d'objets à l'échelle de l'atome. La microscopie de fluorescence s'est également imposée comme une méthode de choix pour les applications biologiques. Il est en effet possible à l'aide de méthodes immunochimiques de marquer spécifiquement certaines molécules à l'aide d'anticorps couplés avec des fluorophores. En excitant ces fluorophores à la bonne longueur d'onde, on obtient des images avec un meilleur contraste. Cependant, la microscopie de fluorescence ne permet pas les reconstructions tridimensionnelles et les images obtenues sont souvent entourées d'un halo flou provenant du fait que la zone d'excitation se situe au niveau du plan focal mais aussi dans deux cônes situés de part à d'autre. Afin de solutionner ce problème, Marvin Minsky breveta en 1957 un nouveau système permettant de s'affranchir de la fluorescence parasite provenant des 2 cônes d'excitation : la microscopie confocale était née. Le développement des lasers comme source d'excitation permit l'expansion de cette méthode au cours des années 1980.

Malgré tous ces avantages, la microscopie confocale ne permet pas de descendre à de grandes profondeurs dans les tissus (200 μ m au maximum dans le cerveau). Cette frontière fut repoussée en 1990 par Denk, Strickler et Webb¹⁰² qui développèrent la microscopie biphotonique en se basant sur la théorie d'absorption à deux photons démontrée théoriquement par Maria Goeppert en 1931¹⁰³. En l'espace d'une quinzaine d'années cette nouvelle méthode s'est imposée comme une référence dans l'étude de phénomènes biologiques d'un point de vue morphologique et physiologique, aussi bien *in vivo* qu'*ex vivo*.

4.2 Quelques notions d'optique.

4.2.1 Nature de la lumière

Afin de mieux comprendre le fonctionnement d'un microscope, il est fondamental de bien cerner les propriétés de la lumière.

La question de la nature de la lumière a longtemps été débattue au cours des siècles, Elle a tout d'abord été décrite comme un flux s'écoulant sous forme de lignes droites : les rayons. Cette description que l'on doit à Kepler (1571 - 1630) a donné naissance à l'optique géométrique. La lumière obéit alors aux grandes lois de la géométrie et son interaction avec la matière est définie par l'indice de réfraction n . Bien que parfaitement utilisable pour la réalisation d'instruments optiques tel que le microscope, cette théorie n'apporte cependant

que peu de renseignements sur la nature de la lumière. La couleur notamment reste sans explications.

La nature de la lumière resta inexplicée pendant de nombreux siècles. Toutefois, deux théories s'affrontaient. Newton (1643 - 1727) émis l'hypothèse que la lumière était composée de particules. De son coté, Euler (1707 - 1783) la décrivait comme une onde se propageant en ligne droite. Les deux théories s'étoffèrent au cours des siècles sans que l'on ne puisse trancher. Au début du XX^{ème} siècle la lumière était donc, décrite soit comme une onde électromagnétique, soit comme un flux de particules.

Ce n'est qu'en 1927 que Niels Bohr décrivit la lumière comme étant à la fois une onde et une particule (le photon prédit par Einstein). La théorie quantique réunifia les deux précédentes : le photon possède une onde associée.

4.2.2 Propriétés de la lumière

4.2.2.1 Propriétés ondulatoires

La lumière possède les caractéristiques d'une onde électromagnétique avec en particulier, un champ électrique perpendiculaire à l'axe de propagation et au champ magnétique. L'amplitude des 2 champs varie comme une sinusoïde. On décrit 3 propriétés majeures à cette onde :

- une longueur d'onde notée λ , représentée par la distance entre 2 points de la courbe ayant la même phase.
- une vitesse de propagation notée c (célérité) dans le vide. C'est une constante universelle dont la valeur est de $2,99.10^8 \text{ m.s}^{-1}$.
- une polarisation qui correspond à l'évolution de la direction du champ électrique au cours de la propagation de l'onde.

4.2.2.2 Spectre de la lumière

Comme nous avons pu le voir précédemment, en tant qu'onde, la lumière possède une longueur d'onde λ associée.

De même, si l'on considère la lumière comme une particule, elle possède une énergie donnée par la formule suivante : $E = h \cdot \nu$ où E est l'énergie en Joules, h est la constante de Planck ($6,6 \cdot 10^{-34}$ J.s) et ν est la fréquence de l'onde associée en s^{-1} . La fréquence étant reliée à la longueur d'onde λ par la formule $\nu = c / \lambda$; on obtient alors $E = h \cdot (c / \lambda)$.

Chaque longueur d'onde est donc associée à une énergie. Plus la longueur d'onde est faible, plus son énergie sera élevée. Un faisceau de rayons X avec une longueur d'onde de $1 \cdot 10^{-10}$ m sera beaucoup plus énergétique qu'un faisceau de lumière verte ayant une longueur d'onde de $0,52 \cdot 10^{-6}$ m.

La microscopie s'intéresse essentiellement aux longueurs d'ondes du spectre de la lumière visible comprises entre le proche UV (300 nm) et le proche infrarouge (900 nm) (Figure 4.3).

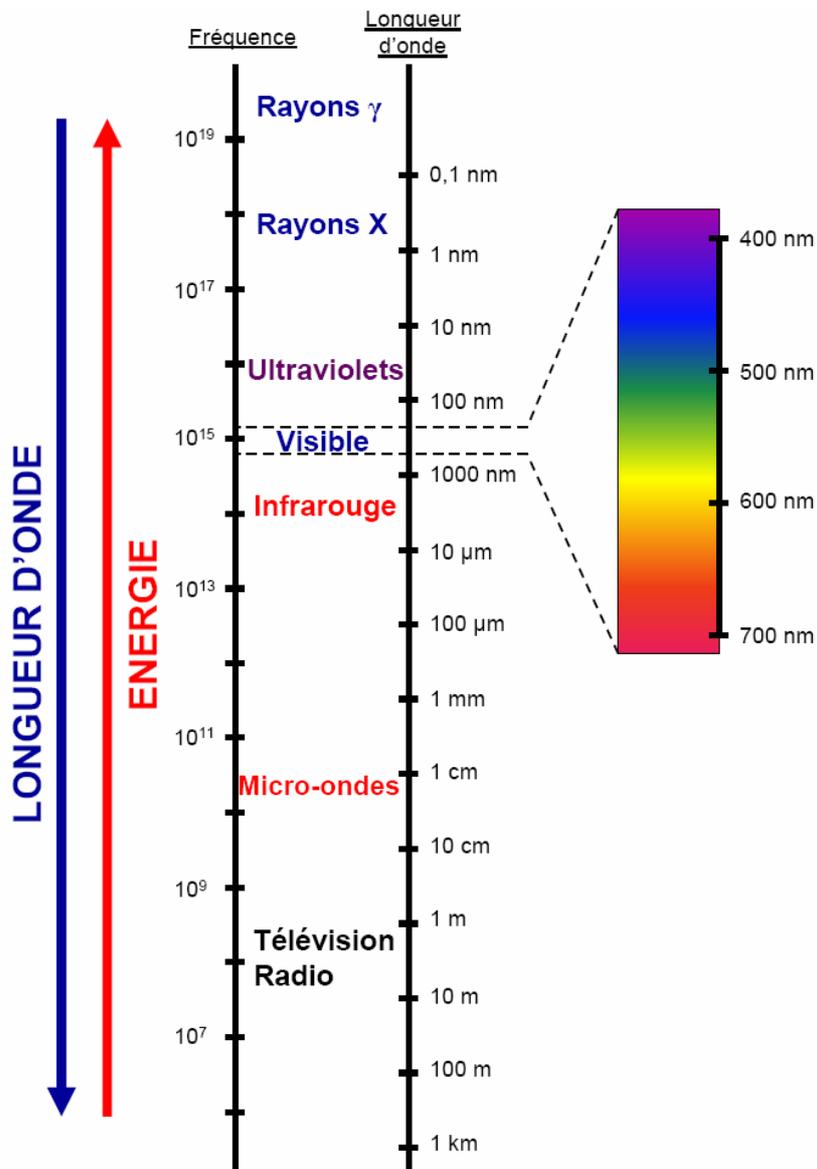


Figure 4.3 : Spectre électromagnétique.

On note que la lumière visible ne représente qu'une petite partie du spectre électromagnétique.

4.2.2.3 Interaction avec la matière

L'interaction de la lumière avec la matière se traduit principalement par une grandeur : l'indice de réfraction, noté n . Il est valable pour une longueur d'onde donnée et se calcule selon la formule suivante : $n(\lambda) = c / v(\lambda)$ avec c la célérité, et v la vitesse de déplacement du faisceau dans le milieu. L'indice de réfraction est toujours supérieur ou égal à 1. Il est par exemple égal à 1,33 dans l'eau.

La connaissance de cette valeur est très importante pour prédire le trajet d'un faisceau lorsqu'il passe d'un milieu d'indice n_1 à un milieu d'indice n_2 . Le faisceau est alors dévié au niveau du dioptre (limite entre les 2 milieux d'indice différents). L'angle de déviation peut être calculé au moyen de la formule suivante : $n_1 \sin(i_1) = n_2 \sin(i_2)$. Avec i_1 , l'angle entre le faisceau incident et la perpendiculaire au dioptre et i_2 , l'angle entre le faisceau réfracté et la perpendiculaire au dioptre¹⁰⁴.

4.2.2.4 Interférences et diffraction

Chaque onde possède une phase, le champ électrique de cette onde est à son maximum à un endroit et à un moment donné. Lorsque deux ondes se superposent et sont de phases identiques, leurs amplitudes vont pouvoir s'additionner pour créer une seule et même onde.

On appelle interférence constructive lorsque deux ondes, de phases identiques, s'additionnent pour donner une onde avec une amplitude plus élevée. On appelle interférence destructive lorsque deux ondes en opposition de phase (l'une est maximale quand l'autre est minimale) s'additionnent pour donner une onde résultante d'amplitude plus faible, voire nulle (Figure 4.4A).

Si l'on fait passer un faisceau lumineux par une fente de petite taille et que l'on place un écran en sortie, on n'observera pas un simple trait lumineux de la même taille que la fente mais une alternance de franges claires et sombres. Ce phénomène est appelé diffraction et peut s'expliquer par le fait que la lumière est re-émise par un grand nombre de « petites sources » au niveau de la fente. Chaque onde re-émise possède une phase différente entraînant l'apparition d'interférences constructives et destructives formant cette image d'alternance de franges claires et sombres baptisée figure de diffraction (Figure 4.4B).

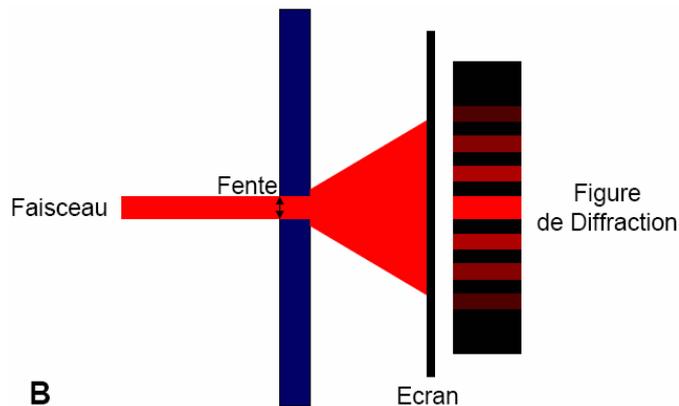
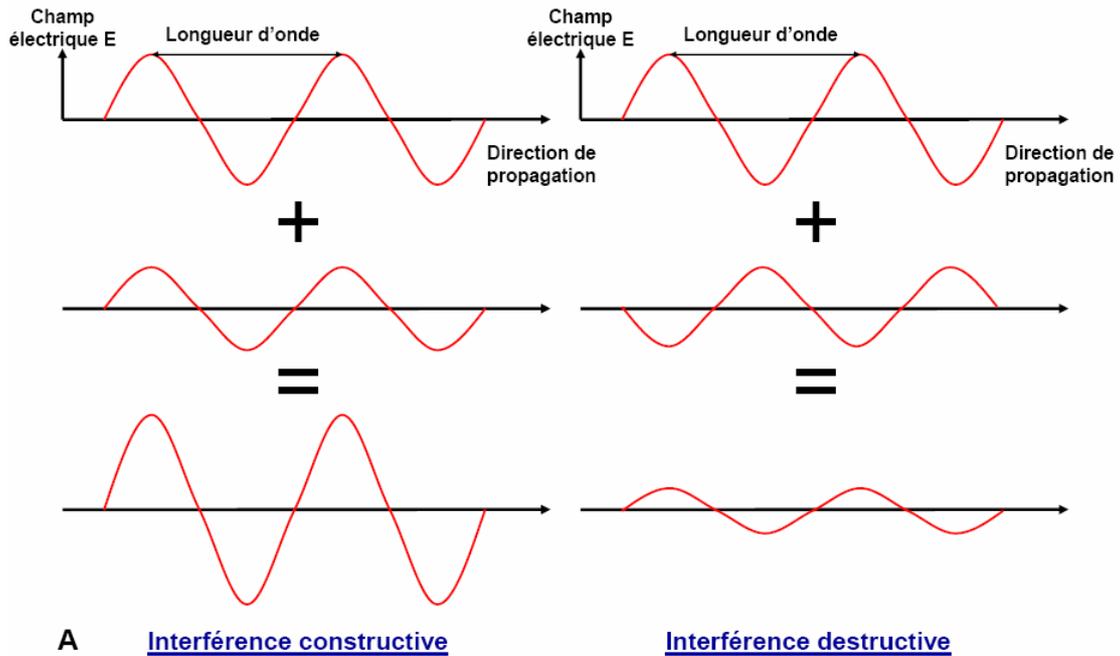


Figure 4.4 : Interférences et phénomène de diffraction.

A. Schématisation d'interférences constructives et destructives de deux ondes. B. Mise en évidence du phénomène de diffraction d'un faisceau laser passant au travers d'une fente.

4.2.3 Les lentilles

Les lentilles sont à la base de tout instrument d'optique. On distingue deux grands types de lentilles : les lentilles convergentes et les lentilles divergentes. Dans le cadre de l'étude d'un microscope nous nous intéresserons essentiellement aux lentilles convergentes (Figure 4.5) qui permettent de focaliser un faisceau parallèle au niveau d'un point appelé point focal F' . On nomme distance focale la distance entre le centre de la lentille (0) et le point focal F' . On définit également le plan objet et le plan image se trouvant respectivement de part et d'autre de la lentille.

Si l'on considère un objet AB se trouvant dans le plan objet, on observera son image A'B' inversée et grossie dans le plan image, le grossissement étant fonction de la distance focale de la lentille. La construction de l'image de l'objet AB répond aux deux règles suivantes :

- les rayons parallèles à l'axe optique (la droite perpendiculaire à la lentille passant par son centre O) coupent celui-ci au niveau du point focal F'.
- les rayons passant par le centre O de la lentille ne sont pas déviés.

L'image A'B' comprend en réalité des défauts que l'on nomme également aberrations. On en note deux grands types :

- les aberrations chromatiques : lorsque le faisceau éclairant l'objet est composé de rayons de longueurs d'onde différentes. Les différentes longueurs d'onde ne sont pas focalisées au même point. L'ajout de plusieurs lentilles permet de corriger ces défauts.
- les aberrations liées à la sphéricité de la lentille.

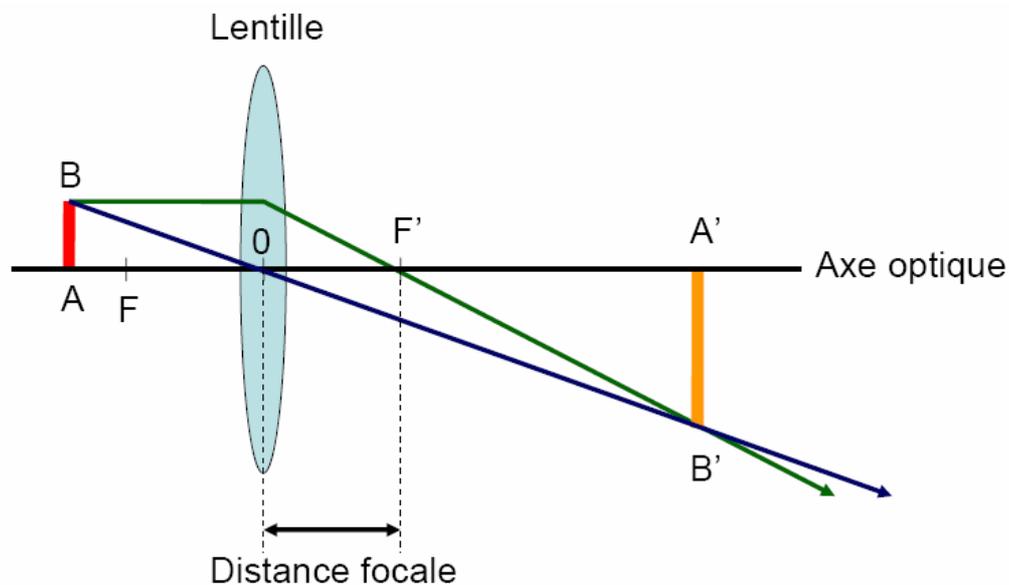


Figure 4.5 : Principe optique d'une lentille convergente.

4.3 Microscopie à fond clair

La microscopie à fond clair est la forme la plus répandue de microscopie dans les laboratoires. Elle est basée sur la transmission d'une lumière blanche au travers de l'échantillon. Bien qu'offrant un faible contraste, de nombreuses colorations, notamment histologiques, en font un outil privilégié pour de nombreuses applications aussi bien en biologie qu'en médecine.

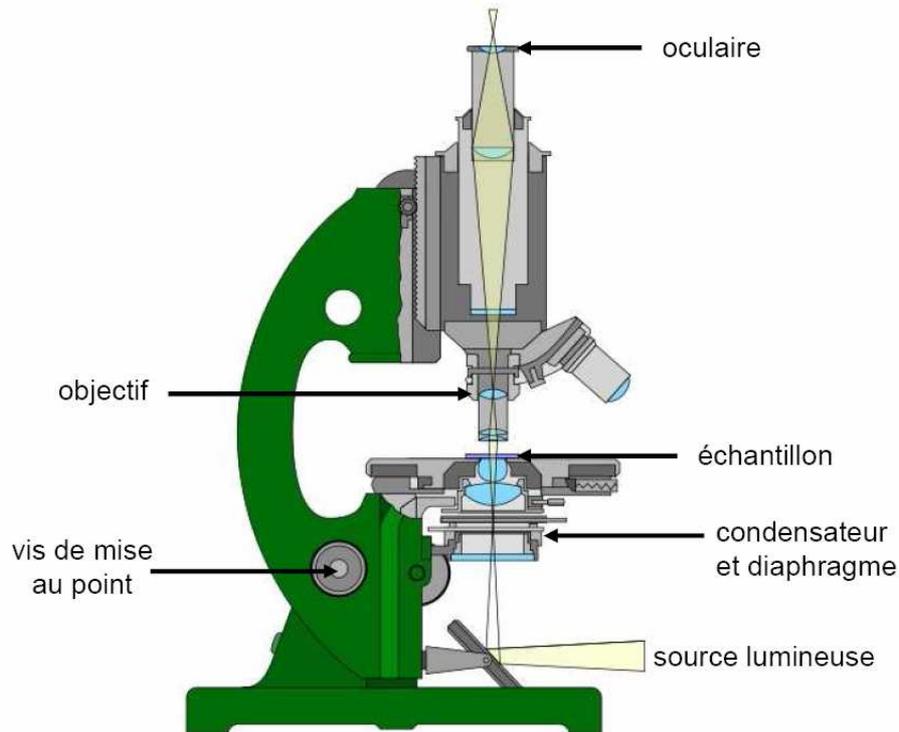


Figure 4.6 : Anatomie d'un microscope à fond clair.

Sur ce schéma, la source lumineuse est reflétée par un miroir qui pourrait être remplacé par une lampe de type halogène afin d'obtenir un éclairage plus homogène.

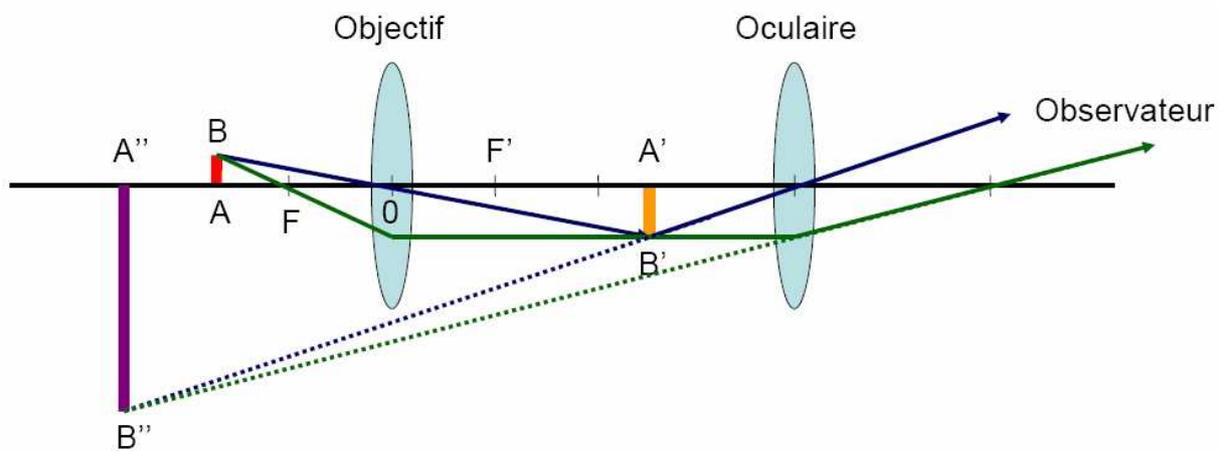


Figure 4.7 : Diagramme optique simplifié d'un microscope.

4.3.1 Anatomie et principe optique d'un microscope

Un microscope classique est composé de différents éléments (Figure 4.6), en suivant le trajet optique, on trouve :

- une source lumineuse : à l'origine la lumière du jour était utilisée et déviée vers l'échantillon à l'aide d'un miroir. Les microscopes actuels utilisent des sources beaucoup plus homogènes tels que les halogènes.

- un condenseur, permettant de focaliser l'éclairage sur l'échantillon.
- une platine sur laquelle l'échantillon est déposé. Cette platine peut être motorisée et reliée à un système de déplacement automatisé permettant d'acquérir des séries d'images de champs d'observation contigus.
- un objectif qui est l'élément central d'un microscope. Bien que composé de plusieurs lentilles afin de corriger les différentes aberrations, il est possible dans un souci de simplification de le représenter comme une unique lentille possédant un fort pouvoir grossissant. Nous détaillerons les différentes caractéristiques des objectifs dans le paragraphe suivant.
- un oculaire permettant de grandir l'image fournie par l'objectif et d'augmenter le confort de l'utilisateur en fournissant une image « à l'infini » (les rayons arrivent parallèles comme si ils venaient de très loin) ne nécessitant pas d'accommodation de l'œil.

De façon simplifiée, un microscope peut être représenté sous la forme de deux lentilles convergentes (Figure 4.7). La première, l'objectif, sert à apporter une image $A'B'$ grossie de l'objet AB . La seconde, l'oculaire, donne une image virtuelle $A''B''$ agrandie de $A'B'$.

4.3.2 Caractéristiques d'un objectif

Chaque objectif est caractérisé par son pouvoir grossissant. Il est défini par le rapport du diamètre apparent de l'image à celui de l'objet observé à l'œil nu à une distance de 25cm. De manière générale on trouve des objectifs dont le grossissement varie de 2x à 100x.

La seconde grandeur caractéristique d'un objectif est son ouverture numérique notée NA (Numerical Aperture) qui varie entre 0,2 et 1,4 suivant les objectifs. L'ouverture numérique est définie par la formule suivante : $NA = n_0 \sin(i_0)$ où n_0 est l'indice de réfraction du milieu d'observation et i_0 l'angle entre l'axe optique et le rayon le plus écarté de l'axe optique rentrant dans la lentille. Plus l'ouverture numérique est élevée, plus la résolution sera élevée.

On distingue également deux grandes familles d'objectifs : les objectifs à air et les objectifs à immersion.

Une gouttelette d'huile ou d'eau (suivant les caractéristiques de l'objectif) permet de maintenir un indice plus homogène entre l'échantillon et l'objectif. La qualité de l'image s'en trouve améliorée notamment pour des objets observés à fort grossissement (Figure 4.8).

Enfin, les lentilles d'un objectif peuvent également être optimisées pour l'infrarouge par exemple à l'aide de revêtements (coating) spéciaux.

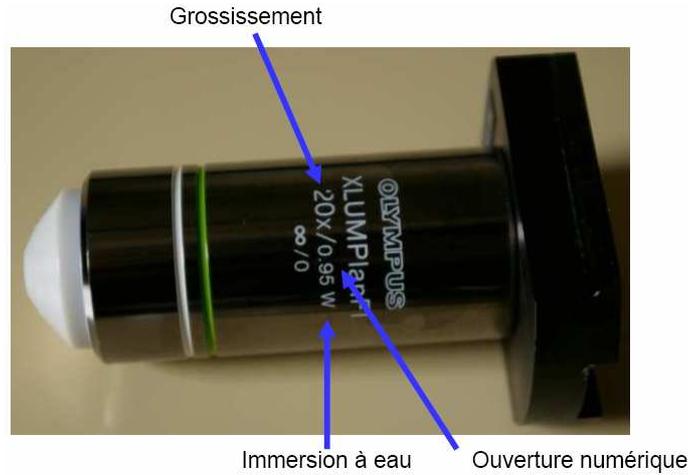


Figure 4.8 : Caractéristiques d'un objectif.

4.3.3 Résolution

Le grossissement de l'objectif et la résolution sont deux paramètres bien différenciés. En effet un objectif de 100x peut avoir une moins bonne résolution qu'un objectif de 60x. La résolution est la valeur en dessous de laquelle il est impossible de discriminer deux points distincts. Si l'on considère la lumière comme une onde et si l'on considère l'objet observé comme un ensemble de points lumineux, chaque point forme une figure de diffraction dans le plan image baptisé disque d'Airy. Si deux figures de diffraction de deux points distincts se superposent trop, l'image ne sera pas résolue (Figure 4.9). On calcule la résolution d en utilisant la formule suivante : $d = 0,61 \lambda / NA$. Elle dépend à la fois de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique.

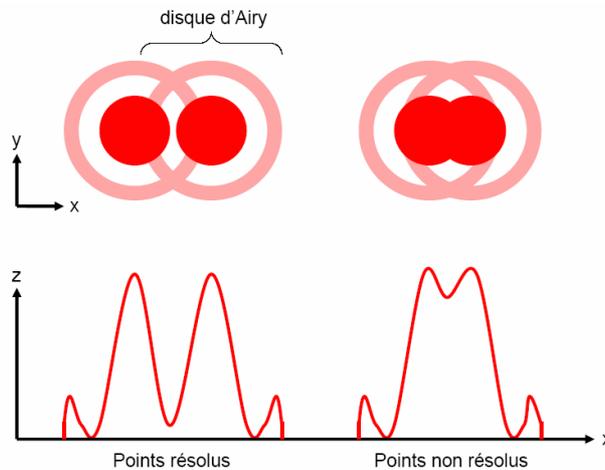


Figure 4.9 : Limite de résolution entre deux points.

4.4 Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence utilise un type de contraste différent de la microscopie à fond clair. La structure d'intérêt est marquée à l'aide d'une sonde fluorescente. La lumière émise provient donc uniquement de cette structure et le contraste est grandement amélioré car le reste de l'échantillon apparaît en noir¹⁰⁵.

4.4.1 Principe de la fluorescence

Lorsqu'une molécule fluorescente est excitée par un photon de longueur d'onde λ_1 et d'énergie suffisante e_1 , l'énergie de ce photon est absorbé par un électron périphérique qui va passer d'une orbitale basse (état fondamental) à une orbitale haute (état excité). L'électron va ensuite se désexciter et revenir à son état fondamental en émettant un photon d'énergie e_2 et de longueur d'onde λ_2 . La longueur d'onde d'excitation λ_1 est inférieure à celle (λ_2) d'émission ; l'énergie e_1 du photon d'excitation est plus élevée que l'énergie e_2 du photon émis. Un fluorophore tel que la rhodamine sera excité par de la lumière verte et émettra de la lumière rouge. On appelle ce phénomène le décalage de Stokes (Figure 4.10, 4.11). La perte d'énergie est due aux états vibrationnels et notamment à la perte de chaleur dans le milieu.

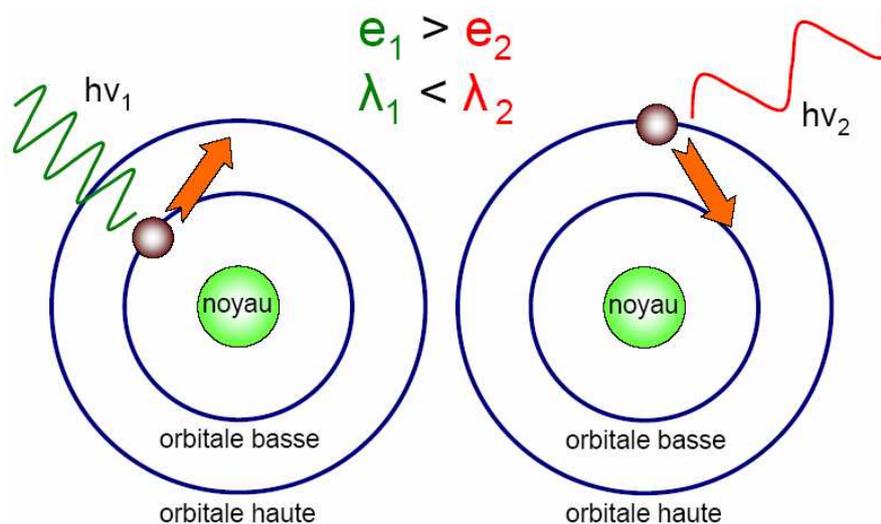


Figure 4.10 : Principe de la fluorescence.

Chaque molécule fluorescente possède des propriétés propres et ne pourra être excitée que dans une certaine gamme de longueurs d'onde. De même la fluorescence émise n'aura lieu

que dans une gamme spectrale bien précise. On définit donc pour chaque fluorophore un spectre d'excitation et un spectre d'émission. Afin de présenter un maximum d'intérêt pour une application en microscopie de fluorescence, la molécule doit présenter des pics d'excitation et d'émission bien distincts ainsi qu'un minimum d'overlap entre les deux spectres (Figure 4.11 ; Table 4.1).

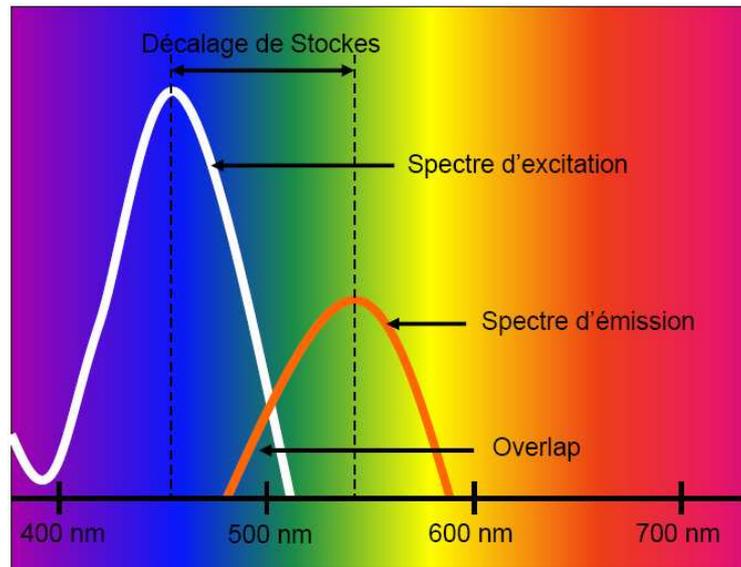


Figure 4.11 : Spectres d'excitation et d'émission d'un fluorophore.

| <u>Fluorophore</u> | <u>Longueur d'onde d'excitation (en nm)</u> | <u>Longueur d'onde d'émission (en nm)</u> |
|---------------------|---|---|
| Hoechst 33342 | 355 | 465 |
| DAPI | 372 | 456 |
| FITC | 490 | 520 |
| Acridine orange | 490 | 590 |
| Rhodamine 123 | 510 | 534 |
| Rhodamine 6G | 530 | 590 |
| Iodure de propidium | 530 | 615 |
| TRITC | 541 | 572 |

Table 4.1 : Caractéristiques spectrales de quelques fluorophores.

4.4.2 Anatomie d'un microscope à fluorescence.

De manière générale, les microscopes à fluorescence sont également équipés pour faire de la microscopie à fond clair et ils possèdent certaines similitudes avec ces derniers.

Si l'on s'intéresse aux différents éléments trouvés sur le trajet optique, nous allons rencontrer une source lumineuse (généralement une lampe à mercure) qui va posséder différents pics caractéristiques à des longueur d'onde données. Un premier filtre va ensuite

sélectionner une longueur d'onde λ_1 précise afin d'obtenir un faisceau monochromatique. Ce faisceau va être réfléchi sur un miroir dichroïque pour être dirigé vers l'objectif qui va le focaliser sur l'échantillon. Les fluorophores vont alors être excités et émettre des photons de fluorescence de longueur d'onde λ_2 . L'objectif va collecter les photons de fluorescence (on parle alors dans ce cas là d'épiscollection en opposition à transmission car la source de lumière et l'observateur ne sont pas situés de part et d'autre de l'échantillon). Le faisceau va ensuite traverser le miroir dichroïque puis un second filtre afin de sélectionner uniquement les longueurs d'onde émises suite à l'excitation du fluorophore (Figure 4.12).

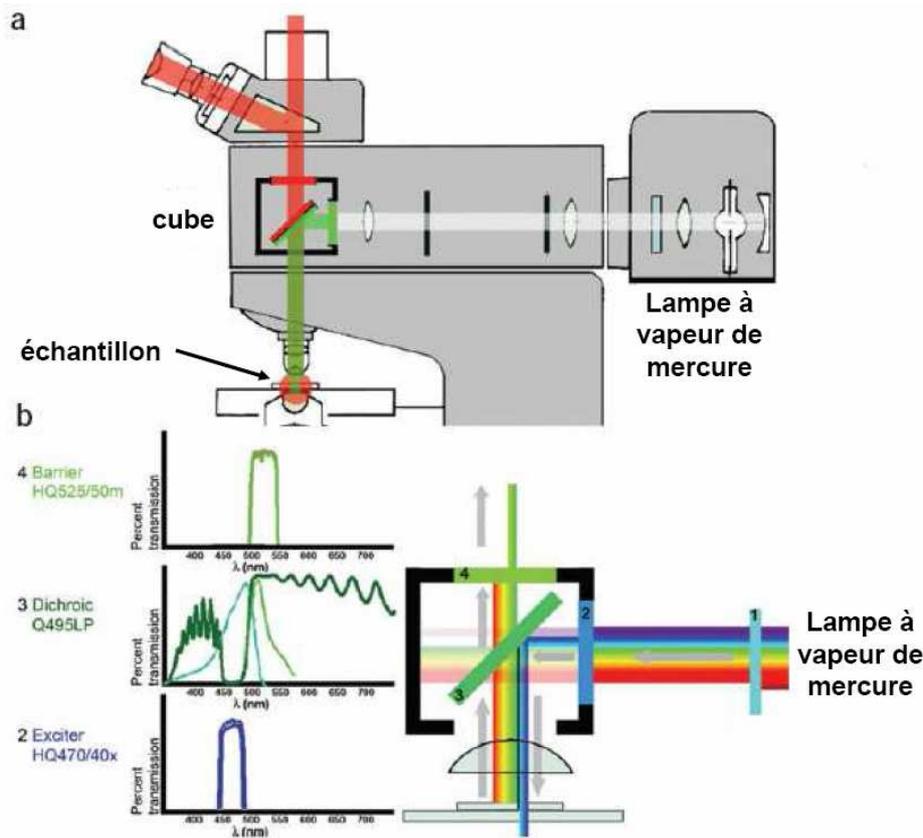


Figure 4.12 : Représentation simplifiée d'un microscope à fluorescence.

A. Profil complet du microscope. B. Schématisation du coin de cube contenant le miroir dichroïque et les filtres (leurs caractéristiques sont indiqués dans les spectres de transmission à gauche : 1. filtre coupant l'infrarouge ; 2. filtre de sélection de la longueur d'onde d'excitation λ_1 ; 3. miroir dichroïque ; 4. filtre de sélection de la longueur d'onde de fluorescence λ_2 . Modifié d'après ¹⁰⁵.

Comme nous venons de le constater, les éléments centraux du dispositif sont les filtres ainsi que le miroir dichroïque. On retrouve en général ces éléments installés sur un cube, lui-même positionné sur une plate forme pivotante afin d'avoir accès à plusieurs configurations différentes sur le même microscope.

Si l'on s'intéresse aux différentes caractéristiques de ces éléments, on distingue plusieurs catégories de filtres :

- les filtres passe-haut qui ne laissent passer que les longueurs d'onde supérieures à une longueur d'onde de coupure.
- les filtres passe-bas qui ne laissent passer que les longueurs d'ondes inférieures à une longueur d'onde de coupure.
- les filtres passe-bande qui ne laissent passer que les longueurs d'onde comprises entre deux valeurs limites. Un filtre HQ 620/60 par exemple ne laissera passer que les longueurs d'onde comprises entre 590 et 650 nm.

Le miroir dichroïque possède une longueur d'onde de coupure. Les longueurs d'onde inférieures à cette valeur seront reflétées, les longueurs d'ondes supérieures seront transmises.

4.4.3 Méthodes de coloration

Il existe plusieurs manières d'obtenir un signal en microscopie à fluorescence : l'utilisation des propriétés d'endofluorescence de certaines molécules, l'utilisation de colorants fluorescents qui vont se fixer sur des molécules d'intérêt, la transgénèse et l'immunochimie. L'endofluorescence est peu utilisée en microscopie à fluorescence classique²⁸, nous nous attarderons donc par la suite sur les trois principales méthodes de coloration les plus répandues dans les laboratoires.

4.4.3.1 Colorants fluorescents

Leur utilisation est très répandue, notamment pour le marquage de l'ADN. Le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), le Hoechst 33342 (bisbenzimidazole) et l'iodure de propidium sont les plus représentatifs et permettent de marquer le noyau des cellules. En utilisant les propriétés de ces colorants qui ne fluorescent que s'ils sont fixés à l'ADN, Dunn *et al.* ont proposé une méthode de quantification de la mort cellulaire dans le rein¹⁰⁶. Le Hoechst 33342 se fixe dans le noyau de toutes les cellules et émet une fluorescence dans le bleu. L'iodure de propidium se fixe uniquement sur l'ADN de cellules dont la membrane est perméabilisée (la cellule est donc morte) en émettant alors une fluorescence dans le rouge. Par une méthode d'imagerie différentielle, il est alors possible de connaître la proportion de cellules vivantes.

²⁸ Nous verrons par la suite que les propriétés d'endofluorescence peuvent avoir un grand intérêt en microscopie biphotonique.

D'autres colorants permettent de marquer d'autres structures cellulaires comme la rhodamine 6G ou la rhodamine 123 qui colorent les mitochondries^{107; 108}.

4.4.3.2 Transgénèse

La GFP (Green Fluorescent Protein) est une protéine extraite de la méduse *Aequorea victoria* ayant la propriété d'émettre une fluorescence de couleur verte. Si l'on combine le gène codant pour cette protéine avec le promoteur de la protéine que l'on souhaite étudier, il est possible d'obtenir des cellules ou des animaux transgéniques possédant la protéine de fusion fluorescente. On peut alors étudier *in vivo* le comportement de cette protéine au cours du temps ou dans des conditions pathophysiologiques.

Il existe d'autres protéines fluorescentes pouvant être utilisées telles que la CFP (Cyan Fluorescent Protein), la YFP (Yellow Fluorescent Protein) ou encore les Coral Reef Proteins.

4.4.3.3 Immunochimie

L'immunochimie¹⁰⁹ peut porter deux noms différents en fonction de la structure étudiée. Si l'on travaille uniquement sur cellules isolées, le terme immunocytochimie sera préféré ; si l'on travaille sur des coupes d'organes ou de tissus, on utilisera le terme immunohistochimie. Les protocoles de marquage restent semblables, seule la nature de l'échantillon étudié est à l'origine de la différence d'appellation.

Cette méthode de coloration consiste à marquer une molécule d'intérêt à l'aide d'anticorps qui lui sont spécifiques puis de détecter le premier anticorps (dit primaire) à l'aide d'un second anticorps marqué par un fluorophore²⁹. L'anticorps secondaire, polyclonal, sert également à amplifier le signal.

De manière générale, un immunomarquage est réalisé selon le protocole suivant :

- fixation de l'échantillon (paraformaldehyde, ...).
- perméabilisation des membranes (si la structure à marquer est intracellulaire).
- saturation des sites, afin d'obtenir par la suite un marquage avec une meilleure spécificité.
- incubation avec l'anticorps primaire qui va se fixer de façon spécifique sur son antigène.

²⁹ Il est également possible de coupler l'anticorps secondaire à d'autres molécules qui pourront permettre une observation par microscopie à fond clair.

- incubation avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore. Cet anticorps est spécifique du premier et permet également une amplification du signal.
- montage avec un liquide contenant le plus souvent un colorant fluorescent tel que le Hoechst 33342 afin de marquer également les noyaux des cellules.

Entre chaque étape, plusieurs lavages successifs permettent de diminuer le bruit de fond et donc d'obtenir un meilleur contraste (Figure 4.13).

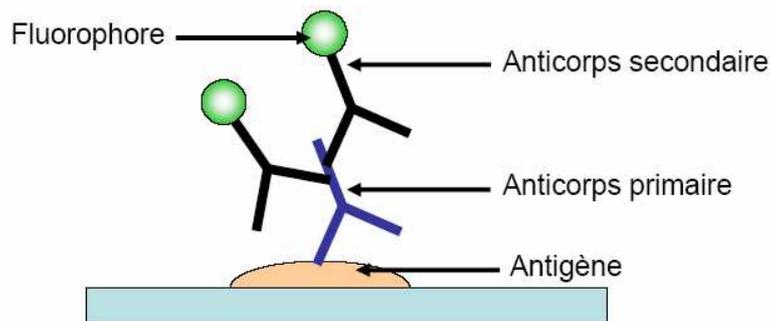


Figure 4.13 : Principe de base de l'immunochimie. L'antigène est la structure reconnue par l'anticorps.

4.4.4 Avantages et Inconvénients

La microscopie à fluorescence permet d'obtenir des images d'un meilleur contraste où seules les structures d'intérêt apparaissent. De même, l'ingénierie de nouvelles molécules fluorescentes telles que les Alexa possédant des spectres d'émission et d'excitation avec une gamme spectrale très fine, a permis de réaliser de nombreux co-marquages sur un même échantillon. L'interaction entre plusieurs molécules peut être alors observée.

Cependant la microscopie de fluorescence présente également deux désavantages majeurs :

- Le premier est lié aux propriétés des molécules fluorescentes. Certaines molécules peuvent présenter un rapide photoblanchiment suite à leur excitation. Ce phénomène est dû à la photodestruction du fluorophore et empêche alors un suivi longitudinal lors de l'expérience. De même certains fluorophores peuvent induire une phototoxicité qui doit être prise en compte lors d'études faites sur échantillons vivants (cellules par exemple).
- Le second est lié au fait que l'excitation n'est pas limitée au seul point focal de l'objectif, on note également un cône d'excitation de part et d'autre de ce point. La fluorescence collectée est donc « parasitée » par les excitations ayant eu lieu dans ces

cônes. Le résultat est un flou visible sur les images et donc une diminution de la résolution. Ce phénomène peut être corrigé par des méthodes de déconvolution (traitement du signal post acquisition). Cependant le développement de nombreuses sources laser a permis l'apparition d'un autre type de microscopie utilisant la fluorescence et s'affranchissant de ce problème : la microscopie confocale.

4.5 Microscopie confocale

La microscopie confocale est une méthode utilisant également les propriétés de fluorescence de certaines molécules¹¹⁰. Cependant, contrairement à la microscopie à fluorescence classique, elle permet d'obtenir des images mieux résolues en s'affranchissant de la fluorescence émise dans les cônes se trouvant de part et d'autres du point focal de l'objectif. Les images obtenues, baptisées sections optiques, sont donc d'une plus grande netteté. De même la motorisation de l'objectif selon l'axe z permet de réaliser des sections optiques à différents niveaux de l'échantillon afin de pouvoir obtenir des reconstitutions tridimensionnelles par la suite.

La microscopie confocale est une microscopie de balayage, c'est-à-dire que l'échantillon est considéré comme une grille et que l'excitation et l'acquisition du signal vont avoir lieu successivement pour tous les points. Chaque point de la grille correspond alors à un pixel sur l'image finale.

4.5.1 Anatomie d'un microscope confocal

La source lumineuse en microscopie confocale doit être particulièrement intense et focalisée, c'est pourquoi les lasers sont utilisés comme sources dans la majorité des cas (Table 4.2).

Si l'on suit le trajet optique, le faisceau laser va d'abord être réfléchi par un miroir dichroïque avant d'être envoyé sur des miroirs galvanométriques qui vont permettre de réaliser un balayage sur l'ensemble de la zone d'intérêt dans l'échantillon. Le faisceau va alors traverser l'objectif et exciter les fluorophores. La fluorescence émise va être collectée par l'objectif, réfléchi à nouveau par les miroirs galvanométriques (on dit alors qu'elle est « descannée ») puis elle va traverser le miroir dichroïque, une lentille convergente et le diaphragme confocal avant d'arriver sur le détecteur. De manière générale, le détecteur utilisé est un tube photomultiplicateur (PMT) dont le signal va être amplifié avant d'être traité par un ordinateur

pour reconstruire l'image. On trouve également des filtres entre le miroir dichroïque et le PMT afin de sélectionner les longueurs d'onde de fluorescence recueillies (Figure 4.14).

L'élément central du système est le diaphragme confocal (également appelé pinhole) localisé devant le PMT au niveau du plan focal conjugué à celui de l'objectif (d'où l'appellation « confocal ») (Figure 4.15). Le pinhole va couper les faisceaux de fluorescence n'ayant pas été émis au niveau du plan focal de l'objectif, la fluorescence parasite n'atteint donc pas le détecteur.

L'épaisseur de la section optique varie en fonction de l'ouverture du diaphragme confocal. Plus l'ouverture est faible, plus la tranche sera fine et nette. Cependant à partir d'une certaine valeur (limite de résolution) la fermeture du diaphragme n'entraîne plus d'augmentation de la qualité mais une réduction de l'intensité lumineuse.

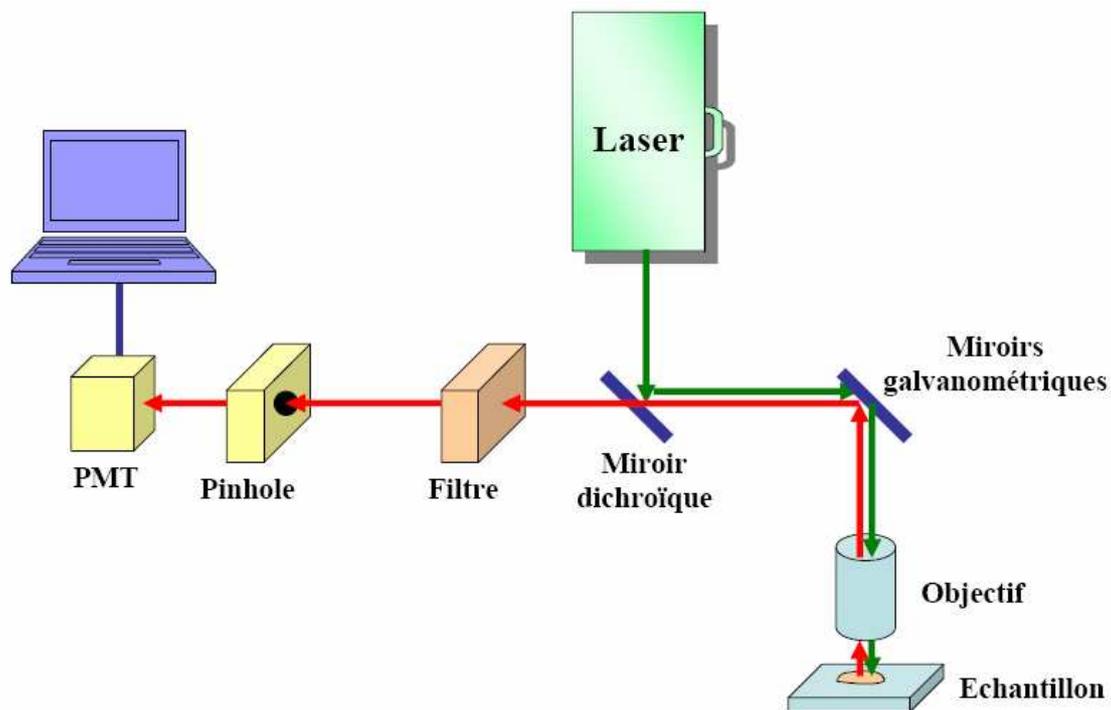


Figure 4.14 : Représentation simplifiée d'un microscope confocal à balayage.

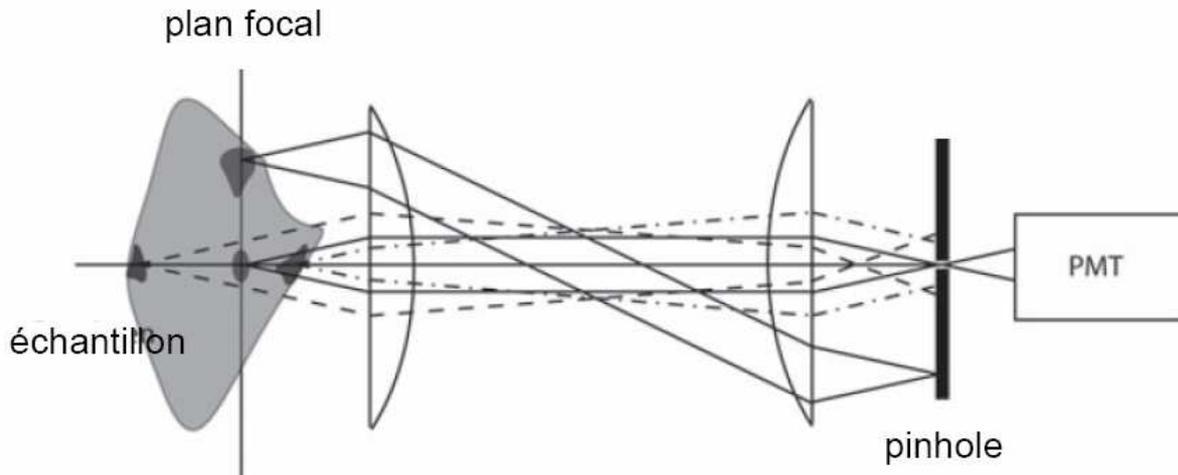


Figure 4.15 : Diagramme optique simplifié d'un microscope confocal.

Seule la fluorescence émise au niveau du plan focal est focalisée dans le plan image au niveau du diaphragme confocal (lignes pleines). La fluorescence émise en dehors du plan focal ne sera pas focalisée sur le plan image conjugué au diagramme confocal (lignes brisées). Seule la lumière émise au niveau du point focal pourra traverser le pinhole et atteindre le PMT. Modifié d'après ¹¹⁰.

| <u>Laser</u> | <u>Raies d'excitation</u> | <u>Puissance (en mW)</u> |
|-----------------------|---------------------------|--------------------------|
| Argon (Ar) | 458 | 5 |
| | 476 | 5 |
| | 488 | 20 |
| | 514 | 20 |
| Argon-Krypton (Ar-Kr) | 488 | 3 - 15 |
| | 568 | 3 - 15 |
| | 647 | 3 - 15 |
| Helium-Neon (He-Ne) | 543 | 1,2 |
| | 633 | 10 |

Table 4.2 : Caractéristiques des principaux lasers utilisés en microscopie confocale.

4.5.2 Résolution

En microscopie à fond clair et en microscopie à fluorescence, seule la résolution latérale (x,y) est définie : $d = 0,61 \lambda / NA$ (voir 4.3.3). En microscopie confocale, la résolution axiale (z) doit également être considérée. Elle prend en compte l'ouverture numérique de l'objectif mais aussi l'indice de réfraction du milieu. A ouverture numérique identique, un objectif à immersion à huile ($n=1,54$) aura une moins bonne résolution axiale qu'un objectif à air ($n=1$). La résolution axiale est définie comme la largeur maximale à mi-hauteur (FWHM) du disque d'Airy selon l'axe z. Elle est donnée par l'équation suivante : $FWHM = 1,4 n \lambda / NA^2$. En règle générale, elle est moins bonne que la résolution latérale.

4.5.3 Avantages et Inconvénients

Depuis le début des années 1990 la microscopie confocale s'est imposée dans de nombreux laboratoires de recherche. En utilisant des techniques de coloration similaires à celles utilisées en microscopie à fluorescence (colorants fluorescents, immunochimie, transgénèse), il est possible d'obtenir des images avec une meilleure résolution latérale ainsi que des informations tridimensionnelles.

Ses principaux inconvénients restent le photoblanchiment des fluorophores, les photodommages cellulaires induits par la focalisation d'un laser avec une puissance importante et le coût d'une source laser d'excitation inférieure à 450nm³⁰. Elle demeure cependant la méthode de référence pour toutes les études menées sur cellules.

En imagerie *in vivo*, la profondeur d'observation a également été améliorée afin de permettre des études pouvant aller jusqu'à 200µm de profondeur dans le cerveau¹¹¹. Malgré cela, cette profondeur reste insuffisante pour conduire des expérimentations couvrant la totalité de l'épaisseur du cortex cérébral par exemple. L'utilisation de la microscopie confocale pour des études intravitales est donc limitée par le fait que les photons d'excitation ainsi que les photons de fluorescence sont diffusés lors de leur passage au travers d'importantes épaisseurs de tissu. Cette limite fut repoussée par l'apparition dans les années 1990 de la microscopie biphotonique.

4.6 La microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique a été inventée en 1990 par Denk, Strickler et Webb¹⁰². Tout comme la microscopie confocale, il s'agit d'une méthode à balayage laser. Son utilisation pour des applications biologiques s'est « démocratisée » à la fin des années 1990 et en l'espace de quelques années elle est devenue une méthode de référence aussi bien pour des études cellulaires que pour des études intravitales^{112; 113}. Elle combine la bonne résolution spatiale et la bonne résolution temporelle de la microscopie confocale tout en offrant des profondeurs d'observation allant jusqu'à un millimètre dans certains tissus.

³⁰ De telles sources existent mais leur coût ainsi que leur entretien font qu'elles ne sont pas présentes sur la majorité des installations.

4.6.1 Bases physiques

La microscopie biphotonique appartient à la famille des techniques faisant appel à l'optique non linéaire¹¹⁴. Elle repose sur le principe d'absorption simultanée de deux photons par un fluorochrome. Un électron périphérique va alors passer d'un état de repos à un état excité en transitant par un niveau virtuel dont la durée de vie est de l'ordre de la femtoseconde. L'électron va ensuite revenir à son état de fondamental en émettant un photon de fluorescence (Figure 4.16).

L'énergie des deux photons excitateurs va s'additionner, l'énergie du photon de fluorescence sera inférieure à la somme des énergies des deux photons excitateurs. Dans la plupart des cas on utilise un laser délivrant une lumière dans l'infrarouge. Si l'on considère une excitation à 800nm, deux photons se combinent pour entraîner une excitation d'énergie double et ainsi mimer celle d'un photon à 400nm.

Pour obtenir un tel phénomène, le laser doit produire une très forte intensité lumineuse sur une très courte période de temps (de l'ordre de la femtoseconde = durée du niveau virtuel) ; cependant, de nombreux échantillons biologiques ne peuvent pas supporter de si fortes puissances. C'est pour cela que l'excitation est réalisée par un laser pulsé permettant de produire de très fortes intensités sur un court laps de temps avec une puissance moyenne faible. Les lasers permettant d'obtenir de tels paramètres sont des lasers à solide (généralement Titane-Saphir) appelés lasers femtosecondes pompés par un second laser continu (généralement Nd : YVO₄), lui-même pompé par des diodes laser.

Ces lasers présentent également l'avantage d'être accordable (principalement entre 700 et 1000 nm) contrairement à ceux utilisés en microscopie confocale (voir Table 4.2).

De même l'excitation efficace n'est produite qu'au niveau du point focal de l'objectif, la probabilité que deux photons balistiques (photons n'ayant pas subi de diffusion) atteignent simultanément le fluorophore dans un laps de temps assez court pour permettre la transition à deux photons est maximale à cet endroit. Contrairement à la microscopie confocale, il n'y aura pas de cône d'excitation de part et d'autre du point focal et toute la fluorescence émise pourra alors être récupérée¹¹⁵ (Figure 4.17).

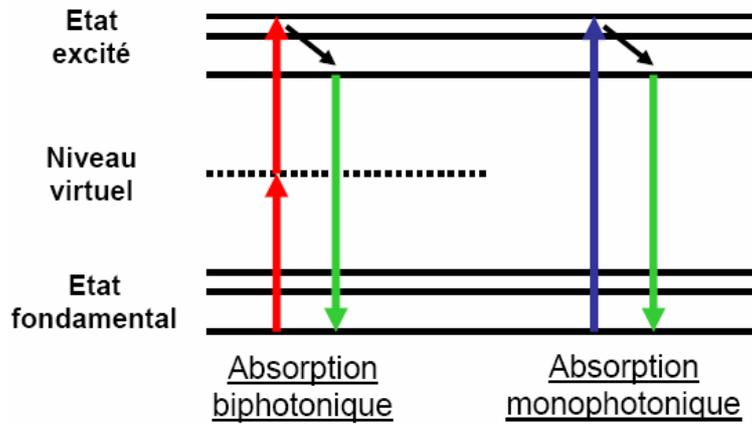


Figure 4.16 : Diagramme de Jablonski.

Comparaison entre une absorption biphotonique et monophotonique. En biphotonique, le passage de l'état de repos à l'état excité se fait via un niveau virtuel dont la durée de vie est de quelques femtosecondes.

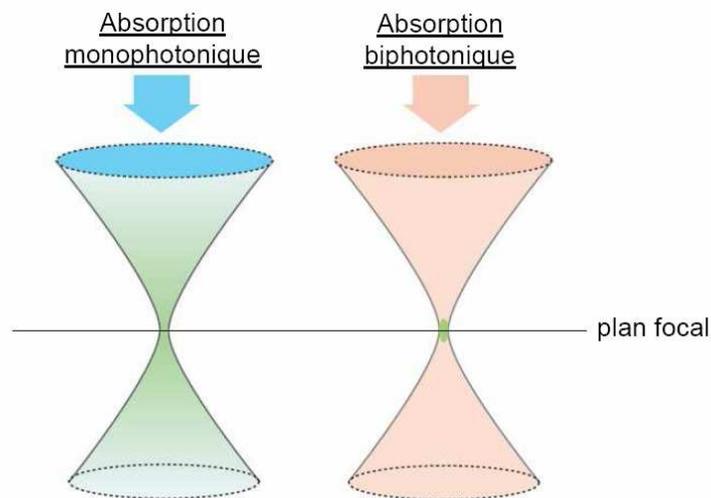


Figure 4.17 : Comparaison mono / biphotonique.

En mode monophotonique (représenté par une excitation dans le bleu) on note l'émission d'une fluorescence verte au niveau du point focal de l'objectif mais aussi dans 2 cônes situés de part et d'autre de ce point. En mode biphotonique (représenté en rose), l'excitation a eu lieu dans l'infrarouge ; la fluorescence est limitée au point focal. Modifié d'après¹¹⁴.

4.6.2 Anatomie d'un microscope biphotonique

Les microscopes biphotoniques actuels sont souvent des microscopes confocaux ayant subi un certain nombre de modifications. Il s'agit également d'un type de microscopie à balayage laser mais le trajet optique présente quelques différences.

Comme nous avons pu le voir précédemment, la source lumineuse est un laser femtoseconde émettant dans l'infrarouge. Le faisceau laser va être réfléchi par des miroirs galvanométriques, traverser un miroir dichroïque m1 avant d'être focalisé sur l'échantillon par l'objectif. La fluorescence émise va être collectée par le même objectif avant d'être réfléchi par le miroir dichroïque m1 pour arriver sur un second miroir dichroïque m2 placé sur un cube. La fluorescence va être séparée grâce à m2, filtrée en sortie du cube et arriver sur l'un des deux PMTs. Il est donc possible d'acquérir simultanément deux gammes de longueurs d'ondes différentes excitées par la même source laser³¹ (Figure 4.18).

Comme nous venons de le voir et contrairement au microscope confocal, la fluorescence n'a pas à être « descannée ».

De même, la fluorescence étant restreinte au niveau du point focal, toute la lumière émise peut être collectée (l'utilisation d'objectifs de forte ouverture numérique augmente alors la qualité du signal), l'utilisation de pinhole n'est donc pas nécessaire.

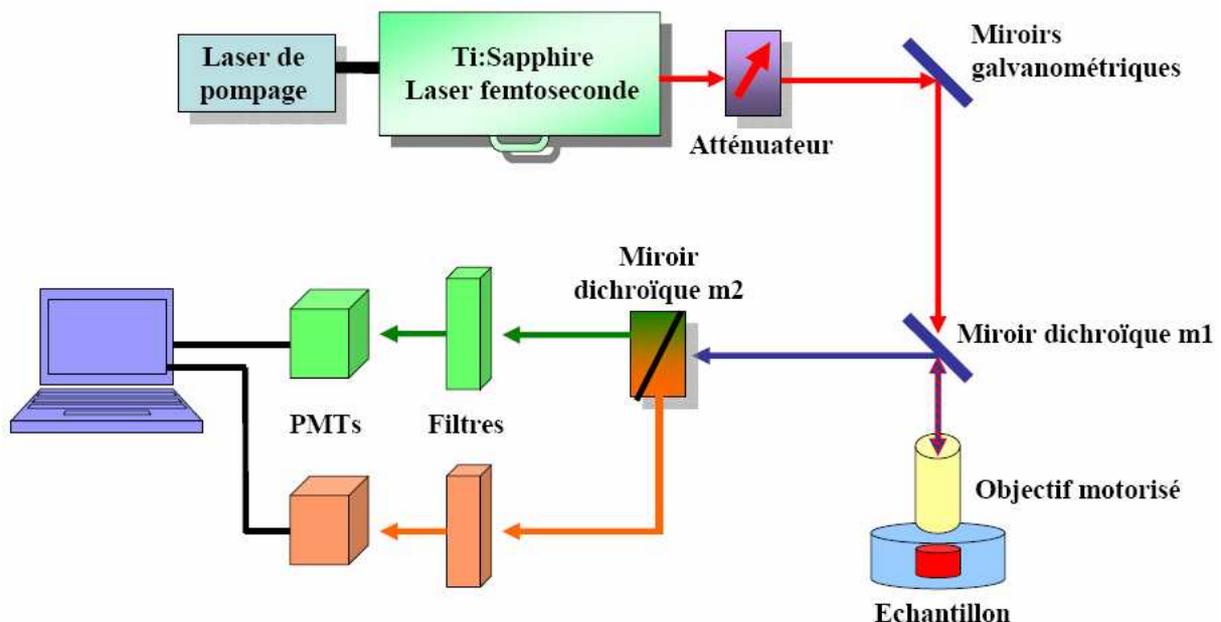


Figure 4.18 : Représentation simplifiée d'un microscope biphotonique.

³¹ Il est également possible d'utiliser plus de PMTs afin d'augmenter le nombre de voies d'acquisition. On pourra alors placer un prisme à la place du miroir dichroïque m2 qui séparera les différentes longueurs d'onde.

4.6.3 Acquisition du signal

Nous avons pu voir que le faisceau laser balaye la totalité de la zone d'intérêt sur l'échantillon et la fluorescence émise est par la suite collectée par les PMTs. Cependant, afin d'obtenir une image exploitable, le signal doit être amplifié et numérisé. La numérisation peut se résumer en deux opérations dont le résultat influera sur la qualité de l'image.

- L'échantillonnage consiste à découper le signal à intervalles de temps réguliers. La zone d'intérêt est donc représentée sous forme d'une grille. A chaque point de la grille correspond un pixel sur l'image finale. En règle générale on acquiert des images sur une grille de 512x512 pixels.
- La quantification consiste à donner à chaque pixel une valeur numérique proportionnelle à l'intensité de la lumière collectée. Pour ce faire, on utilise un convertisseur analogique/numérique à 8 bits³² afin d'obtenir des images avec $2^8 = 256$ niveaux de gris.

Si la quantification est souvent un paramètre propre à l'instrument qu'il est difficile de modifier via les interfaces d'acquisition, l'échantillonnage peut très souvent être choisi par l'utilisateur. Le choix de ce paramètre doit être réfléchi car la résolution de l'image finale en dépend. L'intervalle d'échantillonnage doit être inférieur ou égal à la moitié de la taille du plus petit objet à résoudre. En dessous de deux pixels par élément de résolution (resel), l'image sera mal résolue (Figure 4.19).

Considérons un objectif de 20x dont l'ouverture numérique est de 0,95 ; sa résolution latérale est donc égale³³ à $d = 0,61 \lambda / NA = 0,36\mu\text{m}$.

Pour obtenir une image d'une très bonne résolution, 3 pixels par élément de résolution s'avèrent nécessaires. Un pixel représente donc un carré de $0,12\mu\text{m}$ de côté. Si l'on effectue un scan de 512x512 pixels, le champ couvert sera alors de $62 \times 62 \mu\text{m}^2$.

Si notre objectif 20x couvre un champ de $600 \times 600 \mu\text{m}^2$ à zoom³⁴ x1, il faudra acquérir à zoom x10 pour avoir une résolution maximale.

³² Certains appareils sont équipés de convertisseurs 12 bits permettant d'obtenir des images avec $2^{12} = 4096$ niveaux de gris.

³³ En considérant une longueur d'onde de 550nm. Détermination expérimentale réalisée au Laboratoire de Spectrométrie Physique, Grenoble – non publiée.

³⁴ Le zoom est réglable sur les interfaces utilisateur et représente une donnée tout a fait distincte de celle indiquée sur l'objectif.

Bien qu'en dessous d'un zoom x10, l'objectif ne soit pas utilisé à sa résolution maximale, il peut s'avérer plus pertinent d'acquérir des images en $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ pour des études intravitales sur la microvascularisation cérébrale par exemple. Le choix de la valeur d'échantillonnage est donc de la plus haute importance et celle-ci doit être déterminée avec précision en fonction de la structure étudiée.

Le même raisonnement est appliqué pour déterminer le taux d'échantillonnage axial (selon la direction z ³⁵).

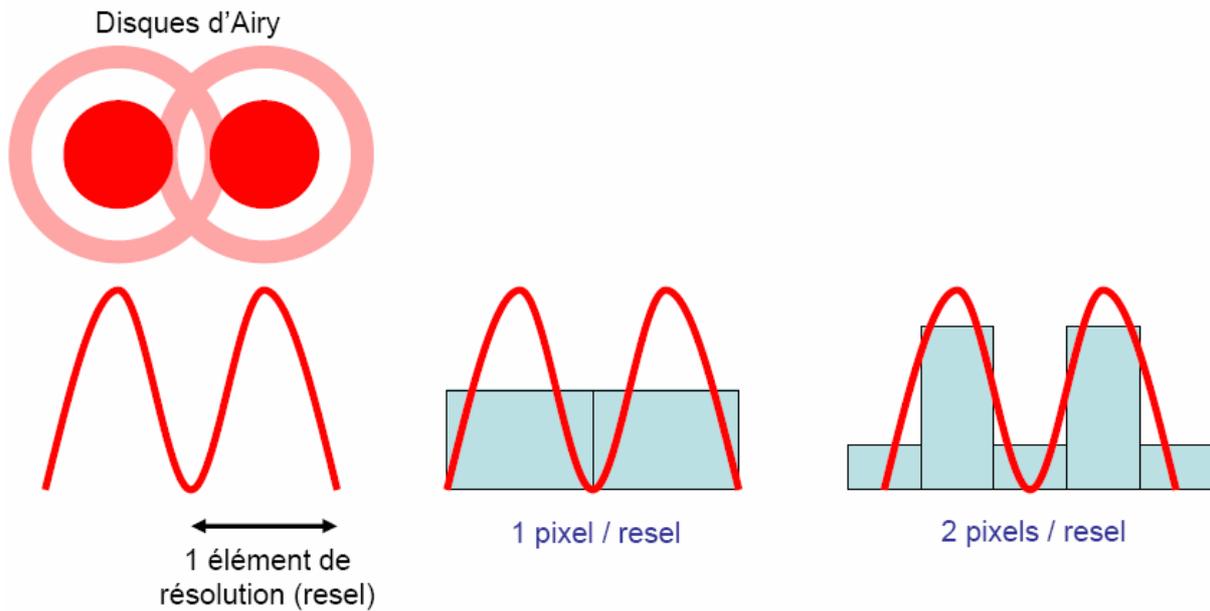


Figure 4.19 : Echantillonnage.

En dessous de deux pixels par élément de résolution (resel), l'image sera mal résolue.

4.6.4 Méthodes de coloration et d'observation en microscopie biphotonique

Le marquage des échantillons en microscopie biphotonique reste identique à celui de la microscopie à fluorescence. Il est donc possible d'observer des colorants fluorescents, des échantillons biologiques présentant des protéines fluorescentes (transgénèse) et de faire appel aux techniques d'immunochimie décrites précédemment. L'utilisation des propriétés d'endofluorescence de certaines biomolécules tel que le NAD(P)H ou encore les flavines présente un intérêt tout particulier en microscopie biphotonique car de nombreuses structures peuvent être imagées avec précision sans ajout de colorants et sans préparation spécifique de l'échantillon. De même, d'autres phénomènes non linéaires comme la génération de seconde

³⁵ Comme pour la microscopie confocale, la résolution axiale est donnée par la formule $FWHM = 1,4.n.\lambda / NA^2$.

harmonique permettent également d'imager d'autres structures telles que le collagène I et III sans coloration^{116; 117}.

4.6.4.1 Propriétés des fluorophores en microscopie biphotonique

Tout comme en fluorescence classique, un fluorophore excité à deux photons présente un spectre d'absorption et un spectre d'émission. Cependant, outre le fait que la longueur d'onde d'excitation à deux photons est en général le double de celle utilisée en excitation monophotonique, elle peut néanmoins différer. Il est donc important de réaliser cette mesure avant d'entreprendre l'utilisation de tout nouveau colorant.

De même, on définit pour chaque colorant le rendement quantique et la section efficace d'absorption à deux photons (σ_{TPEF}). Le rendement quantique est le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Il est généralement donné sous forme de pourcentage. La section efficace d'absorption à deux photons représente la probabilité d'excitation d'un fluorophore par absorption de deux photons. Son unité est le Goepfert-Mayer³⁶ ($1\text{GM} = 10^{-50} \text{cm}^4\text{s}$).

4.6.4.2 Endofluorescence

De nombreuses molécules fluorescentes endogènes ont été décrites et leurs propriétés sous excitation à deux photons ont été mesurées¹¹⁸. Parmi elles, on trouve les acides aminés aromatiques (Tryptophane, Phenylalanine et Tyrosine), les flavines, le NADPH ainsi que l'élastine. Bien que leur section efficace d'absorption à deux photons soit plus faible que pour des colorants exogènes tels que les rhodamines, leur détection est possible et elle permet d'obtenir des images sans aucune coloration des tissus. Boulesteix et al. ont par exemple observé l'endofluorescence de l'élastine dans la paroi artérielle¹¹⁹. La peau a aussi pu être imagée sans l'aide de colorants exogènes grâce à l'endofluorescence de la kératine¹¹⁷ (Figure 4.20 ; Table 4.3).

³⁶ En hommage à Maria Goepfert-Mayer

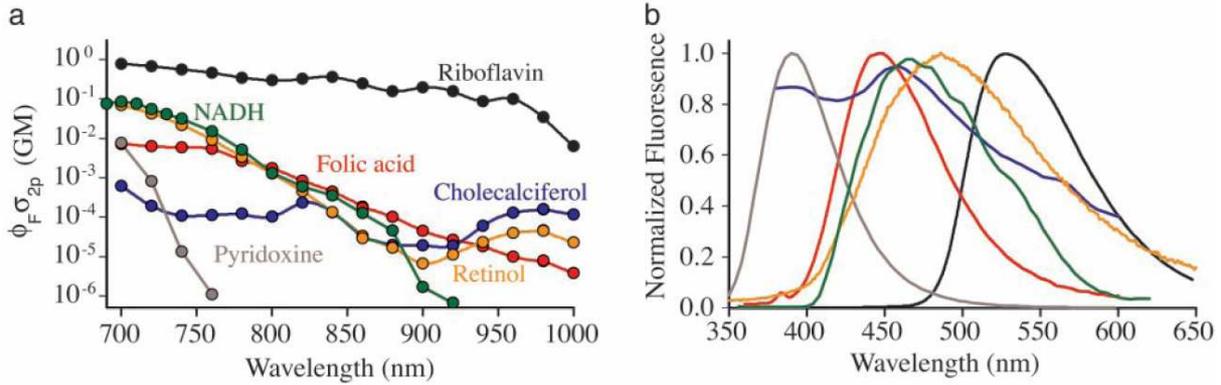


Figure 4.20 : Section efficace à deux photons et spectre d'émission de quelques biomolécules fluorescentes.

a. Section efficace d'absorption à deux photons dite d'action (produit de la section efficace par le rendement quantique) exprimée en Goepfert-Mayer pour 6 biomolécules en fonction de la longueur d'onde d'excitation. b. Spectre d'émission de ces mêmes molécules. Extrait de ¹¹⁸.

| Molécule | Process | λ_{ex} 50% max, nm* | Cross section |
|-----------------|---------|-----------------------------|-----------------------|
| Retinol | 2PE | 700–830 | 7×10^{-52} |
| Flavins | 2PE | 700–730 | $1-8 \times 10^{-51}$ |
| NADH | 2PE | 690–730 | 9×10^{-52} |
| Pyridoxine | 2PE | 690–710 | 8×10^{-53} |
| Folic acid | 2PE | 700–770 | 7×10^{-53} |
| Cholecalciferol | 2PE | <700 | 6×10^{-54} |
| Elastin | 2PE | 700–740 | — |
| NFTs | 2PE | 700–780 | — |
| Lipofuscin | 2PE | 700–850 | High [‡] |
| Collagen | SHG | 700–740 | — |
| Microtubules | SHG | — | — |
| Skel. muscle | SHG | — | — |

Table 4.3 : Longueurs d'onde d'excitation et section efficace d'absorption de quelques biomolécules.

Section efficace d'absorption (en $cm^4.s$) donnée pour des longueurs d'onde dans la gamme des 700nm. *: gamme de longueurs d'onde pour laquelle la section efficace est supérieure à 50% de la valeur du pic. 2PE : Excitation à 2 photons ; SHG : Second harmonic generation. Modifié d'après ¹¹⁸.

4.6.4.3 Génération de Seconde Harmonique

La génération de seconde harmonique (SHG) est une diffusion non linéaire de la lumière dans lequel deux photons interagissant dans un matériau sont combinés pour ne donner qu'un seul d'énergie double et de longueur d'onde divisée par deux. Bien que réalisable sur une installation de microscopie biphotonique de façon simultanée avec l'acquisition de signaux de fluorescence, il ne s'agit pas d'un phénomène d'absorption.

L'imagerie de seconde harmonique permet d'observer des structures non-centrosymétriques tel que le collagène I et III ainsi que la myosine sans aucune coloration exogène^{116; 120}. Si l'on considère une excitation dans le proche infrarouge à 800nm, le signal de second harmonique sera recueilli aux alentours de 400nm, c'est-à-dire dans le proche UV. De manière générale, il est rare de pouvoir dépasser la barre des 100µm à 150µm de profondeur d'observation dans des tissus riches en collagène qui sont fortement diffusants. Il faut cependant noter que le signal SHG a une directionnalité et qu'il sera plus fort en avant, c'est-à-dire que le signal collecté en transmission sera plus important qu'en épiscollection. La collection en transmission s'effectue en plaçant un condenseur et un PMT sous l'échantillon.

Il existe également une autre diffusion baptisée génération de troisième harmonique¹²¹ permettant de visualiser les gouttelettes lipidiques. Cependant, l'emploi de cette méthode implique l'utilisation d'un laser femtoseconde émettant des photons de longueur d'onde proche de 1100nm. Cette technologie est donc pour l'instant très coûteuse et implémentée sur très peu de plateformes optiques.

4.6.5 Paramètres influant sur la profondeur d'observation

Nous avons pu voir précédemment que la profondeur d'observation maximale de la microscopie confocale était de l'ordre de 200µm dans le cerveau. Cette faible profondeur limite considérablement son intérêt pour des applications intravitales.

Si l'on considère un faisceau lumineux traversant un tissu biologique, sa puissance lumineuse va être atténuée par un phénomène d'absorption et de diffusion.

L'absorption des tissus a été caractérisée et on observe entre 650 et 1000nm une fenêtre dite thérapeutique où l'absorption est minimale. On note également une forte absorption dans l'UV due à l'ADN et à certains des acides aminés composant les protéines. Au-dessus de 1000nm, l'absorption par l'eau devient très importante¹²² (Figure 4.21).

Les lasers femtoseconde étant accordables dans le proche infrarouge, l'excitation de l'échantillon se fera à des longueurs d'onde se trouvant dans la fenêtre transparente. La fluorescence émise et le signal de seconde harmonique auront par contre lieu dans des longueurs d'onde comprises entre 400 et 650nm où l'absorption par le sang est élevée. Les images de structures se trouvant sous de gros vaisseaux sanguins seront donc atténuées.

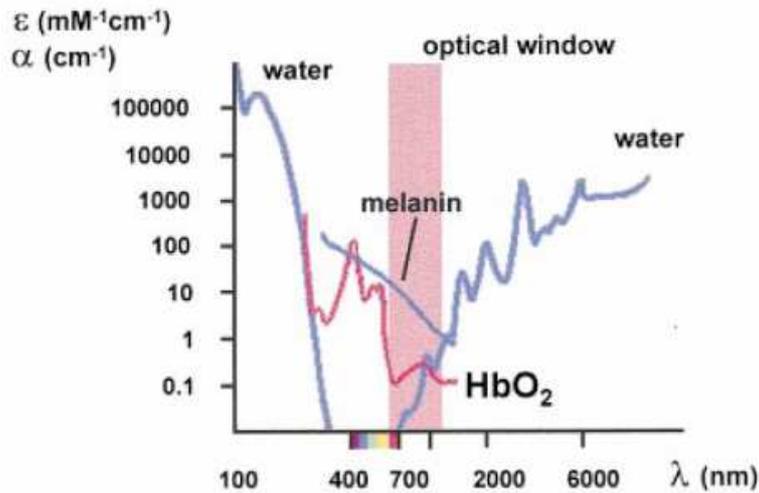


Figure 4.21 : Spectre d'absorption des principales molécules absorbantes des tissus.

On note la présence d'une fenêtre optique également nommée fenêtre transparente où l'absorption est minimale. Traduction : water : eau ; HbO₂ : Oxyhémoglobine ; melanin : mélanine. Extrait de ¹¹².

Cependant, l'absorption n'est pas le phénomène prédominant, la diffusion de la lumière est la principale source de perte de signal. Le libre parcours moyen de diffusion augmente avec la longueur d'onde ; plus la longueur d'onde sera élevée, moins les photons seront diffusés. Le signal des fluorophores émettant dans le rouge pourra donc être capté plus en profondeur que le signal de fluorophores émettant dans le bleu. De même, le signal de seconde harmonique émis aux alentours de 400nm sera difficilement détectable à des profondeurs supérieures à 100µm dans des tissus riches en collagène qui sont fortement diffusants.

4.6.6 Microscopie Biphotonique, Neurosciences et Neuro-oncologie

La microscopie biphotonique présente de très nombreuses applications dans le domaine de la biologie et des sciences biomédicales. De nombreux organes ont ainsi pu être imagés dans des conditions les plus proches de la physiologie. Les artefacts dus à la réalisation des coupes et aux traitements histologiques ont également pu être réduits. La liste non exhaustive des organes étudiés inclut les muscles, les vaisseaux sanguins^{119; 123}, les poumons¹²⁴, les reins¹⁰⁶

ainsi que les ovaires¹¹⁸. Cependant, ce nouveau type de microscopie a également ouvert un grand nombre de perspectives dans le domaine des neurosciences¹²⁵⁻¹²⁹.

Nous allons rapidement nous attarder sur la mise en place d'une observation cérébrale en intravital, puis nous verrons quelques exemples d'imagerie des différents composants du système nerveux (Table 4.4) avant de voir quel peut être l'intérêt de cette méthode d'imagerie dans l'étude des pathologies du système nerveux dont les tumeurs intracrâniennes.

| Labelled structure | Compartment/ subset | Transgenic approach | Fluorophore |
|---------------------------|----------------------|---|-------------------|
| <i>Neurons</i> | | | |
| Cytoplasm | | Thy1-promoter | XFP, coFP |
| | Specific populations | Subtype-specific promoters | XFP |
| Subcellular | Membranes | Thy1-promoter, palmitoylation | XFP |
| | Synaptic vesicles | Thy1-promoter, synaptophysin-fusion | XFP |
| | Mitochondria | Thy1-promoter, coxVIII | CFP, YFP |
| | Vesicular release | Thy1-promoter | SynaptopHluorin |
| | Calcium | CaMKII-promoter, tet-system | Camgaroo, pericam |
| | Chloride | Thy1-promoter | Clomeleon |
| Axon tracts | Corticospinal | Thy1-promoter, conditional | fISTOPfl-YFP |
| | Thalamocortical | Thy1-promoter | XFP |
| <i>Glial cells</i> | | | |
| Schwann cells | | S100-promoter | YFP, GFP |
| Oligodendrocytes | | PLP-promoter | GFP, coFP |
| Astrocytes | | GFAP-promoter | GFP, coFP |
| | | S100-promoter | YFP, GFP |
| Microglia | | CX ₃ CR1-locus S100-promoter | YFP, GFP |
| <i>Vascular component</i> | | | |
| Serum | | Vital dye | Fluor-dextran |
| Erythrocytes | | Vital dye, negative stain | Fluor-dextran |
| Immune cells | | Various immune cell promoters | XFP |
| Endothelium | | TIE2-promoter | GFP |

Table 4.4 : Liste non exhaustive de quelques marqueurs fluorescents (souvent associés à une approche transgénique) pour les applications en neurosciences.

CaMKII, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; CFP, cyan fluorescent protein; coFP, coral derived fluorescent protein; CX3CR1, chemokine (C-X3-C motif) receptor 1; coxVIII: mitochondrial targeting sequence from human cytochrome oxidase subunit VIII; fISTOPfl-YFP, yellow fluorescent protein expression suppressed by floxed stop-sequence; fluor-, fluorophore conjugated; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GFP, green fluorescent protein; PLP, proteolipid protein; tet-system, tetracycline-derivative controlled conditional expression system; TIE2, tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains 2; XFP, green fluorescent or coral fluorescent proteins and their spectral variants YFP, yellow fluorescent protein. Extrait de ¹²⁸.

4.6.6.1 Modélisation animale

Les rongeurs sont les animaux les plus utilisés pour l'observation du cerveau en microscopie biphotonique. Du fait des progrès en matière de transgénèse et du grand nombre de modèles animaux exprimant des protéines fluorescentes, les souris sont les plus représentées. Les études menées sur les rats sont de manière générale réalisées sur de jeunes animaux jusqu'à approximativement 1 mois. Au-delà de ce délai, l'opacité de la dure-mère réduit la profondeur d'observation. Il est possible de la retirer chirurgicalement au moment de l'expérimentation mais cet acte peut entraîner des modifications physiologiques pouvant être incompatibles avec l'étude menée.

Le principal problème rencontré lors d'une observation du cerveau en intravital est l'immobilisation de l'animal. Le temps d'acquisition par image étant approximativement d'une seconde, les mouvements respiratoires peuvent entraîner des zones de décalage sur l'image finale. Le meilleur compromis consiste à bloquer la tête de l'animal dans un cadre stéréotaxique et d'utiliser une anesthésie appropriée. Un mélange de Xylazine et de Kétamine convient, cependant les anesthésies volatiles comme l'isoflurane dans un mélange de dioxygène et de protoxide d'azote offrent de meilleurs résultats.

Afin d'imager en profondeur, un bon accès optique au cortex est nécessaire. Une procédure chirurgicale est dès lors mise en place et peut être effectuée de 3 façons :

- l'os du crâne est retiré sur une petite surface à la verticale de la zone du cortex que l'on souhaite observer (Figure 4.22 A).
- l'os du crâne est retiré puis remplacé par une fenêtre en quartz permettant de réaliser un suivi longitudinal sur le même animal (Figure 4.22 B).
- l'os du crâne est affiné à l'aide d'une fraise dentaire, l'observation est réalisée au travers de la mince lamelle restante. Cette technique limite la profondeur d'observation (au maximum 200 μ m) à cause de la forte diffusion des photons par l'os (Figure 4.22 C).

Dans les trois cas, l'objectif du microscope est ensuite placé en immersion dans du liquide physiologique ou du liquide cérébro-spinal artificiel à la verticale de la zone à observer (Figure 4.22).

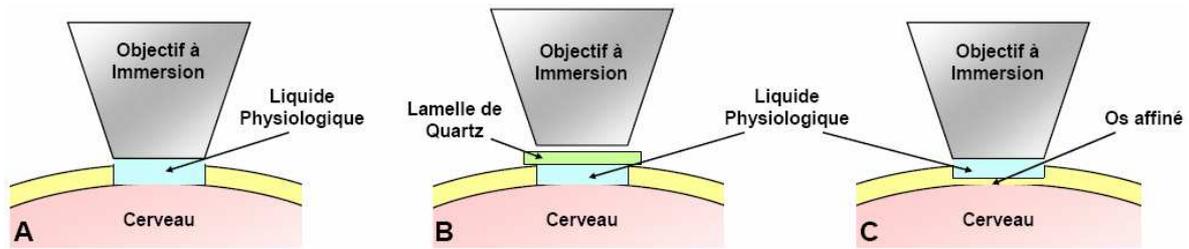


Figure 4.22 : les 3 types de procédures chirurgicales pour pouvoir imager le cerveau.

4.6.6.2 Imagerie des différents composants du système nerveux

4.6.6.2.1 *Neurones*

La fonction première des neurones est de transmettre des signaux électriques dans un réseau qui subit de perpétuelles modifications du fait de la formation, du renforcement ou de l'élimination de synapses. En comparaison avec les méthodes classiques de mesure de potentiels à l'aide d'électrodes ou d'analyse de l'ultrastructure sur échantillons fixés, la microscopie biphotonique apporte une réelle amélioration en terme d'informations recueillies. Les observations de neurones sont de manière générale réalisées en intravital dans le cortex cérébral ou sur des tranches maintenues en vie dans un milieu nutritif oxygéné^{130; 131}.

L'activité électrique des neurones est presque toujours associée à des modifications de concentration en Ca^{2+} libre. Ces modifications peuvent être observées par des méthodes optiques, car les modifications de concentration peuvent dépasser le facteur 1000 et un grand nombre d'indicateurs fluorescents est disponible. C'est le cas par exemple du Fluo-4 ou du Calcium Green 1 qui peuvent être injectés dans un seul neurone via une pipette de patch.

Les signaux calciques sont en général lents comparés aux signaux électriques (quelques centaines de millisecondes). En diminuant la résolution temporelle, il est alors possible de collecter plus de photons. De plus, comme l'injection intracellulaire du colorant requiert l'utilisation d'une pipette de patch, l'activité électrique du soma peut être mesurée et le potentiel de repos du neurone peut être modifié.

De nombreux indicateurs calciques fluorescents peuvent traverser les membranes et être déstérifiés à l'intérieur de la cellule. Ils deviennent alors fonctionnels, cela permet d'obtenir un signal uniquement à l'intérieur des cellules vivantes.

Une fois déposé à la surface du cortex ou sur les tranches en cultures, l'indicateur est absorbé par les neurones et les astrocytes³⁷. Un co-marquage des astrocytes à la sulforhodamine 101¹³² peut s'avérer nécessaire pour distinguer les deux types cellulaires. Il est alors possible d'observer de larges populations de neurones ainsi que la propagation des vagues calciques.

Il existe également des molécules pouvant s'insérer dans les membranes étant donné leurs groupements lipophiles. La fluorescence de ces derniers varie en fonction du potentiel de membrane. Le signal rapport sur bruit de ces marqueurs en fluorescence est faible, limitant son utilisation sur tissus épais. Cependant, un signal de seconde harmonique peut également être obtenu avec les mêmes molécules. Ce signal est plus sensible aux modifications du potentiel et a déjà été utilisé pour réaliser des mesures sur une dendrite isolée dans une tranche en culture¹³³.

La microscopie biphotonique a aussi permis de grandes avancées dans l'étude de la plasticité neuronale. L'utilisation de souris transgéniques dont une sous-population de neurones exprime la GFP a ainsi pu permettre d'observer au travers d'une fenêtre crânienne les modifications (apparitions et disparitions) au niveau des épines dendritiques¹³⁴.

4.6.6.2.2 Cellules gliales

Les 3 grands types de cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et cellules microgliales) ont été observés en microscopie biphotonique.

Les astrocytes peuvent être marqués soit par transgénèse, on place alors le gène de la GFP sous le contrôle du promoteur de la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), soit en utilisant un colorant spécifique tel que la sulforhodamine 101¹³². Tout comme les neurones, les observations peuvent être réalisées soit en intravital, soit sur des tranches en culture¹³⁵.

Il est également possible d'étudier la signalisation calcique en utilisant des indicateurs colorés tel que le Fluo-4 AM (voir 4.6.6.2.1). Il a ainsi pu être mis en évidence qu'une augmentation de la décharge neuronale entraîne une augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} dans les astrocytes voisins¹³⁶.

L'interface glio-vasculaire peut également être étudiée en détail par un double marquage¹³⁷ (utilisation d'un colorant vasculaire injecté par voie intraveineuse ; voir 4.6.6.2.3).

³⁷ Certains indicateurs comme l'Oregon Green Bapta-AM ont une préférence pour les neurones.

Les oligodendrocytes peuvent être observés à l'aide d'animaux transgéniques en introduisant le gène de la GFP placé sous le contrôle du promoteur de la *proteolipid protein* par exemple. Cependant, à cause de sa profondeur, il est difficile d'imager la matière blanche, même sur de petits rongeurs. L'étude sur tranches est ici préférée¹³⁸.

La mobilité des cellules microgliales a été largement étudiée en utilisant la microscopie biphotonique par suivi d'évènements temporels (time-lapse two-photon microscopy)¹³⁹. Les mouvements rapides des extensions cytoplasmiques et la migration des cellules après un dommage focalisé ont ainsi pu être documentés. L'intérêt de la méthode réside dans le fait que le laser permettant l'excitation des fluorophores (ici la GFP) peut également générer le dommage focalisé car comme nous avons pu le voir précédemment, l'excitation est limitée au point focal de l'objectif¹⁴⁰. Une telle précision, tant dans la maîtrise du dommage que dans la qualité des images obtenues, n'est pas possible avec les autres méthodes actuellement disponibles.

4.6.6.2.3 Microvascularisation cérébrale

L'observation de la microvascularisation cérébrale est réalisée suite à l'injection intraveineuse d'un colorant fluorescent tel que la fluoresceine ou la rhodamine couplé à un dextran^{141; 142}. Suivant l'âge et l'espèce du rongeur utilisé, il est possible de réaliser des images avec une résolution micrométrique jusqu'à 600 μ m sous la dure-mère. De même, une reconstitution tridimensionnelle de l'arbre vasculaire peut être obtenue suite à l'acquisition d'une pile d'image (z-stack) (Figure 4.23).

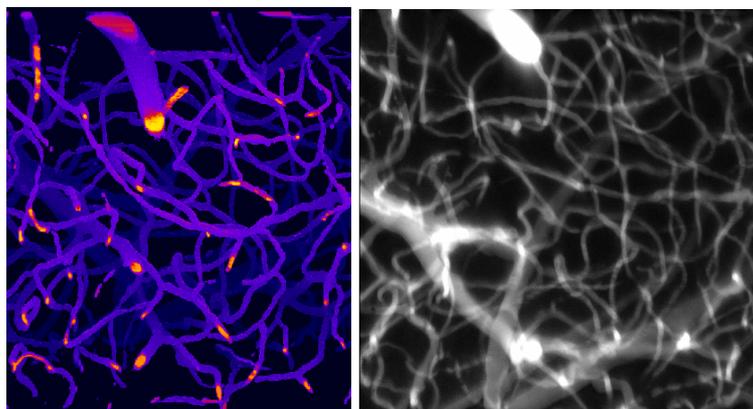


Figure 4.23 : Imagerie de la vascularisation cérébrale.

Les images ont été obtenues à partir d'un stack de 50 images acquises de 0 à 200 μ m sous la dure-mère dans le cortex pariétal d'une souris *nude* après injection intraveineuse de RhodamineB-dextran.

A. Reconstitution tridimensionnelle de l'arbre vasculaire. La reconstitution permet d'observer la structure sous tous les angles (ici par-dessous). B. Projection en Z (échelle de l'image : 300x300 μ m²).

Il existe maintenant un grand nombre de molécules fluorescentes couplées à des dextrans de différents poids moléculaire. Il est ainsi possible de mesurer la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique en injectant par voie intraveineuse deux colorants de poids moléculaire différents et d'imager simultanément leur répartition entre le compartiment intra et extra vasculaire¹⁴¹. Cette méthode présente un grand intérêt dans l'étude des effets secondaires des radiothérapies et sera explicitée et discutée en détail en 5.2.2.

4.6.6.3 Applications aux pathologies du système nerveux

La microscopie biphotonique présente un grand intérêt dans l'étude des différentes pathologies du système nerveux mais aussi dans l'évaluation des différents traitements et protocoles développés par la recherche biomédicale.

4.6.6.3.1 Neuro-oncologie

En oncologie, les applications de la microscopie biphotonique ont essentiellement été abordées par des approches *in vitro*. Cependant, de plus en plus d'études mettent en avant le potentiel de cette méthode d'imagerie pour des observations en intravital¹⁴³.

Le modèle animal le plus utilisé est la souris *nude* dans laquelle ont été greffées des cellules tumorales. Deux types de modélisations cohabitent¹⁴⁴, présentant chacune avantages et inconvénients :

- les greffes orthotopiques consistent à faire développer une tumeur dans son environnement (patho)physiologique. Un gliome sera ainsi greffé dans le cerveau de l'animal. Bien que plus proche de la réalité, cette méthode présente de nombreuses difficultés pour l'observation en microscopie biphotonique car la tumeur doit se développer dans les 600 premiers micromètres du cortex cérébral afin de pouvoir être imagée correctement. De même, le suivi longitudinal ne peut être réalisé que suite à l'implantation d'une fenêtre crânienne.
- les greffes heterotopiques consistent à greffer la tumeur en dehors de son environnement (patho)physiologique, soit en sous cutané, soit sous une fenêtre dorsale. Cette dernière présente l'avantage de pouvoir autoriser un suivi longitudinal sur le même animal afin d'évaluer les effets d'une thérapie sur l'angiogénèse par exemple.

Nous reviendrons sur ces différentes méthodes en 5.3.

Si l'on s'intéresse aux études réalisées en intravital, très peu de recherches ont été menées sur des gliomes. Cependant de nombreux paramètres ont été évalués sur d'autres lignées cellulaires tumorales poussant dans la majeure partie des cas sous des fenêtres dorsales^{145; 143}.

Il est par exemple possible d'imager l'expression des gènes. La partie codante du gène d'une GFP a été placée sous le contrôle du promoteur du VEGF. Avec une telle construction, l'expression du VEGF a été observée dans les différentes parties de la tumeur jusqu'à une profondeur de 200 μ m¹⁴⁵.

La microscopie biphotonique peut aussi permettre de suivre des populations cellulaires. Par exemple, des tumeurs issues de deux populations cellulaires (l'une étant Hif1 α ^{-/-} et marquée à l'EGFP et l'autre étant sauvage) ont été implantées sous une fenêtre dorsale. Il a alors été montré par microscopie biphotonique intravitale que les cellules Hif1 α ^{-/-} se localisaient dans les régions hypoxiques à distance des vaisseaux sanguins¹⁴⁵.

La délivrance de molécules thérapeutiques peut aussi être évaluée. En effet, il est possible de mettre en évidence des hétérogénéités de la perméabilité de la vascularisation tumorale dans différentes zones de la tumeur. L'obtention de ces informations n'est possible que grâce à la profondeur d'observation permise par la microscopie biphotonique intravitale. De même, la différence de morphologie entre les vaisseaux angiogéniques et leur architecture à différentes profondeurs peut être mises en avant^{145; 146}.

Enfin, des paramètres hémodynamiques comme la vitesse de déplacement des hématies et le « rolling » des leucocytes peuvent être quantifiés¹⁴⁵.

L'imagerie de seconde harmonique peut également apporter des informations sur l'infiltration des cellules tumorales dans la matrice extra-cellulaire¹⁴⁷ dans le cas où l'on trouve du collagène de type I ou III dans l'environnement tumoral.

Récemment, le développement des « quantum dots » (nanocristaux fluorescents semi-conducteurs), a ouvert la voie à de nombreuses applications pour des études intravitales^{148; 149}. Leur photostabilité, leur rendement de fluorescence et leur étroit spectre d'émission autorisent des co-marquages sur des animaux transgéniques exprimant la GFP ou encore des observations en parallèle avec une étude en SHG. Une application dans l'imagerie de la paroi des vaisseaux tumoraux, des cellules perivasculaires et de la matrice extracellulaire a d'ailleurs été réalisée avec succès en offrant des images de bonne qualité permettant de bien délimiter ces différentes structures¹⁴⁸.

Bien que réalisée sur des cultures cellulaires ou des explants, une dernière application de la microscopie biphotonique dans le domaine de la neuro-oncologie a montré des résultats prometteurs. Leppert et al. ont en effet utilisé cette méthode d'imagerie ainsi qu'une méthode de mesure de la durée de fluorescence (Fluorescence Lifetime Imaging) pour comparer différents types de gliomes en se basant sur l'endofluorescence des cellules. Ils ont mis en évidence des différences permettant de discriminer des cellules tumorales de cellules saines¹⁵⁰;¹⁵¹. De même, les images obtenues en utilisant les propriétés d'endofluorescence de certaines biomolécules se trouvant à l'intérieur des cellules tumorales présentent un bon contraste.

Les applications notamment intravitales de la microscopie biphotonique pour l'étude des tumeurs et plus particulièrement des gliomes n'en sont pour l'instant qu'à leur début. Nous verrons dans le chapitre 7 que nous avons utilisé avec succès cette méthode d'imagerie pour caractériser les effets de la PAT-Plat sur la vascularisation du gliome F98.

4.6.6.3.2 Autres pathologies du système nerveux

La maladie d'Alzheimer a également été étudiée en utilisant la microscopie biphotonique. Une nouvelle molécule injectable rendue fluorescente, le PIB, a été récemment testée et possède la capacité de traverser la BHE et de se fixer spécifiquement sur les plaques d'amyloïde¹⁵².

Il a été également mis en évidence une atrophie, une perte d'épines dendritiques et la présence d'astrocytes et de cellules microgliales activées à proximité des plaques d'amyloïde¹²⁶.

Les effets à court et à long terme de l'ischémie cérébrale ont pu être observés suite à l'utilisation de fenêtres crâniennes. Une des études les plus marquantes en microscopie biphotonique intravitale a consisté à créer une phototrombose d'un vaisseau isolé du cortex cérébral et de mesurer les modifications des paramètres hémodynamiques dans les vaisseaux avoisinants¹⁵³.

Dans le domaine de l'étude des épilepsies, il a été montré que certaines drogues anti-épileptiques tel que le valproate et le gabapentin réduisaient la capacité des astrocytes à transmettre des signaux calciques. Le rôle central des astrocytes dans la survenue des crises a été proposé à partir de cette étude et a ouvert la voie à une cible thérapeutique potentielle¹⁵⁴.

Comme nous venons de le voir aux travers de quelques exemples, la microscopie biphotonique est utilisée dans l'étude d'un grand nombre de pathologies du système nerveux.

De manière générale, toute étude entreprise doit répondre à 3 critères :

- trouver le meilleur modèle animal de la pathologie étudiée.
- choisir la meilleure méthode de coloration du phénomène à observer.
- déterminer la meilleure façon de traiter et d'analyser les données après l'acquisition.

4.6.7 Avantages et Inconvénients

La microscopie biphotonique présente de nombreux avantages en comparaison avec la microscopie confocale. Comme nous avons pu le voir, la profondeur maximale d'observation est fortement améliorée par l'utilisation d'une source d'excitation dans le proche infrarouge. Il est alors possible de travailler sur cellules, sur coupes ou organes isolés et surtout en intravital sur l'animal anesthésié. Le phénomène d'absorption à deux photons n'a également lieu qu'au point focal de l'objectif limitant le photoblanchiment et la phototoxicité à cet endroit. L'utilisation de colorants excitables dans l'UV, très complexe dans le cadre de la microscopie confocale à cause du coût des sources laser, est possible. Enfin, la grande majorité des colorants utilisés en excitation monophotonique peuvent l'être en biphotonique. De nombreux laboratoires développent également de nouvelles sondes optimisées pour une utilisation sous excitation à deux photons.

Le principal inconvénient reste cependant la profondeur d'observation qui ne permet pas de descendre au cœur de tous les organes. Récemment, un endoscope à deux photons utilisant des lentilles GRIN (GRAdient INdex) a permis de réaliser des observations de l'hippocampe chez le rongeur¹⁵⁵. De tels dispositifs peuvent présenter de multiples applications notamment dans le domaine médical et lever ainsi la seule limitation majeure de la microscopie biphotonique.

4.7 Conclusions

Depuis son invention il y a un peu plus de quatre siècles, le microscope est sûrement l'instrument qui aura permis le plus de découvertes et le plus d'avancées dans le domaine des sciences du vivant. Au fil du temps, ses résolutions spatiale et temporelle ont évolué et la

technologie mise en place pour son fonctionnement s'est diversifiée afin d'apporter différentes sortes de microscopies, adaptées chacune à une problématique donnée.

La microscopie biphotonique s'est imposée en moins d'une quinzaine d'années comme un outil privilégié pour des applications dans le domaine de la recherche biomédicale, aussi bien pour des études fondamentales que pour des études précliniques. Devant tous ses avantages que nous avons pu voir au cours de ce chapitre, ce type de microscopie s'est avéré le plus intéressant pour répondre à notre problématique. Nous allons donc voir dans le prochain chapitre les différents développements réalisés au cours de ce travail de thèse.

Etude



Chapitre 5

Développements en Microscopie Biphotonique

Certaines parties de ce chapitre ont été publiées sous les références :

- Clément Ricard, Jean-Claude Vial, Julien Douady & Boudewijn van der Sanden ; *In vivo imaging of elastic fibers using sulforhodamine B* ; *Journal of Biomedical Optics* ; 12 (6) ; 2007.
- Clément Ricard, Jean-Claude Vial, Julien Douady & Boudewijn van der Sanden ; *Imaging elastic and collagen fibers with sulforhodamine B and second-harmonic generation* ; *Proceedings of Molecular Probes for Biomedical Applications II* ; *Photonics West* ; San José ; 2008.
- Pascale Vérant*, Clément Ricard*, Raphaël Serduc*, Jean-Claude Vial & Boudewijn van der Sanden ; *In vivo staining of neocortical astrocytes via the cerebral microcirculation using Sulforhodamine B* ; *article soumis*. (* : co-premiers auteurs).
- Ali Hayek, Alexei Grichine, Thomas Huault, Clément Ricard, Frédéric Bolze, Boudewijn van der Sanden, Jean-Claude Vial, Yves Mély, Alain Duperray, Patrice Baldeck & Jean-François Nicoud ; *Cell-permeant cytoplasmic blue fluorophores optimized for in vivo two-photon microscopy with low-power excitation* ; *Microscopy Research & Technique*; 70(10) : 880-885 ; 2007.

Comme nous venons de le voir, la microscopie biphotonique est une méthode de choix pour l'étude intravitale de phénomènes se passant à l'échelle cellulaire. La première partie de ce travail de thèse a consisté à développer de nouvelles méthodes pour observer la morphologie de certaines structures mais également pour appréhender certaines modifications physiologiques pouvant être induites soit par la PAT-Plat, soit par la tumeur.

Dans ce chapitre, nous nous attarderons sur la description de la mise en place de ces méthodes ainsi que de leur validation. Nous reviendrons dans les deux chapitres suivants sur leur utilisation pour répondre à notre double problématique concernant la PAT-Plat, à savoir :

- les effets de la thérapie sur les tissus cérébraux sains.
- les effets de la thérapie sur les tissus tumoraux.

Nous commencerons ce chapitre par une description de l'installation de microscopie biphotonique utilisée au cours de notre étude.

Nous nous intéresserons par la suite à la mise en place de méthodes permettant l'imagerie des tissus cérébraux et plus particulièrement l'observation des capillaires corticaux, la mesure de la perméabilité de la BHE et l'imagerie des astrocytes.

Dans un troisième temps, nous verrons comment a été mise en place l'imagerie de la vascularisation tumorale ainsi que les essais conduits sur différents modèles animaux qui nous ont amené à choisir la greffe hétérotopique du gliome F98 en sous-cutané pour les études sur la PAT-Plat.

Nous nous attarderons ensuite sur la mise en place d'une méthode de marquage des fibres élastiques en intravital couplé à une observation du collagène I et III par imagerie de seconde-harmonique. Cette méthode sera illustrée par une application à l'étude des effets de la MRT sur la paroi artérielle.

Enfin, nous évoquerons brièvement la caractérisation de nouveaux colorants pour des applications intravitales.

5.1 Description du Microscope Biphotonique

Le microscope utilisé lors de nos études est installé au Laboratoire de Spectrométrie Physique sur le campus universitaire de Grenoble. Il s'agit d'un modèle construit à partir de plusieurs éléments séparés permettant de faire évoluer l'installation et de réaliser des modifications en fonction des expériences à réaliser. Les éléments principaux sont un microscope Olympus BX50WI, une tête confocale Biorad MRC 1024, deux PMTs externes ajoutés et un laser femtoseconde Titane-Saphir (Tsunami, Spectra-Physics). Nous allons revenir sur ces différents éléments. Une représentation schématique de l'installation de microscopie biphotonique a été présentée dans la figure 4.18.

La figure 5.1 ci après présente quelques photographies de la plateforme de microscopie biphotonique localisée au Laboratoire de Spectrométrie Physique.

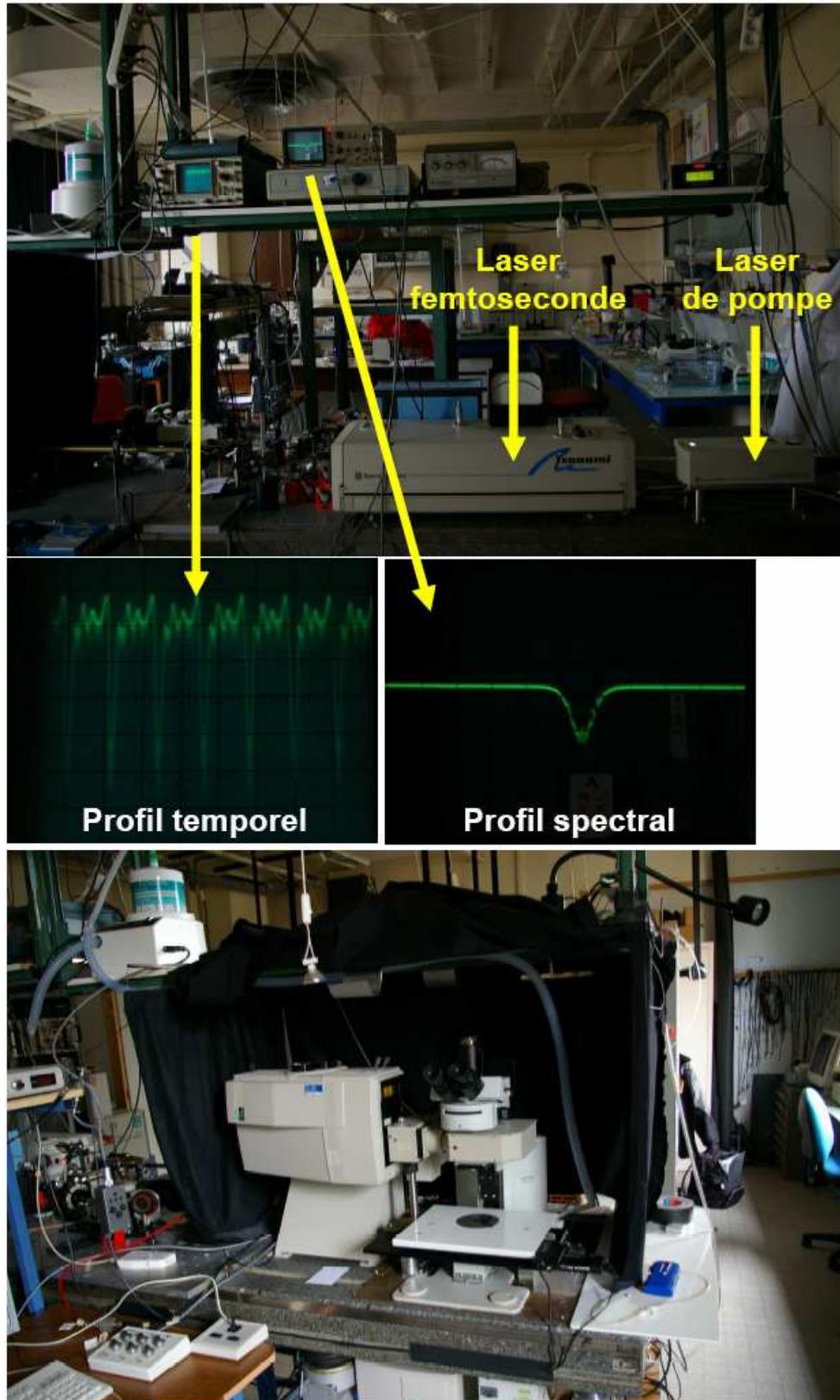


Figure 5.1 : Plateforme de microscopie biphotonique utilisée lors de ce travail de thèse. L'ensemble des appareillages est installé sur une table optique d'approximativement 3.5m de long sur 1.20m de large. La longueur d'émission ainsi que le mode pulsé du laser peuvent être vérifiés en permanence sur deux oscilloscopes (images au centre). La platine du microscope est motorisée et équipée d'un poste d'anesthésie gazeuse avec un système d'aspiration de l'air (photo du bas – tuyau bleu). L'acquisition est contrôlée par deux ordinateurs installés à proximité (hors champ).

5.1.1 Laser d'excitation.

L'excitation est fournie par un laser Titane-Saphir (Tsunami, Spectra-Physics) pouvant délivrer des impulsions femtosecondes en mode bloqué dans une gamme de longueurs d'ondes allant de 760 à 850nm. Les impulsions ont une durée de 120 fs et une fréquence de 82MHz².

Il est pompé à 532nm avec une puissance de 4.2W par un laser continu Nd : YVO4 doublé en fréquence. Ce laser est lui-même pompé par des diodes laser couplées par fibres optiques.

La puissance moyenne en sortie du laser femtoseconde se situe aux alentours de 600mW (ce qui correspond à des puissances de crête de 60kW). Cependant, une forte déperdition de la puissance a lieu lors du trajet optique. La puissance délivrée à l'échantillon en sortie d'objectif a été mesurée à l'aide d'un puissance-mètre calorimétrique (Coherent Inc. – modèle 205). Pour une puissance moyenne de 600mW en sortie de laser, la puissance en sortie d'objectif est de 150mW.

5.1.2 Modulation de la puissance laser

Lors de l'étude d'échantillons biologiques en intravital ou sur des explants, la puissance du faisceau laser envoyée sur l'échantillon doit pouvoir être ajustée afin de ne pas créer de dommages ou d'induire un photoblanchiment des colorants. Cette régulation peut être réalisée par deux moyens :

- via des filtres de densité optique différente installés sur un disque commandé par l'interface constructeur livrée par Biorad. L'atténuation de la puissance est cependant limitée à 100, 30, 10, 3 ou 0.3%. Ce système n'est pas adapté à l'étude intravitale qui nécessite de pouvoir moduler la puissance de transmission du laser entre 30 et 100%.
- en jouant sur la polarisation de la lumière. En sortie du laser, la polarisation de la lumière est verticale. Un dispositif constitué d'une lame $\lambda/2$ sur un moteur rotatif placé devant deux polariseurs disposés à l'angle de Brewster permet de réguler l'intensité du faisceau. Les mouvements du moteur sont gérés par une interface indépendante du système Biorad programmée en Delphi. Il est alors possible de régler l'intensité du laser par pas de 10%. Ce système a été conçu au laboratoire (Pascale Vérant et Jean-Claude Vial).

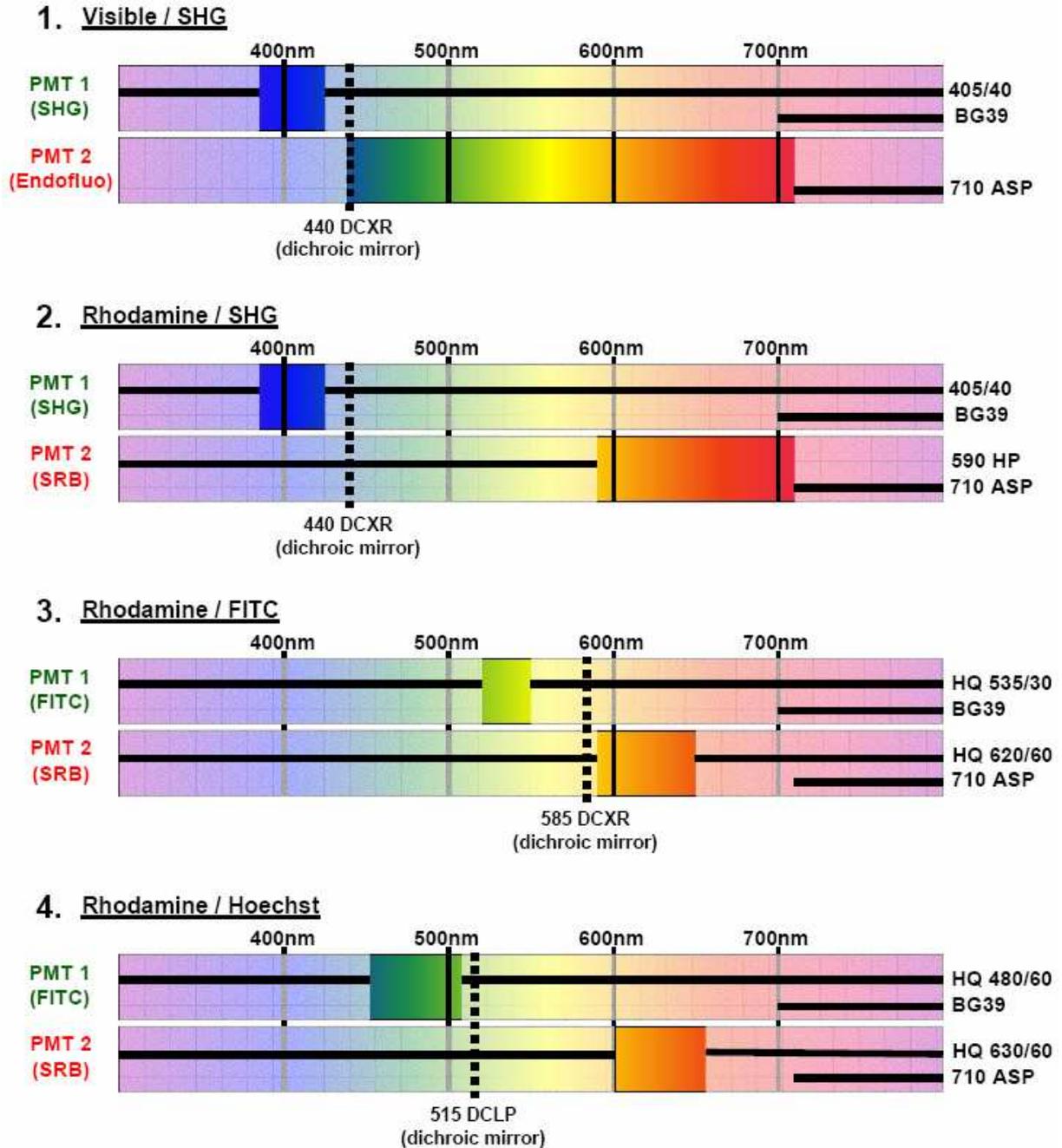


Figure 5.2 : Caractéristiques des différents coins de cube utilisés au cours des différentes expérimentations présentées dans ce travail de thèse. Les traits horizontaux pleins représentent les longueurs d'ondes coupées par les différents filtres. Les traits verticaux en pointillés représentent les valeurs de transition des différents miroirs dichroïques.

5.1.3 Caractéristiques des objectifs

La quasi-totalité des travaux effectués en microscopie biphotonique présentés dans cette thèse ont été réalisés avec un objectif 20X, 0.95NA, Xlum Plan FI Olympus conçu pour l'infrarouge et l'immersion dans des milieux aqueux. Sa distance de travail est de 2mm. La résolution latérale a été mesurée à 1,2 μm (à l'aide d'une lame) et la résolution axiale (en z) a été estimée à 3,5 μm^2 .

Les études sur cultures cellulaires ont été réalisées avec un objectif 60x (Olympus LUM Plan FI / IR ; NA=0.90) et les études sur fenêtres dorsales avec un objectif 10x (Olympus UM Plan FI ; NA=0.30).

5.1.4 Acquisition du signal

La fluorescence émise est récupérée en épicollecion puis dirigée sur un coin de cube à l'aide d'un miroir dichroïque transmettant le faisceau laser d'excitation et réfléchissant les longueurs d'ondes de fluorescence (coupure à 665nm). Trois coins de cubes différents ont été utilisés au cours de ce travail. Leurs différentes caractéristiques sont reprises dans la figure 5.2. Il est également important de noter qu'une 4eme configuration (Rhodamine/SHG) existe en rajoutant un filtre supplémentaire (590HP) à la configuration Visible/SHG.

Par la suite nous nous référerons aux appellations suivantes pour indiquer la configuration utilisée :

- Rhodamine/FITC : HQ535/30, 585DCXR, HQ620/60.
- Visible/SHG : 405/40, 440DCXR.
- Rhodamine/SHG : 405/40, 440DCXR, 590HP.
- Rhodamine/Hoechst : HQ480/60, 515DCLP, HQ630/60.

Des filtres sont également en sortie du coin de cube afin de couper la réflexion du laser. Ces filtres passe-bas sont soit un 710ASP, soit un BG39.

Les photons sont ensuite collectés sur des PMTs externes dont l'amplification (gain) et l'offset sont réglés par des potentiomètres localisés sur un boîtier externe. L'offset est réglé de façon à ce que le nombre de photons détectés soit proche de zéro lorsque le laser est coupé.

L'échantillonnage est réglé de façon à avoir des images de 512x512 pixels. Il est cependant possible de zoomer en utilisant l'interface Biorad. La taille des images obtenues en fonction du zoom est donnée dans le tableau 5.1.

La durée d'acquisition d'une image est de l'ordre de 0.9s. Les images sont codées en 8bits par l'interface Biorad (convertisseur analogique/numérique); cependant l'acquisition est également possible en 12bits via un interfaçage récemment développé. L'intégralité des images présentées ici ont été réalisées en 8bits (256 niveaux de gris).

| Zoom | Echelle de l'image obtenue |
|------|-------------------------------|
| 1x | 598 x 598 μm^2 |
| 1.5x | 398.6 x 398.6 μm^2 |
| 2x | 299 x 299 μm^2 |
| 3x | 199 x 199 μm^2 |
| 4x | 149.5 x 149.5 μm^2 |
| 5x | 119.6 x 119.6 μm^2 |

Table 5.1 : Taille des images obtenues en fonction du zoom sélectionné sur l'interface Biorad et avec l'objectif 20x.

5.1.5 Interface informatique

La figure 5.3 détaille les différentes fonctionnalités de l'interface Biorad. L'affichage des images obtenues à partir des photons captés par les deux PMTs est présentée en temps réel. Une addition des deux voies « merge » est également proposée afin d'avoir une première idée de la colocalisation de certains signaux. Le réglage de la puissance du laser (avec ou sans déclenchement, c'est-à-dire changement de puissance entre chaque image et non en cours d'acquisition) ainsi que certains traitements d'images par le logiciel ImageJ (v.1.36b) sont réalisés sur un second ordinateur en interface avec le logiciel Biorad.

5.2 Imagerie des Tissus Cérébraux

Au cours de cette partie, nous verrons en détail la méthodologie pour la réalisation d'une imagerie des capillaires corticaux, la mesure de la perméabilité de la BHE et enfin le marquage des astrocytes en intravital.

5.2.1 Microvascularisation cérébrale

L'imagerie des vaisseaux du cortex cérébral par microscopie biphotonique intravitale a été utilisée par de nombreuses équipes (voir 4.6.6.3). La méthode consiste à injecter par voie intraveineuse un colorant fluorescent qui va se répandre dans l'ensemble de la vascularisation

de l'animal. Le cortex cérébral est une zone très riche en capillaires (775.8 vaisseaux/mm² dans le cortex pariétal chez le rat Sprague-Dawley¹⁵⁶ ; 433 vaisseaux/mm² dans le cortex pariétal chez la souris nude⁷⁹)³⁸. La reconstruction de l'arbre vasculaire en trois dimensions est également possible.

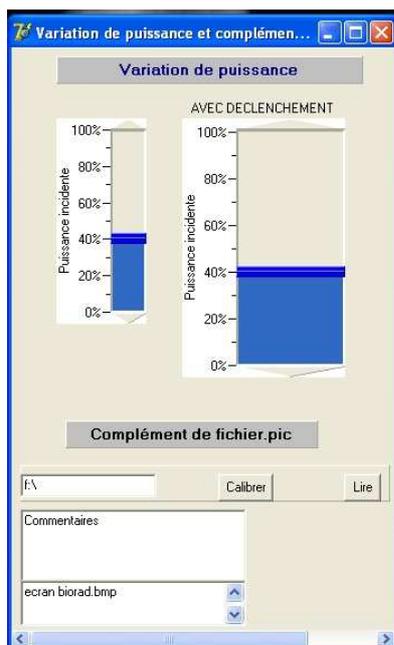
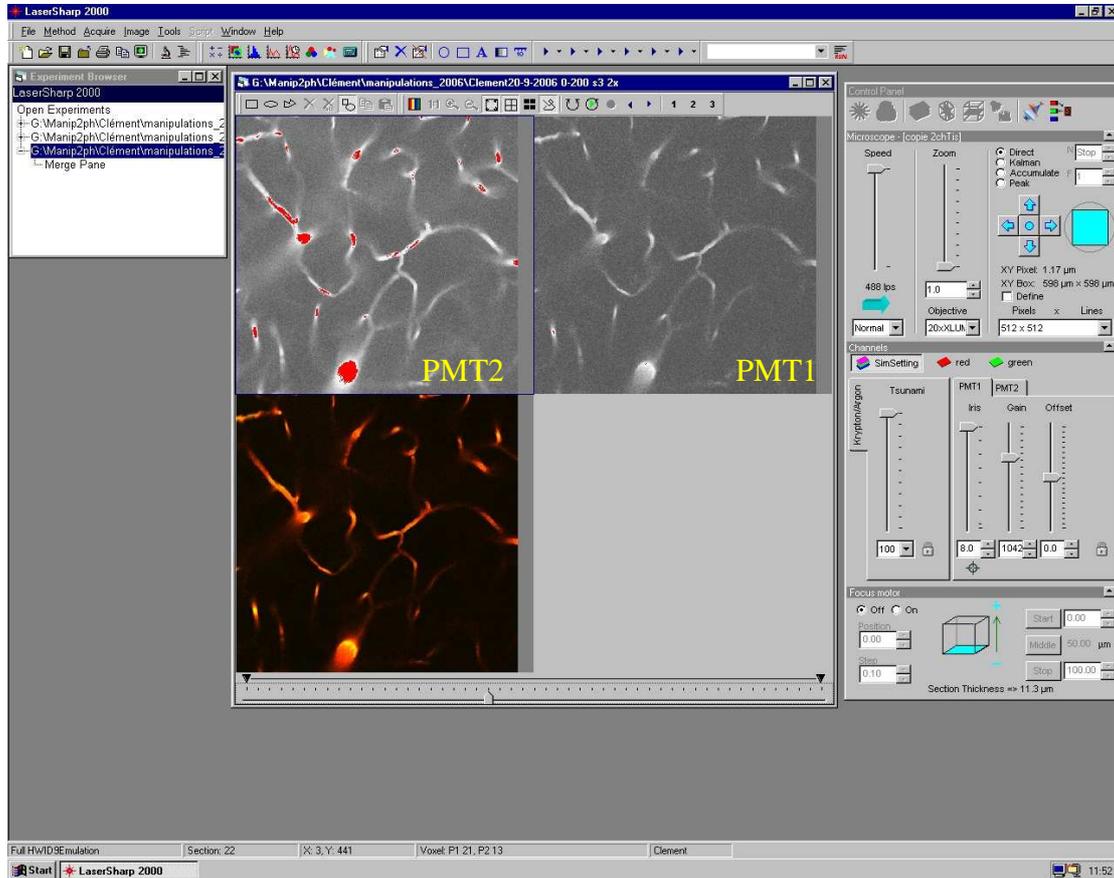


Figure 5.3 : Interface Biorad et interface de réglage de la puissance laser.

En haut : l'acquisition des différentes images est réalisée à l'aide du logiciel propriétaire Biorad permettant d'obtenir en temps réel des images à partir des deux PMTs. L'exemple ci-dessus a été réalisé lors d'une imagerie de la vascularisation cérébrale avec injection de Rhodamine B dextran 70kDa (voie de gauche) et de FITC dextran 4kDa (voie de droite). Une troisième fenêtre permet d'obtenir une combinaison des deux précédentes images. Le zoom, la profondeur ainsi que les paramètres d'acquisition sont réglés sur le panneau de droite. Cependant le gain et l'offset des PMTs sont commandés à partir d'un boîtier séparé.

A gauche : logiciel développé au laboratoire et installé sur un second ordinateur permettant de régler la puissance du laser par pas de 10%. Le réglage « avec déclenchement » lance le changement de puissance entre l'acquisition de deux images de façon à ne pas avoir de changement au milieu de l'acquisition d'une image.

³⁸ Les valeurs sont données en vaisseaux/mm² car réalisées sur des coupes histologiques.

Sur notre installation, il est possible d'observer les capillaires jusqu'à une profondeur de 600 μ m sous la dure-mère. Cependant, il s'agit d'une profondeur maximale ne pouvant être atteinte que dans certaines conditions :

- le colorant doit présenter une bonne section efficace d'absorption à deux photons ainsi qu'un bon rendement quantique.
- le colorant doit avoir une longueur d'onde d'émission décalée dans le rouge. Plus la longueur d'onde des photons de fluorescence sera élevée, moins la diffusion et l'absorption par les tissus sera forte. Les rhodamines sont un bon compromis pour ce type d'application.
- le choix du modèle animal est crucial. Nous avons préféré la souris comme modèle sur la base de la faible épaisseur et la faible opacité de sa dure-mère. Les observations menées sur rats requièrent dans la majorité des cas de retirer la dure-mère pour obtenir une profondeur d'observation acceptable.
- l'animal doit être jeune. Nous avons constaté que les observations les plus profondes étaient réalisées sur de jeunes souris (entre 2 et 3 mois). Au-delà, une opacification du parenchyme cérébral a été notée.
- la puissance d'excitation du laser est également un paramètre important.

En pratique, la majeure partie des observations de la vascularisation cérébrale effectuées dans ce travail a été réalisée entre 0 et 400 μ m sous la dure-mère au niveau du cortex pariétal.

La procédure d'imagerie de la vascularisation cérébrale par microscopie biphotonique intravitale a été couplée dans la majorité des expériences à des mesures de la perméabilité de la BHE. La méthodologie sera donc décrite en détail dans le paragraphe suivant.

5.2.2 Perméabilité de la BHE

Suite à une irradiation ou dans certaines conditions (patho)physiologiques, la BHE peut être lésée. La mesure de sa perméabilité par microscopie biphotonique intravitale permet d'apporter des informations précises sur des modifications pouvant être locales. Serduc et al. ont par exemple montré une augmentation de la perméabilité de la BHE au niveau du passage des microfaisceaux après MRT (dose 1000Gy, largeur des faisceaux : 25 μ m, distance pic à pic : 211 μ m)^{3: 79}. Cette observation est possible par l'injection simultanée de deux colorants par voie intraveineuse.

Nous ne présenterons ici que la méthode permettant de mesurer la perméabilité. L'application à l'étude de la PAT-Plat sera exposée dans le chapitre 6.

5.2.2.1 Matériels & Méthodes

5.2.2.1.1 Préparation des animaux

L'induction de l'anesthésie est réalisée dans une cage d'induction à l'isoflurane (5%) pendant 45 à 60s. La tête de l'animal est ensuite positionnée sur un cadre stéréotaxique, l'anesthésie étant maintenue à l'aide d'un masque délivrant 1.5 à 2% d'isoflurane dans un mélange gazeux (30% O₂, 70% N₂O). Ce type d'anesthésie s'avère être le plus confortable pour l'animal et l'utilisateur. Une anesthésie prolongée est réalisable avec la possibilité de l'adapter au cours du temps. De même l'isoflurane mélangée avec le protoxyde d'azote permet d'obtenir des mouvements respiratoires moins saccadés et en conséquence moins d'artefacts de mouvements sur les images.

Une fois positionnée sur le cadre stéréotaxique, la tête est immobilisée par des barres bloquées sous les bas-joues en prenant soin de ne pas créer de compression des voies respiratoires. Une incision d'approximativement 1cm de long est alors pratiquée sur le scalp. Le périoste est alors retiré délicatement à l'aide de cotons-tiges.

Une craniotomie de 3mm de large est alors réalisée à la verticale du cortex pariétal gauche à l'aide d'une perceuse équipée d'une mèche de 0.6mm de diamètre. L'os est ensuite retiré délicatement et du liquide physiologique (solution de NaCl à 0.9%) est immédiatement déposé à la surface du cortex exposé afin d'éviter tout dessèchement.

L'ensemble de la partie chirurgicale est réalisé sous un microscope (Leica MZ6). Avant de commencer la phase d'injection, il est également vérifié qu'aucune hémorragie n'est présente sur la surface de la zone à étudier.

5.2.2.1.2 Injection des colorants

Un cocktail de 100µl d'une solution de Rhodamine B isothiocyanate dextran (70kDa, 100mg/ml, Sigma) et de 100µl d'une solution de FITC dextran (4kDa, 100mg/ml, Sigma) dans une solution de NaCl à 0.9% sont injectés dans une veine caudale. L'animal est ensuite positionné sous l'objectif du microscope qui est placé en immersion dans la solution saline à la verticale de la craniotomie. La mise au point est effectuée en microscopie de fluorescence classique. L'observation du déplacement des globules sanguins dans les vaisseaux se trouvant au niveau des méninges permet de régler le niveau de départ et de faire la mise au point.

5.2.2.1.3 Protocole d'observation

La fluorescence émise par les deux colorants est acquise simultanément par les deux PMTs en utilisant le coin de cube Rhodamine/FITC. Il est ainsi possible d'imager leur répartition (uniquement intravasculaire ; intravasculaire et dans le parenchyme cérébral ; uniquement dans le parenchyme cérébral). Les deux colorants ayant des poids moléculaires différents (4kDa = faible poids moléculaire ; 70kDa = haut poids moléculaire), il sera possible de déterminer pour quelle gamme de poids moléculaires la BHE est perméable.

Afin d'augmenter la reproductibilité statistique, les images sont acquises sur cinq zones bien distinctes de la craniotomie, à des profondeurs allant de 0 à 400 μ m sous la dure-mère. La longueur d'onde d'excitation est réglée à 800nm.

5.2.2.1.4 Validation de la méthode

La méthode a été validée sur des souris nude saines (n=5) et sur des souris nude dont la BHE a été lésée localement par l'application répétée de points de pression à la surface du cortex exposé à l'aide d'un coton-tige imbibé de liquide physiologique (n=5).

5.2.2.2 Résultats

Sur l'animal sain n'ayant subi aucune altération de la BHE, les deux colorants restent dans le volume vasculaire (Figure 5.4 A-C). Cependant, chez les animaux ayant une lésion de la BHE, le colorant de faible poids moléculaire (FITC dextran 4kDa) est sorti du volume vasculaire et s'est répandu dans le parenchyme cérébral. Certains spots noirs sont dans ce cas visibles dans les tissus cérébraux (Figure 5.4 D-F). Il s'agit de corps cellulaires dont la membrane est imperméable au FITC-dextran. Il est également intéressant de noter que le colorant de haut poids moléculaire est resté dans le volume vasculaire. Nous pouvons donc en conclure que la BHE est, dans ce modèle, perméable à des molécules de faible poids moléculaire (au moins inférieur ou égal à 4kDa). La BHE demeure imperméable aux molécules de haut poids moléculaire (au moins supérieur ou égal à 70kDa).

Enfin, l'absence d'infiltration du colorant de haut poids moléculaire permet d'invalider l'hypothèse de l'infiltration de colorant suite à une hémorragie. Dans ce cas, les deux colorants seraient sortis du volume vasculaire.

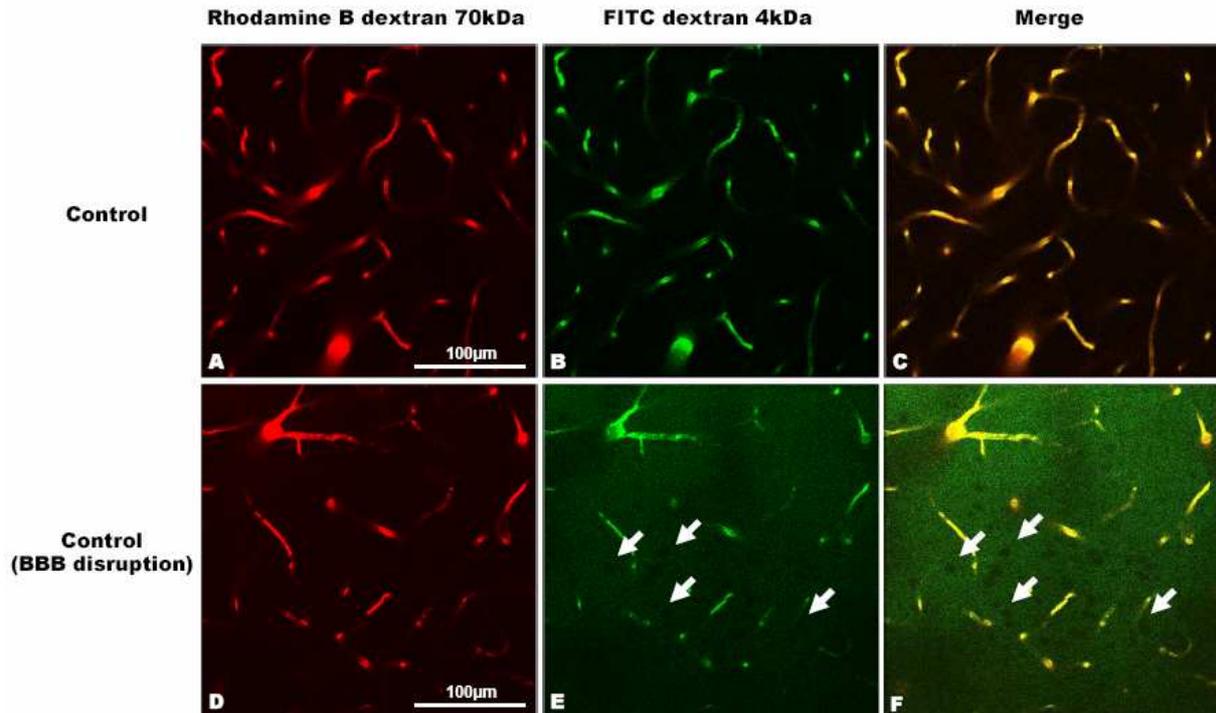


Figure 5.4 : Mesure de la perméabilité de la BHE par microscopie biphotonique intravitale.

Les souris ont reçu une injection d'un cocktail de deux colorants (Rhodamine B dextran 70kDa et FITC dextran 4kDa) par voie intraveineuse et la microvascularisation cérébrale a été imagée. Chez des animaux sains, les deux colorants sont restés dans le volume vasculaire (control – A, B, C). Chez des animaux dont la BHE a été lésée par contraintes mécaniques (control (BBB disruption) – D, E, F), le colorant de haut poids moléculaire est resté en intravasculaire tandis que le colorant de faible poids moléculaire s'est infiltré dans le parenchyme cérébral. Les tâches noires indiquées par des flèches représentent les cellules se trouvant dans le tissu cérébral n'ayant pas été marquées par le colorant extravasé. Les images présentées dans cette figure ont été acquises à une profondeur de 150µm sous la dure-mère avec le coin de cube Rhodamine/FITC.

5.2.2.3 Discussion

5.2.2.3.1 Choix des colorants

Lors de précédents travaux menés au laboratoire, la mesure de la perméabilité de la BHE avait été réalisée avec deux autres colorants : la sulforhodamine B (SRB, 560Da) et le FITC-dextran (70kDa)^{79; 157}. Cette méthodologie permet d'avoir des informations d'une plus grande précision car l'un des deux colorants présente un poids moléculaire bien inférieur au notre (FITC dextran 4 kDa). Cependant, il a été observé chez des animaux sains que la SRB avait tendance à sortir du volume vasculaire à partir de 30 à 40 minutes après l'injection intraveineuse. Lors de la réalisation de nos premières expériences, nous avons pu constater qu'au bout d'une heure, la coloration due à la SRB devenait importante dans le parenchyme cérébral mettant en évidence un grand nombre de « spots » noirs (corps cellulaires) mais également certaines cellules qui semble capter la SRB (nous reviendrons sur ce dernier point

dans le paragraphe 5.2.3). Nous avons donc décidé de changer de colorant afin de nous affranchir de cette infiltration qui peut poser des problèmes dans l'interprétation d'images obtenues plus de 30 minutes après l'injection des colorants.

Pour déterminer le nouveau couple de colorants à utiliser, nous avons dû répondre au cahier des charges suivants :

- trouver un colorant de haut poids moléculaire (aux alentours de 70kDa) permettant d'acquérir un signal exploitable jusqu'à des profondeurs de 400 μ m. Nous en avons sélectionné deux : le FITC dextran 70kDa déjà utilisé dans les précédentes expérimentations et la Rhodamine B dextran 70kDa.
- trouver un colorant de faible poids moléculaire ne traversant pas la BHE de façon passive au bout d'un certain temps comme c'est le cas pour la SRB. Notre choix s'est porté sur le FITC dextran 4kDa qui est la molécule fluorescente (de type FITC ou Rhodamine B) couplée à un dextran dont le poids moléculaire est le plus faible.

Le choix des colorants utilisés dans l'ensemble de nos expérimentations sur la BHE s'est donc porté sur la Rhodamine B dextran 70kDa et le FITC dextran de 4 kDa.

5.2.2.3.2 *Intérêt de la méthode*

L'acquisition simultanée de la fluorescence émise par les deux colorants permet à la fois de tester la perméabilité de la BHE pour des molécules de poids moléculaires différents mais également de détecter d'éventuelles lacunes dans l'arbre vasculaire.

Aucune sortie des colorants hors du volume vasculaire n'a été constatée jusqu'à deux heures après l'injection (aucune observation n'a été réalisée au-delà).

Le principal inconvénient est le fait de ne pas avoir d'informations sur la perméabilité de la BHE pour des molécules avec un poids moléculaire inférieur à 4kDa. Malgré cela, il apparaît que cette méthode est très reproductible et le vaste choix proposé par Sigma en termes de molécules couplées à des dextrans et de poids moléculaires différents (4, 10, 20, 40, 70, 150, 250, 500 et 2000 kDa pour le FITC ; 10 et 70 kDa pour la Rhodamine B) peut permettre d'affiner la mesure de la perméabilité.

5.2.3 Marquage des astrocytes

L'observation des astrocytes par microscopie biphotonique intravitale a déjà été décrite par l'utilisation notamment de souris transgéniques¹²⁸ ou par l'injection locale dans le parenchyme

cérébral de sulforhodamine 101 (SR101)¹⁵⁸. Cependant, de telles observations sont soit coûteuses (animaux transgéniques), soit invasives (une injection locale de SR101 dans le parenchyme cérébral peut générer des lésions et modifier certains paramètres physiologiques). Nous avons pu mettre en évidence que la SRB injectée par voie intraveineuse peut traverser la BHE et marquer les astrocytes. Nous allons maintenant nous attacher à décrire cette méthode de coloration et les conditions dans lesquelles nous l'avons découverte.

5.2.3.1 Découverte de la coloration des astrocytes par la SRB.

Au cours des travaux de thèse de Raphaël Serduc et de Pascale Vérant qui utilisaient la SRB pour mesurer la perméabilité de la BHE^{3; 79; 2; 157}, il avait été noté que dans les régions où la SRB sortait du volume vasculaire (c'est-à-dire sur le passage des microfaisceaux à 1000Gy), certaines structures ayant une forme arrondie étaient marquées. La nature de ces structures fut longtemps débattue et l'hypothèse fut émise qu'il pourrait s'agir d'astrocytes ou de cellules microgliales. A ce jour, la question demeure encore ouverte car il est difficile de savoir si la pénétration du colorant dans de nombreuses cellules sur le passage des microfaisceaux est due à une affinité du colorant pour les cellules ou à un effet de l'irradiation. Cependant, l'idée que la SRB pourrait avoir une affinité pour les astrocytes fut avancée.

Au début de ce travail de thèse, lors de la réalisation des expériences pilotes pour la mise en place de la méthode de mesure de la perméabilité de la BHE, les premiers essais furent réalisés avec la SRB comme colorant de faible poids moléculaire. Il fut constaté que la SRB traversait la BHE de façon passive au bout de 30 à 40 minutes et colorait certaines cellules dans le parenchyme cérébral. La morphologie de ces cellules présente de grandes ressemblances avec celle des astrocytes et notamment de nombreuses extensions cytoplasmiques dont certaines sont en contact avec les capillaires sanguins. Si elle s'avérait exacte, cette méthode de coloration des astrocytes présenterait le double intérêt d'être faiblement invasive (une injection intraveineuse suffit) et peu coûteuse. La caractérisation de la SRB et la validation de la méthode fut alors entreprise.

5.2.3.2 Matériels & Méthodes

Les caractéristiques de la SRB furent évaluées dans un premier temps (fixation à l'albumine, cinétique d'élimination). La vérification de la spécificité fut ensuite réalisée par des essais sur cultures cellulaires et par des observations morphologiques.

5.2.3.2.1 *Liaison de la SRB à l'albumine*

La fixation de colorants à l'albumine empêche leur passage au travers de la BHE (la même constatation a été réalisée pour le passage de drogues chimiothérapeuthiques, voir 2.2.1). Afin de mesurer la fixation de la SRB à l'albumine, une solution d'albumine (30g/l ; Molekula, Germany) est préparée dans un tampon phosphate à 0.1M. La SRB est ensuite déposée à une concentration finale de 0.2g/l. La solution ainsi créée est dialysée pendant 24h à 37°C dans une poche à dialyse en cellulose (coupure : 1000Da ; Fisher Scientific AG, Germany). La concentration en SRB dans la dialysat est enfin mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Lambda 9, Perkin Elmer, USA). Les contrôles sont réalisés avec une solution de SRB sans albumine.

5.2.3.2.2 *Elimination de la SRB*

Pour étudier l'élimination de la SRB du compartiment vasculaire, les souris (Swiss/IOPS CD1 ; 38 - 43g ; n=2 ; Charles River France) sont anesthésiées par un mélange isoflurane / air (5% pour l'induction, 2% pour le maintien). Un cathéter est positionné dans la veine jugulaire et 100µl d'une solution de SRB (5mg/ml dans une solution de NaCl à 0.9%) sont injectés. Sur une période de 3h après l'injection, des prélèvements sanguins de 40µl sont effectués à intervalles réguliers. Les prélèvements sont dilués 40 fois dans une solution de NaCl 0.9% héparinée. Un millilitre de chaque échantillon est ensuite centrifugé et l'absorbance du surnageant est mesuré à 560nm¹⁵⁹ contre une solution de NaCl 0.9% héparinée.

5.2.3.2.3 *Cultures primaires d'astrocytes*

Les cultures primaires d'astrocytes ont été réalisées par Jean-Christophe Deloulme selon la méthode décrite par Raponi et al¹⁶⁰.

En résumé, les hémisphères cérébraux de souriceaux nouvellement nés (P2 ; Charles River France) sont séparés et dissociés par trypsination et contraintes mécaniques dans une solution de Hanks. Les cellules microgliales sont retirées en déposant la suspension cellulaire sur des boîtes de Pétri sans *coating* pendant 15 minutes. La suspension cellulaire est ensuite repiquée dans des tubes Falcon sans *coating* dans une solution de DMEM supplémentée avec 10% de sérum de veau foetal.

Après 4 jours d'incubation, les progéniteurs d'oligodendrocytes et les neuroblastes (précurseurs des neurones) poussant à la surface de la couche d'astrocytes en développement sont retirés par lavage. Le pourcentage de cellules autre que des astrocytes est estimé à 2.5%.

5.2.3.2.4 Cultures primaires de neurones

Les cultures primaires de neurones ont été réalisées par Flavie Strappazon et Yves Goldberg selon la méthode décrite par Trioulier et al¹⁶¹.

En résumé, les cervelets de souriceaux nouveaux-nés (6 jours ; S/IOPS NMRI ; Charles River France) sont retirés et coupés avant d'être incubés pendant 10 minutes à 37°C dans 0.25% de trypsine EDTA dilués dans du DMEM. Les cervelets sont ensuite dissociés par contraintes mécaniques et les cellules sont centrifugées pendant 5min à 500g. Les cellules sont ensuiteensemencées dans des boîtes recouvertes de poly-D-lysine et incubées à 37°C dans du milieu K25+S. Un jour plus tard, une solution de cytosine-β-D arabinoside (10μM ; Sigma) est ajoutée dans le milieu pour empêcher la prolifération de cellules autres que des neurones.

5.2.3.2.5 Etudes menées sur cellules

Cinq microlitres d'une solution de SRB (10mg/ml) sont ajoutés dans les boîtes contenant les cellules (volume de milieu : 5ml). Les observations ont été réalisées sur l'installation de microscopie biphotonique décrite précédemment. L'objectif utilisé est le 60x qui est immergé dans le milieu de culture. L'acquisition s'est déroulée de 3 minutes à 2 heures après la mise en présence avec le colorant. L'observation des noyaux cellulaires a été réalisée suite au dépôt de 40μl d'une solution de Hoechst 33342 (1mg/ml ; Sigma). Le coin de cube utilisé est le Rhodamine/Hoechst. Les observations ont été réalisées sur 6 boîtes différentes pour les astrocytes et 3 boîtes différentes pour les neurones, avec une excitation à 800nm.

5.2.3.2.6 Etudes intravitales

Les études intravitales ont été réalisées sur des souris nude (n=4 ; Charles River France). Les animaux ont été brièvement anesthésiés par un mélange isoflurane / air (2%) afin de permettre l'injection de 50μl d'une solution de SRB à 10mg/ml dans une solution de NaCl 0.9% dans la veine caudale. Deux heures après l'injection, l'animal est à nouveau anesthésié par inhalation d'isoflurane et une craniotomie est réalisée à la verticale du cortex pariétal (pour plus de détails, voir 5.2.2.1.1). Dix minutes après la chirurgie, 100μl d'une solution de FITC dextran 70kDa (100mg/ml dans une solution de NaCl 0.9%) sont injectés dans la veine caudale. L'objectif du microscope est placé en immersion à la surface du cortex exposé. La phase d'imagerie a lieu entre 2h30 et 5h après l'injection de la SRB. La longueur d'onde d'excitation a été réglée à 800nm.

5.2.3.3 Résultats

5.2.3.3.1 Caractérisation de la SRB

Après 24h de dialyse de la solution contenant la SRB et l'albumine, une fraction dialysable de la SRB égale à 0.6 a été mesurée. Cela signifie que la majorité des molécules de SRB se trouvant dans le sang ne sont pas liées à l'albumine et peuvent donc passer la BHE. De façon plus surprenante, le contrôle réalisé sans albumine a montré une fraction dialysable plus faible. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'en solution aqueuse, la SRB a tendance à s'agréger pour former des dimères¹⁶². L'albumine semble être un moyen d'éviter cette dimérisation.

L'élimination de la SRB semble suivre une décroissance exponentielle (Figure 5.5). Cette élimination est réalisée majoritairement par les reins (une forte coloration des urines est visible). Il a également été remarqué à l'autopsie une coloration de la lumière intestinale au niveau du duodenum. Il semble qu'à ce niveau la SRB puisse être extraite du sang. Cette observation nécessite de plus amples investigations qui n'ont pas encore été réalisées.

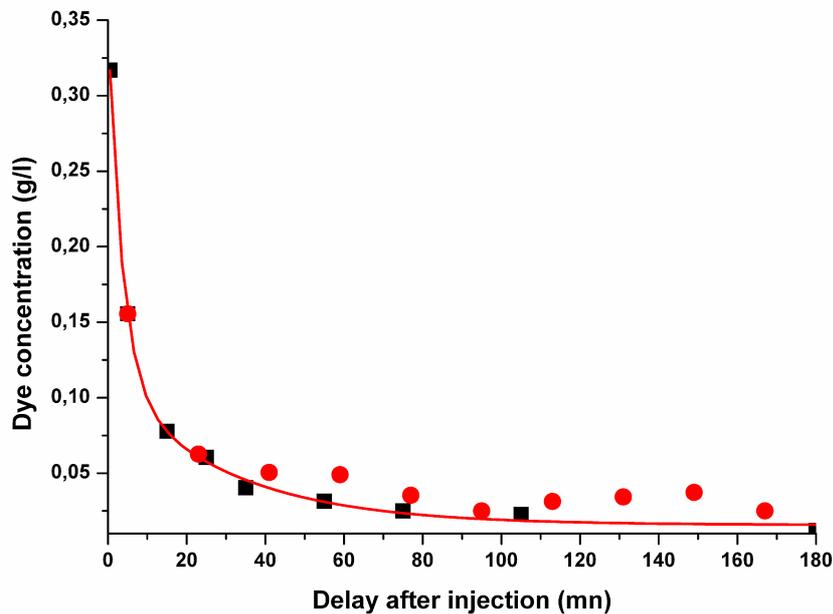


Figure 5.5 : Cinétique d'élimination de la SRB après une injection intraveineuse. La cinétique a été réalisée sur une période de trois heures après l'injection d'un bolus de 100µl d'une solution de SRB à 5mg/ml. La concentration en SRB (axe des ordonnées) est donnée en grammes par litre de sang. Une courbe ($C = 0.35 (0.68e^{-x/3.5}) + 0.27e^{-x/30} + 0.045$) a été ajustée sur les données d'une souris (carrés noirs).

5.2.3.3.2 *Caractérisation des cellules marquées par la SRB*

Deux heures trente après l'injection de SRB, un marquage est observé dans certaines cellules du cortex. Ce marquage est présent dans le cytoplasme mais également dans le noyau ; il est toujours détectable 5h après l'injection. La SRB a donc bien la propriété de traverser la BHE de manière passive. Les cellules ayant capté la SRB partagent une morphologie proche : une forme étoilée avec de nombreuses extensions cytoplasmiques dont certaines sont en contact avec les capillaires sanguins. Ces caractéristiques sont celles des astrocytes.

De même, une densité de cellules marquées de 11.10^3 cellules/mm³ est observée dans la zone se trouvant entre 80 et 120µm sous la dure-mère. Nimmerjahn et al. ont trouvé une densité astrocytaire proche de nos valeurs : $14.2 \cdot 10^3$ cellules/mm³ dans la couche II/III du cortex de souris¹⁵⁸ (niveau équivalent à nos observations) (Figure 5.6).

Les expériences menées sur cultures cellulaires montrent que la SRB reste extracellulaire pour les cultures primaires de neurones mais va marquer l'intégralité des astrocytes (cytoplasme et noyau) dans les cultures primaires d'astrocytes (Figure 5.7).

L'ensemble de ces arguments morphologiques et les essais menés sur cultures cellulaires laissent à penser que la SRB pourrait marquer de façon spécifique les astrocytes.

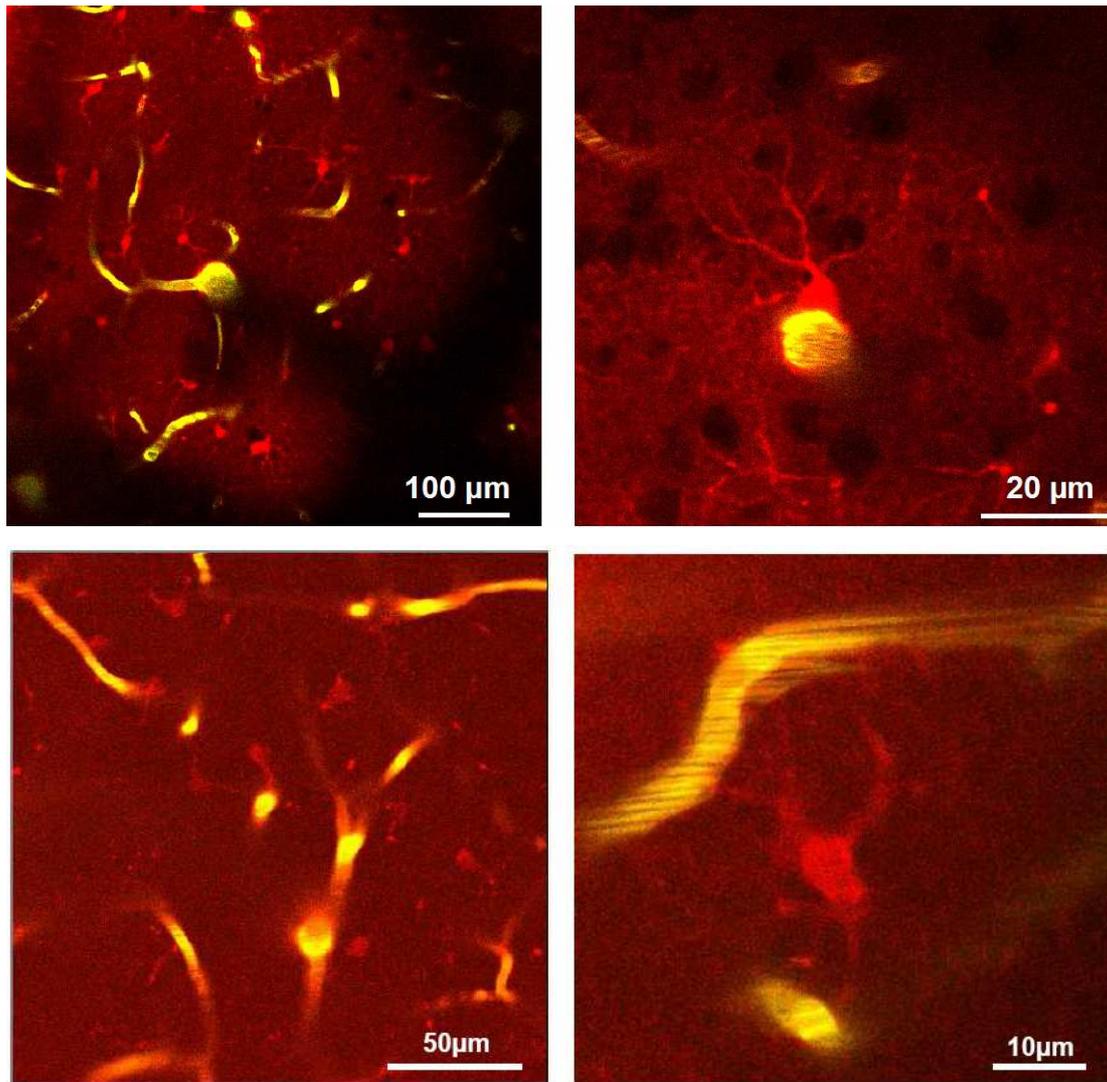
5.2.3.4 Discussion

5.2.3.4.1 *Passage de la BHE*

Avec les observations précédemment menées lors de la mise en place de la méthode d'observation de la perméabilité de la BHE, nos expériences montrent que la SRB peut traverser de façon passive la BHE. La mesure du coefficient de partition eau/octanol qui permet de prédire le comportement d'une molécule par rapport à la BHE donne un coefficient de 0.017³⁹. Cette faible valeur signifie que le passage de la BHE devrait être très lent. Nous devons en effet attendre 30 à 40 minutes avant de détecter la SRB dans le parenchyme cérébral. Une observation 2h30 après l'injection nous paraît être un bon compromis pour avoir un bon contraste.

Nous avons également réalisé une observation 18 heures après l'injection ; aucun marquage n'a pu être détecté, suggérant que la SRB pouvait soit être dégradée par les astrocytes, soit être excrétée et éliminée par un autre système. Cependant, les conclusions de cette expérience réalisée sur un seul animal ne doivent être prises qu'à titre indicatif.

³⁹ Méthode « shake-flake » ; préconisée par l'OECD, test guideline 107, decision of the council C(81) 30 final, 1981.



Figures 5.6 : Marquage en intravital des astrocytes par la SRB. On remarque les nombreuses extensions cytoplasmiques des cellules marquées par la SRB (en rouge) qui ont tendance à aller se placer au contact des capillaires sanguins (en jaune). Les images ont été acquises à diverses profondeurs entre 50 et 200 μ m sous la dure-mère en utilisant le coin de cube Rhodamine/FITC. Le FITC dextran 70kDa reste intravasculaire et sert à repérer les vaisseaux sanguins.

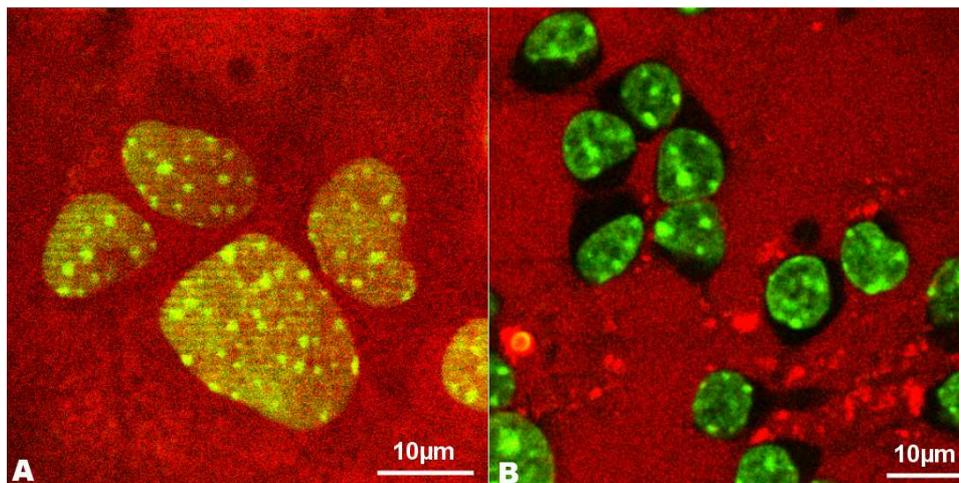


Figure 5.7 : Tests de la SRB sur cultures primaires d'astrocytes (A) et de neurones (B).

Une nouvelle vague d'observations sur plusieurs animaux assurerait une reproductibilité statistique pour confirmer ces hypothèses.

La sortie de la SRB du volume vasculaire pourrait également être dû à l'acte chirurgical. Cette hypothèse peut toutefois être écartée car l'injection a lieu 2 heures avant la réalisation de la crâniotomie. En se basant sur les données d'élimination de la SRB (figure 5.5), la concentration en SRB dans le sang est à ce moment très faible (0.02g/l).

5.2.3.4.2 Spécificité du marquage

La spécificité du marquage a été démontrée ici de deux manières différentes : par des constatations morphologiques et par des études sur cultures cellulaires.

La morphologie des cellules marquées est très proche de celle des astrocytes, les extensions cytoplasmiques en contact avec les capillaires sont typiques d'une interaction astrocyte-vascularisation pour former la dernière partie de la BHE.

De même, la densité de cellules marquées que nous avons observé est proche de la densité astrocytaire décrite par Nimmerjahn et al. pour cette couche¹⁵⁸.

Les études sur cultures cellulaires n'ont été réalisées que sur neurones et astrocytes, confirmant nos précédentes observations. Cependant tous les types de cellules gliales n'ont pas été explorés. En effet, nous n'avons pas pu nous procurer de cultures d'oligodendrocytes ou de cellules microgliales. Cependant leur densité dans la zone du cortex que nous avons observé est moindre et la morphologie des cellules marquées est différente de celle d'un oligodendrocyte ou d'une cellule microgliale.

Afin de confirmer la spécificité de notre marquage, la preuve définitive pourrait être apportée par l'utilisation d'animaux transgéniques. En réalisant une expérience en intravital dans les mêmes conditions que décrites précédemment et en observant simultanément la fluorescence émise par la SRB et la fluorescence émise par une protéine fluorescente uniquement localisée dans les astrocytes (une GFP sous le contrôle du promoteur de la GFAP par exemple), il serait possible de vérifier si les signaux colocalisent. En cas de colocalisation, une preuve supplémentaire de la spécificité pourrait être apportée.

5.2.3.4.3 Intérêt de la méthode

Cette méthode de coloration des astrocytes par la SRB présente de nombreux avantages.

D'une part elle est faiblement invasive et l'injection intraveineuse permet un marquage uniforme du parenchyme cérébral, notamment dans le cortex où la densité capillaire est très élevée.

La forte solubilité de la SRB dans l'eau permet d'injecter des *bolus* de colorant fortement concentrés. La toxicité de la SRB est très faible (Sigma-Aldrich MSDS) ; sa DL50 est de 10300 mg/kg (à titre de comparaison, les injections pratiquées dans nos expériences sont de 22 mg/kg). Sur des animaux porteurs de fenêtres crâniennes en quartz, des études longitudinales sont possibles.

Enfin, un intérêt supplémentaire peut être d'utiliser ce marquage sur des animaux transgéniques qui expriment des protéines fluorescentes dans d'autres types cellulaires. Il sera alors possible d'imager les interactions entre différents types cellulaires.

5.2.4 Conclusions

Nous avons ainsi développé deux méthodes permettant d'imager en intravital la perméabilité de la BHE et la morphologie des astrocytes. Nous reviendrons dans le chapitre 6 sur la mesure de la perméabilité.

Le parenchyme cérébral permet l'observation de structures jusqu'à des profondeurs de 600 μ m sous la dure-mère. Il est un modèle de choix pour le développement de techniques angiographiques et une première étape dans la mise en place de l'angiographie tumorale qui présente des obstacles supplémentaires, notamment la forte densité cellulaire qui empêche des observations au-delà de 200 μ m et la forte perméabilité des capillaires qui entraîne une fuite des colorants.

5.3 Imagerie de la Vascularisation Tumorale

Nous venons de voir que la microscopie biphotonique intravitale est un outil particulièrement adapté à l'imagerie de la vascularisation du cortex cérébral avec une résolution micrométrique. Afin de mieux caractériser les effets de la PAT-Plat sur la vascularisation du gliome F98, nous allons maintenant voir comment nous avons déterminé le modèle animal le mieux adapté et les conditions nous paraissant comme optimales pour l'observation des vaisseaux tumoraux.

5.3.1 Greffe orthotopique du gliome F98

Une greffe orthotopique de cellules de gliome F98 permet d'avoir une tumeur qui se développe dans son environnement (patho)physiologique normal, c'est-à-dire dans le parenchyme cérébral. Cependant pour être observable en microscopie biphotonique, elle doit pousser dans le cortex cérébral, à une profondeur inférieure à 600 μ m qui est la profondeur limite d'observation. Dans l'idéal, la tumeur devrait être présente dès 200 μ m afin d'imager au mieux une plus grande partie de la zone péri-tumorale.

Si ces constatations apparaissent séduisantes et plausibles sur le papier, en pratique elles sont extrêmement difficiles à mettre en place pour plusieurs raisons :

- bien que réalisée en conditions stéréotaxiques avec de faibles volumes et une trépanation d'un diamètre à peine supérieur à celui de l'aiguille d'injection (pour le détail du protocole chirurgical, voir 6.3.1.1), l'injection des cellules tumorales à une profondeur inférieure à 1mm sous la dure-mère entraîne quasi inévitablement un reflux. Certaines cellules tumorales vont alors se localiser au niveau des méninges. La modélisation s'en trouve modifiée.
- le fait qu'une partie de la tumeur pousse au niveau des méninges peut entraîner l'adhésion du néoplasme au périoste. Lors de la réalisation de la crâniotomie pour l'observation en microscopie biphotonique, la tumeur peut soit rester accrochée à l'os qui est retiré, soit entraîner une hémorragie difficilement contrôlable.

Nous avons réalisé de nombreuses tentatives afin de mettre en place ce modèle orthotopique. Toutes se sont soldées par un échec, dû dans la majorité des cas à une adhésion de la tumeur à l'os. Nous avons donc décidé de développer un autre modèle animal qui ne présente pas ces problèmes.

Malgré tout, la piste orthotopique n'est pas à abandonner définitivement. La réalisation d'une fenêtre crânienne (voir 4.6.6.1) au moment de l'injection des cellules tumorales peut supprimer le problème de l'adhérence de la tumeur à l'os et peut permettre un suivi longitudinal. De même, une augmentation de la viscosité de la solution d'injection contenant les cellules tumorales (par ajout d'agarose par exemple) peut atténuer le phénomène de reflux. Nous avons cependant volontairement écarté la solution de la réalisation d'une fenêtre crânienne pour plusieurs raisons :

- la difficulté de réaliser une dosimétrie par la suite lors des irradiations.

- la lourdeur chirurgicale qui empêche de réaliser une large cohorte d'animaux nécessaire pour avoir des résultats représentatifs.
- la reproductibilité dans le développement de la tumeur.

Enfin, la greffe d'un petit explant de tumeur F98 a également été proposée afin de pallier au problème du reflux. Cette approche a rapidement été écartée à cause des lésions qui pourraient être causées lors des micro-incisions du parenchyme cérébral au moment de l'implantation des explants. Ces lésions pourraient être à l'origine d'artefacts lors de l'observation.

5.3.2 Greffe hétérotopique du gliome F98 sous fenêtre dorsale

Les fenêtres dorsales sont un modèle de plus en plus utilisé en oncologie. Elles consistent en la pose d'une chambre d'observation sur le dos de rongeurs par un repli de la peau. La peau est retiré sur une face est remplacée par une fenêtre de quartz. La vascularisation au niveau du dos étant bien développée, il est alors possible de déposer un explant de gliome F98 entre la lame et la peau et de réaliser par la suite un suivi longitudinal de l'angiogénèse.

5.3.2.1 Matériels & Méthodes

5.3.2.1.1 *Mise en place de la fenêtre dorsale*

La souris est anesthésiée par inhalation d'isoflurane (1.5% dans 30% O₂ / 70% N₂O ; 5% d'isoflurane pour l'induction). Elle est ensuite placée sur un support chauffant afin de maintenir la température de l'animal dans des conditions physiologiques pendant toute la durée de l'intervention chirurgicale.

La peau est épilée au niveau du champ opératoire à l'aide d'une crème dépilatoire (Veet). La crème est déposée pendant 3 à 4 minutes puis retirée à l'aide de cotons-tiges imbibés de liquide physiologique.

A l'aide d'un fil de suture en soie, l'animal est suspendu sur une potence en passant les fils aux extrémités supérieures de ce qui deviendra la fenêtre dorsale. La peau du dos doit être légèrement tendue mais l'animal doit reposer sur le sol de la potence. La plaque arrière de la fenêtre dorsale est ensuite stérilisée par un bain d'alcool puis trois petites incisions sont réalisées en vis-à-vis sur les deux faces de la peau repliée. La plaque arrière est positionnée en faisant passer les vis par les incisions réalisées. La peau est ensuite suturée à la plaque arrière par les minuscules perforations prévues à cet effet. A l'aide de ciseaux à bouts recourbés, une

incision circulaire d'approximativement 1.5cm de diamètre est réalisée sur une face de la peau. Après le retrait de la peau, l'aponévrose du second feuillet de peau est délicatement incisée. La plaque avant de la chambre est ensuite posée, puis bloquée à l'aide de minuscules écrous sur les trois vis. Un antibiotique en pommade (fucidine) est ensuite déposé. La fenêtre est ensuite remplie avec du liquide physiologique (NaCl 0.9%) et une lamelle de quartz est déposée avant d'être bloquée à l'aide d'une bague adaptée. Un antalgique est ensuite administré à l'animal. Le protocole chirurgical ainsi que la formation nous ont été fournis par Christine M'Rini – ITAV (Toulouse).

5.3.2.1.2 Implantation de la tumeur

Vingt quatre heures après la pose de la fenêtre dorsale, l'animal est à nouveau anesthésié par une inhalation d'isoflurane. Il est nécessaire d'attendre un délai de 24h pour vérifier si il n'y a pas de développement d'une infection ou d'une inflammation. La lamelle de quartz est retirée et un explant de gliome F98 (volume : approximativement 5 mm³) est déposé à proximité d'un vaisseau sanguin. La lamelle est ensuite reposée.

5.3.2.1.3 Suivi de l'angiogenèse

A divers délais après l'implantation (J3, J6 et J12 pour l'expérience présentée ici), l'animal est à nouveau anesthésié par inhalation d'isoflurane puis placé sous un microscope (Leica MZ6) sur lequel est installé un appareil photo numérique (Pentax IstDI). Des photographies de la vascularisation sont alors réalisées.

A J6, une injection d'un cocktail de 100µl de FITC dextran 70kDa (100mg/ml) et de 50µl de SRB (10mg/ml) dans une solution de NaCl 0.9% est réalisée dans la veine caudale. La vascularisation est ensuite imagée par microscopie biphotonique intravitale comme décrit précédemment avec l'objectif du microscope placé en immersion à la surface de la lamelle. L'objectif utilisé est un 10x (voir 5.1.3) avec le coin de cube Rhodamine/FITC ; la longueur d'onde d'excitation a été réglée à 800nm.

5.3.2.2 Résultats

Sur les macrophotographies, un début d'angiogenèse est visible dès 3 jours après l'implantation de la tumeur. Un anneau très riche en vascularisation avec certaines zones hémorragiques est observable à J6 et à J12 (Figure 5.8).

La microscopie biphotonique intravitale met en avant une zone en bordure de tumeur présentant un grand nombre de néo-vaisseaux avec une architecture anarchique typique d'une angiogénèse tumorale. Le FITC dextran 70kDa reste dans le compartiment intravasculaire alors que la SRB en sort ce qui permet d'augmenter le contraste.

5.3.2.3 Discussions

La modélisation par fenêtres dorsales présente de nombreux avantages pour une observation en microscopie biphotonique intravitale, notamment le suivi longitudinal qui est facilité, la possibilité d'observer directement l'angiogénèse tumorale ainsi que les effets d'une thérapie sur celle-ci.

Pour ce qui est des inconvénients, elle demeure une greffe hétérotopique, l'environnement (patho)physiologique n'est donc pas respecté. D'autre part, il est possible de suivre les événements précoces du développement tumoral mais à cause de la taille de la fenêtre il est impossible de travailler sur des tumeurs de plus gros volume.

Enfin pour des questions techniques, biologiques et éthiques, la durée de vie d'une fenêtre dorsale est de dix à quinze jours, limitant également les observations à plus long terme.

Malgré le fait qu'il se prête très bien à la microscopie biphotonique intravitale, nous avons écarté ce modèle pour l'étude de la PAT-Plat pour plusieurs raisons :

- la lourdeur de l'acte chirurgical empêche de travailler sur une cohorte d'animaux suffisante pour avoir une robustesse statistique.
- la dosimétrie ainsi que le protocole d'irradiation est très complexe à mettre en place. D'autre part, les conditions d'irradiation et notamment les matériaux que doit traverser le rayonnement synchrotron sont très différents de la réalité (patho)physiologique. Ce modèle présente donc de nombreux biais.
- la durée de vie de la fenêtre dorsale empêche les observations à long terme (> 2 semaines). Il est alors très difficile d'évaluer l'issue du traitement.

Le développement d'un modèle permettant l'obtention d'informations sur des tumeurs de plus gros volume, dans un environnement plus proche de la réalité biologique et sans l'interposition entre le faisceau et la tumeur de matériaux autres que biologiques nous est apparu nécessaire.

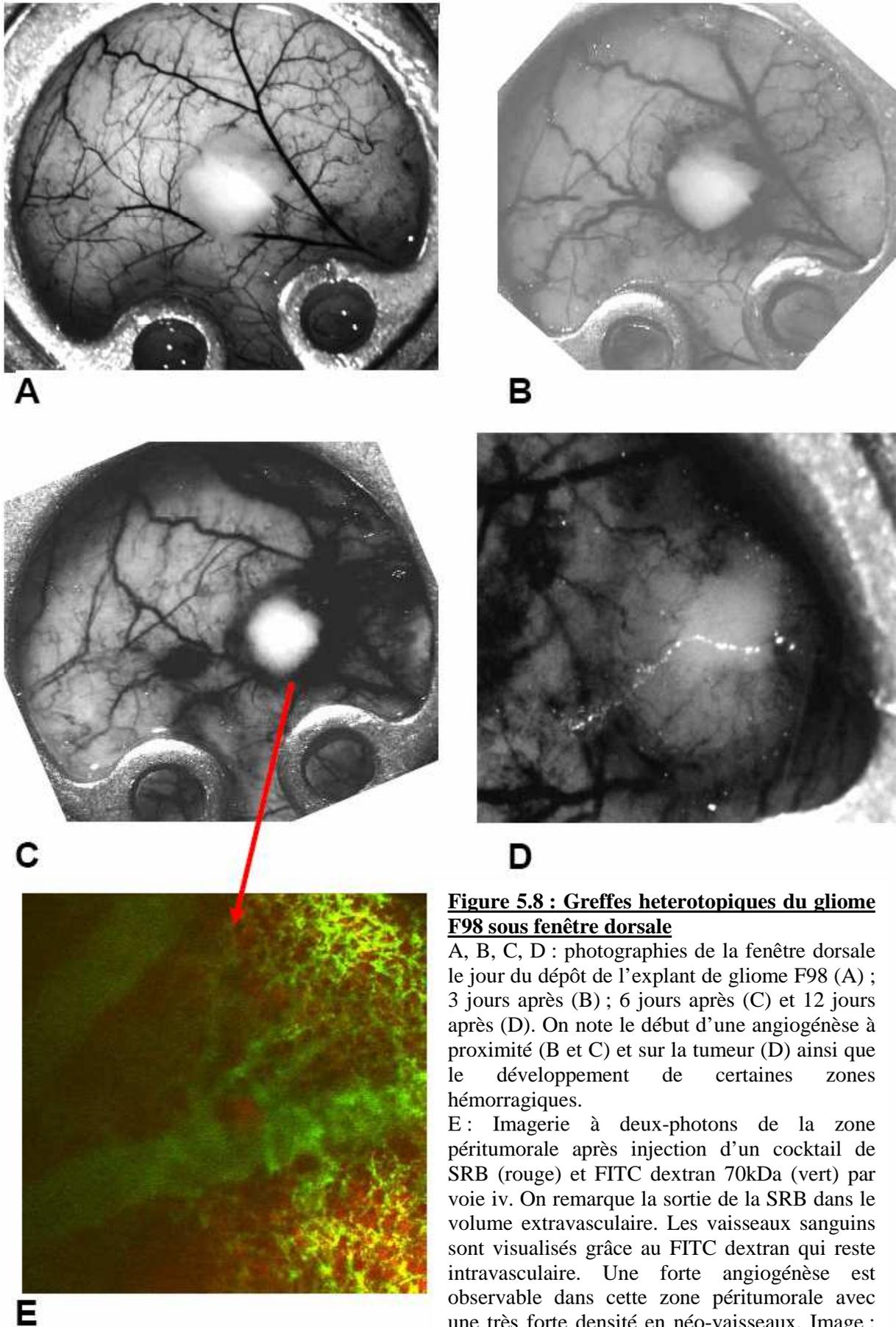


Figure 5.8 : Greffes heterotopiques du gliome F98 sous fenêtre dorsale

A, B, C, D : photographies de la fenêtre dorsale le jour du dépôt de l'explant de gliome F98 (A) ; 3 jours après (B) ; 6 jours après (C) et 12 jours après (D). On note le début d'une angiogénèse à proximité (B et C) et sur la tumeur (D) ainsi que le développement de certaines zones hémorragiques.

E : Imagerie à deux-photons de la zone péri-tumorale après injection d'un cocktail de SRB (rouge) et FITC dextran 70kDa (vert) par voie iv. On remarque la sortie de la SRB dans le volume extravasculaire. Les vaisseaux sanguins sont visualisés grâce au FITC dextran qui reste intravasculaire. Une forte angiogénèse est observable dans cette zone péri-tumorale avec une très forte densité en néo-vaisseaux. Image : $1196 \times 1196 \mu\text{m}^2$.

5.3.3 Greffes hétérotopiques du gliome F98 en sous-cutané

Une autre modélisation tumorale consiste à injecter une suspension de cellules tumorales (dans notre cas des cellules de gliome F98) en sous cutané dans le membre inférieur.

5.3.3.1 Matériels & Méthodes

5.3.3.1.1 *Mise en place du modèle*

Les animaux sont très brièvement anesthésiés par une inhalation rapide (1 à 2 minutes) d'isoflurane (5% dans de l'air). Cinquante microlitres d'une suspension cellulaire contenant 10^5 cellules F98 dans du DMEM sont ensuite injectés en sous-cutané dans le membre inférieur gauche⁴⁰. Les animaux sont ensuite remis en stabulation pour un délai variable en fonction du volume tumoral que l'on souhaite étudier.

Dans le cas de la mise en place du modèle pour les expériences de microscopie biphotonique intravitale, le délai entre l'implantation et l'observation est de l'ordre de 3.5 à 4.5 semaines. Le volume tumoral est ainsi compris entre 480 et 800 mm³ au moment de la phase d'imagerie.

5.3.3.1.2 *Protocole d'imagerie*

L'animal est anesthésié par inhalation d'isoflurane (1.5% dans 30% O₂ / 70% N₂O ; 5% d'isoflurane pour l'induction), puis le membre inférieur gauche est immobilisé dans de la pâte à moulage dentaire afin de réduire les mouvements causés par la respiration. Au niveau de la tumeur, la peau est soulevée à l'aide d'une pince et une incision est réalisée afin de retirer un disque de peau. La surface de la tumeur exposée est recouverte par une solution de NaCl à 0.9%.

Une solution de 100µl de FITC dextran 70kDa (100mg/ml) dans du NaCl 0.9% est ensuite injectée dans la veine caudale (il est également possible d'ajouter 50µl d'une solution de SRB à 10mg/ml dans la solution d'injection. La SRB sortira du volume vasculaire et permettra d'améliorer le contraste).

L'objectif du microscope est placé en immersion dans la solution saline se trouvant à la surface de la tumeur. La forme arrondie de l'incision réalisée auparavant permet de maintenir le liquide. L'observation est réalisée avec l'objectif 20x et le coin de cube Rhodamine/FITC avec une longueur d'onde d'excitation de 800nm.

⁴⁰ La description de la préparation des cellules se trouve dans la section 6.3.1.1.1

5.3.3.2 Résultats

La vascularisation tumorale est très clairement visible à des profondeurs allant jusqu'à 200µm sous la surface. Une étude morphologique met en évidence une architecture anarchique, avec certains vaisseaux présentant des diamètres élevés typiques d'une angiogenèse tumorale. Cette méthode se prête donc très bien à une observation intravitale de la vascularisation tumorale (Figure 5.9).

5.3.3.3 Discussion

Comme nous venons de le constater, cette méthode permet d'observer la vascularisation tumorale jusqu'à une profondeur de 200µm sous la surface. Il s'agit d'une performance bien moindre que celle obtenue lors d'une angiographie cérébrale. Cependant, les tissus tumoraux sont denses et la diffusion ainsi que l'absorption de la lumière sont beaucoup plus élevés réduisant ainsi le signal détectable. Malgré cela les informations morphologiques sont d'une grande qualité et certaines mesures comme la largeur des vaisseaux sont aisément réalisables. L'injection sous-cutanée donne également des résultats reproductibles entre les animaux, avec un accès facilité au volume tumoral. Il est aussi possible d'obtenir rapidement une large cohorte d'animaux permettant ainsi de faire des études avec une bonne reproductibilité statistique.

Lors du processus d'irradiation, la dosimétrie est beaucoup plus aisée et des éléments autres que biologiques (lamelles de quartz, métal, ...) ne se trouvent pas sur le trajet du faisceau synchrotron.

Cette méthode présente cependant quelques inconvénients. Il s'agit toujours d'un modèle hétérotopique, donc présentant un environnement (patho)physiologique différent de la réalité. Il est également impossible de réaliser un suivi longitudinal. En effet, une fois l'incision réalisée et l'observation en microscopie biphotonique intravitale effectuée, l'animal doit être euthanasié. La suture après la période d'imagerie pose à la fois des problèmes en terme de stérilité (les expérimentations sont réalisées sur souris nude qui y sont tout particulièrement sensibles) et d'artefacts (la suture et l'observation qui l'ont précédé peuvent générer des modifications physiologiques locales, sources de biais).

Malgré ces deux inconvénients majeurs, c'est ce modèle que nous avons décidé d'utiliser pour l'ensemble de nos études.

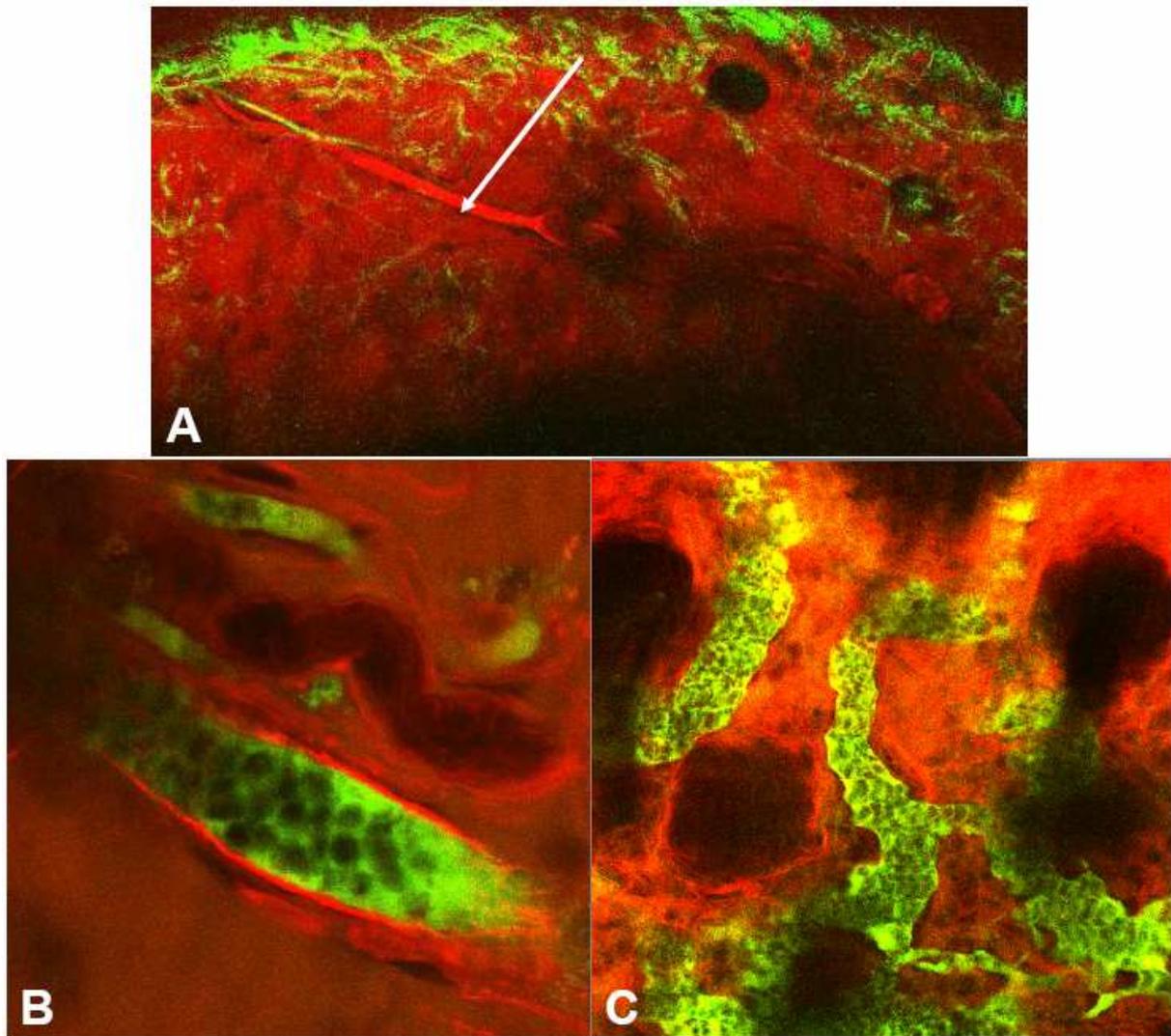


Figure 5.9 : Imagerie de la vascularisation du gliome F98.

A. Après injection de SRB (rouge) et acquisition simultanée du signal SHG (vert). On note une forte dilatation d'un vaisseau en zone peritumorale (à droite de la flèche). Largeur de l'image : $600\mu\text{m}$; acquisition avec le coin de cube Rhodamine/SHG.

B. Après injection de SRB (rouge) et FITC dextran 70kDa (vert). On remarque que la SRB sort du volume vasculaire et rentre dans les tissus. Elle marque également certaines structures dans la membrane du vaisseau (nous verrons par la suite qu'il s'agit de fibres élastiques). Un vaisseau non perfusé est également visible (haut). Image acquise en 5x ($120\times 120\mu\text{m}^2$) avec le coin de cube Rhodamine/FITC.

C. Même protocole d'injection et coin de cube qu'en B. On remarque que la SRB qui est sortie du volume vasculaire est allée marquer certaines fibres (voir 5.4). Grossissement 2x ($300\times 300\mu\text{m}^2$). Images acquises entre 50 et $100\mu\text{m}$ sous la surface de la tumeur.

5.4 Imagerie des Fibres Élastiques

Au cours de la mise en place du modèle de tumeur en sous-cutané, nous nous sommes aperçu qu'après une injection intraveineuse d'une solution contenant la SRB, le colorant sortait du volume vasculaire. Il a également été constaté qu'il allait se fixer préférentiellement sur certaines structures se trouvant dans la paroi des vaisseaux ainsi que dans le tissu conjonctif. En se basant sur la morphologie et la localisation des structures marquées, l'hypothèse fut émise qu'il pourrait s'agir des fibres élastiques. Nous avons donc dans un premier temps vérifié la spécificité du marquage puis nous avons proposé et mis en place quelques applications de cette méthode.

5.4.1 Généralités sur les fibres élastiques

Les fibres élastiques sont un composant majeur de la matrice extra-cellulaire. Elles sont composées de deux principaux constituants : un cœur d'élastine, une protéine hydrophobe, entouré d'un manteau riche en microfibrilles¹⁶³⁻¹⁶⁶.

Les fibres élastiques sont responsables de la déformabilité réversible de certains organes comme les artères ou les poumons¹⁶⁷. On en trouve également dans le tissu conjonctif, autour des fibres musculaires, dans la peau ainsi que dans les ligaments.

Il existe plusieurs méthodes pour imager les fibres élastiques :

- par des méthodes de colorations histologiques classiques telles que la méthode resorcine-fuchsine. Dans ce cas, l'observation est réalisée en microscopie à fond clair sur des coupes fines.
- par des méthodes de colorations immunohistochimiques. En utilisant des anticorps anti-elastine par exemple.
- en utilisant les propriétés d'endofluorescence de la molécule d'élastine lorsqu'elle est excitée par microscopie biphotonique. Les observations peuvent être pratiquées sur des explants jusqu'à des profondeurs de l'ordre de 50 μ m sous la surface suivant les tissus^{119; 168-170; 123}.

Il existe donc plusieurs méthodes établies pour observer les fibres élastiques. Cependant aucune d'elle n'est applicable à des études *in vivo*. Les méthodes histologiques et immunohistochimiques demeurent restreintes aux coupes fines après un certain nombre de traitements sur les tissus ; les méthodes d'endofluorescence demandent des temps

d'acquisition de l'ordre de 5s, ce qui est difficilement applicable au vivant en raison des mouvements respiratoires. Malgré tout, l'utilisation d'endoscopes et l'immobilisation de certains organes peuvent permettre une imagerie utilisant les propriétés d'endofluorescence de l'élastine. Cependant, la profondeur d'observation demeure très limitée^{169; 170}.

Avant de continuer à caractériser le marquage de la SRB, nous nous sommes fixés le cahier des charges suivant afin de développer non pas une méthode supplémentaire de marquage des fibres élastiques mais une méthode permettant d'apporter plus d'éléments et notamment l'accès à des études intravitales :

- l'acquisition doit pouvoir être effectuée en moins d'une seconde pour une image de 512x512 pixels. Cette contrainte de temps est nécessaire pour s'affranchir des mouvements respiratoires.
- la spécificité du colorant pour les fibres élastiques doit être avérée.
- la voie d'administration du colorant doit être simple.
- il doit être possible de marquer d'autres structures à l'aide d'autres colorants ou par imagerie de seconde harmonique (SHG) pour avoir des informations morphologiques supplémentaires
- le colorant ne doit pas être toxique pour l'animal.

5.4.2 Matériels & Méthodes

5.4.2.1 Mesures physiques

Le spectre d'émission à deux photons de la SRB a été réalisé de la manière suivante. La SRB (dans une solution de NaCl à 0.9%) a été déposée dans une fiole puis excitée à 800nm par microscopie biphotonique. La fluorescence émise a ensuite été analysée par un spectrophotomètre (Jobin Yvon H-20).

5.4.2.2 Etudes sur anneaux d'artères

5.4.2.2.1 *Prélèvement des artères*

La crosse aortique ainsi que l'aorte thoracique ont été prélevées sur des rats Wistar (n=5). Certaines expériences ont été réalisées directement sur du matériel frais conservé moins de 4h dans du PBS (Phosphate-Buffered Saline, Sigma) ; d'autres ont été effectuées sur des artères

fixées dans du paraformaldehyde 4%. Aucune différence en termes de morphologie et de qualité du marquage n'a pu être constatée entre les deux groupes. Avant la phase de coloration, des anneaux d'artères de un à deux millimètres d'épaisseur ont été coupés à l'aide d'un scalpel.

5.4.2.2.2 Immunohistochimie (vérification de la spécificité)

Les anneaux sont rincés au PBS avant d'être incubés pendant 4h à 20°C avec un anticorps primaire anti-élastine (mouse monoclonal ; dilution au 1/100 dans du PBS-Bovine Serum Albumine 3% ; Abcam BA-4). Ils sont ensuite à nouveau rincés au PBS puis mis à incuber pendant 2h à 20°C avec un anticorps secondaire donkey anti-mouse IgG couplé à du FITC (dilution au 1/100 dans du PBS-Bovine Serum Albumine 3% ; Jackson Immunoresearch). Après une nouvelle phase de rinçage au PBS, les anneaux sont incubés pendant 5min dans une solution de SRB (0.5mg/ml dans du NaCl 0.9%). Enfin, les anneaux sont rincés 5 fois au PBS avant observation en immersion dans le même liquide.

5.4.2.2.3 Paramètres d'imagerie

L'ensemble des expériences, qu'elles soient intravitales ou sur anneaux d'artères, ont été réalisées avec l'objectif 20x. Différents coins de cube ont été utilisés au cours de ces expériences. Leur utilisation sera mentionnée dans les résultats et dans les légendes des figures. La longueur d'onde d'excitation est de 800nm.

5.4.2.3 Etudes intravitales

Les souris (n=20) sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane (1.5% dans 30% O₂ / 70% N₂O ; 5% d'isoflurane pour l'induction), puis le membre inférieur gauche est immobilisé dans de la pâte à moulage dentaire afin de réduire les mouvements causés par la respiration. Un morceau de peau (1cm de diamètre) est retiré à la verticale de l'artère saphène. La surface exposée est immédiatement remplie d'une solution de NaCl à 0.9%.

Le colorant peut être déposé de deux manières :

- soit par injection systémique dans la veine caudale d'un cocktail de 50µl d'une solution de SRB (10mg/ml dans du NaCl 0.9%) et de 100µl d'une solution de FITC dextran 70kDa (100mg/ml dans du NaCl 0.9% dans le cas où l'on souhaite visualiser la lumière des vaisseaux sanguins).

- soit par dépôt local au niveau du tissu à imager de 40µl d'une solution de SRB (10mg/ml dans du NaCl 0.9%). Le colorant est ensuite rincé plusieurs fois par une solution saline.

Pour la phase d'imagerie ; l'objectif du microscope est placé en immersion dans la solution saline à la surface du tissu à observer. Les expériences ont été réalisées à la fois en intravital et *in situ* ; c'est-à-dire dans les mêmes conditions que décrites précédemment mais dans les 20 minutes après l'euthanasie de l'animal. Ce type d'observation permet de s'affranchir totalement des mouvements respiratoires.

5.4.3 Résultats

5.4.3.1 Le marquage est spécifique des fibres élastiques

5.4.3.1.1 Morphologie

Afin de vérifier si le marquage est bien spécifique des fibres élastiques, nous nous sommes placés dans l'épimysium (couche de tissu conjonctif qui entoure les muscles) où les fibres élastiques forment un réseau avec une morphologie bien particulière et où il est également possible d'imager le collagène I et III par SHG. C'est l'imagerie par SHG du collagène qui nous permettra de nous positionner dans l'épimysium.

Dans un premier temps nous avons cherché à imager l'épimysium en utilisant les paramètres suivants : coin de cube Visible/SHG ; durée d'acquisition 0.9s/image ; puissance laser : 60mW. Aucune fibre élastique n'est détectable. Le signal du collagène détectable en SHG confirme notre position. Seuls quelques points rouges sont observables sur la voie « visible » qui permet de détecter l'endofluorescence.

Nous avons ensuite réalisé la même expérience dans des conditions similaires en remplaçant le coin de cube par le Rhodamine/SHG. Le signal SHG dû au collagène est bien présent mais rien n'est détecté sur la voie Rhodamine.

Dans un dernier temps, nous avons conservé les mêmes paramètres mais la phase d'imagerie a été réalisée, soit 10min après une injection intraveineuse de SRB, soit après un dépôt local du colorant. Dans les deux cas, un fort marquage est observable sur la voie Rhodamine. Les filaments ramifiés ont une morphologie très proche de celle décrite pour les fibres élastiques dans cette zone (Figure 5.10).

En réduisant la puissance d'excitation jusqu'à 25mW, il est encore possible d'obtenir des images exploitables.

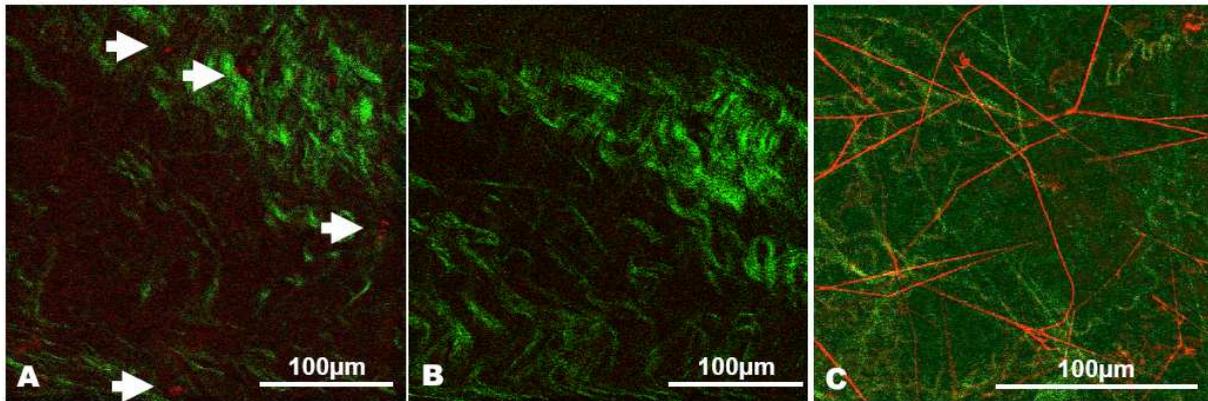


Figure 5.10 : Comparaison entre l'endofluorescence et le marquage à la SRB dans l'épimysium.

A. Merge de l'image acquise sur la voie visible et sans coloration (= endofluorescence (en rouge)) avec l'image acquise sur la voie SHG (en vert). On ne note quasi aucun signal d'endofluorescence mis à part quelques points isolés (flèches). Coin de cube : Visible/SHG.

B. Merge de l'image acquise sur la voie rhodamine (en rouge) sans coloration (= endofluorescence) avec l'image acquise sur la voie SHG (en vert). Aucune endofluorescence n'est détectable. Coin de cube : Rhodamine/SHG.

C. Merge de l'image acquise sur la voie rhodamine (en rouge) après coloration à la SRB et image acquise sur la voie SHG (en vert). La SRB a marqué des structures fibreuses ayant une morphologie proche de celle décrite pour les fibres élastiques dans ce type de tissu. Coin de cube : Rhodamine/SHG. Les images ont été acquises avec une longueur d'onde d'excitation de 800nm et une puissance laser de 60mW. Les images ont également été traitées avec une soustraction du bruit de fond en utilisant un rolling ball avec un rayon de 10 pixels.

Images acquises approximativement 20µm sous la surface.

5.4.3.1.2 Immunohistochimie

L'observation simultanée d'un double marquage anticorps anti-élastine (détecté par un anticorps secondaire couplé au FITC) et SRB sur anneaux d'aorte thoracique de rat a permis de mettre en évidence une colocalisation des deux signaux. La SRB se fixe donc bien de façon spécifique au niveau des fibres élastiques (Figure 5.11).

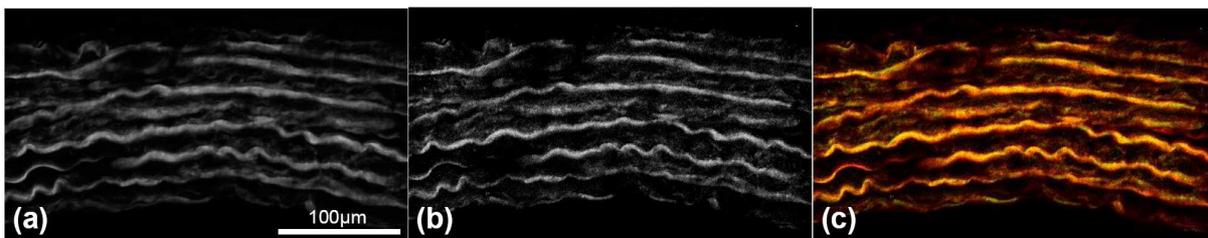


Figure 5.11 : Vérification de la spécificité du marquage par immunohistochimie.

Coupe transversale du même anneau d'aorte thoracique de rat marqué à la SRB (a) ; avec un anticorps anti-élastine (b) et merge des deux précédentes images (c) (rouge : SRB ; vert : anti-élastine ; jaune : colocalisation). On note que les deux marquages colocalisent parfaitement.

Ces images sont des projections en z de 10 images acquises avec un pas d'un micron. Longueur d'onde d'excitation : 800nm ; puissance laser : 60mW ; coin de cube : Rhodamine/FITC ; les images ont été soumises à une soustraction du bruit de fond par un rolling ball avec un rayon de 50 pixels avant la réalisation de la projection en z.

5.4.3.2 Il est possible de réaliser d'autres marquages en parallèle

Le second intérêt de cette méthode est de pouvoir visualiser d'autres structures que les fibres élastiques à l'aide, soit d'autres colorants, soit par SHG. Le spectre d'émission de la SRB à 800nm (Figure 5.12) est nul pour des longueurs d'ondes inférieures à 560nm. Il est donc possible d'utiliser cette gamme spectrale.

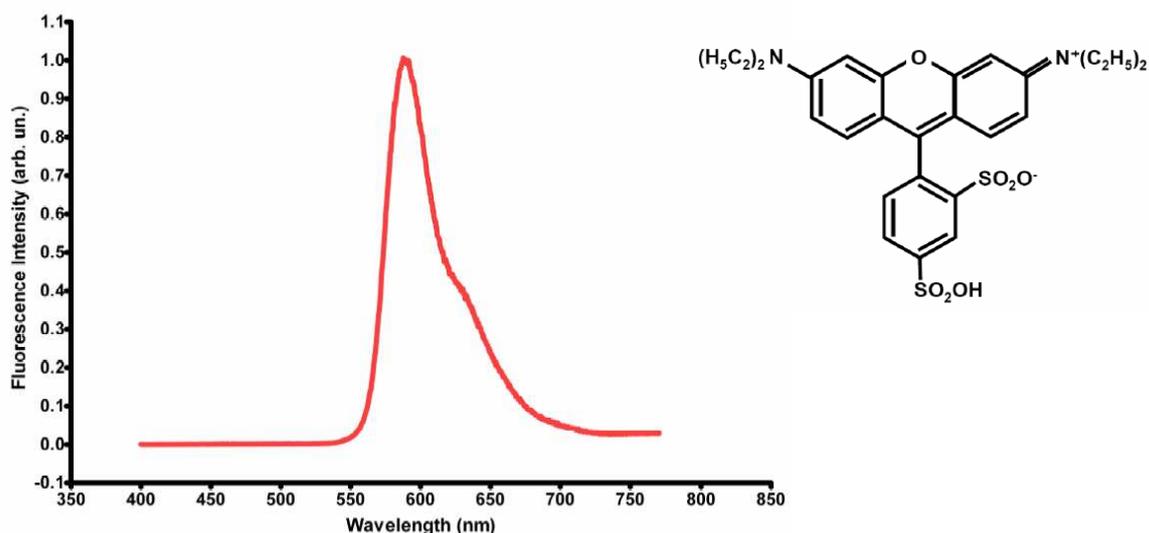


Figure 5.12 : Spectre d'émission et formule chimique de la SRB.

5.4.3.2.1 Essais avec des colorants

En injectant un cocktail de FITC dextran 70kDa et de SRB par voie intraveineuse, il est possible d'imager la lumière des vaisseaux sanguins et les fibres élastiques se trouvant dans l'espace extravasculaire (dans le cas des muscles, la SRB peut traverser les capillaires). De même, il est possible d'imager les fibres élastiques se trouvant dans la paroi artérielle et de mettre en évidence les noyaux cellulaires à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342 (voir 5.4.6).

5.4.3.2.2 Essais avec la SHG

La SHG est un signal endogène dont la longueur d'onde est égale à la moitié de la longueur d'onde d'excitation (dans le cas présent, la SHG est recueillie à 400nm). Nous avons pu voir

précédemment qu'elle mettait en évidence le collagène I et III. Elle permet également de visualiser la myosine dans les fibres musculaires. Etant donné qu'il est possible d'acquérir simultanément le signal SHG et le signal SRB, une visualisation des fibres élastiques et de collagène dans l'endomysium (tissu conjonctif entourant les fibres musculaires) est possible (Figure 5.13).

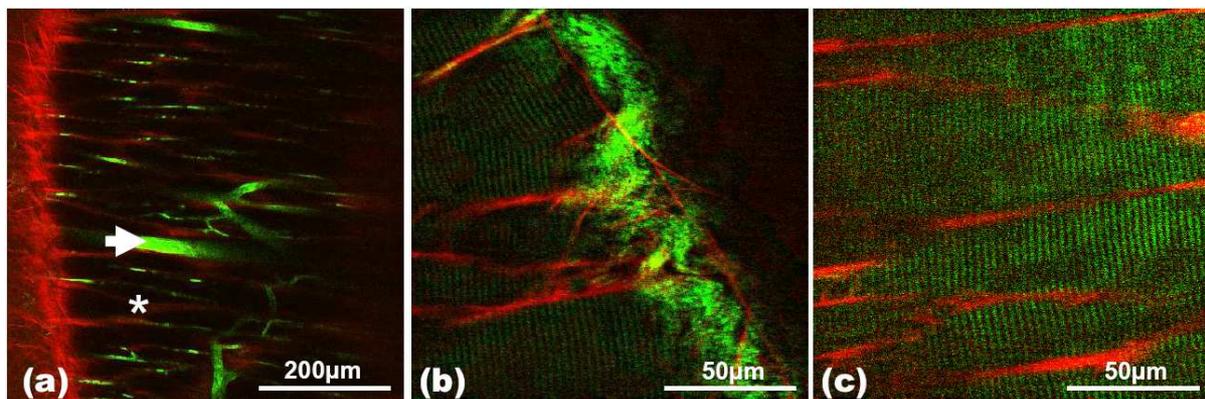


Figure 5.13 : Double marquage

A. Observation de la vascularisation (vert) et des fibres élastiques marquées à la SRB (rouge) dans un muscle squelettique après injection intraveineuse d'un cocktail des deux colorants. On note la présence de fibres élastiques dans la paroi des vaisseaux sanguins (flèche) et dans l'endomysium musculaire (étoile). Coin de cube : Rhodamine/FITC.

B et C. Observation du signal SHG (vert) et du marquage des fibres élastiques par la SRB (rouge). On note la présence de fibres élastiques dans l'endomysium ainsi qu'à la surface du muscle dans l'épimysium. Le signal SHG permet également d'imager la myosine (bandelettes parallèles se trouvant dans les fibres musculaires). L'image en C. permet de mieux observer la myosine. Coin de cube : Rhodamine/SHG.

L'ensemble de ces images a été acquise avec une longueur d'onde d'excitation de 800nm et une puissance laser de 60mW.

5.4.3.3 Imagerie de la paroi des vaisseaux sanguins

5.4.3.3.1 *Rappels histologiques*

Une grande quantité de fibres élastiques peuvent être trouvées dans les artères. Elles sont également présentes dans les veines mais en plus faibles proportions.

Histologiquement, une artère est composée de trois tuniques^{171; 172} (Figure 5.14) :

- l'intima qui est en contact avec la lumière. Elle est composée d'une couche de cellules endothéliales.
- la média qui est une couche riche en fibres élastiques et en cellules musculaires lisses (SMC⁴¹).
- l'adventice qui est composée de collagène et de fibres élastiques.

⁴¹ SMC pour Smooth Muscle Cell.

La limite entre l'intima et la média est matérialisée par une épaisse couche de fibres élastiques nommée limitante élastique interne. En coupe transversale, cette couche a une structure en forme de vaguelettes ; elle est très faiblement fenestrée.

La limite entre la média et l'adventice est marquée par une autre couche de fibres élastiques baptisée limitante élastique externe. Cette couche est très souvent fenestrée et présente une structure en toile d'araignée.

Dans les grosses artères élastiques (aorte, carotide, ...), il existe un certain nombre de couches concentriques de fibres élastiques au niveau de la média baptisées lamelles élastiques. Nous y reviendrons dans la partie 5.4.5.

La paroi des veines est composée des trois mêmes couches. On remarquera cependant quelques différences majeures⁸ :

- l'épaisseur totale de la paroi est beaucoup plus fine.
- la média comporte beaucoup moins de fibres élastiques. Dans les artères musculaires, seule la limitante élastique interne est visible et présente de nombreuses fenestrations. La limitante externe est inexistante.

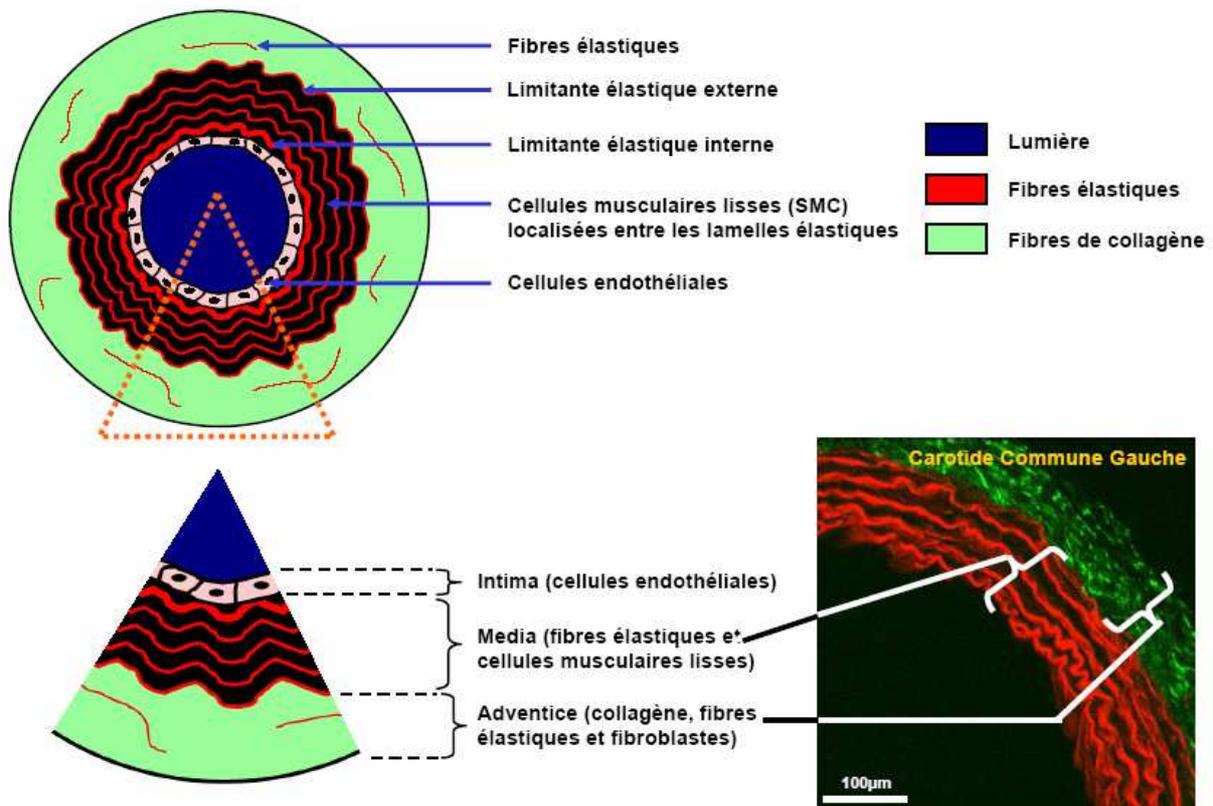


Figure 5.14 : Histologie de la paroi artérielle.

A droite : imagerie de la paroi de l'artère carotide commune gauche de rat observée en microscopie biphotonique après coloration à la SRB (rouge) et acquisition du signal SHG (vert).

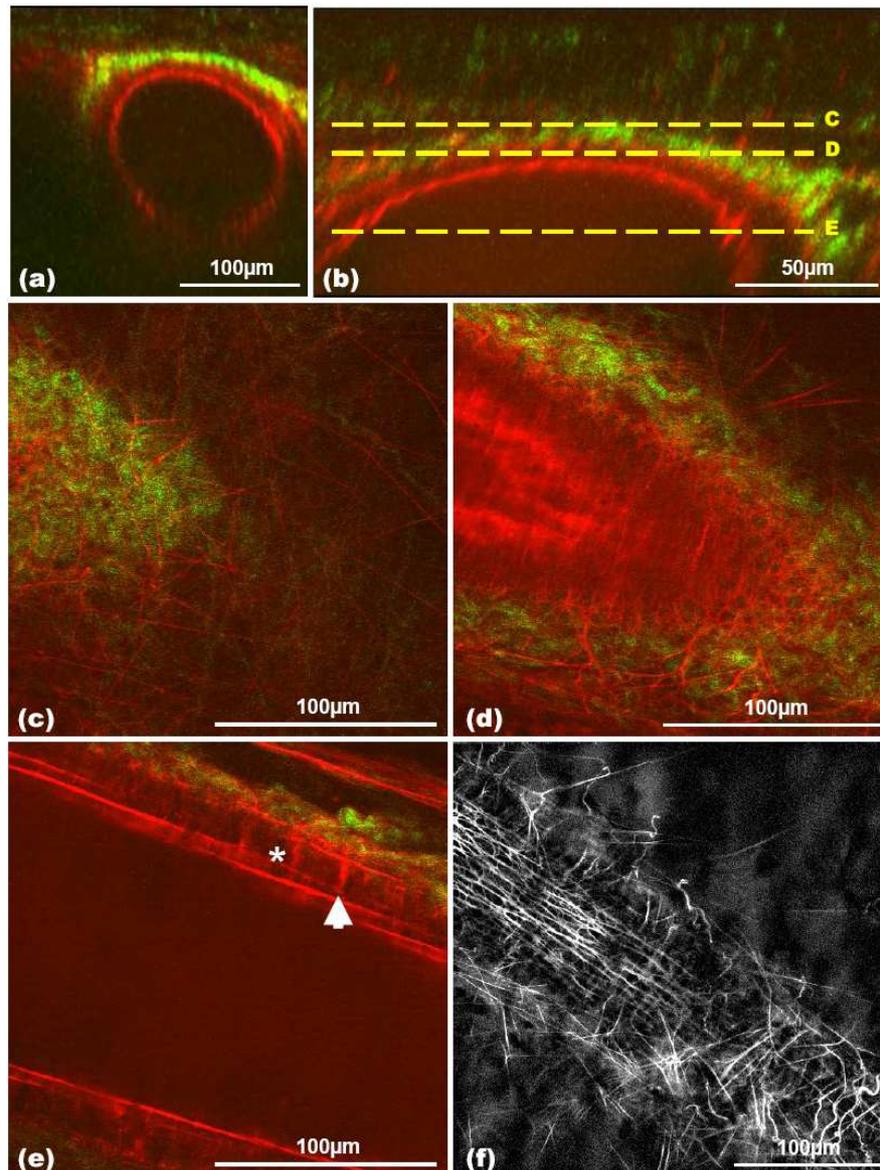


Figure 5.15 : Imagerie de la paroi artérielle.

- A. Coupe transversale de l'artère saphène de souris reconstituée à partir de 84 coupes horizontales obtenues *in situ* approximativement une minute après l'euthanasie de l'animal. En rouge, marquage des fibres élastiques par la SRB ; en vert, signal SHG.
- B. Grossissement de l'image présentée en A. avec la localisation des plans de coupe présentés en C, D et E. L'origine de l'acquisition est localisée à la surface du tissu conjonctif entourant l'artère.
- C. Coupe horizontale obtenue dans l'adventice ($z = 41\mu\text{m}$). L'adventice est la seule zone riche en collagène.
- D. Coupe horizontale obtenue dans la media ($z = 53\mu\text{m}$). On note la structure fenestrée de la limitante élastique externe en bas de l'image.
- E. Coupe horizontale obtenue dans la lumière de l'artère ($z = 73\mu\text{m}$). On remarque des fibres élastiques reliant les deux limitantes élastiques (flèche). Les zones noires dans la média (étoile) correspondent aux SMCs.
- F. Coupe horizontale obtenue au niveau de la media d'une veine musculaire. On note l'absence de limitante externe et une limitante interne très fenestrée.

Toutes ces images ont été acquises avec une longueur d'onde d'excitation de 800nm, une puissance laser de 60mW et le coin de cube Rhodamine/SHG. Dans le cas de la figure F, seul la voie Rhodamine est présentée.

5.4.3.3.2 Visualisation des différentes couches

La phase d'imagerie a été réalisée avec le coin de cube Rhodamine/SHG après coloration soit par injection intraveineuse, soit par dépôt local du colorant. En se plaçant à la verticale de l'artère saphène, il est possible de l'imager dans son intégralité et d'obtenir des coupes horizontales à différents niveaux (Figure 5.15). Il est ensuite possible par traitement informatique de reconstruire des coupes transversales (Figure 5.15 A et B).

Le signal SHG est restreint à l'adventice, riche en collagène. On remarque également un certain nombre de fibres élastiques. La media est bordée par les deux limitantes. La limitante externe est fortement fenestrée (Figure 5.15 C et D) alors que la limitante interne a l'air plus épaisse et non fenestrée. L'artère saphène n'est constituée que de ces deux couches élastiques, on remarque que des fibres relient également les deux limitantes ; les zones noires entre les fibres (Figure 5.15 E) abritent les SMCs.

Une veine a également été observée en intravital (Figure 5.15 F). On remarque la limitante élastique interne fortement fenestrée comme décrit dans la littérature¹⁷¹.

Enfin, l'expérience a été réalisée soit en intravital, soit *in situ* après l'euthanasie de l'animal. Aucune différence morphologique n'a été constatée entre les deux expériences. Si le but de l'imagerie est uniquement morphologique, il sera alors intéressant de travailler sur l'animal euthanasié afin de s'affranchir des mouvements respiratoires.

5.4.4 Discussions

5.4.4.1 Spécificité du marquage

Le marquage de la SRB est donc bien spécifique des fibres élastiques ; cette affirmation a été vérifiée à la fois par des observations morphologiques et par des méthodes immunohistochimiques. Une question reste cependant en suspens. Nous avons toujours qualifié ce marquage comme étant un marquage des fibres élastiques. Or, comme nous avons pu le voir précédemment, les fibres élastiques sont composées d'élastine et de microfibrilles. A l'heure actuelle, nous ne pouvons pas encore préciser sur laquelle de ces structures se fixe la SRB. Des expériences sur des souris KO élastine -/- sont en cours de développement. Ces souris génétiquement modifiées ne peuvent pas produire d'élastine. Si la SRB se fixe spécifiquement sur l'élastine, aucun marquage ne devrait être visible. L'inconvénient majeur

de ce type d'expérience réside dans le fait que les souris elastine -/- ne survivent guère plus de trois jours après la naissance. L'abord chirurgical est donc en train d'être défini. De même, une expérience similaire est également envisagée sur des souris KO pour les microfibrilles (en collaboration avec Gilles Faury, Laboratoire de Physiopathologie Vasculaire – Grenoble).

Cependant, si l'on considère que l'élastine est une protéine hydrophobe et que la SRB est une molécule hydrophile, une interaction entre les deux paraît moins probable.

La SRB est donc une molécule particulièrement intéressante aux nombreuses propriétés. Nous avons pu mettre en évidence dans ce travail de thèse une spécificité pour les fibres élastiques ainsi que pour les astrocytes. Cette double spécificité ne pose guère de problème en pratique car les tissus cérébraux ne contiennent pas de fibres élastiques (hormis dans la paroi des grosses artères). Inversement, les tissus périphériques ne contiennent pas d'astrocytes.

5.4.4.2 Avantages de la SRB

Comme nous avons pu le voir précédemment, la SRB est une molécule hydrophile qui peut être injectée en grandes quantités chez l'animal sans générer de dommages. La DL50 est très élevée (10300 mg/kg). La SRB appartient également à la famille des xanthenes dont de nombreux membres sont déjà utilisés en intravital comme la rhodamine 6G ou la Sulforhodamine 101^{173; 174; 108; 158}.

Son spectre d'émission permet également l'utilisation simultanée d'autres colorants comme le FITC ou le Hoechst ; certaines protéines fluorescentes comme la GFP ou encore l'imagerie par SHG.

Les deux méthodes d'application (intraveineuse ou dépôt local) sont d'une grande simplicité pour le manipulateur et ne requièrent pas de longs temps d'incubation ou d'autres traitements chimiques des tissus.

Enfin, le rendement quantique élevé de la SRB (80%)¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ et son émission dans le rouge permettent de s'affranchir des phénomènes de diffusion et d'absorption fréquemment rencontrés aux longueurs d'ondes plus basses. Il est alors possible d'imager les artères in vivo jusqu'à des profondeurs de 250µm. De manière générale, quand on réalise une acquisition simultanée SRB/SHG, le signal SHG est perdu bien avant celui de la SRB. De même, la puissance laser d'excitation est bien souvent relevée pour avoir un signal SHG correct ; la voie SRB doit alors avoir un gain diminué lors de l'acquisition.

5.4.4.3 Comparaison avec l'endofluorescence

De nombreuses publications ont rapporté l'utilisation des propriétés d'endofluorescence de l'élastine pour observer les fibres élastiques en microscopie biphotonique.

Différentes longueurs d'ondes d'excitation ont été décrites : 760¹⁷⁸⁻¹⁸⁰, 800¹²³ et 860nm^{119; 181}. Devant la diversité des systèmes (type d'objectif, ouverture numérique, ...) et des paramètres utilisés, il est assez difficile d'effectuer des comparaisons quantitatives entre ces études et la nôtre. Cependant, dans chacun des cas, l'émission d'endofluorescence est moins forte en comparaison de ce qui est obtenu avec le marquage par la SRB. De même, l'émission a lieu dans la gamme spectrale du bleu¹²³ (aux alentours de 500nm) ce qui augmente les phénomènes de diffusion et d'absorption. Ces phénomènes déjà présents sur des anneaux d'artères isolés peuvent se révéler beaucoup plus importants pour une observation en intravital.

Les temps d'exposition (ou le nombre d'images à intégrer pour obtenir une image finale avec un bon contraste) sont donc assez élevés. Certaines publications décrivent une durée de 5s par image pour une excitation à 860nm¹¹⁹. De tels délais sont incompatibles avec une observation en intravital ; de même les faibles profondeurs d'observations décrites en endofluorescence (50µm) ne permettent pas d'imager une artère telle que l'artère saphène dans son intégralité. L'élastine n'est pas la seule biomolécule à présenter des propriétés d'endofluorescence lorsqu'elle est excitée à deux-photons. D'autres biomolécules comme les flavines ou le NAD(P)H ont un comportement similaire¹⁸². Il est alors difficile de réaliser une segmentation efficace entre la fluorescence émise par l'élastine et celle des autres molécules. Cependant, une longueur d'onde d'excitation de 860nm semblerait favoriser l'excitation de l'élastine de façon majoritaire^{119; 181}.

Notre méthode de coloration à la SRB apparaît donc comme apportant un signal plus important à des puissances laser comparables à celles utilisées en endofluorescence. Une image peut être acquise dans des délais beaucoup plus courts (inférieur à une seconde). A titre de comparaison une imagerie d'endofluorescence réalisée dans les mêmes conditions qu'une imagerie SRB ne donne pas de signal détectable pour l'élastine (Figures 5.10).

Ce marquage est également plus spécifique, sans parasitage par des signaux d'autres molécules, car recueilli à des longueurs d'ondes élevées où peu de biomolécules présentent une endofluorescence.

Enfin, il permet de travailler aussi bien sur des anneaux d'artères, que sur des explants, des biopsies ou directement sur l'animal entier en intravital.

Nous allons voir maintenant, deux applications de cette méthode.

5.4.5 Etude morphologique de la crosse aortique du rat

Une application de la méthode de coloration des fibres élastiques par la SRB a été de réaliser une étude morphologique de la paroi de la crosse aortique et de certaines artères qui y ont leur origine chez le rat. L'objectif étant de valider notre application pour des études menées sur des explants.

5.4.5.1 Matériels & Méthodes

La crosse aortique a été prélevée sur 3 rats Wistar selon la méthode décrite en 5.4.2.2.1. Des anneaux de un à deux millimètres d'épaisseur ont été prélevés au niveau de l'aorte ascendante, de l'aorte thoracique (partie supérieure et inférieure), du tronc artériel brachio-céphalique, de la carotide commune gauche et de la sous-clavière gauche. Les anneaux ont été incubés pendant 5 minutes à 20°C dans une solution de SRB (10mg/ml dans du NaCl 0.9%). Ils ont ensuite été lavés 5 fois avec une solution saline avant d'être observés en immersion. Le coin de cube utilisé est le Rhodamine/SHG ; la longueur d'onde d'excitation a été fixée à 800nm (des expériences réalisées dans les mêmes conditions à 810nm ont également été pratiquées et ont montré des résultats similaires) et la puissance laser a été réglée à 40mW.

5.4.5.2 Résultats

Des images de très bonne qualité ont été obtenues (Figure 5.17). Il a été possible de dénombrer le nombre de lamelles élastiques dans la média ainsi que d'obtenir un bon signal SHG dans l'adventice. Le tableau 5.3 résume le nombre de lamelles élastiques ayant été dénombrées dans la média des différentes artères étudiées. Si l'on s'intéresse uniquement à l'aorte, on se rend compte que le nombre de lamelles élastiques diminue quand on s'éloigne du ventricule gauche (11 lamelles sur l'aorte ascendante vs 8 à 9 lamelles sur la partie basse de l'aorte thoracique). De même, on remarque que le nombre de lamelles élastiques est plus important dans le tronc artériel brachio-céphalique que dans la carotide commune gauche ou la sous-clavière gauche. Ces observations sont en accord avec le rôle de ces artères élastiques qui aident au maintien de la pression artérielle lors de la diastole⁸. Plus on s'éloigne du cœur, moins on trouvera de lamelles élastiques dans la média des artères. De même le plus fort

nombre de lamelles dans le tronc artériel brachio-céphalique en comparaison de la carotide commune gauche et la sous-clavière gauche s'explique par le fait que la carotide commune droite et la sous-clavière droite prennent naissance au niveau du tronc artériel brachio-céphalique. La pression doit donc être maintenue à un plus haut niveau dans cette artère au cours de la diastole.

| Artère | Nombre de lamelles élastiques dans la media |
|--------------------------------------|---|
| Aorte Ascendante | 11 |
| Aorte Thoracique (partie supérieure) | 9 – 10 |
| Aorte Thoracique (partie inférieure) | 8 – 9 |
| Tronc Artériel Brachio-céphalique | 6 – 7 |
| Carotide Commune Gauche | 4 – 5 |
| Sous-Clavière Gauche | 5 - 6 |

Tableau 5.3 : Quantification du nombre de lamelles élastiques dans la paroi de différentes artères à l'aide de la méthode de coloration à la SRB.

5.4.5.3 Discussion

5.4.5.3.1 *Imagerie de la crosse aortique*

Nos résultats expérimentaux sont en accord d'une part avec la fonction des artères élastiques et d'autre part avec des données publiées par Medeiros de Mello et al¹⁸³. Les travaux de cette équipe ont été réalisés en utilisant des coupes d'artères de rats Wistar colorées avec la technique du trichrome de Masson et la coloration de Calleja puis observées en microscopie à fond clair. Ils ont noté un nombre de lamelles élastique égal à 11.86 ± 0.74 dans l'aorte ascendante et un nombre égal à 8.78 ± 0.6 dans l'aorte thoracique. Ces résultats sont très proches des nôtre (11 dans l'aorte ascendante et 8 à 9 dans l'aorte thoracique).

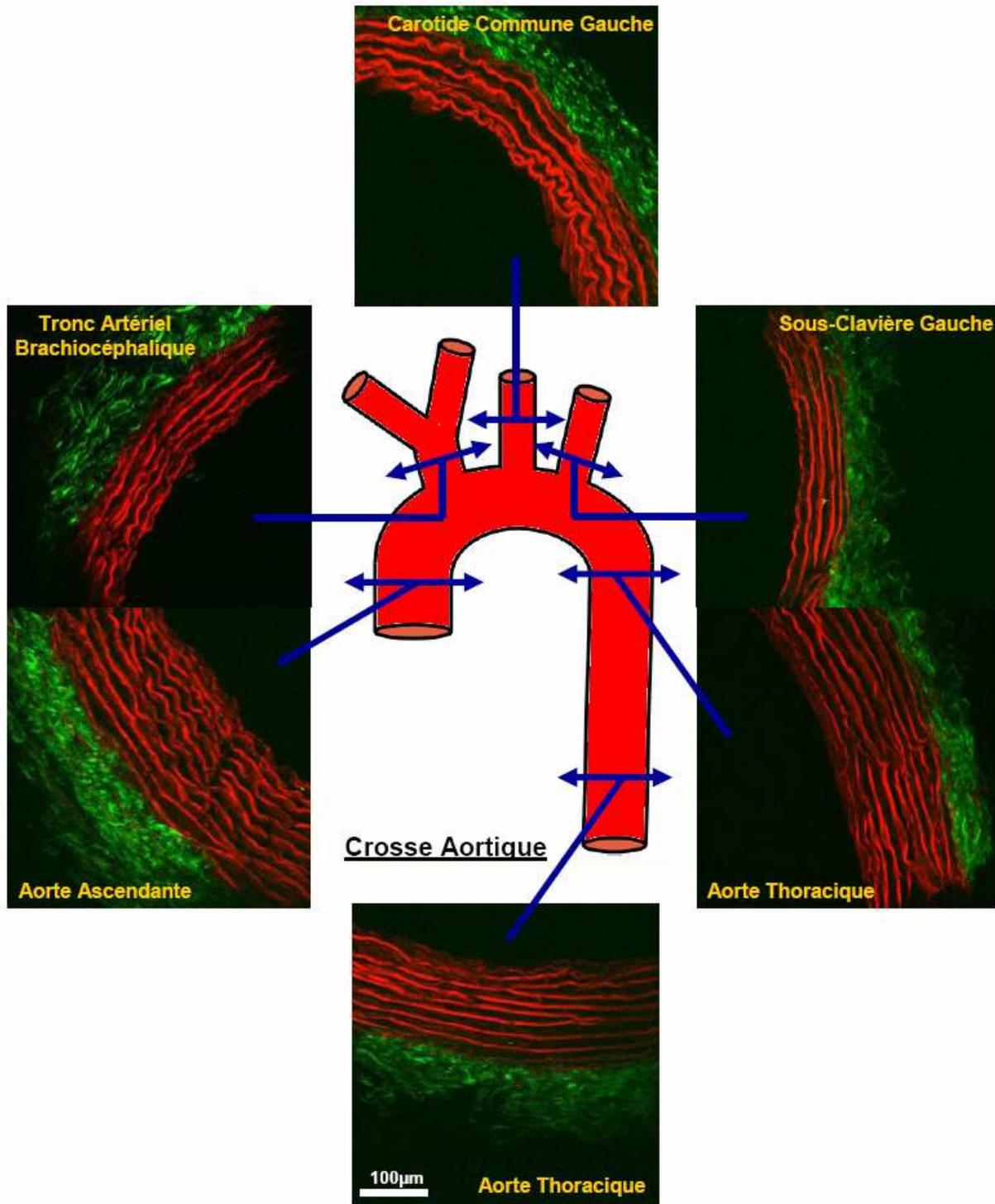


Figure 5.17 : Etude de la crosse aortique et des artères qui y prennent leur origine.

Les fibres élastiques marquées par la SRB sont en rouge, le collagène représenté par le signal SHG est en vert. Les images correspondent à des projections en z de stacks de 50 images acquises par pas d'un micron. La longueur d'onde d'excitation utilisée est de 800nm (des observations similaires ont été effectuées à 810nm); la puissance laser est de l'ordre de 40mW; le coin de cube est le Rhodamine/SHG. Avant projection en z, les images ont été traitées par une soustraction du bruit de fond par un rolling ball avec un rayon de 50 pixels.

5.4.5.3.2 Intérêt de la méthode

Notre méthode de coloration des fibres élastiques par la SRB est donc bien applicable sur des explants (dans le cas présent des anneaux d'artères) pour réaliser des études morphologiques. De telles expériences peuvent également être réalisées en utilisant les propriétés d'endofluorescence de l'élastine ; l'avantage étant de ne pas avoir besoin de coloration exogène ; l'inconvénient étant que l'acquisition d'une image demande des délais supérieurs à cinq secondes avec le risque d'avoir l'image parasitée par la fluorescence émise par d'autres biomolécules endofluorescentes.

Au cours de nos expériences, la puissance laser a été réglée à 40mW afin d'obtenir un signal SHG fort ; cependant à cette puissance le signal recueilli sur la voie SRB est très important et entraîne une saturation des PMTs ; le gain doit donc être fortement réduit. Nous avons essayé d'exciter la préparation avec une puissance laser de un milliWatt. A cette puissance, un fort signal est toujours détectable sur la voie SRB nous permettant de tirer des observations morphologiques. Par contre aucun signal SHG n'est capté (Figure 5.18). Il est donc possible avec la méthode de coloration à la SRB d'imager des fibres élastiques sur un explant avec une grande spécificité, un temps d'acquisition inférieur à une seconde par image et une puissance laser de l'ordre du milliWatt. Cette méthode peut être appliquée à l'étude de la formation de la plaque d'athérome ou à l'étude du vieillissement des vaisseaux sanguins.

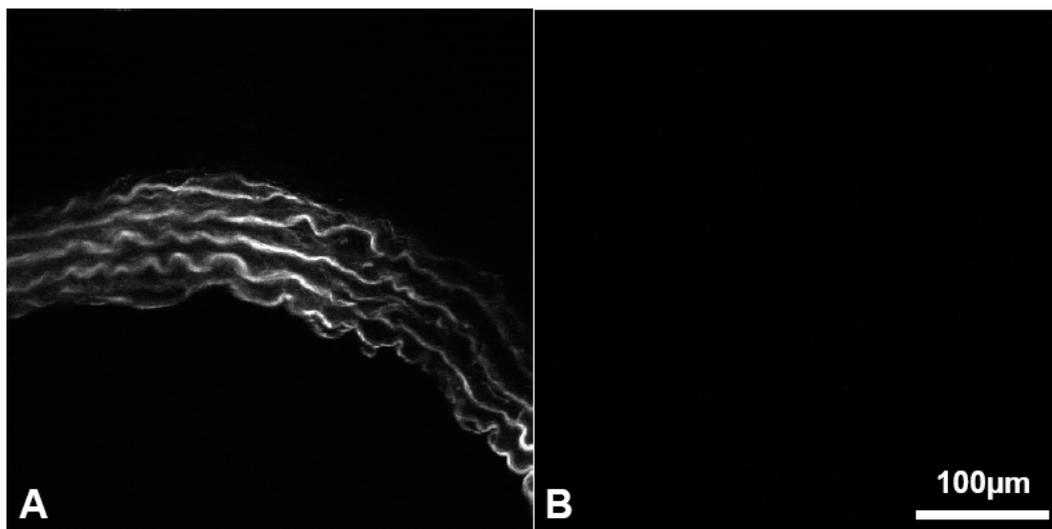


Figure 5.18 : Imagerie de l'artère carotide commune gauche avec une puissance laser de 1 milliWatt. Le coin de cube utilisé est le Rhodamine/SHG avec une longueur d'onde d'excitation de 800nm. On remarque que le marquage à la SRB met en évidence de façon très nette les lamelles élastiques de la média malgré la faible puissance. Cependant, le signal SHG n'est pas visible. Seule une image est représentée sur cette figure, il ne s'agit pas d'une projection en z.

5.4.6 Etude des effets de la MRT sur la paroi artérielle

Nous avons également utilisé la méthode de coloration des fibres élastiques par la SRB pour observer les effets de la MRT sur la paroi de l'artère saphène chez la souris.

5.4.6.1 Matériels & Méthodes

5.4.6.1.1 *Protocole d'irradiation*

Trente souris Swiss/IOPS CD1 (Charles River France) ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale de Xylazine/Ketamine 0.1% / 1% dans une solution de NaCl 0.9%. Les animaux ont ensuite été irradiés en mode MRT à l'ESRF (pour plus de détails concernant la procédure d'irradiation, voir ³). Les paramètres sont les suivants : 18 microfaisceaux de 50 μ m avec une distance pic à pic de 450 μ m. L'irradiation a été réalisée sur le membre inférieur gauche de façon à avoir des microfaisceaux perpendiculaires à la direction de l'artère saphène sur une grande partie de sa longueur. Les animaux ont été divisés en deux groupes ; l'un recevant une dose pic de 312Gy (n=12 souris) ; le second recevant une dose pic de 2000Gy (n=12 souris). Une fois réveillés, les animaux ont été remis en stabulation jusqu'à l'observation en microscopie biphotonique réalisée un, trois et six mois après l'irradiation (n=3 à 4 animaux par dose et par temps).

5.4.6.1.2 *Protocole d'observation*

L'observation de la veine saphène a été réalisée *in situ* juste après euthanasie de l'animal en utilisant la méthode du dépôt local de colorant pour marquer les fibres élastiques (pour le protocole complet voir 5.4.2.3).

Deux types d'observations ont été réalisées sur le même animal :

- marquage des fibres élastiques à la SRB ; imagerie du collagène par SHG (dans ce cas le coin de cube Rhodamine/SHG a été utilisé).
- marquage des fibres élastiques à la SRB et marquage des noyaux au Hoechst 33342 (dans ce cas, le coin de cube Rhodamine/Hoechst a été utilisé).

La puissance laser utilisée a été ajustée en fonction de la profondeur (entre 40 et 130 mW approximativement). Cette augmentation est nécessaire pour avoir un signal SHG correct ou pour capter la fluorescence émise par le Hoechst 33342 lors d'une imagerie en profondeur.

5.4.6.2 Résultats

Un effondrement de la limitante élastique externe sur la limitante élastique interne a pu être observé tous les 450µm sur le trajet de l'artère saphène. Cet espacement correspond à la distance pic à pic des microfaisceaux. Dans les zones vallées, l'artère possède une structure normale (Figure 5.19).

En imageant les noyaux des cellules marqués par le Hoechst 33342, il est possible d'observer des noyaux de forme allongée entre les deux limitantes élastiques (donc dans la média). Ces noyaux sont ceux des SMCs. Cependant, sur le passage des microfaisceaux, les noyaux ont disparus (Figure 5.19 C et D).

L'hypothèse émise est donc que l'irradiation détruit les SMCs se trouvant sur le passage des microfaisceaux ce qui entraîne un effondrement de la limitante élastique externe sur la limitante interne. Aucun effet n'est visible dans les zones vallées.

Des observations similaires ont été réalisées un, trois et six mois après l'irradiation aux deux doses précédemment décrites et ont donné des résultats proches ; cependant les dégâts semblent être un peu plus importants pour des doses de 2000Gy.

5.4.6.3 Discussion

La méthode de coloration des fibres élastiques à la SRB permet donc d'effectuer des observations *in situ* de la paroi de l'artère saphène après une irradiation MRT. La qualité des images obtenues autorise une étude morphologique approfondie et permet de mieux cerner les conséquences locales de l'irradiation. Nous avons ainsi pu montrer une disparition des SMCs et un effondrement de la limitante élastique externe au niveau des microfaisceaux. De telles observations auraient été beaucoup plus difficilement réalisables avec d'autres méthodes :

- les méthodes de colorations histologiques classiques auraient imposé de travailler sur des coupes minces. Une partie de l'information morphologique aurait pu disparaître lors de la préparation.
- les méthodes utilisant l'endofluorescence de l'élastine n'auraient pas permis de travailler *in situ* et de descendre à des profondeurs supérieures à 50µm.

Du point de vue de la radiothérapie, les expériences menées apportent une information essentielle : lors d'un traitement par MRT, il faudra essayer d'éviter l'irradiation d'une artère

sur sa longueur au risque de détruire une partie de sa media et de générer des modifications physiologiques qui pourront être délétères par la suite.

La méthode de coloration par la SRB peut donc s'avérer d'un grand intérêt dans l'étude de nouvelles thérapies ou de pathologies. Des expériences de marquage des fibres élastiques à la SRB dans le tissu pulmonaire et dans les ganglions lymphatiques sont envisagées. De même, une comparaison avec un marquage à l'orcéine pourrait être intéressant.

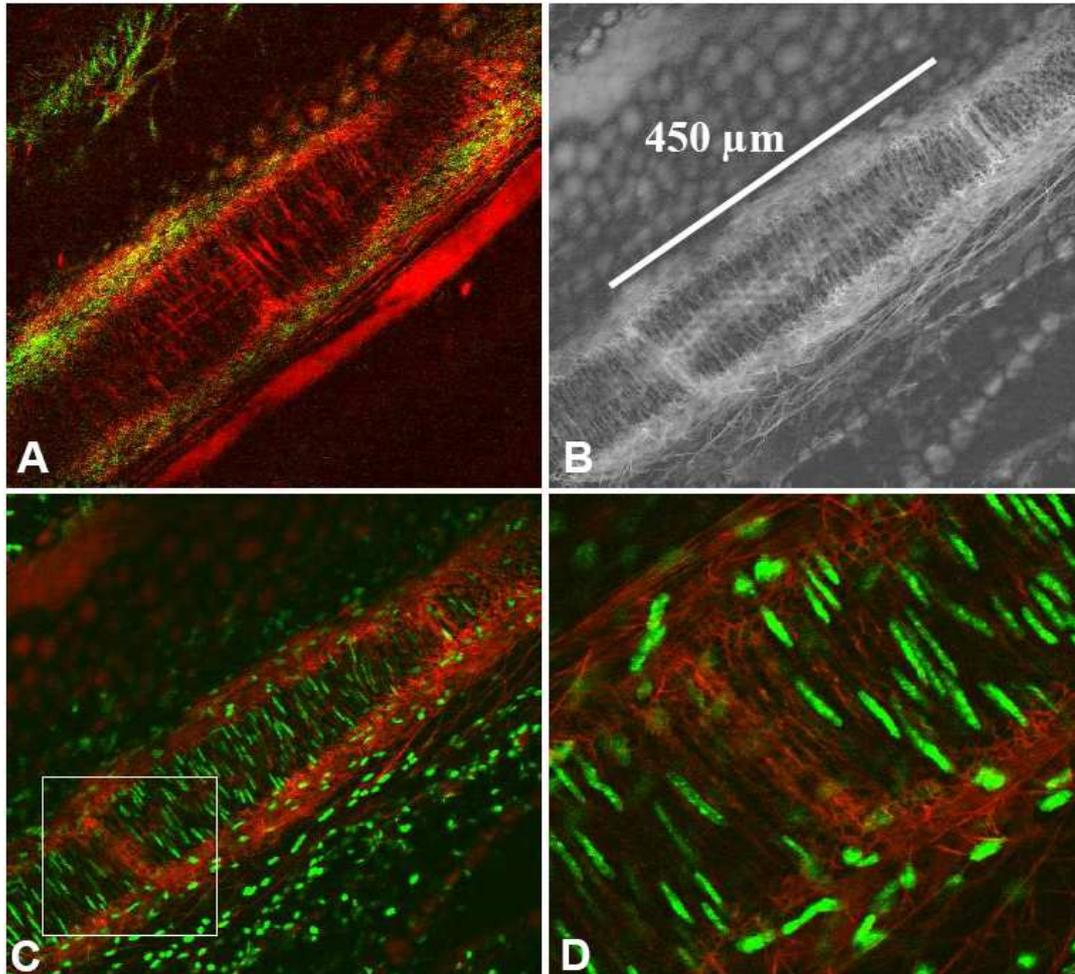


Figure 5.19 : Visualisation des effets de la MRT sur la paroi artérielle.

A. Imagerie des fibres élastiques par la SRB (rouge) et du collagène par SHG (vert). On remarque un effondrement de la limitante externe sur le passage d'un microfaisceau au milieu de l'image. Image en 1x soit $600 \times 600 \mu\text{m}^2$.

B. Imagerie des fibres élastiques par la SRB. On note que la distance entre deux zones d'effondrement est égale à la distance entre deux microfaisceaux soit $450 \mu\text{m}$. $600 \times 600 \mu\text{m}^2$.

C. Imagerie des fibres élastiques par la SRB (rouge) et des noyaux cellulaires par le Hoechst 33342 (vert). Il semble qu'il y ait une disparition des noyaux des SMCs sur le passage des microfaisceaux. $600 \times 600 \mu\text{m}^2$.

D. Gros plan sur une zone de l'image C, confirmant l'absence de SMC sur le passage des microfaisceaux. Image en 3x soit $200 \times 200 \mu\text{m}^2$.

Les images ont été acquises in situ avec une longueur d'onde d'excitation de 810nm et le coin de cube Rhodamine/SHG (A et B) et Rhodamine/Hoechst (C et D).

Irradiation avec une dose de 312Gy ; animal observé un mois post-irradiation.

5.5 Essais de Nouveaux Colorants et Méthodes

L'essai de nouveaux colorants pour l'imagerie de la vascularisation cérébrale a également été l'un des enjeux de ce travail de thèse. Parmi eux, notons le BF3⁴², une molécule excitable à 800nm et émettant dans la gamme spectrale du bleu. Sur cultures cellulaires, cette molécule a la faculté de marquer le cytoplasme. Injecté par voie intraveineuse, elle permet d'obtenir un marquage homogène des vaisseaux sanguins dans le cortex cérébral. Cependant, la fluorescence émise se trouve dans des longueurs d'ondes plus facilement absorbées et diffusées. Une imagerie en profondeur n'est donc pas réalisable. Malgré tout, il peut être intéressant d'avoir un tel colorant pour des études réalisées en surface. Si le microscope dispose de trois voies de détection, c'est-à-dire trois PMTs, il sera alors possible de réaliser des triples marquages et d'avoir à sa disposition un colorant vasculaire émettant dans le bleu. Pour de plus amples informations, la publication caractérisant le BF3 est indexée à la fin du manuscrit¹⁸⁴.

Une méthode d'imagerie différentielle par microscopie biphotonique intravitale développée au laboratoire est également indexée à la fin de ce manuscrit¹⁸⁵.

5.6 Conclusions

Au cours de ce chapitre nous avons pu voir les différents développements effectués en microscopie biphotonique lors de ce travail de thèse. La méthode de mesure de perméabilité de la BHE et l'imagerie des vaisseaux tumoraux seront utilisés par la suite dans l'étude des effets de la PAT-Plat.

D'autres méthodes comme le marquage des astrocytes et des fibres élastiques par la SRB ne seront pas utilisées dans la suite de ce travail de thèse. Cependant, comme nous avons pu le voir, elles présentent un potentiel très intéressant pour de nombreuses études.

La microscopie biphotonique est donc un formidable outil d'imagerie ouvrant la voie à la visualisation de structures à l'échelle micrométrique directement chez l'animal vivant, c'est-à-dire au plus proche des conditions physiologiques.

⁴² BF3 est le nom de travail donné à la molécule.

Chapitre 6

Effets d'une Irradiation Tomographique Synchrotron sur la Vascularisation et les Tissus Cérébraux

Certaines parties de ce chapitre ont donné lieu à une publication sous les références :

- *Clément Ricard, Manuel Fernández, Jérôme Gastaldo, Lucie Dupin, Laurette Somveille, Régine Farion, Herwig Requardt, Jean-Claude Vial, Hélène Elleaume, Christoph Segebarth & Boudewijn van der Sanden ; Short-term effects of synchrotron irradiation on vasculature and tissue in healthy and glioma bearing mouse brain ; article soumis.*

Afin de caractériser au mieux les effets de la PAT-Plat sur les tissus qu'ils soient sains ou tumoraux et d'apporter un maximum d'informations pour le développement des essais cliniques, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à étudier les effets d'une irradiation synchrotron de 15Gy en mode tomographique centrée soit sur le cortex cérébral sain, soit sur un gliome F98 implanté en orthotopique chez la souris nude.

Dans ce chapitre nous allons donc voir dans un premier temps quels sont les objectifs de cette étude et la justification du choix des paramètres utilisés pour la phase d'irradiation.

Dans un second temps, nous nous intéresserons à la caractérisation des effets de l'irradiation réalisée dans le cortex pariétal d'animaux sains. Cette caractérisation inclut une étude de la perméabilité de la BHE, des paramètres vasculaires, de la gliose ainsi qu'une observation histologique classique.

L'étude sera ensuite réalisée sur des animaux porteurs du gliome F98 en orthotopique. Une caractérisation de ce modèle tumoral chez la souris nude sera entreprise et les effets de l'irradiation sur la croissance tumorale seront mis en avant.

Enfin, nous discuterons les implications de ces différents résultats pour le développement d'essais cliniques.

6.1 Objectifs et Mise en Place de l'Etude.

Avant de mener des études sur les effets de la PAT-Plat sur les tissus tumoraux, il apparaît nécessaire dans un premier temps de s'intéresser aux seuls effets de l'irradiation synchrotron en mode tomographique. Cela nous permettra d'obtenir de précieuses informations notamment sur l'action de la radiothérapie :

- sur les tissus sains. En effet, la forme des tumeurs est assez irrégulière et lors d'essais cliniques, il peut être nécessaire d'irradier certaines zones saines afin de pouvoir couvrir toute la tumeur. Il apparaît donc important de quantifier les effets dans les tissus cérébraux sains.
- sur les tissus tumoraux. Les effets de l'irradiation synchrotron sur les tissus tumoraux n'ont jusqu'à maintenant été étudiés qu'en terme de survie. La connaissance de ces effets sur la croissance tumorale permettra de mieux cerner le rôle de la radiothérapie.

Nous avons volontairement écarté l'étude des effets d'injections locales de cisplatine sur tissus sains. La neurotoxicité de cette molécule a déjà été présentée dans de nombreuses études^{88; 87} (voir également 3.6.2.4).

Le choix des paramètres d'irradiation est crucial à la fois pour l'efficacité de la thérapie mais également pour éviter des effets secondaires trop marqués dans les zones saines ayant été irradiées.

L'étude de MC. Biston¹ a révélé que le protocole le plus efficace en PAT-Plat correspondait à une injection de 3µg de cisplatine dans la tumeur suivi par une irradiation synchrotron de 15Gy avec une énergie réglée juste au dessus du K-edge du platine, c'est à dire à 78.8keV.

Nous avons donc décidé d'utiliser la même dose, en se plaçant également à une énergie légèrement supérieure au K-edge du platine (79keV).

Pour les études menées sur animaux sains, la localisation de la zone irradiée a été débattue dans un second temps. Trois paramètres majeurs ont dû être pris en considération :

- la spécificité de la souris nude. Nous avons décidé de réaliser une irradiation locale sur un faible volume de tissu cérébral (environ 1.75mm^3) afin de ne pas mimer un ratio tissu irradié sur tissu sain trop élevé.
- l'accès à la zone irradiée. Pour réaliser une étude de la perméabilité de la BHE en microscopie biphotonique, il faut que la zone observée se trouve dans une partie plane du cerveau et à une profondeur maximale de $600\mu\text{m}$.
- la réalité (patho)physiologique. Les gliomes de haut grade qui sont l'une des indications visées par la PAT-Plat sont dans la majorité des cas positionnés dans les hémisphères cérébraux au niveau du cortex cérébral.

Nous avons donc choisi de réaliser une irradiation en mode tomographique afin de ne déposer qu'une dose minimale dans les tissus sains entourant la zone choisie. La zone recevant l'intégralité de la dose (15Gy) est localisée dans le cortex pariétal gauche¹⁸⁶ (Figure 6.1). Cet endroit est facilement accessible en microscopie biphotonique, il est le siège de certaines fonctions (on y trouve notamment les aires somatosensorielles) et il permet de comparer nos résultats avec ceux d'autres études ayant porté sur la même zone¹⁴¹.

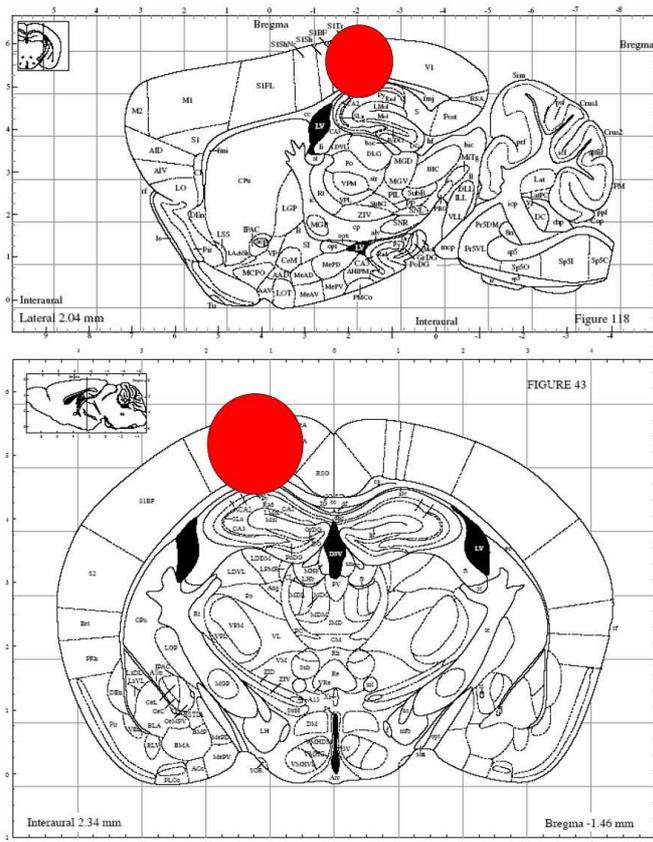


Figure 6.1 : Localisation de la zone ayant reçu l'intégralité de la dose lors de l'irradiation tomographique.

La zone ayant reçu la dose complète (15Gy) chez les animaux sains est matérialisée en rouge sur les deux planches de stéréotaxie présentées à gauche.

On remarque sur une coupe sagittale (image du haut) que la zone irradiée est localisée dans le cortex pariétal à la verticale de l'hippocampe. La coupe frontale (image du bas) permet également de visualiser la zone irradiée dans le cortex pariétal de l'animal.

Enfin, les effets de l'irradiation ont essentiellement été observés à court terme (de 48h à 1 mois après l'irradiation). Certains paramètres comme la gliose ont été suivis jusqu'à 6 mois. L'objectif étant d'avoir une idée des effets aigus afin de pouvoir préparer au mieux une réponse thérapeutique toujours dans l'objectif d'essais cliniques.

Les résultats présentés dans cette partie ont été obtenus à partir des expérimentations menées sur deux campagnes d'irradiation indépendantes (mars et novembre 2006).

6.2 Etude des Effets sur les Tissus Sains

La première partie de ce travail s'est donc concentrée sur l'étude des effets d'une irradiation synchrotron en mode tomographique avec une dose de 15Gy et une énergie de 79keV. Ces effets ont été observés sur les tissus cérébraux sains par des méthodes histologiques et immunohistochimiques. L'étude de la vascularisation a été réalisée par microscopie biphotonique intravivante et par immunohistochimie afin de pouvoir couvrir l'intégralité du cortex cérébral.

6.2.1 Matériel & Méthodes

6.2.1.1 Préparation des animaux

Les souris (souris nude femelles, Charles River France) ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un cocktail de xylazine/ketamine (0.1% / 1%) dans une solution de NaCl à 0.9%. Une fois anesthésiés, les animaux ont été placés sur un cadre stéréotaxique vertical en plexiglas spécialement construit pour cette expérience (Figure 6.2). Un sachet de gel chauffant a été placé au niveau du corps de l'animal afin de maintenir sa température dans des conditions physiologiques tout au long de la phase d'irradiation (le mélange anesthésiant utilisé peut entraîner des déficiences au niveau du centre de la régulation de la température engendrant rapidement une hypothermie qui peut être fatale pour l'animal).

Le cadre stéréotaxique est fixé sur une plateforme permettant des mouvements de rotation ainsi qu'une translation sur les trois directions de l'espace. L'axe de rotation de la plate forme est positionné de sorte à traverser la zone du cortex à irradier.

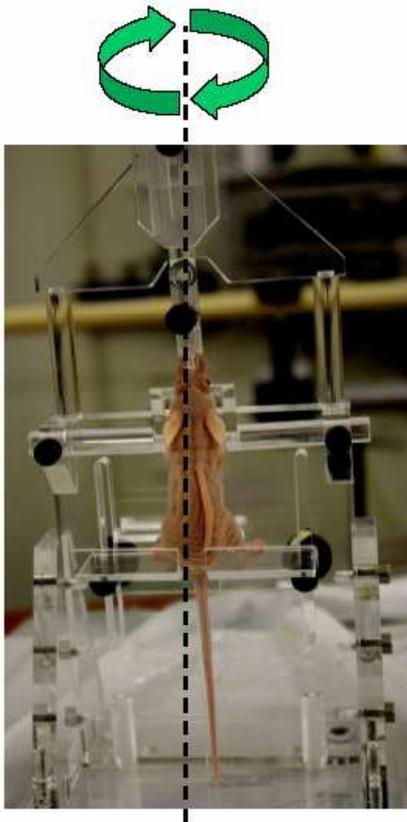
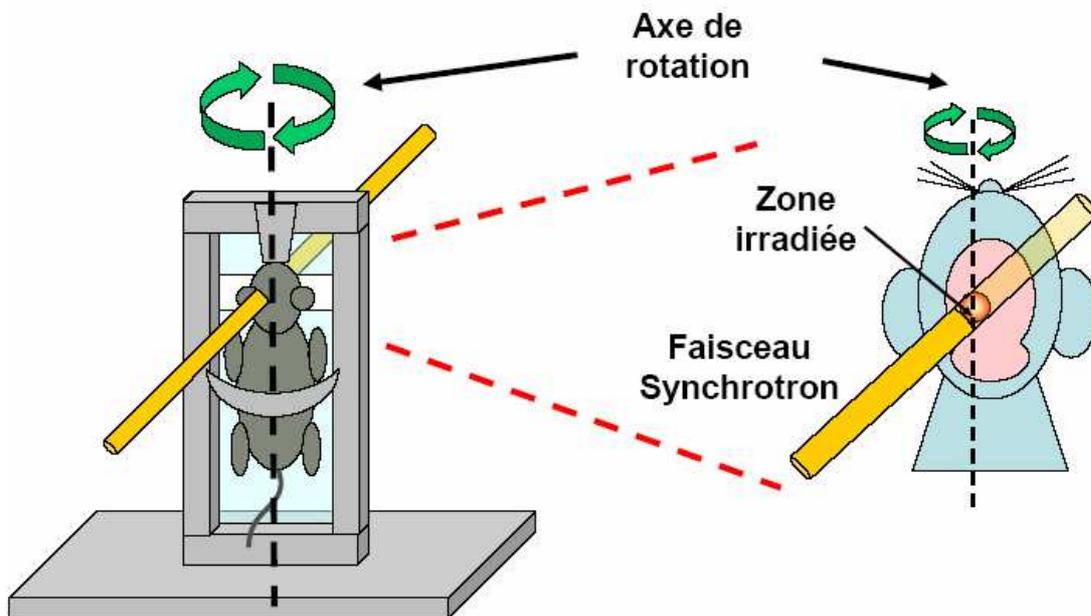


Figure 6.2 : Positionnement de la souris sur le cadre vertical et simulation d'irradiation.

L'animal est placé sur un cadre stéréotaxique vertical. Il est fixé à l'aide d'une barre d'incisives, deux barres sous les bas joues et il repose sur une plateforme horizontale en plexiglas afin que son poids ne soit pas uniquement supporté par le système de fixation au niveau de sa tête.

L'axe de rotation de la plateforme d'irradiation est aligné de façon à traverser la zone qui doit être irradiée.



6.2.1.2 Protocole d'irradiation

L'origine du rayonnement est un wiggler positionné à l'intérieur de l'anneau de stockage approximativement à 150m de l'animal. La divergence de ce faisceau est très faible (0.1mrad

en vertical ; 3mrad en horizontal) et un collimateur positionné juste en amont de la cabine expérimentale permet de définir un faisceau de 1.5 x 1.5 mm.

Le rayonnement est monochromatisé à l'aide d'une paire de cristaux de silicium légèrement courbés et utilisés en géométrie de Laue (en transmission). La monochromatisation peut être réalisée de 20 à 90 keV approximativement. Dans le cadre de nos expériences, elle sera réglée à 79keV. La bande passante est de l'ordre de 80eV (Figure 6.3).

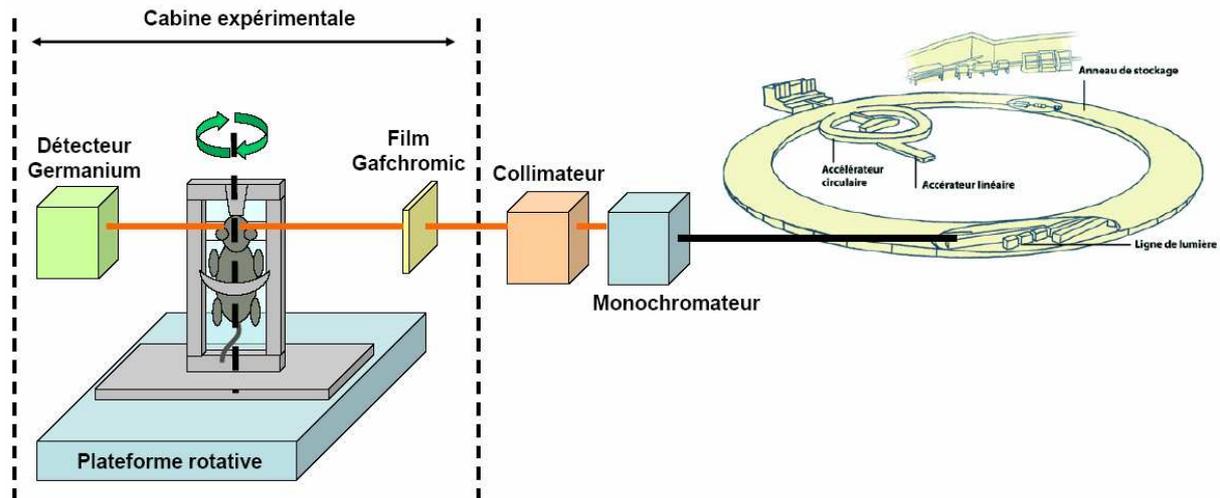


Figure 6.3 : Représentation simplifiée du setup d'irradiation utilisé pour les irradiations cérébrales. Partie droite du schéma adaptée de www.esrf.eu.

Avant chaque irradiation, un CT-Scan de la tête de l'animal est réalisé à l'aide de la même installation que celle utilisée pour l'irradiation. La détection est réalisée à l'aide d'un détecteur germanium offrant une résolution spatiale latérale de $350 \times 350 \mu\text{m}^2$. Ce détecteur est également utilisé afin de vérifier la dosimétrie. Un film Gafchromic (MD55, International Speciality Products, Wayne, NJ) a également été placé sur le trajet du faisceau en amont de l'animal pour vérifier la forme du faisceau. Les images obtenues permettent de définir la localisation de la zone à irradier (Figure 6.4).

L'irradiation est réalisée en mode tomographique avec l'axe de rotation de la plateforme aligné sur le centre de la zone à irradier. Pour les animaux sains la hauteur d'irradiation est de 1.5mm correspondant à une seule rotation de la plateforme.

Le débit de dose (normalisé par rapport à la valeur du courant des électrons dans l'anneau de stockage) est de $9.9 \cdot 10^{-4} \text{ Gy} \cdot \text{mA}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ au niveau de la peau.

La vitesse de rotation est ajustée de façon à avoir une dose déposée de 15Gy à l'axe de rotation ; la durée de l'irradiation est de l'ordre de 90s.

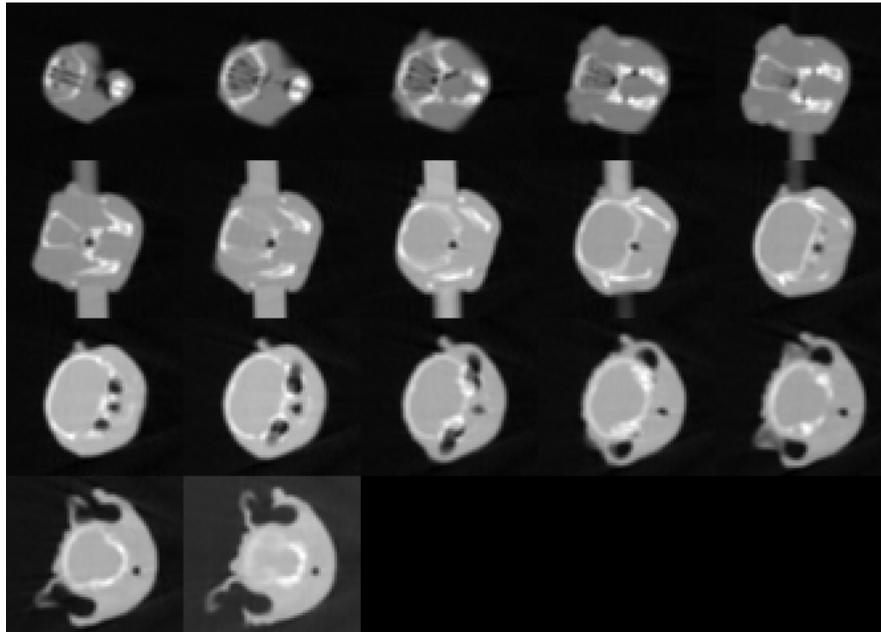


Figure 6.4 : Exemple d'un CT-Scan réalisé au niveau de l'extrémité céphalique d'une souris saine. On remarque que l'os ressort en hypersignal. Le signal provenant du cerveau est uniforme, il est donc impossible de différencier ses différentes subdivisions (notamment la substance grise et la substance blanche). L'espace entre chaque image est de 1mm.

6.2.1.3 Observations en microscopie biphotonique

La quantification de la perméabilité de la BHE a été réalisée 48h, une semaine et un mois après l'irradiation (n=5 animaux par temps) selon le protocole décrit en 5.2.2.1.

6.2.1.4 Histologie et Immunohistochimie

6.2.1.4.1 Préparation des coupes

A différents délais post-irradiation (48h, une semaine, un mois, trois et six mois), les animaux ont été sacrifiés (induction à l'isoflurane 5% puis dislocation cervicale) puis leur cerveau a été prélevé et congelé dans de l'isopentane à -80°C (n=5 animaux par délai sauf à 6 mois (n=4)). Des coupes sagittales de 10µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées sur un cryotome (Microm HM560), recueillies sur des lames préencollées à l'aminopropyle, et congelées à -20°C.

6.2.1.4.2 Coloration Hematoxyline – Erythrosine (HE)

Les coupes sont fixées pendant 2min au méthanol/acétone (v/v), puis après un rinçage à l'eau courante (5min) traversent successivement un bain d'Hematoxyline de Harris (4min), un rinçage à l'eau courante, un rinçage à l'HCl 0.5%, un nouveau rinçage à l'eau courante, un

bain d'eau ammoniacuée (2,5ml/l, 30s), un rinçage à l'eau courante, un bain d'erythrosine (1min), un rinçage à l'eau courante puis 3 bains d'éthanol absolu et enfin 3 bains de toluène. Les lames sont immédiatement montées au Pertex après le dernier bain de toluène.

6.2.1.4.3 Immunohistochimie

Après fixation pendant 15min au Paraformaldéhyde 4% à température ambiante, les coupes sont perméabilisées à l'aide d'une solution de lyse (Sucrose 300mM, MgCl₂ 3mM, Tris 20mM, NaCl 50mM, Triton 0.5% final) pendant 5min. 100µl d'une solution d'anticorps primaires dilués dans du PBS-BSA 3% sont ensuite déposés sur chaque coupe et mis à incuber pendant une nuit à 4°C. Après rinçage, 100µl d'une solution d'anticorps secondaires dans du PBS-BSA 3% sont mis à incuber pendant 2 heures à 20°C sur chaque coupe. Tous les rinçages sont effectués au PBS. Les lames sont ensuite montées avec un liquide de montage contenant du Hoechst 33342.

Les anticorps primaires utilisés au cours de cette étude sont :

- goat anti-collagen IV (Southern Biotech ; dilué au 1/100)
- goat anti-GFAP (Southern Biotech ; dilué au 1/100)
- rabbit anti-GFAP (DAKO ; dilué au 1/100)
- mouse anti-NeuN (Chemicon ; dilué au 1/100)

Les anticorps secondaires utilisés sont :

- TRITC conjugated donkey anti-goat (Jackson Immunoresearch ; dilué au 1/100)
- FITC conjugated donkey anti-mouse (Jackson Immunoresearch ; dilué au 1/100)
- FITC conjugated donkey anti-rabbit (Jackson Immunoresearch ; dilué au 1/100).

6.2.1.4.4 Microscopie

Les lames ont été observées sur un microscope Nikon à epifluorescence (modèle Eclipse E600) équipé d'une caméra numérique (Olympus ; Color View II). L'acquisition a été réalisée à l'aide du programme AnalySIS (version 5, Soft Imaging System, Olympus). L'observation des lames colorées en HE a été effectuée sur le même microscope qui permet également les observations à fond clair.

Les coins de cube utilisés pour la microscopie à fluorescence sont les suivants :

- Hoechst (excitation : 340/380nm ; dichroïque : 400nm ; émission : 435/485nm)
- FITC (excitation : 465/495nm ; dichroïque : 505nm ; émission : 515/555nm)
- Rhodamine (excitation : 510/560nm ; dichroïque : 610nm)

6.2.1.5 Mesure des paramètres vasculaires

Les paramètres vasculaires ont été estimés en utilisant une macro développée au laboratoire et tournant sous ImageJ (Benjamin Lemasson et Samuel Valable). La première étape consiste à acquérir des images (2080x1544 pixels) au niveau de la zone irradiée sur des coupes immunomarquées avec un anti-collagène IV (Figure 6.5 A). Les images ont ensuite été traitées selon le protocole suivant :

- Binarisation automatisée avec un filtre de seuillage.
- Retrait des structures plus petites ou égales à deux pixels.
- Fermeture et remplissage des structures vasculaires ouvertes (Figure 6.5 B).
- Comparaison entre l'image obtenue et l'image d'origine afin de vérifier la précision du traitement (Figure 6.5 C).
- Calcul de la densité vasculaire (nombre de vaisseaux / mm^2) et de la fraction de surface vasculaire (surface vasculaire / surface totale de l'échantillon ; donné en pourcentage).

La figure 6.5 résume les différentes étapes nécessaires à l'obtention des paramètres vasculaires.

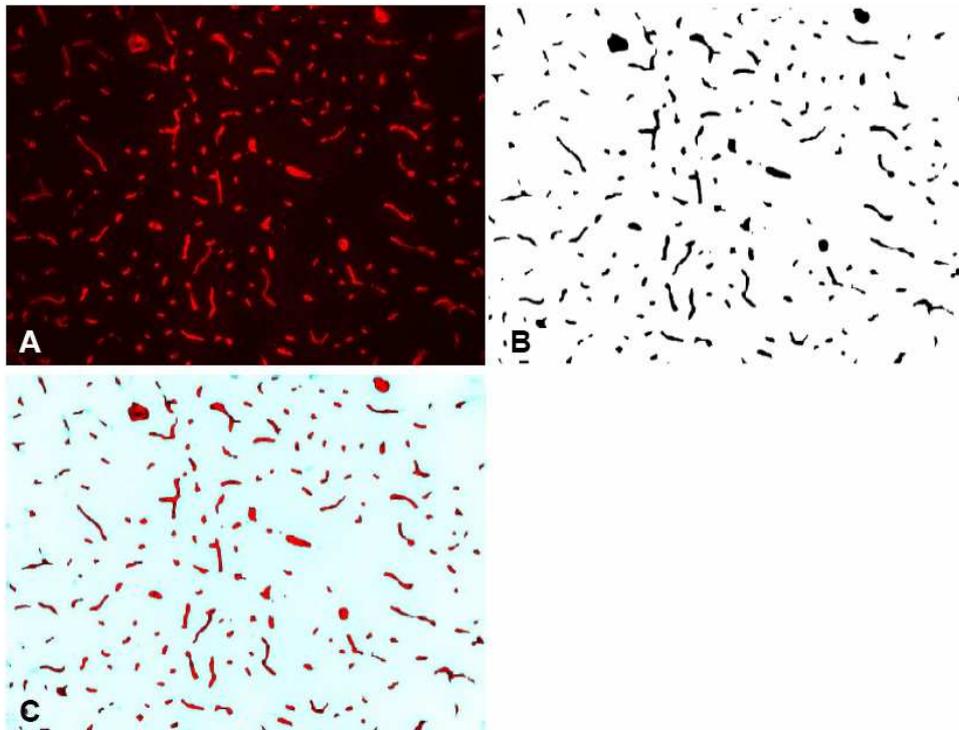


Figure 6.5 : Traitement de l'image pour obtenir les paramètres vasculaires.

L'image de base (A) immunomarquée par le collagène IV est tout d'abord binarisée, puis les structures ouvertes sont fermées et remplies (B). L'image obtenue est ensuite comparée à l'image de départ pour vérifier la qualité du traitement (C).

6.2.2 Résultats

6.2.2.1 Perméabilité de la BHE

Comme nous l'avons vu dans le précédent chapitre, dans le cas des animaux sains n'ayant pas été irradiés, les deux colorants (Rhodamine B dextran 70kDa ; FITC dextran 4kDa) restent en intravasculaire (Figure 6.6 A-C). Dans le cas d'animaux ayant subi une altération mécanique de la BHE (voir 5.2.2.1.4) la Rhodamine B dextran 70kDa reste en intravasculaire alors que le FITC dextran 4kDa s'infiltré dans le parenchyme cérébral (Figure 6.6 D-F).

Les animaux irradiés ont été observés 48h (Figure 6.6 G-I), une semaine (Figure 6.6 J-L) et un mois (Figure 6.6 M-O) après l'irradiation. A tous les temps, les deux colorants sont restés dans le compartiment intravasculaire. Aucune infiltration dans le parenchyme cérébral n'a donc pu être observée entre 48h et un mois post irradiation.

L'irradiation ne semble donc pas générer de lésions dans la BHE entraînant l'infiltration dans le tissu cérébral de molécules possédant un poids moléculaire supérieur ou égal à 4kDa.

Des reconstitutions tridimensionnelles de l'arbre vasculaire ont également été réalisées à partir des images acquises en microscopie biphotonique intravitale. Ces reconstitutions ne révèlent pas de dégâts dans le réseau vasculaire se trouvant dans la zone irradiée. De même, l'intégralité des vaisseaux sanguins semblent être fonctionnels.

6.2.2.2 Paramètres vasculaires

Etant donné que les observations réalisées en microscopie biphotonique ne couvrent pas l'intégralité du cortex cérébral, les cerveaux des animaux ont également été prélevés afin de réaliser une étude des paramètres vasculaires dans l'intégralité du cortex sur coupes (Figure 6.8). Les paramètres vasculaires ont été évalués par immunohistochimie en utilisant un anticorps anti-collagène IV (qui marque la lame basale des vaisseaux sanguins) et une macro tournant sous le programme ImageJ.

La densité vasculaire ainsi que la surface de la fraction vasculaire ont été mesurées 48h, une semaine et un mois après l'irradiation. Aucune modification n'a été observée entre le cortex irradié et le cortex d'animaux sains (Table 6.1). Le cortex controlatéral à l'irradiation a également été utilisé comme contrôle et n'a montré aucune différence avec des animaux sains non irradiés.

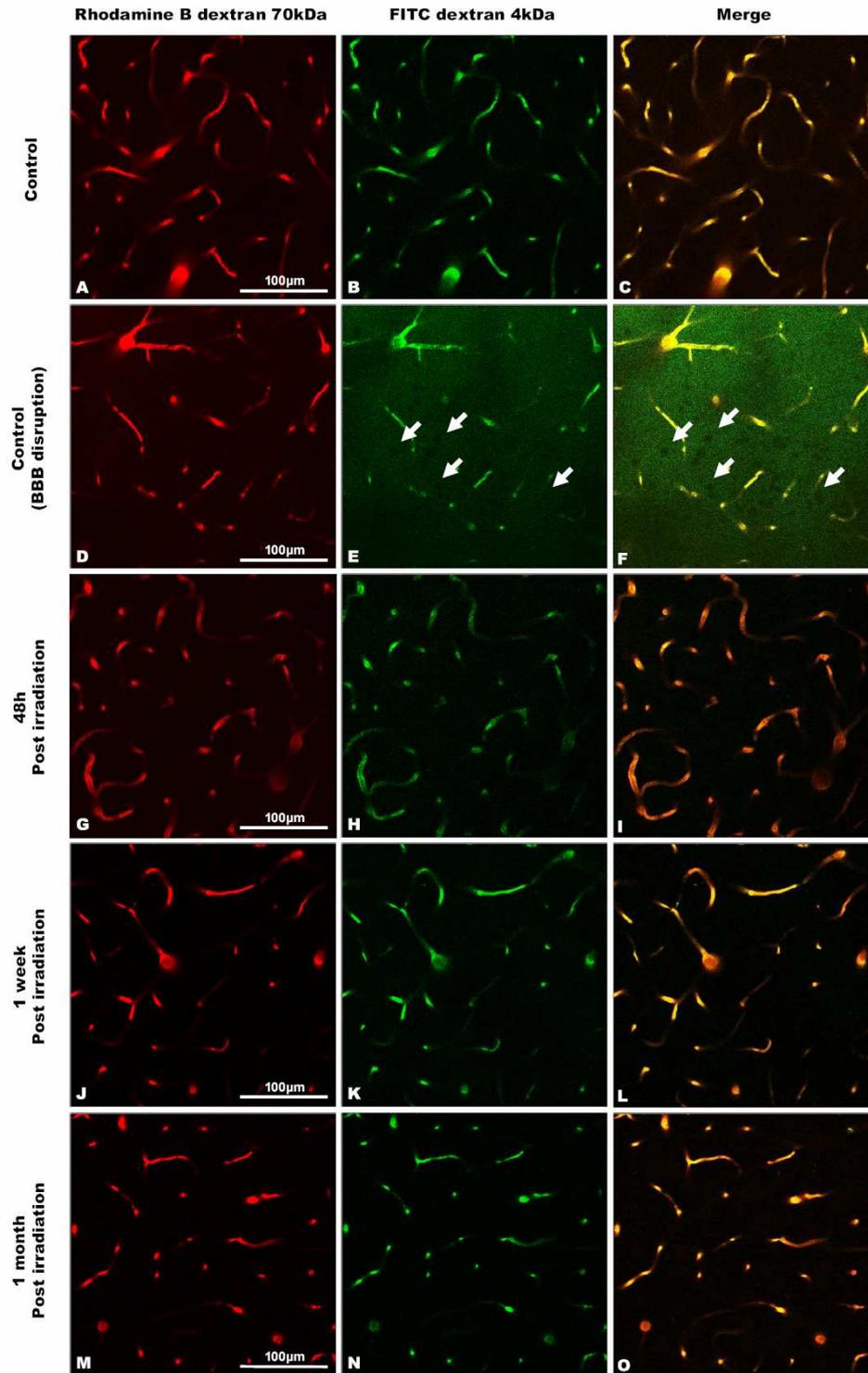


Figure 6.6 : Effets de l'irradiation sur la BHE. Images acquises dans le cortex cérébral à une profondeur de 150µm sous la dure-mère par microscopie biphotonique intravivante et représentatives de différents groupes d'animaux : souris saines non irradiées (A-C) ; souris saines avec une rupture de la BHE pour les faibles poids moléculaires (D-F ; flèches = cellules se trouvant dans le parenchyme cérébral et n'ayant pas capté le colorant extravasé) ; 48h après l'irradiation (G-I) ; une semaine après l'irradiation (J-L) et un mois après l'irradiation (M-O). Les images de la troisième colonne « merge » correspondent à l'addition des deux premières (Rhodamine B dextran 70kDa (en rouge) et FITC dextran 4kDa (en vert)).

| Delai post-irradiation | Densité vasculaire (vaisseaux/mm ²) | Fraction de surface vasculaire (%) |
|------------------------|--|---------------------------------------|
| Contrôle | 339 ± 31 | 4.3 ± 0.6 |
| 48h | 343 ± 30 | 3.9 ± 0.5 |
| 1 semaine | 341 ± 37 | 3.9 ± 0.6 |
| 1 mois | 344 ± 34 | 3.9 ± 0.6 |

Table 6.1 : Evolution de la densité vasculaire et de la fraction de la surface vasculaire à différents délais post-irradiation (48h à 1 mois). n=5 souris par temps.

6.2.2.3 Effets sur le parenchyme cérébral

La gliose a été évaluée en utilisant un immunomarquage contre la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) qui est spécifique des astrocytes matures. Une augmentation du marquage GFAP est synonyme de gliose. Aucune augmentation du marquage n'a été observée dans la zone irradiée à court terme (48h, une semaine et un mois) ainsi qu'à long terme (trois et six mois après l'irradiation) (Figure 6.7).

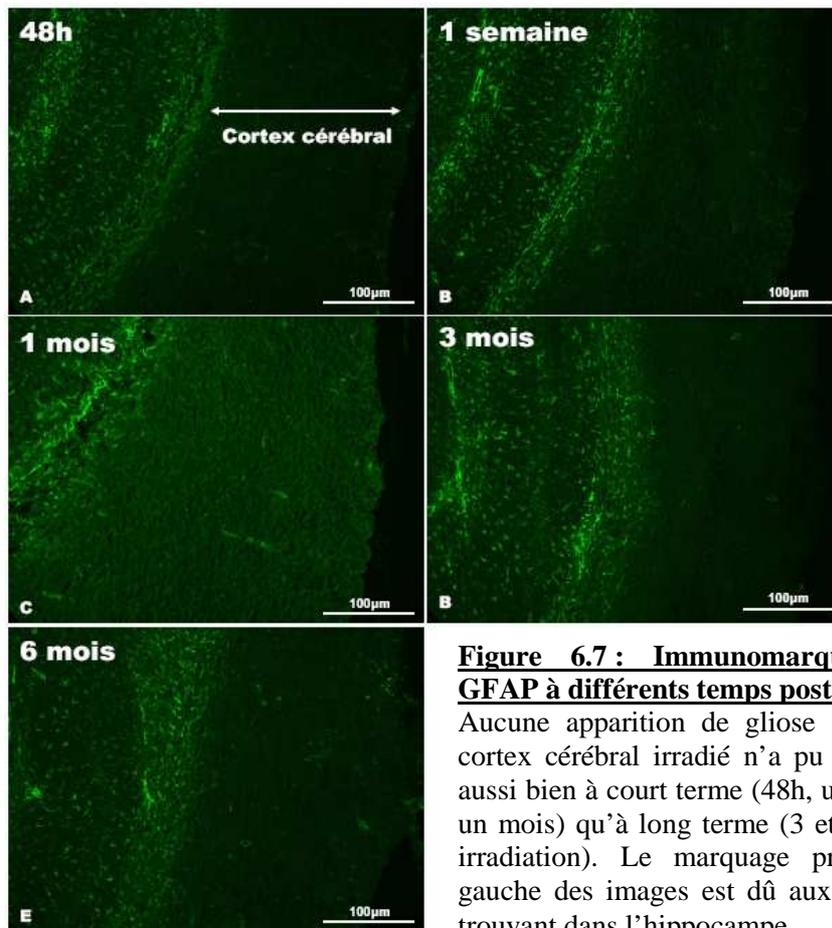


Figure 6.7 : Immunomarquage de la GFAP à différents temps post-irradiation.

Aucune apparition de gliose au niveau du cortex cérébral irradié n'a pu être observée aussi bien à court terme (48h, une semaine et un mois) qu'à long terme (3 et 6 mois post-irradiation). Le marquage présent sur la gauche des images est dû aux astrocytes se trouvant dans l'hippocampe.

Des coupes au niveau du cortex irradié ont également été observées après un marquage histologique HE ou un marquage immunohistochimique avec un anticorps dirigé contre le marqueur des noyaux des neurones NeuN. Aucune différence significative n'a pu être observée entre des animaux contrôles et des animaux irradiés.

Enfin, plus d'un an après l'irradiation, les souris constituant un groupe d'étude à très long terme étaient toujours en vie et ne présentaient pas de déficits moteurs ou comportementaux visibles.

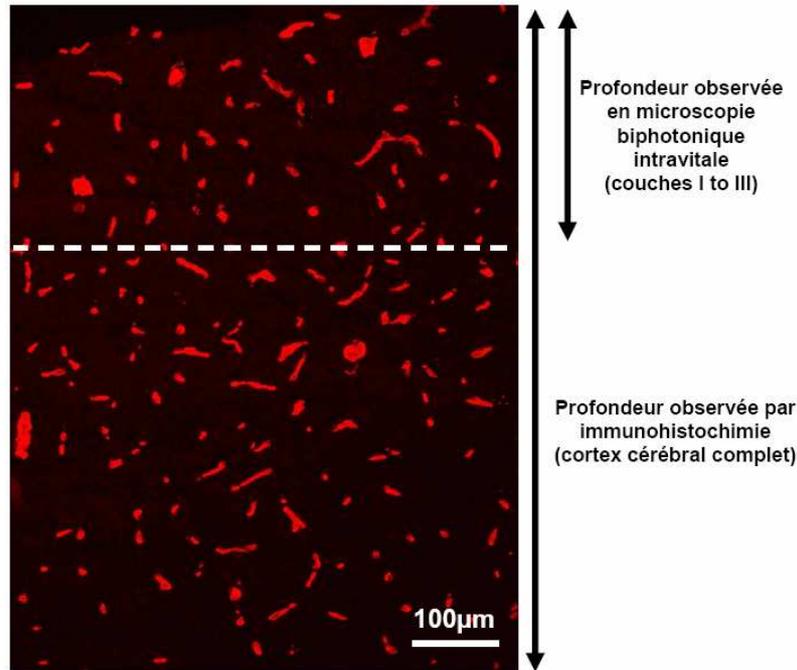


Figure 6.8 : Champs d'observation de la zone irradiée accessibles par microscopie biphotonique intravitale et par immunohistochimie.

Sur cette image d'un immunomarquage du collagène IV dans le cortex cérébral de souris irradiées, les zones observées au cours de cette étude par microscopie biphotonique intravitale et par immunohistochimie ont été représentées.

6.2.3 Discussion

6.2.3.1 Etude sur la vascularisation

L'étude des effets d'une irradiation synchrotron en mode tomographique avec une dose de 15Gy et une énergie de 79keV a été réalisée sur la vascularisation à l'aide de deux modalités d'imagerie bien distinctes. La microscopie biphotonique intravitale a été utilisée pour réaliser à la fois une étude morphologique (étude de l'arbre vasculaire et modifications de structure dans la zone irradiée) et fonctionnelle (mesures de la perméabilité de la BHE et perfusion).

Cette étude ayant été réalisée chez des souris entre 5 et 10 semaines, il est assez difficile d'atteindre des profondeurs de plus de 300µm sous la dure-mère avec un signal exploitable pour les deux colorants. Cette constatation est particulièrement vraie pour les souris ayant été observées à un mois post-irradiation (c'est-à-dire à 10 semaines d'âge) où le parenchyme cérébral s'est opacifié.

L'immunohistochimie quantitative a été utilisée par marquage du collagène IV afin de pouvoir avoir des données chiffrées à de plus grandes profondeurs. La figure 6.8 résume les zones accessibles par les deux méthodes et montre ainsi leur complémentarité.

6.2.3.1.1 Effets sur la BHE

Nous avons pu constater que les deux colorants injectés par voie intraveineuse (Rhodamine B dextran 70kDa et FITC dextran 4kDa) restaient dans le volume vasculaire au niveau de la zone irradiée aussi bien à 48h, une semaine et un mois après l'irradiation. La BHE semble conserver son imperméabilité pour des molécules dont le poids moléculaire est supérieur ou égal à 4kDa. Cette imperméabilité peut être conservée pour des molécules plus petites mais nos conditions expérimentales ne nous ont pas permis d'affiner notre gamme (4kDa est la taille la plus faible de molécules fluorescentes de type FITC ou Rhodamine couplées à un dextran fournies par Sigma).

Cependant une augmentation de la perméabilité de la BHE a souvent été décrite comme un effet secondaire des radiothérapies.

Comparer notre étude à d'autres est un travail assez difficile car de nombreux paramètres doivent être pris en compte :

- la radiosensibilité peut différer en fonction des modèles animaux choisis.
- la dose, la manière dont elle est délivrée, le débit de dose ainsi que l'énergie des rayonnements ionisants utilisés peuvent énormément varier entre les études.
- la perméabilité de la BHE peut être mesurée de différentes manières comme par exemple avec une imagerie radiographique de la diffusion d'agents radioactifs, par IRM, par immunohistochimie ou encore par utilisation du methotrexate¹⁸⁷. La sensibilité de ces différentes méthodes est de surcroît différente.

Nous allons donc par la suite essayer de comparer notre étude avec celles effectuées sur des rongeurs utilisant des méthodes de mesure de perméabilité de la BHE comparables à la nôtre. Nakata et al. ont étudié l'effet de doses uniques de 20 et 40Gy chez des rats. Ils ont quantifié l'extravasation des composants du sérum en utilisant des méthodes immunohistochimiques (anticorps dirigés contre l'albumine sérique)¹⁸⁸.

Une rupture de la BHE a été observée aux deux doses, vingt-quatre heures après l'irradiation. L'extravasation de l'albumine sérique atteint un pic à trois jours post-irradiation et diminue jusqu'à une disparition complète un mois après la phase d'irradiation.

Yuan et al. réalisèrent une irradiation focale de 20Gy avec un irradiateur de 6MV. La mesure de la perméabilité de la BHE fut réalisée par de la microscopie de fluorescence en intravital sur les vaisseaux de la pie-mère. Ils rapportèrent que la perméabilité de la BHE pour des molécules de FITC dextran de 4.4, 10, 38.2 et 70kDa était augmentée vingt-quatre heures après l'irradiation. Cependant, aucune sortie des molécules de FITC dextran 150kDa ne fut observée¹⁸⁹.

Une augmentation temporaire de la perméabilité de la BHE n'a pas été observée dans nos expériences en comparaison de ce qui a été décrit dans les deux publications précédemment citées. Les méthodes sont comparables aussi bien celle de Yuan qui utilise une approche assez similaire à la nôtre que celle de Nakata qui observe l'extravasation de l'albumine qui a un poids moléculaire de 67kDa (Sigma) (proche de celui des molécules de FITC dextran que nous avons utilisé (70kDa)). Toutefois, nos travaux ont été réalisés avec une dose plus faible (15Gy) et sur des souris. La différence de radiosensibilité entre les deux espèces pourrait être une explication à ces observations contradictoires.

Une autre étude de Yuan et al. a utilisé un protocole d'irradiation fractionnée (40Gy délivrés en doses quotidiennes de 2Gy, 5 fois par semaine) chez la souris C57BR/6J. Les auteurs rapportèrent une augmentation de la perméabilité de la BHE pour des molécules de FITC dextran de 4.4 et de 38.2 kDa seulement 90 jours après la phase d'irradiation fractionnée. Il apparaît donc que les effets sur la BHE d'une irradiation de 40Gy en mode fractionné apparaissent plus tard que pour une dose unique¹⁹⁰.

L'irradiation réalisée au cours de ce travail de thèse n'a pas induit une augmentation de la perméabilité de la BHE lors d'observations réalisées au cours du mois suivant l'irradiation. C'est dans ce laps de temps qu'une augmentation de la perméabilité de la BHE est décrite dans des études réalisées après une irradiation unique. Une dose de 15Gy semble donc être acceptable pour ne pas induire de dégâts à court terme sur la BHE de souris saines au moment de l'irradiation. Devant les différences de radiosensibilité entre les espèces, il est cependant très difficile de prédire si une telle dose aura des effets similaires chez l'homme.

6.2.3.1.2 Effets sur les paramètres vasculaires

Des modifications des paramètres vasculaires autres que des changements de perméabilité de la BHE peuvent également entraîner des dysfonctions. C'est pourquoi nous avons mesuré les

changements de densité et de surface vasculaire dans le volume irradié. Aucune modification n'a été constatée au cours du mois suivant l'irradiation. Ces résultats sont en accord avec une étude de Roth et al. qui n'observa aucun effet d'une irradiation avec une dose de 10Gy (irradiateur de 6MV) sur la densité vasculaire de muscles de hamster jusqu'à trente jours post-irradiation¹⁹¹.

De plus, une étude de Serduc et al. a mis en évidence une densité vasculaire dans le cortex cérébral de souris nude très proche de nos résultats et très proche de celle observée dans le cortex cérébral de souris saines irradiées en mode MRT^{3; 141}.

6.2.3.2 Gliose

La gliose est souvent rapportée comme un effet secondaire de la radiothérapie. Son apparition peut être reliée à d'éventuels dysfonctionnements¹⁹².

Une étude de Yuan et al. conduite sur souris a mis en évidence que le nombre d'astrocytes avait doublé 60 jours après la mise en place d'une radiothérapie fractionnée (40Gy délivrés en fractions journalières de 2Gy, 5 jours par semaine). La gliose était toujours présente 180 jours après le commencement du traitement. Cependant, aucune différence ne fut mise en évidence entre des animaux contrôles et des animaux irradiés observés à 30 jours. Les auteurs ont également décrit que la gliose était limitée au cortex cérébral mais qu'aucune augmentation du nombre de cellules marquées par la GFAP n'avait été constatée dans l'hippocampe¹⁹⁰.

Chiang et al. ont étudié la gliose sur des souris ayant reçu une irradiation encéphalique totale. Une augmentation des cellules marquées par la GFAP fut observée entre 120 et 180 jours après une irradiation unique avec une dose de 20Gy ou de 45Gy. Aucune modification n'a été constatée pour des doses de 2 ou 8Gy¹⁹³.

Plus récemment, Hwang et al. ont mis en évidence qu'une irradiation encéphalique totale de 15Gy (irradiateur de 6MV) entraînait une augmentation significative de la gliose dans le cortex cérébral de rats dès 6 heures après l'irradiation. Cette augmentation est encore plus marquée à 24 heures post irradiation¹⁹⁴.

Au cours de nos expérimentations, nous n'avons pas observé d'apparition de gliose aussi bien à court terme (48h, une semaine et un mois) qu'à long terme (3 et 6 mois post-irradiation). Les expérimentations en immunohistochimie ont été pratiquées avec deux anticorps anti-GFAP différents provenant également de fournisseurs indépendants (voir 6.2.1.4.3). Des résultats similaires ont été trouvés dans les deux cas. L'absence d'apparition de gliose dans les tissus corticaux sains ayant reçu une dose de 15Gy (79keV) par irradiation synchrotron est

très prometteuse car comme nous l'avons signalé plus haut, l'apparition de gliose est synonyme de développement de problèmes fonctionnels.

6.2.3.3 Conclusions

Nous avons donc constaté qu'une irradiation synchrotron en mode tomographique avec une dose de 15Gy et une énergie de 79keV n'entraînait pas l'apparition d'effets secondaires gênants à court terme après l'irradiation. Les effets ont été évalués au niveau vasculaire (aussi bien au niveau structure que fonction) mais également au niveau du parenchyme cérébral (absence de gliose et absence de différences, sur des lames colorées en HE, entre animaux irradiés et non irradiés).

Nos études se sont principalement focalisées sur le court terme (jusqu'à un mois post irradiation). C'est au cours de cette période qu'apparaissent les effets secondaires aigus dus à une radiothérapie. Cependant, nous avons également mené certaines observations sur le long terme où nous avons constaté par exemple l'absence de gliose à 6 mois.

Sur la souris nude saine, les effets d'une irradiation synchrotron réalisée avec les mêmes modalités que celles utilisées pour la PAT-Plat complète n'entraînent pas d'effets secondaires gênants au niveau de la vascularisation et des tissus cérébraux. Avec toutes les précautions d'usage qui doivent être prises en ce qui concerne les différences de radiosensibilité entre espèces, ces informations sont très positives pour le développement des essais cliniques. En effet, si une zone saine au niveau du cerveau des patients recevait l'intégralité de la dose, les effets secondaires seraient limités.

6.3 Etude des Effets sur le Gliome F98

Après avoir constaté l'absence d'effets de l'irradiation sur les tissus sains, une étude des effets d'une irradiation tomographique synchrotron avec une dose de 15Gy (79keV) centrée sur le volume tumoral a été entreprise pour mieux définir la radiosensibilité de ce tissu. Le modèle tumoral choisi est le gliome F98 implanté en orthotopique. Notre étude s'est portée dans un premier temps sur la caractérisation de ce modèle chez la souris nude puis nous avons observé les effets de l'irradiation sur la croissance tumorale.

6.3.1 Matériels & Méthodes

6.3.1.1 Mise en place du modèle

6.3.1.1.1 *Culture cellulaire*

Après décongélation, les cellules F98 sont mises en culture à 37°C en atmosphère air/CO₂ (95/5) dans du milieu DMEM contenant de la L-glutamine (2%) additionné de sérum de veau fœtal (SVF) (10%) et de pénicilline/streptomycine (1%).

Arrivées à confluence, les boîtes de culture sont rincées une fois au PBS avant d'être décollées par trypsination (0,25% dans PBS - 5min à 37°C). L'action de la trypsine est stoppée par l'ajout de 200µl de SVF. La concentration cellulaire est déterminée par comptage sur une cellule de Neubauer. Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans du milieu d'injection (DMEM, L-glutamine 2%, pénicilline/streptomycine 1%), à une concentration de 5.10³ cellules/µl.

6.3.1.1.2 *Implantation*

Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (2% dans l'air ; 5% pour l'induction). Après avoir placé l'animal sur un cadre stéréotaxique, la voûte crânienne est dégagée puis une crâniotomie est réalisée à l'aide d'une aiguille de 0,5mm aux coordonnées bregma 0 ; latéral gauche 2mm¹⁸⁶ (Figure 6.9).

Une seringue Hamilton est ensuite introduite au niveau de la crâniotomie et descendue jusqu'à une profondeur de 3mm par rapport à la surface du crâne.

Après 5 minutes d'attente, 2µl de suspension cellulaire (10⁴ cellules F98) sont ensuite lentement injectés. La seringue est retirée 5 minutes après la fin de la phase d'injection afin de minimiser le reflux. La crâniotomie est ensuite obturée par de la cire et la peau de l'animal est suturée à l'aide de glue chirurgicale. Le champ opératoire est nettoyé à la bétadine et l'animal est placé dans une couveuse jusqu'à son réveil complet. Il est ensuite remis en stabulation dans l'animalerie.

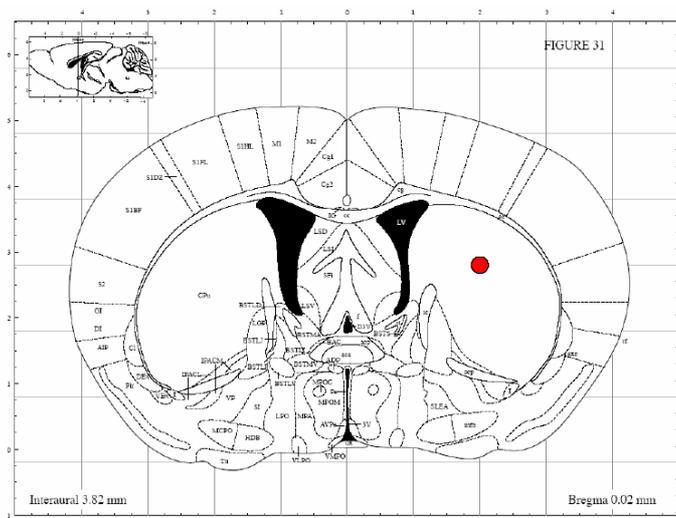


Figure 6.9 : Localisation du point d'injection des cellules tumorales F98 dans le striatum gauche de souris nude. Planche d'atlas stéréotaxique adapté de ¹⁸⁶.

6.3.1.1.3 Caractérisation histologique et immunohistochimique

Des coupes frontales de 10 μ m d'épaisseur ont été réalisées sur les cerveaux porteurs de tumeurs F98 à différents temps après l'implantation (5, 10, 12 et 14 jours) ou à différents temps après l'irradiation (2, 4 et 6 jours) ; n= 4 à 5 animaux par temps.

Certaines de ces coupes ont été colorées par la méthode HE ou par des méthodes immunohistochimiques (pour le protocole de ces deux types de marquage, voir 6.2.1.4).

6.3.1.2 Etude des effets de l'irradiation

6.3.1.2.1 Répartition des animaux

Les animaux implantés avec des cellules de gliome F98 en orthotopique ont été répartis en deux groupes :

- un groupe contrôle composé de 24 animaux (4 groupes de 5 animaux pour les mesures de volumes à différents temps ; un groupe de 4 animaux pour la survie).
- un groupe irradiation composé de 20 animaux (3 groupes de 5 animaux pour les mesures de volume ; un groupe de 4 animaux pour la survie).

6.3.1.2.2 Protocole d'irradiation.

L'irradiation a été réalisée 10 jours après l'implantation des cellules tumorales en suivant le protocole décrit en 6.2.1.2. L'axe de rotation de la plateforme a été positionné de façon à passer au centre du volume tumoral. Une dose de 15Gy avec un rayonnement d'une énergie de 79keV a été déposée en mode tomographique au niveau de la tumeur sur une hauteur de

3mm. Cette hauteur correspond à une irradiation avec un faisceau de 1.5mm de haut répétée sur deux rotations de la plateforme. La vérification de la jonction entre les deux bandes d'irradiation a été réalisée à l'aide du film radiosensible Gafchromic (MD55, International Speciality Products, Wayne, NJ) positionné entre le faisceau et la tête de l'animal. Le volume irradié est de l'ordre de 5.3mm³.

6.3.1.2.3 Mesure du volume tumoral

Le volume tumoral a été mesuré sur des séries de coupes frontales de 10µm d'épaisseur colorées avec la méthode HE. Les cerveaux de 4 à 5 animaux par temps ont pu être exploités. Pour le groupe contrôle, le volume a été observé 5, 10, 12 et 14 jours après l'implantation ; pour le groupe irradié le volume a été observé 2, 4 et 6 jours après l'irradiation (soit 12, 14 et 16 jours après l'implantation).

Afin d'avoir accès au volume tumoral, les différentes coupes colorées en HE ont été observées en microscopie à fond clair et les images ont été numérisées à l'aide du dispositif décrit en 6.2.1.4.4. La surface tumorale a été délinéée manuellement et mesurée à l'aide du programme AnalySIS.

Le volume tumoral V a été estimé en utilisant l'équation $V = \sum_1^n Z.X_j$ où Z est l'épaisseur effective de la coupe (cette valeur prend également en compte la distance entre deux coupes), X_j est la surface de la tumeur mesurée sur la coupe j et n est le nombre de coupes qui couvrent l'intégralité de la tumeur.

6.3.2 Résultats

6.3.2.1 Caractérisation du modèle F98

La croissance tumorale a été observée au cours de nos expérimentations après une injection de 10000 cellules F98 dans le striatum de souris nude. La courbe de croissance peut être superposée de façon satisfaisante avec une courbe exponentielle (Figure 6.10). Tous les animaux du groupe survie sont décédés entre 12 et 14 jours après l'implantation.

Une gliose a été observée autour de la tumeur dès la première observation réalisée à 5 jours après l'implantation (Figure 6.11 A) ; elle a ensuite augmentée jusqu'à 14 jours (Figure 6.11 B).

Malgré le fait que les cellules tumorales aient été implantées selon un protocole standardisé, aux mêmes coordonnées et par le même expérimentateur, leur forme est assez variable entre les animaux.

Cependant, elles présentent toutes un fort caractère invasif (des colonies de cellules tumorales peuvent être observées dans le parenchyme cérébral à distance de la lésion principale (Figure 6.11 C)).

Un immunomarquage contre le collagène IV met en évidence de larges vaisseaux dans la zone péri-tumorale avec un diamètre moyen de $33 \pm 11 \mu\text{m}$ en comparaison des $7 \pm 1 \mu\text{m}$ dans des contrôles sains (Figure 6.11 D ; flèches).

Nous avons également noté un fort bruit de fond dû au collagène IV dans la matrice extracellulaire du gliome F98 (Figure 6.11 D).

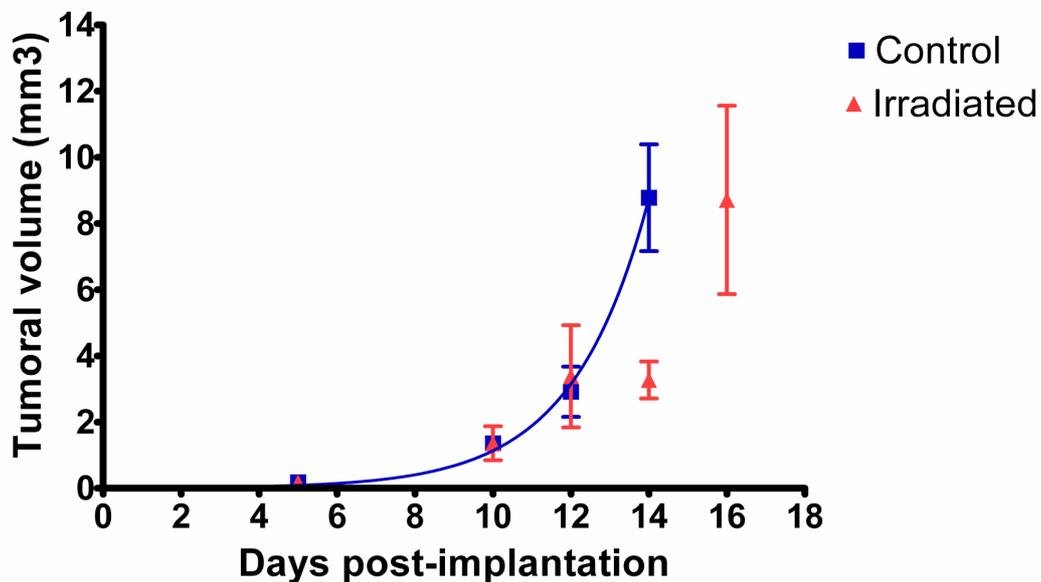


Figure 6.10 : Caractérisation de la croissance tumorale.

Le volume tumoral (en mm^3) a été évalué à différents délais après implantation sur des animaux non traités (carrés bleus) et irradiés (triangles rouges). On note une stagnation de la croissance durant les deux jours suivant l'irradiation.

6.3.2.2 Effets de l'irradiation sur le gliome F98

Si l'on compare la courbe de croissance des animaux porteurs du gliome F98 mais non irradiés avec celle des animaux ayant reçu l'irradiation synchrotron, on observe que la croissance exponentielle de la tumeur a été retardée de deux jours à partir du moment de l'irradiation. Le volume tumoral semble stagner entre les jours 10 et 12 post implantation (soit entre le moment de l'irradiation et deux jours après) avant de reprendre son rythme de croissance.

La survie a également été améliorée. Alors que tous les animaux du groupe survie contrôle sont morts entre 12 et 14 jours après l'implantation, les animaux traités sont décédés entre 22 et 32 jours après l'implantation. Pour ces survivants à long terme, une étude histologique a été entreprise et a révélé des plages de nécrose au cœur du volume tumoral (Figure 6.11 E ; flèche).

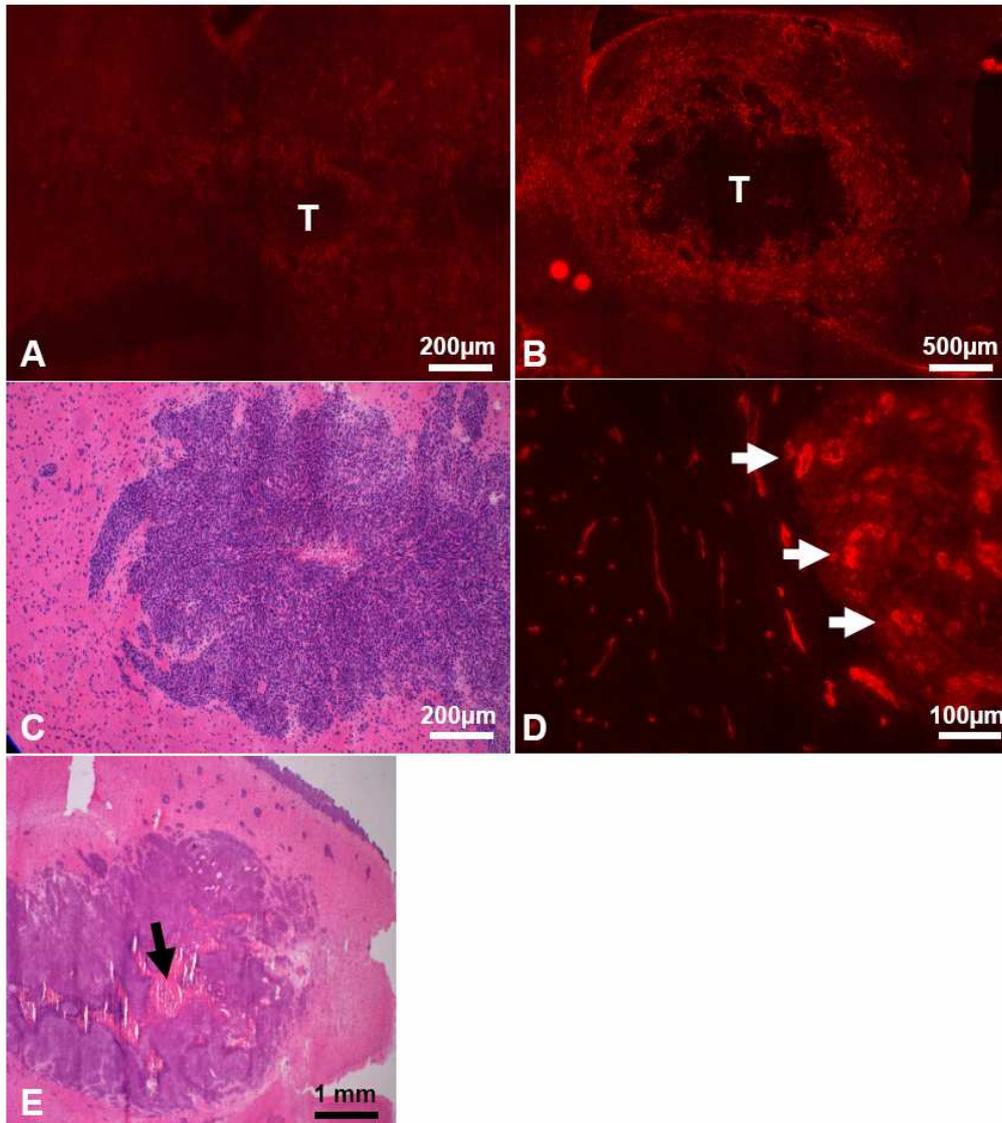


Figure 6.11 : Caractérisation du gliome F98.

A et B : Caractérisation de la gliose au voisinage de la tumeur (T) à J5 (A) et J14 (B) post implantation. On note que la gliose qui est déjà présente 5 jours après l'implantation devient plus importante à J14. L'image en A est une mosaïque de 2x1 images ; celle présentée en B de 5x5 images.

C : Coupe colorée en HE montrant la forme irrégulière du gliome F98 et son fort caractère invasif. On observe en effet des colonies à distance de la lésion principale (gauche de l'image).

D : Immunomarquage du collagène IV mettant en évidence un marquage de la matrice extracellulaire à l'intérieur de la tumeur (droite de l'image). De gros vaisseaux sanguins sont également visibles en marge de la tumeur (flèches) et dans la zone péri-tumorale.

E : Coupe colorée en HE montrant le gliome F98 à 32 jours après l'implantation chez un animal irradié et faisant partie du groupe survie. On remarque une zone nécrotique au cœur de la tumeur (flèche).

6.3.3 Discussion

6.3.3.1 Caractérisation du modèle F98

L'utilisation du modèle F98 a jusqu'alors essentiellement été décrite chez le rat^{38; 39}. Il s'agit d'une lignée établie ayant servi à plusieurs études en neuro-oncologie (voir 1.4.4.4) et notamment à de nombreuses expériences réalisées sur la ligne médicale de l'ESRF^{33; 1; 42}. Etant donné que la majorité des études réalisées sur la PAT-Plat ont été effectuées avec ce modèle, il nous est apparu nécessaire dans un premier temps de mieux le caractériser chez la souris nude qui est le modèle animal choisi pour ce travail de thèse. Rappelons que ce choix est motivé à la fois par le fait que ce modèle animal est plus adapté à la microscopie biphotonique que le rat et par le fait que les développements méthodologiques mis en place pourront par la suite être utilisés sur des souris nude porteuses de gliomes humains.

Nous avons ainsi pu observer que le gliome F98 se développant en orthotopique chez la souris nude possède les mêmes caractéristiques que celles observées chez le rat. Un fort caractère invasif, une croissance rapide et une morphologie proche des glioblastomes humains ont ainsi pu être mis en évidence.

Nous avons également remarqué que la matrice extracellulaire à l'intérieur du gliome F98 contient du collagène IV (Figure 6.11 D). Il a déjà été reporté dans la littérature qu'en présence de certains types de cellules tumorales (et notamment certaines issues de gliomes humains), le parenchyme cérébral adjacent à la lésion pouvait produire de la laminine, de la fibronectine ainsi que du collagène IV^{195; 196}. Dans nos expériences, le collagène IV est situé dans la matrice extracellulaire à l'intérieur de la lésion. Les cellules F98 pourraient donc produire ce type de collagène.

A cause du « bruit de fond » créé par ce marquage, il nous a été impossible d'appliquer la macro ImageJ pour quantifier les paramètres vasculaires à l'intérieur de la tumeur. Nous avons cependant pu remarquer un certain nombre de vaisseaux se trouvant dans la zone péri-tumorale présentant un bon signal émanant du collagène IV et permettant de quantifier leur diamètre moyen. Nous avons ainsi pu constater que ces vaisseaux avaient un diamètre de $33 \pm 11 \mu\text{m}$. Ces valeurs sont quatre fois plus élevées que celles constatées dans la même zone mais sur des animaux sains ($7 \pm 1 \mu\text{m}$). L'augmentation du diamètre des vaisseaux en

péritumoral confirme l'angiogénèse se déroulant au niveau de ses marges de progression actives.

6.3.3.2 Effets de l'irradiation sur le gliome F98

Les effets de l'irradiation synchrotron sur le gliome F98 ont essentiellement été quantifiés en terme de croissance tumorale.

Le gliome F98 est rapidement létal lorsqu'il est injecté dans le cerveau. Biston et al. ont rapporté une médiane de survie de 26 jours pour des rats Fisher implantés avec seulement 1000 cellules F98 dans le striatum. La médiane de survie pour des rats irradiés 13 jours après l'implantation avec une dose de 15Gy par rayonnement synchrotron avec une énergie de 78.8keV est de 48 jours¹.

Une étude de Adam et al. rapporte une médiane de survie de 26 jours pour des animaux non traités et de 46 jours pour des animaux ayant reçu une dose de 15Gy sur l'intégralité de l'hémisphère porteur de la tumeur F98³³.

Au cours de notre étude, nous avons irradié un volume de 5.3mm³ localisé dans le cortex de l'animal en considérant le point théorique d'injection comme le centre de la tumeur. Malgré le fait qu'un CT-Scan soit réalisé avant chaque irradiation, il est impossible de repérer la tumeur sans injecter d'agent de contraste. Or, un agent de contraste, notamment iodé, pourrait être photoactivé par le rayonnement synchrotron et ainsi créer des biais dans nos résultats (l'irradiation d'agent de contraste iodé est également à la base d'une thérapie baptisée tomothérapie). Le CT-scan nous sert donc uniquement pour positionner le point théorique d'injection (en comparant avec un atlas stéréotaxique).

Lors des études histologiques menées sur le gliome F98 nous avons pu constater que la forme des tumeurs était très hétérogène. Il est donc fortement vraisemblable que nous n'ayons pas irradié l'ensemble de la tumeur, ce qui explique l'effet transitoire observé seulement lors des deux jours suivant l'irradiation.

Malgré tout, l'irradiation synchrotron en mode tomographique avec une dose de 15Gy (79keV) avait déjà montré des effets bénéfiques en terme de survie ; nous venons ici de mettre en évidence un effet de ralentissement de la croissance tumorale.

6.4 Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons pu constater qu'une irradiation synchrotron de 15Gy en mode tomographique et avec une énergie de 79keV n'entraînait pas d'effets secondaires sur les tissus et la vascularisation cérébrale saine à court terme.

Dans un second temps, nous avons caractérisé le gliome F98 implanté en orthotopique chez la souris nude et montré que le même type d'irradiation présente un effet de ralentissement sur la croissance tumorale.

La dualité entre l'absence d'effets sur les tissus sains et leur présence sur tissus tumoraux fait donc que ce type d'irradiation apparaît comme très prometteur pour le développement d'essais cliniques.

Chapitre 7

Caractérisation des Effets de la PAT-Plat sur un Modèle de Gliome Hétérotopique.

Certaines parties de ce chapitre donneront lieu à publication sous les références :

- *Clément Ricard, Manuel Fernández, Jean-Claude Vial, Hélène Elleaume, Herwig Requardt, François Estève, Christoph Segebarth & Boudewijn van der Sanden ; Synergistic effects of cisplatin and synchrotron irradiation on F98 gliomas growing in nude mice ; article en préparation.*

Nous avons vu dans le précédent chapitre qu'une irradiation synchrotron en mode tomographique avec une dose de 15Gy et une énergie de 79keV n'entraînait pas de dommages au niveau des tissus et de la vascularisation cérébrale saine mais générait un délai dans la croissance du gliome F98. La suite de notre travail va se pencher sur l'étude des effets de la PAT-Plat complète sur le gliome F98.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser dans un premier temps à la définition des différentes modalités qui seront testées.

Dans un second temps, nous verrons quels sont les effets de la thérapie complète, de la radiothérapie seule ou de l'injection de cisplatine seule sur la croissance du gliome F98 implanté en hétérotopique.

Enfin, nous étudierons les effets de la PAT-Plat sur la vascularisation du gliome F98 en utilisant la microscopie biphotonique intravitale comme moyen d'étude.

7.1 Objectifs et Mise en Place de l'Etude.

Les travaux de MC. Biston ont mis en évidence que la PAT-Plat avait des effets curatifs sur 33% des rats porteurs du gliome F98 implanté en orthotopique¹. Ces conclusions reposent sur des études de survie ; cependant l'étude des effets de cette thérapie sur la croissance tumorale juste après l'irradiation ainsi que ses effets sur la vascularisation tumorale n'a jamais été entreprise. Le but des travaux présentés dans ce chapitre est donc d'observer le rôle de la thérapie sur la croissance tumorale et de déterminer si la combinaison cisplatine et irradiation génère un effet additif (les effets des deux thérapies s'additionnent) ; supra-additif (les effets des deux thérapies s'additionnent et donnent un résultat supérieur à la somme des deux) ou synergétique (une interaction se produit entre les deux thérapies de façon à donner un effet supérieur à l'addition de leurs effets respectifs). Le second objectif de ce travail est d'évaluer les effets de la PAT-Plat sur la vascularisation tumorale.

Le choix du modèle animal pour la réalisation de cette étude se révèle primordial. Le modèle orthotopique utilisé pour l'étude des effets de l'irradiation seule (voir chapitre précédent) apparaît intéressant cependant sa réalisation se heurte à plusieurs problèmes :

- la réalisation des actes chirurgicaux. La thérapie complète requiert en effet deux actes chirurgicaux majeurs en mode stéréotaxique : l'implantation des cellules tumorales et l'injection du cisplatine aux coordonnées du site d'injection le jour précédant l'irradiation. Nous avons précédemment évoqué la difficulté d'obtenir des cohortes de tumeurs homogènes, sans reflux le long de la trajectoire de l'aiguille. Il faut rajouter à ce problème les risques septiques de pratiquer une seconde intervention sur des souris nude dont le système immunitaire et particulièrement fragilisé. Les biais générés nous semblent donc assez importants.
- l'observation en microscopie biphotonique limitée à 600 μ m sous la dure-mère. Ce problème a été discuté plus en détail en 5.3.1.
- l'impossibilité de réaliser des mesures de volume tumoral à différents délais post-irradiation sans avoir recours, soit à des sacrifices d'animaux à intervalles réguliers et à des mesures réalisées sur coupes histologiques (méthode utilisée dans le chapitre précédent) ; soit à faire appel à des méthodes d'imagerie telles que l'IRM (cependant, le nombre d'animaux pouvant être observés par jour est très inférieur aux nombres d'animaux de nos cohortes expérimentales).

Nous avons donc décidé de travailler sur le modèle de greffe hétérotopique de cellules F98 en sous-cutané dans le membre inférieur de souris nude (voir 5.3.3). Ce modèle permet à la fois de réaliser des observations en microscopie biphotonique intravitale, d'obtenir facilement des mesures de volume à intervalles réguliers (il suffit simplement de mesurer la longueur et la largeur de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse) et il réduit les risques septiques pour l'animal (l'injection des cellules tumorales et du cisplatine est réalisée en sous-cutané en moins d'une minute sans incision).

Le volume tumoral au moment de la réalisation du traitement est également un élément important. Nous avons donc choisi de modéliser deux stades de la croissance tumorale :

- un stade baptisé « gliome de petit volume » où le volume moyen au moment du traitement est de l'ordre de 100mm^3 . Cela correspond au moment où l'angiogénèse devient importante. Toutes proportions gardées, nous pourrions qualifier ce modèle comme proche de la situation rencontrée lors d'un diagnostic précoce de glioblastome.
- un stade baptisé « gliome de gros volume » où le volume moyen au moment du traitement est de l'ordre de 480mm^3 . Cela correspond au moment où l'angiogénèse est bien établie. Toutes proportions gardées, nous pourrions qualifier ce modèle comme proche de la situation observée au moment d'un diagnostic tardif de glioblastome.

Les modalités du traitement ont également été calquées sur les résultats précédemment obtenus lors des expérimentations de MC. Biston¹. Nous avons donc conservé une irradiation en mode tomographique avec une dose de 15Gy. Le choix de la dose de cisplatine s'est révélé plus complexe car nos expérimentations ont lieu sur des gliomes implantés en hétérotopique dans des tissus où la neurotoxicité de la molécule n'est pas une limitation majeure ; de même le volume de la tumeur au moment de l'injection est sensiblement différent. Nous avons donc choisi dans un premier temps de traiter les animaux avec une dose de $5\mu\text{g}$ de cisplatine dilué dans $50\mu\text{l}$ d'une solution de NaCl à 0.9%. Ce choix a été motivé entre autres par des expériences préliminaires réalisées par Jérôme Gastaldo (communication personnelle).

Cette dose de cisplatine a dans un premier temps été testée lors d'une première série d'expériences puis un nouveau dosage ($2.5\mu\text{g}$ dans $50\mu\text{l}$ d'une solution saline) a été utilisé lors de deux autres séries d'expériences.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont le fruit de trois campagnes d'irradiation indépendantes (avril, juin et septembre 2007).

7.2 Etude des Effets sur la Croissance Tumorale

La première partie de l'étude a donc été consacrée à regarder les effets de la PAT-Plat complète et de ses différentes modalités (irradiation seule ou injection de cisplatine seule) sur la croissance du gliome F98 implanté en hétérotopique. Trois expérimentations différentes ont été réalisées :

- tumeurs de gros volume ; dose de cisplatine de 5 μ g ; irradiation de 15Gy/79keV.
- tumeurs de gros volume ; dose de cisplatine de 2.5 μ g ; irradiation de 15Gy/79keV.
- tumeurs de petit volume ; dose de cisplatine de 2.5 μ g ; irradiation de 15Gy/79keV.

Pour chacune de ces expériences, les animaux ont été divisés en différents groupes (contrôles non traités, traitement complet, irradiation seule et cisplatine seul). La table 7.1 indique la répartition des animaux dans les différents groupes.

Les résultats des différentes expériences seront également comparés entre eux.

| Groupe | Type de traitement | Nombre de souris |
|--------|--|------------------|
| I | Contrôle (gros volume) | 14 |
| II | Cisplatine 5 μ g (gros volume) | 7 |
| III | Irradiation 1 (gros volume) | 5 |
| IV | Traitement complet (5 μ g cisplatine) (gros volume) | 24 |
| V | Cisplatine 2.5 μ g (gros volume) | 7 |
| VI | Irradiation 2 (gros volume) | 8 |
| VII | Traitement complet (2.5 μ g cisplatine) (gros volume) | 27 |
| VIII | Contrôle (petit volume) | 6 |
| IX | Cisplatine 2.5 μ g (petit volume) | 7 |
| X | Irradiation (petit volume) | 5 |
| XI | Traitement complet (2.5 μ g cisplatine) (petit volume) | 18 |

Table 7.1 : Répartition des animaux (souris nude femelles) et constitution des différents groupes.

7.2.1 Matériels & Méthodes

7.2.1.1 Mise en place du modèle

Les tumeurs ont été implantées selon la procédure décrite en 5.3.3.1.1 par l'injection de 50µl d'une suspension de 10^5 cellules F98 dans du DMEM en sous-cutané dans le membre inférieur gauche de souris nude.

A la suite de l'injection, les animaux ont été placés en stabulation pour une durée de 2 semaines ½ pour obtenir des tumeurs de petit volume (approximativement 100mm³) ou pour une durée de 3 semaines ½ pour obtenir des tumeurs de gros volume (approximativement 480mm³).

7.2.1.2 Préparation des animaux

Les animaux ont été répartis de façon aléatoire dans différents groupes (voir table 7.1 pour les détails de la répartition). Pour les souris des groupes « traitement complet » (IV, VII, XI), une injection de cisplatine (2.5 ou 5µg en fonction des groupes) dans 50µl d'une solution de NaCl 0.9% a été pratiquée 24h avant la phase d'irradiation. Pour les animaux des groupes « cisplatine seul » (II, V, IX), l'injection a eu lieu au même moment que pour les groupes « traitement complet » afin de pouvoir réaliser des comparaisons.

La phase d'injection a été réalisée sous une brève anesthésie à l'isoflurane (4% dans l'air pendant une minute) et à l'aide d'une seringue avec une aiguille 29G dont l'extrémité a été placée au centre du volume tumoral. La durée de la phase d'injection est d'approximativement 30s.

7.2.1.3 Protocole d'irradiation

Les souris ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un cocktail de xylazine/ketamine (0.1% / 1%) dans une solution de NaCl à 0.9%. Une fois anesthésié, l'animal est positionné sur un cadre horizontal en plexiglas spécialement conçu pour l'expérience. Un sachet de gel chauffant placé sous la souris permet de maintenir sa température dans des conditions physiologiques.

Le membre inférieur gauche de l'animal est ensuite inséré et maintenu à l'aide d'un fil dans un tube vertical en plexiglas (Figure 7.1).

Le cadre est fixé sur la plateforme d'irradiation puis l'axe de rotation est positionné de façon à se trouver au centre du tube en plexiglas contenant le membre inférieur de l'animal.

Le rayonnement synchrotron après avoir été monochromatisé à 79keV traverse un collimateur définissant un faisceau de 1.5mm de haut sur 40mm de large. L'intégralité de la surface se trouvant à l'intérieur du cylindre est irradiée en mode tomographique.

Avant chaque irradiation une radiographie est réalisée en utilisant le rayonnement synchrotron et le détecteur Germanium de façon à repérer la hauteur sur laquelle l'irradiation doit avoir lieu. La dosimétrie est également vérifiée à l'aide de ce détecteur (Figure 7.2).

La hauteur sur laquelle le membre inférieur de l'animal est irradié dépend de la forme et du volume de la tumeur. Elle varie entre 12 et 21mm ce qui correspond à un nombre de 8 à 14 rotations de la plateforme. La jonction entre les différentes rotations est vérifiée à l'aide du film Gafchromic.

Le débit de dose (normalisé par rapport à la valeur du courant des électrons dans l'anneau de stockage) est de $9.9 \cdot 10^{-4} \text{ Gy} \cdot \text{mA}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ au niveau de la peau.

La vitesse de rotation est ajustée de façon à avoir une dose déposée de 15Gy à l'axe de rotation ; la durée de l'irradiation est de l'ordre de 15 à 25 minutes.

7.2.1.4 Mesure du volume tumoral

Le volume de référence (t=0) pour tous les groupes d'animaux a été mesuré 24h avant la phase d'irradiation (pour les animaux contrôles et les animaux ayant reçu uniquement l'injection de cisplatine, la mesure a également été pratiquée le même jour).

Le volume a ensuite été évalué à différents délais après le traitement en utilisant un pied à coulisse numérique. Seules la longueur l et la largeur w de la tumeur ont été prises en compte pour le calcul. La hauteur n'a pas été considérée. En conséquence, les volumes tumoraux observés sur certains animaux des groupes IV, VII et XI peuvent être légèrement surestimés étant donné qu'un effondrement a pu être observé au centre de la tumeur chez certains animaux (20%).

Le volume V a été obtenu en appliquant l'équation : $V = \pi (4/3) l w^2$. Le volume tumoral de référence (t=0) a été normalisé à 100 dans l'ensemble des figures présentées dans cette étude.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le programme GraphPad Prism4 (San Diego, USA). Un test de Student pour données non appariées (Student's unpaired two-tailed t test) a été utilisé pour comparer les moyennes. Les données sont représentées sous la forme « moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM) ». Les différences sont considérées comme significatives à une probabilité $p < 0.05$.

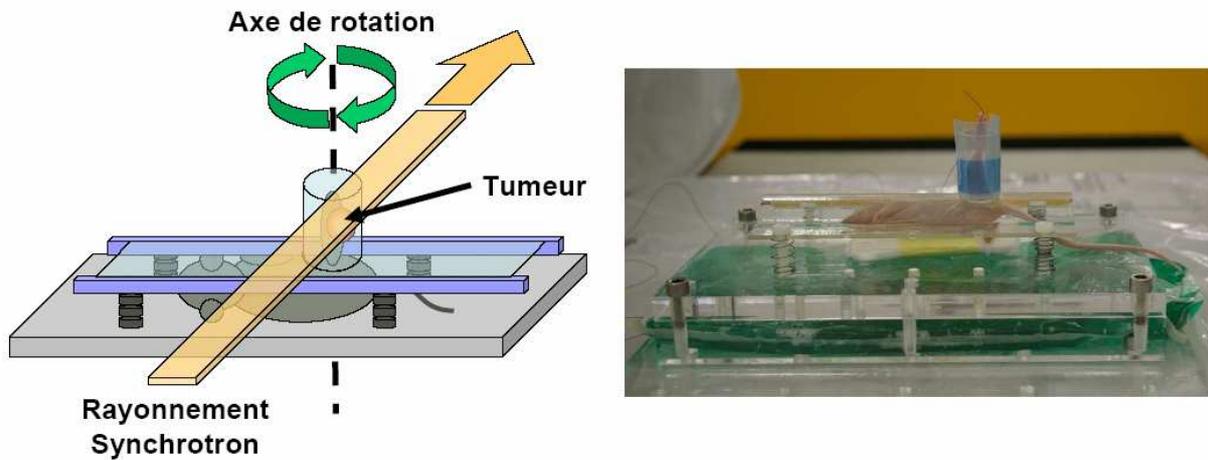


Figure 7.1 : Positionnement de la souris sur le cadre.

La souris est allongée sur un cadre horizontal et le membre inférieur gauche portant la tumeur est positionné dans un cylindre vertical en plexiglas. L'axe de rotation de la plateforme est aligné sur l'axe du cylindre. L'animal est irradié en mode tomographique de sorte que le volume se trouvant à l'intérieur du tube reçoive l'intégralité de la dose. A droite, photo du dispositif ; le film Gafchromic déposé au niveau du cylindre permet par la suite de vérifier si la jonction entre les différentes rotations est bien réalisée. La couleur bleue montre la zone qui a reçu l'irradiation.

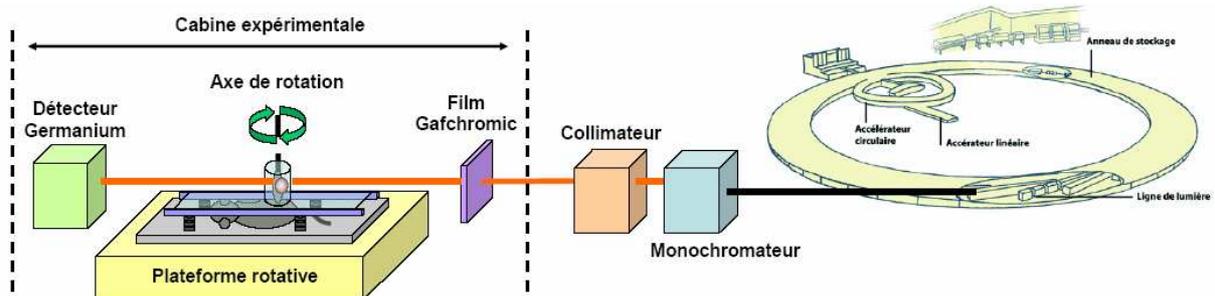


Figure 7.2 : Représentation simplifiée du setup d'irradiation utilisé pour le traitement des tumeurs implantées en hétérotopique. Partie droite du schéma adaptée de www.esrf.eu.

7.2.2 Résultats

Nous décrivons dans un premier temps les effets du traitement et de ses différentes modalités sur des tumeurs de gros volume au moment de la thérapie ($480 \pm 33 \text{ mm}^3$) en regardant notamment le rôle de la quantité de cisplatine injecté sur la croissance tumorale. Dans un second temps, nous nous intéresserons aux tumeurs de petit volume ($106 \pm 11 \text{ mm}^3$).

7.2.2.1 Campagne d'avril 2007

Dans cette première série d'expériences, nous avons travaillé sur des tumeurs de gros volume avec une dose de $5\mu\text{g}$ de cisplatine (Figure 7.3).

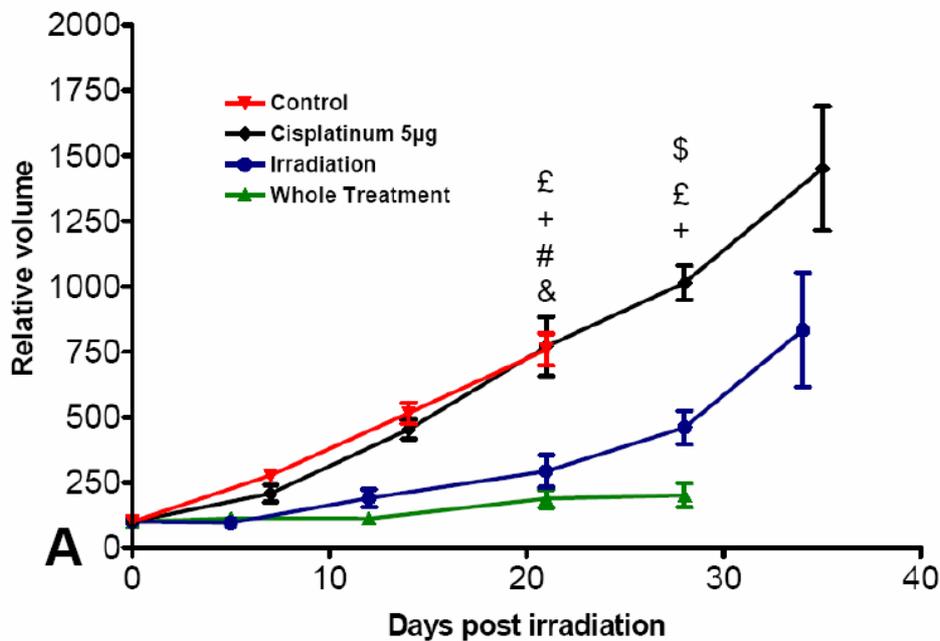


Figure 7.3 : Courbe de croissance du gliome F98 sur des tumeurs de gros volume avec une dose de cisplatine de $5\mu\text{g}$ (campagne d'avril 2007).

Le volume relatif (normalisé à 100 à J0) est représenté en fonction du temps après le traitement.

Effets d'une injection intratumorale de $5\mu\text{g}$ de cisplatine (groupe II, diamants noirs); de la radiothérapie seule (groupe III, ronds bleus); du traitement complet (groupe IV, triangles verts) et animaux contrôles (groupe I, triangles inversés rouges).

Statistiques. &: $p < 0,05$ traitement complet vs contrôle; #: $p < 0,05$ irradiation seule vs contrôle; +: $p < 0,05$ traitement complet vs cisplatine seul; £: $p < 0,05$ irradiation seule vs cisplatine seul; \$: $p < 0,05$ traitement complet vs irradiation seule.

Le cisplatine seul semble n'avoir aucun effet sur la croissance tumorale par rapport à des animaux non traités. L'irradiation réduit la croissance tumorale, cependant, la croissance pour ce groupe redevient exponentielle à partir de la quatrième semaine après le traitement.

Le traitement complet semble réduire considérablement la croissance tumorale. Cependant, la différence entre les groupes irradiation seule et traitement complet ne devient statistiquement significative qu'au-delà de 3 semaines.

Entre 3 et 4 semaines post traitement, la croissance du groupe traitement complet stagne mais l'ensemble des animaux ont été trouvés morts sur un laps de temps très court aux alentours du 28eme jour, sans observation de signes avant-coureurs. Une toxicité de la thérapie avec une dose de cisplatine de 5 μ g sera discutée par la suite.

Malgré tout, la thérapie complète semble avoir plus d'effets que la radiothérapie seule ou que la chimiothérapie seule, cette dernière n'ayant aucun effet sur la croissance tumorale. Il semble donc que les effets observés lors de la thérapie complète ne soient pas additifs ou supra additifs mais synergiques.

7.2.2.2 Campagne de juin 2007

Etant donné que la thérapie complète réalisée avec une dose de cisplatine de 5 μ g semble être toxique pour l'animal, nous avons décidé de mener une nouvelle campagne d'expérimentations sur tumeurs de gros volume en utilisant une dose de cisplatine réduite de moitié ; c'est à dire 2.5 μ g (Figure 7.4).

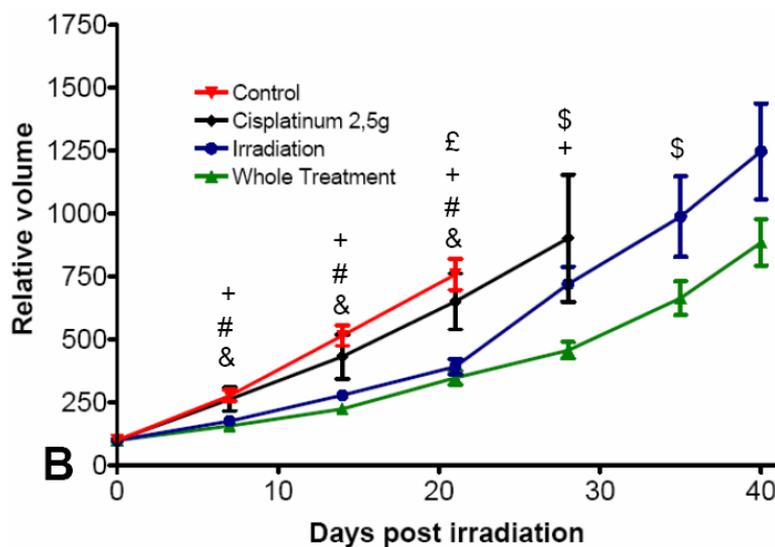


Figure 7.4 : Courbe de croissance du gliome F98 sur des tumeurs de gros volume avec une dose de cisplatine de 2.5 μ g (campagne de juin 2007).

Le volume relatif (normalisé à 100 à J0) est représenté en fonction du temps après le traitement.

Effets d'une injection intratumorale de 2.5 μ g de cisplatine (groupe V, diamants noirs) ; de la radiothérapie seule (groupe VI, ronds bleus) ; du traitement complet (groupe VII, triangles verts) et animaux contrôles (groupe I, triangles inversés rouges).

Statistiques. &: p<0,05 traitement complet vs contrôle; #: p<0,05 irradiation seule vs contrôle; +: p<0,05 traitement complet vs cisplatine seul; £: p<0,05 irradiation seule vs cisplatine seul; \$: p<0,05 traitement complet vs irradiation seule.

Nous avons à nouveau constaté que le cisplatine seul n'avait aucune action sur la croissance tumorale.

L'irradiation seule entraîne un ralentissement de la croissance tumorale observée au cours des 3 premières semaines suivant le traitement. Cependant à 4 semaines, la croissance devient à nouveau exponentielle.

Le traitement complet entraîne une réduction de la croissance tumorale identique à celle de l'irradiation seule au cours des 3 premières semaines suivant le traitement. Par contre au-delà de 3 semaines, l'effet de la thérapie complète en terme de réduction de la croissance tumorale est plus important. Il faut cependant noter qu'à 6 semaines post traitement cette différence est une tendance et n'est pas significative ($p=0.08$).

7.2.2.3 Rôle de la dose de cisplatine

Que ce soit avec une dose de $2.5\mu\text{g}$ ou de $5\mu\text{g}$, nous avons pu constater que le cisplatine n'avait aucune action sur la croissance tumorale. Les courbes de croissance des animaux traités avec le cisplatine seul sont superposables avec la courbe des animaux non traités (Figure 7.5).

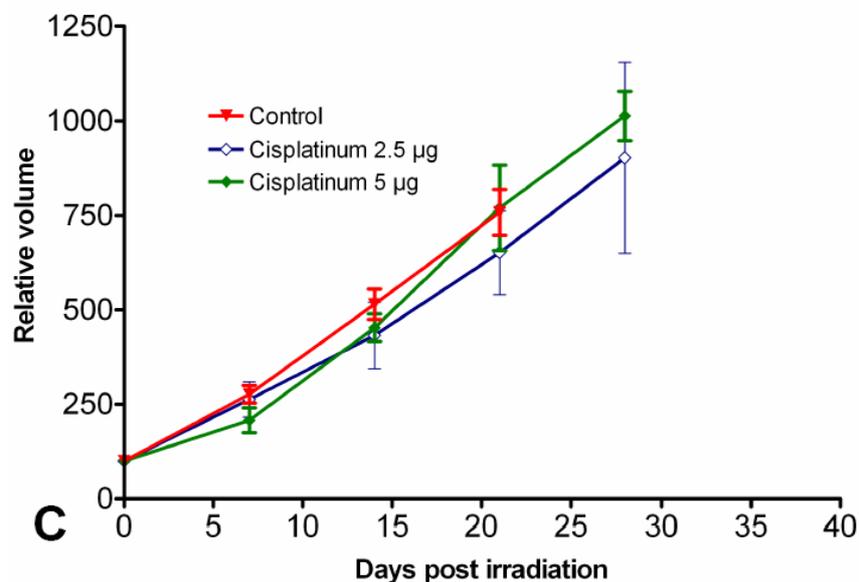


Figure 7.5 : Action du cisplatine seul sur la courbe de croissance du gliome F98 sur des tumeurs de gros volume.

Le volume relatif (normalisé à 100 à J0) est représenté en fonction du temps après le traitement. Effets d'une injection intratumorale de $2.5\mu\text{g}$ de cisplatine (groupe V, diamants vides bleus) ; de $5\mu\text{g}$ de cisplatine (groupe II, diamants pleins verts) et animaux contrôles (groupe I, triangles inversés rouges).

La forte toxicité rencontrée sur le groupe traitement complet avec 5 μ g de cisplatine n'a pas été observée pour les animaux ayant reçu le traitement complet avec une dose de 2.5 μ g de cisplatine. Cependant, la réduction de la croissance tumorale est plus importante avec 5 μ g de cisplatine qu'avec 2.5 μ g (Figure 7.6). La stabilisation de la croissance tumorale observée entre 3 et 4 semaines post traitement n'est visible que pour le groupe traitement complet avec 5 μ g de cisplatine.

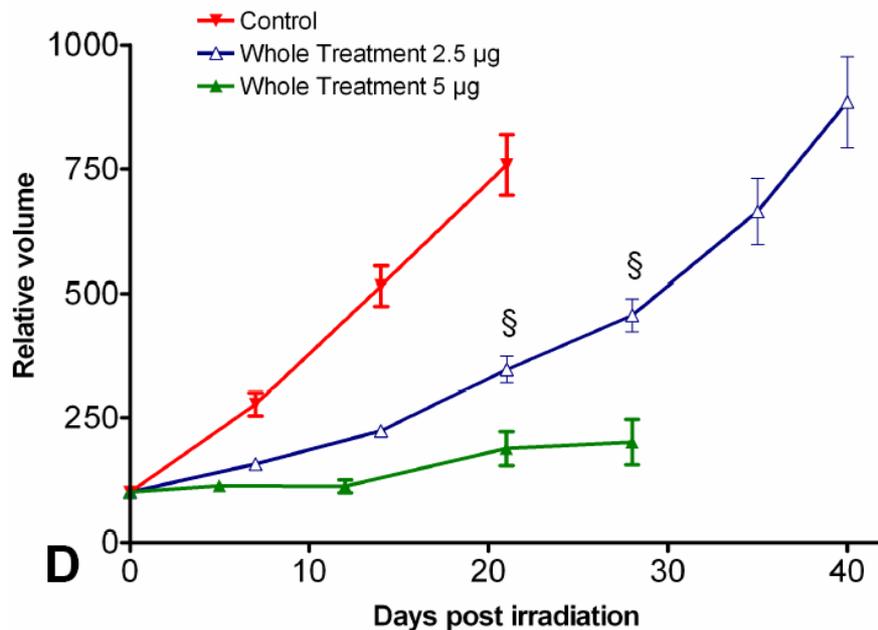


Figure 7.6 : Action de la thérapie complète avec différentes doses de cisplatine sur la courbe de croissance du gliome F98 (tumeurs de gros volume).

Le volume relatif (normalisé à 100 à J0) est représenté en fonction du temps après le traitement.

Effets de la thérapie complète avec 2.5 μ g de cisplatine (groupe VII, triangles vides bleus) ; de la thérapie complète avec 5 μ g de cisplatine (groupe IV, triangles pleins verts) et animaux contrôles (groupe I, triangles inversés rouges).

Statistiques. §: $p < 0.01$ traitement complet avec 5 μ g de cisplatine vs traitement complet avec 2.5 μ g de cisplatine.

7.2.2.4 Campagne de septembre 2007

L'objectif de cette dernière campagne a été de tester l'efficacité de la PAT-Plat et de ses différentes modalités sur des tumeurs de petit volume (environ 100mm³). Nous avons également choisi une dose de 2.5 μ g de cisplatine afin d'éviter la toxicité observée précédemment (Figure 7.7).

Nous constatons à nouveau que le cisplatine seul n'a pas d'action sur la croissance tumorale sauf au cours de la première semaine où l'on observe un très léger ralentissement.

L'irradiation seule entraîne un ralentissement de la croissance tumorale qui est significatif les 3 premières semaines après le traitement.

Le traitement complet entraîne également un fort ralentissement. La différence entre le traitement complet et l'irradiation seule est significative à partir de la deuxième semaine post traitement. Le ralentissement observé après le traitement complet reste significatif jusqu'à de long délais (6 semaines post traitement).

A modalité de traitement identique (2.5µg de cisplatine), l'efficacité de la PAT-Plat en comparaison d'une irradiation seule apparaît une semaine plus tôt et reste significative à plus long terme pour des tumeurs de petit volume que pour des tumeurs de gros volume.

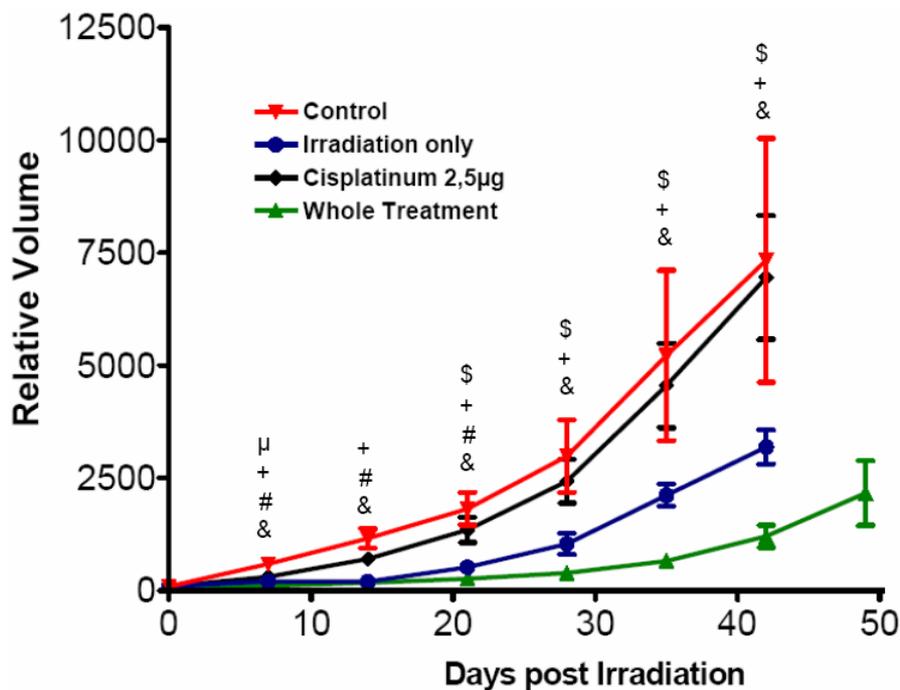


Figure 7.7 : Courbe de croissance du gliome F98 sur des tumeurs de petit volume avec une dose de cisplatine de 2.5µg (campagne de septembre 2007).

Le volume relatif (normalisé à 100 à J0) est représenté en fonction du temps après le traitement.

Effets d'une injection intratumorale de 2.5µg de cisplatine (groupe IX, diamants noirs) ; de la radiothérapie seule (groupe X, carrés bleus) ; du traitement complet (groupe XI, diamants verts) et animaux contrôles (groupe VIII, carrés rouges).

Statistiques. &: $p < 0,05$ traitement complet vs contrôle; #: $p < 0,05$ irradiation seule vs contrôle; +: $p < 0,05$ traitement complet vs cisplatine seul; µ: $p < 0,05$ cisplatine seul vs contrôle; \$: $p < 0,05$ traitement complet vs irradiation seule.

7.2.2.5 Effet de synergie

Au cours des différentes expérimentations menées sur les trois campagnes nous avons donc pu constater que le cisplatine n'avait pas d'effet sur la croissance tumorale, que l'irradiation seule avait un effet à court terme et que le traitement complet avait un effet plus important

notamment dans la durée. Les effets des deux modalités que l'on retrouve dans la PAT-Plat ne sont pas additifs mais synergiques.

7.2.3 Discussions

Jusqu'à maintenant, les effets de la PAT-Plat sur le gliome F98 ont essentiellement été observés en terme de survie. Cependant, l'étude des effets du traitement complet ou de ses différentes modalités sur la croissance tumorale n'avait jamais été reportée.

Dans notre étude, le gliome F98 s'est développé en hétérotopique, au niveau du membre inférieur de la souris nude permettant d'une part de réaliser facilement une étude longitudinale (il est facile de mesurer le volume tumoral à intervalles réguliers) mais également de s'affranchir des interactions du système immunitaire sur l'efficacité du traitement (comme nous l'avons vu précédemment, les souris nude ne présentent pas de réaction immunitaire à médiation cellulaire).

D'autre part, notre protocole a été testé sur des tumeurs de volumes différents permettant d'observer les effets du traitement à différents stades de la croissance tumorale.

7.2.3.1 Effets de l'irradiation seule

Nous avons observé qu'une irradiation synchrotron avec une dose de 15Gy et une énergie de 79keV entraînait un ralentissement de la croissance du gliome F98 implanté en hétérotopique. Biston et al.¹ ainsi que Adam et al.³³ avaient déjà rapportés une augmentation de la médiane de survie pour des rats irradiés avec une dose de 15Gy à l'ESRF (48 et 46 jours respectivement en comparaison des 26 jours pour des animaux contrôles).

Au cours de notre étude, le ralentissement de la croissance tumorale a été observé pendant 3 semaines avant que la courbe ne reprenne une allure exponentielle. Ces 3 semaines correspondent approximativement à l'augmentation de la durée de survie pour les animaux ayant été traités au cours des deux études précédemment citées.

Bencokova et al. ont récemment classifié le gliome F98 comme étant une lignée cellulaire dont la radiosensibilité est modérée⁴⁰. La fraction de survie cellulaire *in vitro* après une irradiation de 2Gy a été quantifiée à $41.4 \pm 2.5\%$. Malgré cette radiosensibilité modérée, l'irradiation ne semble pas stériliser l'intégralité des cellules tumorales. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un grand nombre de cellules F98 sont en mort mitotique mais que

l'intégralité du volume tumoral n'est pas stérilisé. La récurrence semble apparaître au bout de 3 semaines après l'irradiation.

Si l'on compare cette étude réalisée en hétérotopique avec l'étude orthotopique présentée dans le chapitre précédent, nous constatons que l'effet de l'irradiation dure beaucoup plus longtemps pour les tumeurs implantées dans le membre inférieur. Une des explications pourrait venir du fait de la différence d'environnement tumoral entre les deux modèles, cependant tout ne peut pas être expliqué de cette manière.

Nous avons vu précédemment que nos irradiations en orthotopique sont réalisées à partir de données théoriques (localisation du point d'injection des cellules dans le cerveau) ; il nous est cependant impossible de prédire comment a poussé la tumeur et devant la grande hétérogénéité dans la forme des gliomes F98 observée en histologie, il est très fortement probable que l'intégralité de la tumeur n'a pas reçu l'irradiation.

Cependant, dans le cas des gliomes implantés en hétérotopique, l'intégralité de la tumeur a été irradiée. La différence entre les effets observés dans les deux modèles pourrait donc avoir pour origine le volume de la zone tumoral irradié (partiel en orthotopique ; intégral en hétérotopique). Ce paramètre doit particulièrement être pris en compte pour le développement d'essais cliniques pour délimiter au mieux par différentes méthodes d'imagerie les contours de la tumeur avant de l'irradier dans sa totalité.

7.2.3.2 Effets de la chimiothérapie seule

Nous n'avons constaté aucun effet du cisplatine sur la croissance tumorale, avec une dose de 2.5µg comme avec une dose de 5µg. Biston et al.¹ avaient cependant rapporté une légère augmentation de la médiane de survie chez des rats traités avec 3µg de cisplatine (37 jours en comparaison de 26 jours pour des animaux contrôle). Une différence de sensibilité entre souris et rats pourrait être éventuellement avancée. Le rôle du système immunitaire peut également être une hypothèse pouvant expliquer l'absence d'effets. L'addition de l'action du cisplatine et de la réaction immunitaire sur les cellules tumorales pourrait être à l'origine de la légère augmentation de survie observée par Biston et al. Dans le cas de notre étude, le cisplatine n'est pas suffisant pour entraîner seul un effet sur la croissance.

7.2.3.3 Effets de la thérapie complète

Au cours de notre étude, une réduction de la croissance tumorale a été observée après le traitement complet. Cette réduction est plus importante que celle observée pour l'irradiation seule, notamment sur la durée.

Pour les animaux porteurs d'une tumeur de gros volume, la différence en terme de croissance tumorale entre les animaux ayant reçu le traitement complet et ceux ayant simplement reçu l'irradiation est significatif à partir de 3 semaines post traitement (quelque soit la dose de cisplatine, 2.5 ou 5 μ g). Pour les animaux avec un faible volume tumoral au moment du traitement, cette différence est significative dès 2 semaines post traitement.

Nous n'avons constaté aucune rémission à long terme (3 animaux ont eu un volume tumoral stable durant 3 mois post irradiation mais ont tous rapidement subi une récurrence par la suite). Nos résultats sont donc loin de ceux décrits dans l'étude de MC. Biston¹ qui a mis en évidence 33% d'effets curatifs de la PAT-Plat sur des rats Fisher porteurs du gliome F98 implanté en orthotopique.

Une explication de l'origine de ces différences pourrait être le rôle de la réponse immunitaire à médiation cellulaire dont les souris nude sont dépourvues en comparaison des rats Fisher. La stimulation du système immunitaire lors du développement d'un néoplasme et après une radiothérapie peut avoir un rôle important dans la réponse anti-tumorale. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'absence de rémission complète à long terme peut être due à l'absence de système immunitaire à médiation cellulaire dans notre modèle.

Nous avons également observé que les effets de la thérapie complète en terme de réduction de la croissance tumorale était beaucoup plus important avec une dose de cisplatine de 5 μ g. Malheureusement tous les animaux de ce groupe (IV) ont été trouvés morts sur un intervalle de 5 jours centrés sur le 28eme jour post traitement. Ces morts prématurées et non prévisibles (les animaux décédés le matin ne présentaient aucun signe visible la veille) pourraient être dues à la toxicité du cisplatine. Cependant, les animaux du groupe cisplatine seul 5 μ g (II) n'ont pas subi d'intoxication. Il semble donc que la toxicité soit liée à la combinaison cisplatine + irradiation.

Les meilleurs résultats en terme de contrôle du volume tumoral avec un minimum de toxicité ont été obtenus sur le groupe XI (tumeurs de petit volume traitées avec une dose de 15Gy et

2.5µg de cisplatine). Jusqu'à maintenant, il avait été impossible de déterminer si les effets observés suite à la PAT-Plat étaient supra additifs ou synergiques.

Dans cette étude, nous avons pu montrer pour la première fois que les effets étaient synergiques. Il existe une interaction entre les deux modalités. Cet effet de synergie n'a pu être démontré que par le fait que le cisplatine seul n'a aucun effet et que le rôle du système immunitaire est écarté chez la souris nude.

La nature de la synergie reste cependant sans réponse. Biston et al. avaient émis l'hypothèse que ces effets (qui n'étaient pas encore différenciés à ce moment entre effets de synergie ou supra additifs) pouvaient être du à l'émission d'électrons Auger¹. Quand le platine est irradié avec une énergie juste au dessus de son K-edge, un électron de la couche K est éjecté par effet photoélectrique et crée ainsi une lacune. Cette lacune est remplie par un réarrangement des électrons se trouvant sur les couches périphériques et peut donner lieu à une cascade Auger. Les électrons Auger peuvent interagir sur des distances de quelques nanomètres avec des macromolécules. Comme le cisplatine forme des adduits au niveau de l'ADN, un nombre maximal de dommages comme des DSBs sont créés (voir chapitre 3).

Cependant, il a également été démontré qu'une irradiation avec une énergie réglée juste au-dessus ou juste en-dessous du K-edge du platine entraînait des effets similaires en terme de survie. En dessous du K-edge, l'effet Auger est beaucoup moins présent mais un effet photoélectrique important est également créé. Cet effet photoélectrique prédominant pourrait être l'une des explications sur l'origine de l'effet de synergie observé entre le cisplatine et l'irradiation.

7.3 Etude des Effets sur la Vascularisation

La seconde partie de l'étude a consisté en l'observation des effets de la thérapie complète sur la vascularisation du gliome F98. Les expérimentations ont été réalisées sur le groupe IV (tumeurs de gros volume avec injection de 5µg de cisplatine et irradiation synchrotron avec une dose de 15Gy et une énergie de 79keV).

7.3.1 Matériel & Méthodes

7.3.1.1 Protocole d'irradiation

Les animaux utilisés lors de cette expérience font partie du groupe IV et ont été implantés et traités selon les procédures décrites en 7.2.1

7.3.1.2 Observations en microscopie biphotonique

Les animaux ont été étudiés à J5 et J12 post irradiation (n=4 souris par temps). La vascularisation tumorale a été observée selon le protocole décrit en 5.3.3.

Un cocktail de 100µl d'une solution de FITC dextran 70kDa à 100mg/ml et de 50µl d'une solution de SRB à 10mg/ml dans une solution de NaCl 0.9% a été injecté dans la veine caudale de la souris. Le FITC dextran 70kDa reste dans le circuit vasculaire et sert à repérer les vaisseaux sanguins ; la SRB s'extravase et permet d'augmenter le contraste. La vascularisation tumorale a été observée de 0 à 200µm sous la surface.

7.3.1.3 Etudes histologiques et immunohistochimiques

Les tumeurs ont été prélevées sur les souris en fin d'expérimentation puis congelées dans de l'isopentane à -80°C. Des coupes de 10µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées sur un cryotome (Microm HM560) et recueillies sur des lames préencollées à l'amimopropyle. Les lames ont ensuite été congelées à -20°C jusqu'à la réalisation des colorations histologiques en HE (pour le protocole, voir 6.2.1.4.2) ou des colorations immunohistochimiques du collagène IV (pour le protocole, voir 6.2.1.4.3).

7.3.1.4 Mesure de la surface vasculaire non perfusée

La surface vasculaire non-perfusée n'a pu être mesurée que sur des animaux contrôles (n=3) et des animaux à J5 post traitement (n=3). Une ROI dans l'image provenant d'un « merge » des deux voies (FITC-dextran 70kDa et SRB) est tout d'abord sélectionnée puis binarisée et le pourcentage de la surface non perfusée est calculé selon la formule suivante : $S = ((\text{nombre de pixels de la ROI} - \text{nombre de pixels blancs}) / \text{nombre de pixels de la ROI}) \times 100$.

7.3.2 Résultats

Les gliomes F98 non traités présentent un cœur nécrotique entouré par des marges prolifératives très actives et vascularisées (Figure 7.8 A et B). Les vaisseaux angiogéniques trouvés dans cette zone sont larges et désorganisés (Figure 7.8 C et D). Ces caractéristiques sont bien celles d'un glioblastome. La macrophotographie de la figure 7.8 A met bien en évidence l'origine des vaisseaux angiogéniques qui proviennent des tissus sains avoisinant la tumeur et qui cheminent à sa surface pour l'englober.

En utilisant la microscopie biphotonique intravitale, la perfusion des vaisseaux angiogéniques a été observée 5 et 12 jours après le traitement complet (groupe IV, irradiation de 15Gy/79keV et 5 μ g de cisplatine). A ces deux temps, de nombreux vaisseaux ne sont plus perfusés (Figure 7.9 B et C ; flèches) en comparaison de contrôles n'ayant reçu aucun traitement (Figure 7.9 A). La mesure de la surface non perfusée donne 52 ± 5 % pour les animaux à J5 et 5 ± 5 % pour les contrôles.

Une régression du volume tumoral (concavité et nécrose) a également été observée au sommet du volume tumoral à partir de 3 semaines post traitement chez certains animaux des groupes ayant reçu le traitement complet (groupes IV, VII et XI) (Figure 7.9 D). Nous discuterons par la suite de la possible origine de ce phénomène.

Enfin, des observations histologiques ont montré que quelque soit le groupe étudié, la microstructure de la tumeur est identique à des stades avancés de développement quelque soit la thérapie utilisée (PAT-Plat complète, irradiation seule ou cisplatine seul). La récurrence entraîne des caractéristiques identiques à celles d'une tumeur n'ayant pas été traitée : cœur nécrotique et marges prolifératrices (Figure 7.10).

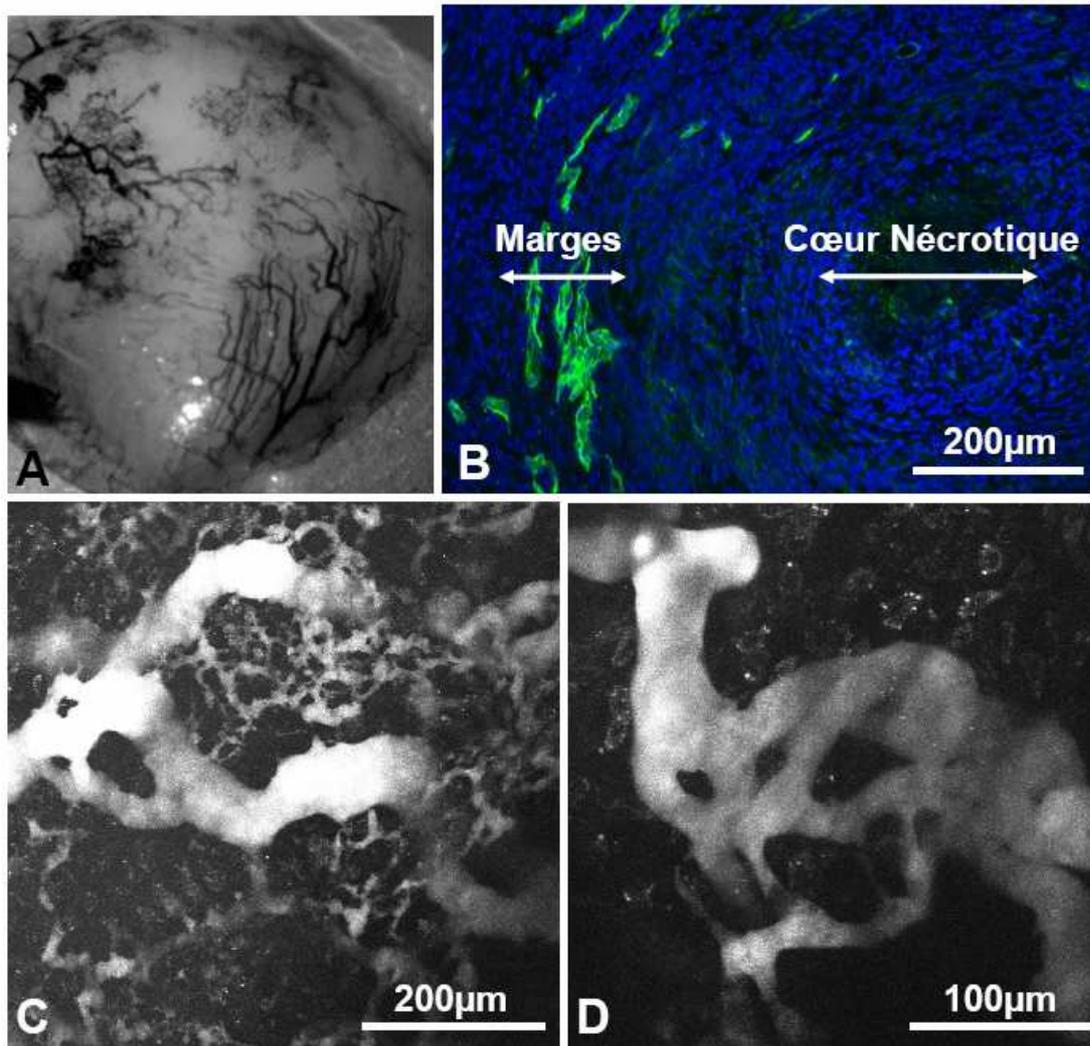


Figure 7.8 : Caractérisation de la vascularisation du gliome F98 non traité implanté en hétérotopique.

A. Macrophotographie de la surface du gliome F98 après retrait du plan cutané. Les observations en microscopie biphotonique ont été réalisées en plaçant l'objectif en immersion dans une solution saline au dessus de la tumeur.

B. Marquage immunohistochemique réalisé sur une coupe de 10µm d'épaisseur d'un gliome F98 ayant poussé en hétérotopique. Vert : marquage du collagène IV mettant en évidence la vascularisation ; bleu : marquage des noyaux avec du Hoechst 33342. Le bruit de fond dû au marquage du collagène IV dans la matrice extracellulaire de la tumeur est masqué par le signal du Hoechst 33342.

C. Projection en z de 100 coupes acquises de 0 à 200µm sous la surface de la tumeur par microscopie biphotonique intravitale (colorant : FITC dextran 70kDa).

D. Projection en z de 50 coupes acquises de 0 à 100µm sous la surface de la tumeur par microscopie biphotonique intravitale (colorant : FITC dextran 70kDa). Pour les images C et D, une soustraction du bruit de fond a été réalisée par un rolling ball avec un rayon de 50 pixels.

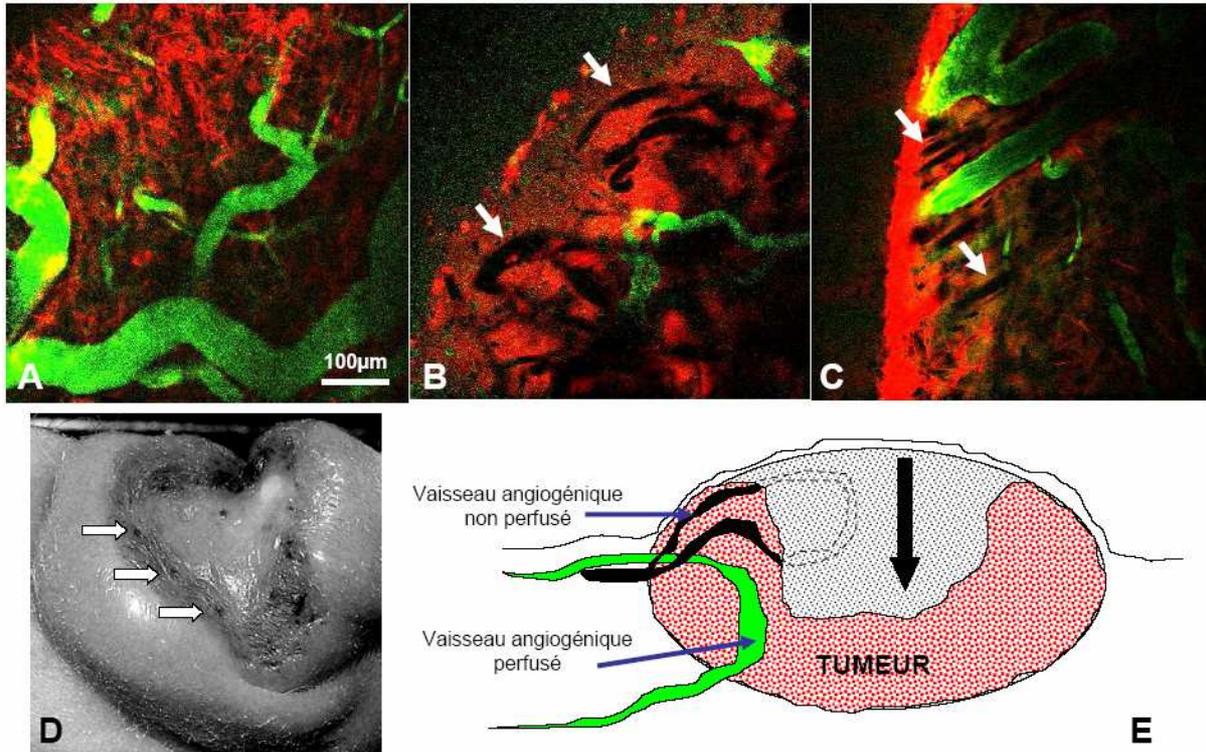


Figure 7.9 : Effets du traitement complet (5µg de cisplatine ; irradiation avec une dose de 15Gy/79keV) sur la vascularisation tumorale.

A, B, C. Images acquises en microscopie biphotonique intravitale à approximativement 75µm sous la surface de la tumeur chez une souris non traitée (A) ; 5 jours après le traitement (B) et 12 jours après le traitement (C). Les flèches blanches signalent des vaisseaux non perfusés. Vert : marquage de la vascularisation par le FITC dextran 70kDa ; rouge : SRB servant à augmenter le contraste. Une soustraction du bruit de fond par rolling ball avec un rayon de 10 pixels a été appliquée sur les 3 images.

D. Macrophotographie d'un gliome F98 implanté en orthotopique un mois après avoir reçu le traitement complet. La zone se trouvant au sommet de la tumeur a régressé et présente des zones de nécrose. On remarque des points noirs (flèches blanches) sur les bords de la partie concave créée par la régression. Il semble s'agir de vaisseaux sanguins coupés et non perfusés.

E. Schéma d'interprétation de la régression observée un mois après le traitement complet chez certains animaux. La zone grisée représente la partie ayant régressée.

7.3.3 Discussion

Les effets de la PAT-Plat sur la vascularisation tumorale ont été observés dans le groupe IV ayant reçu le traitement complet (irradiation + 5µg de cisplatine sur tumeurs de gros volume). Nous avons précédemment constaté qu'il s'agit du groupe où la réduction de la croissance tumorale est la plus importante ; cependant, il s'agit également du groupe où une forte toxicité a été observée 4 semaines après le début du traitement. Nos observations ayant été réalisées à court terme (J5 et J12 post traitement), la toxicité n'a pas été problématique et nous avons pu

mener notre étude sur une phase où la courbe de croissance de la tumeur est quasiment stable (Figure 7.3).

Nous avons constaté une augmentation de la surface vasculaire non perfusée ($52 \pm 5\%$ à J5 vs $5 \pm 5\%$ chez les contrôles) dans les marges actives. Cette diminution a lieu bien avant la régression observée au sommet du volume tumoral, 3 semaines après le traitement.

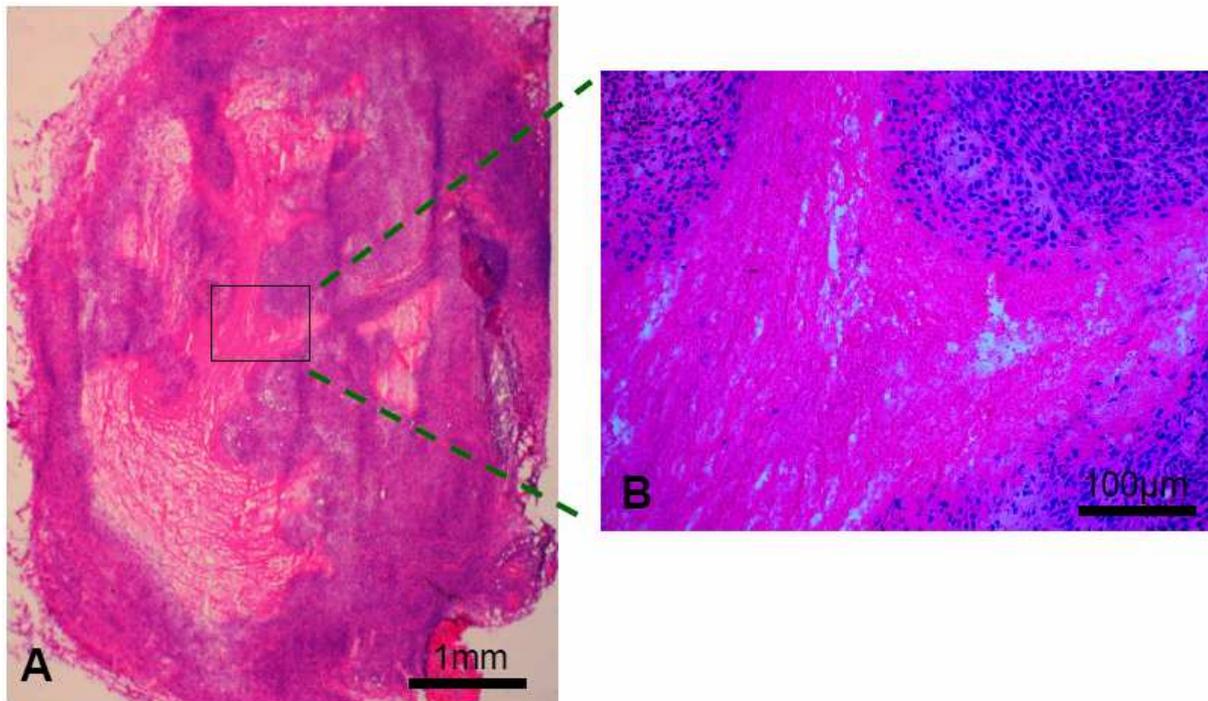


Figure 7.10 : Coupe histologique colorée en HE réalisée sur un gliome F98 ayant poussé en hétérotopique et ayant reçu le traitement complet (2.5µg de cisplatine et irradiation avec une dose de 15Gy/79keV).

Les coupes ont été réalisées sur des prélèvements faits en fin d'expérimentation après la récurrence. On note la présence d'un cœur nécrotique entouré par des marges de progression actives (A). Un zoom au cœur de la tumeur permet de mieux observer la zone nécrotique dépourvue de cellules et en marge les zones riches en cellules tumorales (B). Des observations similaires ont été réalisées sur des animaux contrôles et des animaux ayant reçu, soit l'irradiation seule, soit le cisplatine seul (quelque soit la dose).

7.3.3.1 Explication de la régression au sommet de la tumeur

La distribution du cisplatine a été réalisée de manière homogène dans tout le volume tumoral (les travaux de MC. Biston utilisant une méthode d'injection proche de la notre avaient conclu à une distribution dans tout le volume tumoral en se servant de la méthode SR-XRF pour cartographier la localisation du platine^{82: 1}).

Les cellules endothéliales ont donc reçu à la fois une dose élevée de cisplatine ainsi que l'irradiation. Le traitement complet peut alors induire une mort de certaines cellules

endothéliales se trouvant dans les marges actives de la tumeur. Les conséquences sont des collapsés des vaisseaux sanguins et donc une diminution de la perfusion entraînant le ralentissement de la croissance tumorale.

Nous avons constaté une régression au sommet de la tumeur apparaissant 3 semaines après le traitement complet. L'analyse des macrophotographies (Figure 7.8 A) met en avant que les vaisseaux angiogéniques cheminent depuis les zones saines pour aller recouvrir la tumeur. Nous constatons également que la zone se trouvant au sommet de la tumeur est la moins vascularisée. Etant donné que le traitement complet induit une diminution de la perfusion, l'apport en oxygène et en nutriments sera beaucoup plus faible au sommet de la tumeur qu'en périphérie, d'où une régression observée à ce niveau.

Le départ de la récurrence a été observé au niveau des marges actives se trouvant à proximité des tissus sains, là où la vascularisation est plus importante et où, malgré les effets de la PAT-Plat, la perfusion demeure suffisante pour permettre un approvisionnement suffisant à la survie et au développement des cellules tumorales.

Bien que ces observations soient dues à un biais de notre modèle, elles demeurent intéressantes pour mieux comprendre les mécanismes de la PAT-Plat. En effet, implanté en orthotopique, un gliome est en contact avec la vascularisation du tissu hôte sur l'intégralité de sa surface tandis qu'en hétérotopique, une face est en contact avec la peau qui est moins vascularisée.

Considérons une seconde hypothèse où le cisplatine n'aurait pas diffusé de manière homogène dans l'intégralité de la tumeur. Dans ce cas, l'effet de la PAT-Plat sur la vascularisation serait maximal au niveau de la partie centrale et au sommet de la tumeur (trajet de l'aiguille) entraînant une obturation des boucles de l'arbre vasculaire (Figure 7.9 E). Les conséquences seraient alors une diminution de la perfusion en périphérie. Malgré tout, le plus grand nombre de vaisseaux se trouvant à proximité des tissus sains permettrait à la perfusion de demeurer suffisante à ce niveau pour permettre une récurrence. Nous avons donc à faire ici à un effet direct au niveau du cœur et du sommet de la tumeur et un effet indirect en périphérie.

Il est assez difficile de trancher entre les deux hypothèses précédemment citées pour expliquer la régression centrale observée après PAT-Plat. Quoi qu'il en soit, nous pouvons avancer que la PAT-Plat entraîne une diminution de la perfusion tumorale. Ce paramètre est primordial

pour le succès de la thérapie. Une thérapie anti-angiogénique néo-adjuvante à la PAT-Plat (c'est-à-dire réalisée dans l'idéal entre 7 et 10 jours avant) pourrait permettre de réduire de manière encore plus significative la perfusion et donc de mieux contrôler le volume tumoral.

7.3.3.2 Validité de nos résultats

Nos expériences ont été réalisées sur les animaux ayant reçu la thérapie complète (groupe IV) ainsi que sur des contrôles non traités (groupe I). Nous avons mis en évidence des différences entre ces deux groupes en terme de perfusion. Cependant, à l'heure actuelle, nous n'avons pas évalué le rôle de chacune des modalités (irradiation ou injection de cisplatine) sur la vascularisation pour des raisons techniques. Les expériences menées sur le cerveau de souris nude (voir chapitre 6) laissent à penser qu'une irradiation synchrotron avec une dose de 15Gy et une énergie de 79keV n'a pas d'effet sur la vascularisation. Une toxicité du cisplatine pour les cellules endothéliales a déjà été rapportée, notamment dans le cadre du cancer du testicule. Cependant, la nature de ses effets demeure assez peu décrite^{197; 198}.

Dans notre étude, la régression observée au niveau du sommet de la tumeur n'a été constatée que sur les animaux ayant reçu le traitement complet. Les souris du groupe cisplatine seul 5µg (groupe II) n'ont pas présenté ce type de régression. Il apparaît donc que les effets sur la vascularisation pourraient bien avoir pour origine la thérapie complète.

Des expériences complémentaires sont cependant nécessaires pour confirmer le rôle précis des deux modalités du traitement sur la diminution de la perfusion.

7.4 Conclusions

Nous avons pour la première fois mis en évidence un effet de synergie entre l'irradiation et le cisplatine permettant un net ralentissement de la croissance du gliome F98 implanté en hétérotopique.

En considérant nos résultats et les études précédemment menées, nous pouvons émettre l'hypothèse que le ralentissement de la croissance tumorale suite à la PAT-Plat est dû :

- à une mort mitotique des cellules tumorales médiée par l'effet photoélectrique et l'émission d'électrons Auger.
- à une réduction de la perfusion du volume tumoral.

Cet effet sur la vascularisation doit être pris en compte et optimisé, notamment par l'utilisation de thérapies anti-angiogéniques néo-adjuvantes à la PAT-Plat.

Conclusions et Perspectives

Au cours de ce travail de thèse nous avons cherché à caractériser les effets de la PAT-Plat et de ses différentes modalités sur les tissus et la vascularisation cérébrale chez des animaux sains mais également sur le gliome F98, un modèle de glioblastome, implanté chez la souris nude.

Les connaissances des effets de la PAT-Plat avaient jusqu'alors deux origines :

- *in vitro*, par des expérimentations menées sur cultures cellulaires apportant une grande quantité d'informations présentant cependant certains biais car la modélisation est extrêmement éloignée de la réalité (patho)physiologique.
- *in vivo*, par la réalisation d'études de survie.

Mis à part quelques observations histologiques, les effets biologiques de la PAT-Plat et de ses différentes modalités n'avaient jusqu'alors jamais été observés chez l'animal. L'objectif de ce travail de thèse a donc été de caractériser ces effets dans des modèles les plus proches possibles de la réalité (patho)physiologique. Pour cela, nous avons dû développer des modèles animaux ainsi que mettre au point certaines techniques de marquage et d'observation. Parmi toutes les méthodes d'imagerie disponibles, nous avons privilégié la microscopie biphotonique qui permet des observations intravitales avec une résolution spatiale de l'ordre du micromètre et une résolution temporelle de l'ordre de la seconde. Nous avons donc dû développer et adapter ce type de microscopie aux contraintes de notre modèle et mettre au point des techniques de coloration mettant en évidence à la fois la morphologie mais également la physiologie de certaines structures cérébrales et vasculaires.

Effets du rayonnement synchrotron sur les tissus cérébraux

Nous avons pu caractériser les effets d'une irradiation synchrotron avec une dose de 15Gy et une énergie de 79keV sur la vascularisation et les tissus cérébraux. Cette étape est indispensable afin de mieux connaître quels pourraient être les effets secondaires d'une irradiation dans une zone de cerveau saine. Nous avons ainsi mis en évidence que l'irradiation n'entraînait aucune modification visible à court terme (48h à 1 mois) sur la microvascularisation de la zone irradiée (les vaisseaux demeurent perfusés, les paramètres

vasculaires sont inchangés et la perméabilité de la BHE ne semble pas être modifiée). De même aucune gliose, ni aucune modification morphologique n'ont été observées dans le parenchyme cérébral. Enfin, l'absence de gliose a également été constatée à 3 et 6 mois post-irradiation.

L'irradiation synchrotron seule avec une dose de 15Gy et une énergie de 79keV ne semble donc pas générer d'effets secondaires à court terme sur la vascularisation et le parenchyme cérébral. Ces informations sont de première importance car des zones saines pourront être emmenées à être irradiées sur des patients porteurs de gliome. En effet, la morphologie des gliomes est souvent très hétérogène et bien que la géométrie de l'irradiation puisse être modulée à l'ESRF, il est encore assez difficile de ne déposer la dose qu'à l'intérieur du volume tumoral.

Effets du rayonnement synchrotron sur le gliome F98

Nous avons choisi de travailler uniquement sur un seul modèle de glioblastome au cours de cette étude. Notre choix s'est porté sur le gliome F98 qui présente le double avantage d'avoir déjà été utilisé dans de précédents travaux sur la PAT-Plat mais également d'avoir des caractéristiques très proches d'un glioblastome humain. Nous avons d'ailleurs confirmé plusieurs fois ces caractéristiques sur les modèles animaux que nous avons mis en place aussi bien pour des implantations en orthotopique que pour des implantations en hétérotopique.

Sur un modèle orthotopique, nous avons constaté que l'irradiation entraînait une stagnation de la courbe de croissance durant les deux jours suivant la thérapie. Cependant après ce délai, la courbe a repris une allure exponentielle. Grâce à des analyses histologiques, nous avons déterminé par la suite que cette reprise rapide semble être due au fait que l'intégralité du volume tumoral n'a pas été irradié.

Cependant, nous avons mis en évidence que si l'irradiation ne semblait pas avoir d'effet sur les tissus cérébraux sains, elle a un effet sur les cellules tumorales.

Sur un modèle hétérotopique, nous avons constaté que l'irradiation entraînait un fort ralentissement de la croissance au cours des 3 semaines suivant la thérapie. Dans cette configuration, nous avons pu irradier l'intégralité du volume tumoral. Malheureusement, après ces 3 semaines la courbe de croissance reprend une allure exponentielle ; une récurrence

est observée. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux obtenus sur le modèle orthotopique.

L'irradiation seule entraîne dans tous les cas un ralentissement de la croissance tumorale. Ce ralentissement est encore plus marqué si l'intégralité du volume tumoral a reçu l'intégralité de la dose.

Nos résultats sont en accord avec des études précédemment emmenées ayant mis en évidence une augmentation de la survie de l'ordre de 3 semaines pour des rats ayant reçu une irradiation dans des conditions expérimentales très proches¹.

Effets du cisplatine sur le gliome F98

Nous avons uniquement testé le cisplatine sur les gliomes F98 implantés en hétérotopique. L'étude des effets du cisplatine sur les tissus sains n'a pas été entreprise car déjà largement discutée dans la littérature^{88; 87}.

Nous avons constaté que le cisplatine n'avait aucun effet sur la croissance tumorale quelque soit la dose utilisée. Ces résultats sont assez surprenants car cette molécule a déjà été utilisée dans le traitement de nombreux cancers.

Au cours de travaux précédemment menés sur des rats dans des conditions proches des nôtres, il avait été montré que le cisplatine n'entraînait qu'une faible augmentation de la survie¹. Cependant, d'autres études menées récemment tendent à présenter une conclusion inverse⁴². Bien qu'il ait été démontré que notre méthode d'administration de la drogue permettait d'avoir une distribution homogène, d'autres méthodes comme la CED doivent permettre d'optimiser ce paramètre⁸⁵. De même, le type de molécule platinée ainsi que d'autres méthodes de délivrance comme les pompes osmotiques sont d'autres pistes en cours d'expérimentation⁵⁸.

Dans notre modèle expérimental, l'impact de la chimiothérapie seule sur le gliome est cependant minime.

Effets de la PAT-Plat sur le gliome F98

Pour des raisons pratiques discutées précédemment, l'intégralité de nos expérimentations ont été réalisées sur des gliomes F98 implantées en hétérotopique sur deux types de volumes

tumoraux au moment de l'irradiation : des tumeurs de gros volume (approximativement 480mm³) et des tumeurs de petit volume (approximativement 100mm³).

Nous avons ainsi constaté que la PAT-Plat entraînait un ralentissement de la croissance tumorale.

Pour les tumeurs de gros volume, ce ralentissement est identique à celui observé avec l'irradiation seule au cours des 3 semaines suivant le traitement. Cependant, au-delà de ce délai, le ralentissement dû à la thérapie complète est beaucoup plus stable. La PAT-Plat a donc plus d'effets sur la croissance tumorale que la radiothérapie ou la chimiothérapie seule.

Pour les tumeurs de petit volume, le ralentissement dû à la thérapie complète est plus important que celui dû à la radiothérapie seule après seulement deux semaines. La PAT-Plat semble donc être plus efficace sur des tumeurs ne se situant pas à un stade avancé de développement.

La quantité de cisplatine injectée pour la thérapie complète semble également avoir un rôle primordial. Le ralentissement est plus important pour une dose de 5µg que pour une dose de 2.5µg ; cependant, la toxicité est très marquée pour la dose la plus élevée. Le problème de la délivrance de la molécule est à nouveau soulevé. L'efficacité du traitement complet semble passer par la capacité à concentrer la molécule dans les cellules tumorales.

Nous avons également mis en évidence que la PAT-Plat repose sur un effet de synergie entre l'irradiation et la molécule de cisplatine. Cet effet de synergie semble être traduit par un effet photoélectrique renforcé et un effet Auger.

Il avait précédemment été mis en avant que la PAT-Plat générerait de nombreux dégâts au niveau de la molécule d'ADN (DSB et SSB) ; l'hypothèse d'une action sur d'autres structures cellulaires comme les mitochondries peut également être avancé. Cependant, nous avons démontré qu'outre son action directe sur les cellules tumorales, la PAT-Plat avait également un effet sur la vascularisation tumorale en entraînant notamment une diminution de la perfusion. Cet effet pourrait être potentialisé par l'utilisation d'agents anti-angiogéniques.

Particularités de notre modèle expérimental

La modélisation animale mise en place pour les essais précliniques présentés dans ce travail a été réalisée sur des souris nude, c'est-à-dire des souris dont l'immunité à médiation cellulaire

est inexistante. Cette inexistence de système immunitaire peut expliquer l'absence d'effets curatifs de la thérapie après la PAT-Plat. En effet, l'immunité peut jouer un rôle très important dans la lutte de l'organisme contre le développement tumoral avant et après traitement. Nos travaux suggèrent donc que le statut immunitaire au moment de la PAT-Plat doit être pris en considération.

Implications pour les essais cliniques

Au vu des résultats expérimentaux obtenus dans ce travail de thèse à l'échelle préclinique, nous pouvons mettre en avant quelques recommandations pour la mise au point des essais cliniques ainsi que pour le développement de la PAT-Plat. Il ne faut cependant pas perdre de vue que l'intégralité de nos expériences a été réalisée chez le rongeur. La transposition de ces données chez l'humain doit donc prendre en considération la variabilité inter-espèces notamment en terme de radiosensibilité. Notre modèle tumoral, bien que présentant des caractéristiques proches d'un glioblastome est cependant issu d'une lignée établie. Un néoplasme se développant *de novo* chez l'humain pourra présenter des différences.

Malgré cela, nos travaux suggèrent les conclusions suivantes :

- les effets de l'irradiation seule sur les tissus sains étant faibles, il semble être recommandé d'irradier le volume tumoral ainsi qu'une marge de sécurité large autour du néoplasme.
- la dose de cisplatine et la méthode d'injection doivent être optimisées de façon à déposer un maximum de molécules dans le volume tumoral et un minimum dans les tissus sains. Cette constatation se révèle particulièrement importante pour les gliomes étant donné la neurotoxicité du cisplatine.
- la vascularisation tumorale peut être une cible supplémentaire. Les effets de la PAT-Plat sur cette dernière peuvent être optimisés par une thérapie anti-angiogénique néo-adjuvante.
- le statut immunitaire au moment du traitement est également important. Un patient sous immunosuppresseurs aura de fortes chances de moins bien répondre à la PAT-Plat.

Perspectives

Malgré l'imminence du début des essais cliniques de phase I, de nombreux axes de recherche doivent encore être explorés pour optimiser la PAT-Plat, notamment au niveau de l'agent chimiothérapeutique utilisé mais également dans la méthode de délivrance de cet agent.

L'utilisation de liposomes chargés en cisplatine pourrait permettre d'emmener de plus grandes concentrations de molécules au niveau de la tumeur tout en préservant les tissus sains. Le ciblage pourrait être effectué via des ligands (peptides) enchâssés dans la membrane du liposome et ayant la capacité de se fixer spécifiquement sur des récepteurs se trouvant à la surface des membranes des cellules tumorales¹⁹⁹.

L'utilisation de nouvelles molécules contenant un atome de platine, rendues fluorescentes et détectables par IRM est également un axe en cours de développement. Ces molécules ont donc trois propriétés :

- elles peuvent être photoactivées.
- comme elles sont fluorescentes, elles peuvent être détectées par microscopie biphotonique. Leur biodistribution à l'intérieur de la cellule peut donc être imagée et il est possible de voir quelles sont les structures ciblées.
- comme elles sont détectables par IRM, leur distribution au niveau de la tumeur peut être évaluée afin de vérifier si la distribution est homogène à l'intérieur du volume tumoral.

Ces molécules sont à l'heure actuelle en cours de développement par des équipes de chimistes mais des premiers candidats sont cependant déjà en cours de tests *in vitro*. De même des nanoparticules contenant de l'or et pouvant être photoactivées sont à l'étude. L'objectif étant d'avoir une particule cytotoxique uniquement si elle est photoactivée afin de réduire les effets secondaires dans les tissus sains.

Les deux pistes précédemment citées ne sont que des idées à tester en vue d'optimiser la PAT-Plat. Les connaissances que nous avons à l'heure actuelle sont suffisantes pour se permettre de lancer une première phase d'essais cliniques ; cependant, devant la longueur de la phase préclinique, ces nouvelles optimisations doivent être testées et validées au plus tôt afin, en cas de succès, de pouvoir les intégrer au plus tôt en applications cliniques.

Intérêt de la microscopie biphotonique

Au cours de ce travail de thèse, nous avons utilisé la microscopie biphotonique comme un outil afin d'étudier les effets de la PAT-Plat ou de ses différentes modalités. Nous avons également développé des méthodes permettant d'observer la perméabilité de la BHE, de réaliser une imagerie de la vascularisation tumorale ou encore dans un autre registre d'observer les fibres élastiques en intravital.

De son rôle d'outil, la microscopie biphotonique est rapidement devenu le second axe central de ce travail. Ses résolutions spatiale et temporelle permettent l'observation de structures à l'échelle micrométrique directement *in vivo*. Le développement et l'étude d'un grand nombre de colorants ouvre la voie à un marquage spécifique d'un nombre important de structures.

Il s'agit également d'une méthode d'imagerie permettant de réaliser des coupes virtuelles à différentes profondeurs dans des tissus vivants et d'obtenir par la suite des reconstitutions tridimensionnelles. Les artefacts dus à la réalisation de coupes pour des études histologiques classiques sont donc supprimés et les informations morphologiques mais aussi fonctionnelles obtenues sont au plus proche de la réalité. La microscopie biphotonique permet donc de passer d'une histologie classique à une histologie intravitale.

Sa principale limitation demeure à l'heure actuelle la profondeur d'imagerie qui est fonction du colorant (ou de la molécule endofluorescente), de l'absorption et de la diffusion de la lumière par les tissus. En pratique, nous avons pu constater que la profondeur maximale d'observation est de l'ordre de 600µm dans les tissus cérébraux et 200µm dans les tissus tumoraux.

Ce handicap est en voie d'être contourné par l'utilisation d'endoscopes à deux-photons. Avec de tels dispositifs, des structures cérébrales plus profondes comme l'hippocampe peuvent déjà être imagées²⁰⁰. De même, il est maintenant envisageable d'utiliser de tels dispositifs pour aller observer la vascularisation de tumeurs localisées plus profondément dans les tissus cérébraux.

Un outil à privilégier en neuro-oncologie

Nous avons constaté que la microscopie biphotonique intravitale pouvait permettre de réaliser une imagerie de la vascularisation tumorale et ainsi mettre en avant à la fois la perfusion des vaisseaux angiogéniques mais aussi leur structure.

L'utilisation de lignées tumorales rendues fluorescentes via des protéines comme la GFP est une piste qui est en cours d'étude. Il sera alors possible d'observer à la fois la vascularisation mais aussi l'organisation des cellules tumorales. La mortalité cellulaire pourra également être observée en intravital notamment en utilisant une double méthode de coloration des noyaux déjà décrite par Dunn et al¹⁰⁶. De telles études précliniques pourraient apporter de nouvelles informations notamment sur les effets de la PAT-Plat.

Vers l'histologie intravitale peropératoire

L'une des applications les plus intéressantes de la microscopie biphotonique pourrait résider dans le développement de méthodes peropératoires permettant au chirurgien d'affiner son geste lors de l'exérèse d'une tumeur. En effet, que ce soit pour des gliomes ou pour d'autres types de tumeurs, l'exérèse chirurgicale est une étape particulièrement complexe où le travail du chirurgien est basé sur des clichés d'imagerie et sur une observation macroscopique du champ opératoire. Un grand nombre de récurrences sont souvent dues à des exérèses partielles.

L'observation d'explants ou de biopsies par microscopie biphotonique ne requiert pas toutes les étapes d'inclusion, de fixation, de réalisation de coupes ou encore de coloration complexe actuellement utilisées en anatomopathologie. Nous avons par exemple pu voir qu'une coloration des fibres élastiques par la SRB sur un explant ne demande guère plus d'une dizaine de minutes de préparation. De même, les propriétés d'endofluorescence de certaines biomolécules et la SHG ne requièrent aucune préparation de l'échantillon qui peut être observé brut.

La microscopie biphotonique peut donc permettre l'avènement de l'histologie peropératoire où le chirurgien pourrait avoir rapidement des données anatomopathologiques en cours d'intervention afin d'affiner son geste. Cette avancée serait fondamentale car la majeure partie des analyses anatomopathologiques menées à l'heure actuelle demandent des délais souvent supérieurs à 24h avant d'avoir des résultats.

La microscopie classique a révolutionné la biologie en permettant d'observer le vivant à l'échelle de son constituant fondamental : la cellule. Au cours du siècle dernier, la microscopie électronique a permis d'augmenter la résolution spatiale et d'ouvrir de nouvelles perspectives dans l'observation de structures à l'échelle nanométrique. Cependant, la microscopie biphotonique a ouvert une voie tout aussi importante en permettant l'observation de structures micrométriques en intravital sans réalisation de coupes, sources de multiples artefacts.

En 18 ans, la microscopie biphotonique est passée d'un outil de physique fondamentale à un outil d'investigations biologiques. A l'heure actuelle des centaines d'études de biologie fondamentale et d'essais précliniques (dont ce travail de thèse) font appel à cette formidable méthode d'imagerie. La microscopie biphotonique a maintenant atteint un stade de maturité où elle est à la fois reconnue comme une méthode de référence et comme porteuse d'un fort potentiel pour des applications biomédicales.

Références

Références

1. Biston M.-C., Joubert A., Adam J.-F., Elleaume H., Bohic S., Charvet A.-M., Esteve F., Foray N., Balosso J. (2004).
Cure of Fisher Rats Bearing Radioresistant F98 Glioma Treated with cis-Platinum and Irradiated with Monochromatic Synchrotron X-Rays. *Cancer Research*, **64**, pp.2317-2323.
2. Vérant P. (2006).
Imagerie intravitale par microscopie biphotonique : application à l'étude des effets de la radiothérapie synchrotron par microfaisceaux sur la microvascularisation corticale de la souris, These de doctorat - Université Joseph Fourier, Grenoble,
3. Serduc R. (2006).
Effets de la radiothérapie par microfaisceaux synchrotron sur la microvascularisation cérébrale saine et tumorale chez la souris, These de doctorat - Université Joseph Fourier, Grenoble,
4. Bear M., Connors B., Paradiso M. (2007)
Neurosciences : à la découverte du cerveau. 3eme édition éd., Pradel.
5. Purves D., Augustine G., Fitzpatrick D., Hall W. (2005)
Neurosciences. 3eme édition éd., De Boeck.
6. Stoll G., Jander S. (2005)
Microglia.
In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences.* Nature Publishing Group.
7. Hasboun D. (2004)
Polycopié de Neuroanatomie - Morphologie. Université Pierre & Marie Curie, Paris.
8. Silverthorn D. U. (2007)
Physiologie humaine : une approche intégrée. 4eme edition éd., Pearson Education France, Paris.
9. Abbott N. (2005).
Dynamics of CNS barriers : evolution, differentiation, and modulation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **25**, 1, pp.5-23.
10. Abbott N. J., Ronnback L., Hansson E. (2006).
Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 1, pp.41-53.
11. Peterson D. (2005)
Blood-Brain Barrier.
In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences.* Nature Publishing Group.
12. Volterra A., Meldolesi J. (2005).
Astrocytes, from brain glue to communication elements : the revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*, **6**, pp.626-640.
13. Brownell A.-L., Eidelberg D., Dhawan V., Isacson O. (2001)
Brain Imaging as a Diagnostic Tool.

In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.

14. Renton P. (2005)

Imagerie Médicale. Elsevier, Paris (Campus Illustré).

15. Dixon A. (2001)

Computed Tomography.

In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.

16. Ell P. (2001)

Nuclear Medicine.

In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.

17. Padhani A. R., Krohn K. A., Lewis J. S., Alber M. (2007).

Imaging oxygenation of human tumours. *Eur Radiol*, **17**, 4, pp.861-72.

18. Worthington B. (2001)

Magnetic Resonance Imaging.

In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.

19. Odludas Y., Posner M. (2007)

Brain Imaging: Localization of Brain Functions.

In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.

20. Behin A., Hoang-Xuan K., Carpentier A., Delattre J.-Y. (2003).

Primary Brain Tumours in Adults. *The Lancet*, **361**, pp.323-331.

21. DeAngelis L. (2001).

Brain Tumors. *N Engl J Med*, **344**, 2, pp.114-123.

22. Greenlee R., Murray T., Bolden S., Wingo P. (2000).

Cancer Statistics, 2000. *CA Cancer J Clin*, **50**, pp.7-33.

23. Gurney J., Kadan-Lottick N. (2001).

Brain and Other Central Nervous System Tumors: Rates, Trends and Epidemiology. *Current Opinion in Oncology*, **13**, pp.160-166.

24. Maidment S., Pilkington G. (2001)

Brain Cancers.

In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.

25. Durando X., Lemaire J., Curé H., Mazon J. (2006).

Les Tumeurs Intracrâniennes. *Polycopié national de cancérologie*.

26. Chatel M., Frenay M., Lebrun C., Bourg V., Fauchon F. (2005).

Gliomes de haut grade : astrocytomes anaplasiques et glioblastomes. *EMC Neurologie*, **2**, 3, pp.257-278.

27. Kleihues P., Sobin L. H. (2000).

World Health Organization classification of tumors. *Cancer*, **88**, 12, pp.2887.

28. Tolnay M. (2002).

Neuropathologie des tumeurs cérébrales gliales. *Forum Med Suisse*, 29/30, pp.698-703.

29. Bergers G., Benjamin L. (2003).

Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, **3**, pp.401-410.

30. Jain R., di Tomaso E., Duda D., Loeffler J., Sorensen A., Batchelor T. (2007).

Angiogenesis in brain tumours. *Nature Reviews Neuroscience*, **8**, pp.610-622.

31. Simola N., Morelli M., Carta A. R. (2007).

The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res*, **11**, 3-4, pp.151-67.

32. Hosford D. A. (1995).

Models of primary generalized epilepsy. *Curr Opin Neurol*, **8**, 2, pp.121-5.

33. Adam J.-F., Joubert A., Biston M.-C., Charvet A.-M., Peoc'h M., Le Bas J.-F., Balosso J., Esteve F., Elleaume H. (2006).

Prolonged Survival of Fischer Rats Bearing F98 Glioma after Iodine-Enhanced Synchrotron Stereotactic Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Bio Phys*, **62**, 2, pp.603-611.

34. Anisimov V. N., Ukraintseva S. V., Yashin A. I. (2005).

Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? *Nat Rev Cancer*, **5**, 10, pp.807-19.

35. Balenci L., Clarke I., Dirks P., Assard N., Ducray F., Jouvett A., Belin M., Honnorat J., Baudier J. (2006).

IQGAP1 protein specifies amplifying cancer cells in glioblastoma multiforme. *Cancer Res*, **66**, 18, pp.9074-9082.

36. Antunes L. (2002).

La greffe orthotopique de biopsies de gliomes malins humains chez la souris nude : un modèle pré-clinique général de recherches en neuro-oncologie., These de doctorat - Université Henry Poincaré - Nancy 1, Nancy,

37. Ricard C., Coles J., Serduc R., van der Sanden B., Vérant P., Vial J. C. (2008)

Two-photon Imaging.

In: *Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press, Oxford.

38. Barth R. (1998).

Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 Gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, **36**, pp.91-102.

39. Mathieu D., Lecomte R., Tsanaclis A., Larouche A., Fortin D. (2007).

Standardization and Detailed Characterization of the Syngeneic Fischer/F98 Glioma Model. *Can. J. Neurol. Sci.*, **34**, pp.296-306.

40. Bencokova Z., Pauron L., Devic C., Joubert A., Gastaldo J., Massart C., Balosso J., Foray N. (2007).

Molecular and Cellular Response of the most Extensively Used Rodent Glioma Models to Radiation and/or Cisplatin. *J Neurooncol*.

41. Adam J., Elleaume H., Joubert A., Biston M.-C., Charvet A., Balosso J., Le Bas J., Estève F. (2003).

Synchrotron Radiation Therapy of Malignant Brain Glioma Loaded with an Iodinated Contrast Agent: First Trial on Rats Bearing F98 Gliomas. *Int J Radiat Oncol Bio Phys*, **57**, 5, pp.1413-1426.

42. Rousseau J., Boudou C., Barth R., Balosso J., Esteve F., Elleaume H. (2007).

Enhanced Survival and Cure of F98 Glioma-Bearing Rats following Intracerebral Delivery of Carboplatin in Combination with Photon Irradiation. *Clin Cancer Res*, **13**, 17, pp.5195-5201.

43. Dunn I. F., Black P. M. (2003).

The neurosurgeon as local oncologist: cellular and molecular neurosurgery in malignant glioma therapy. *Neurosurgery*, **52**, 6, pp.1411-22; discussion 1422-4.

44. Albert F. K., Forsting M., Sartor K., Adams H. P., Kunze S. (1994).

Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurgery*, **34**, 1, pp.45-60; discussion 60-1.

45. Hall W. A. (2004).

Extending survival in gliomas: surgical resection or immunotherapy? *Surg Neurol*, **61**, 2, pp.145-8.

46. Muldoon L., Soussain C., Jahnke K., Johanson C., Siegal T., Smith Q., Hall W., Hynynen K., Senter P., Peereboom D., Neuwelt E. (2007).

Chemotherapy Delivery Issues in Central Nervous System Malignancy: A Reality Check. *Journal of Clinical Oncology*, **25**, 16, pp.2295-2305.

47. Mandula H., Parepally J. M., Feng R., Smith Q. R. (2006).

Role of site-specific binding to plasma albumin in drug availability to brain. *J Pharmacol Exp Ther*, **317**, 2, pp.667-75.

48. Neuwelt E. A. (2004).

Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. *Neurosurgery*, **54**, 1, pp.131-40; discussion 141-2.

49. Fellner S., Bauer B., Miller D. S., Schaffrik M., Fankhanel M., Spruss T., Bernhardt G., Graeff C., Farber L., Gschaidmeier H., Buschauer A., Fricker G. (2002).

Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, **110**, 9, pp.1309-18.

50. Fine R. L., Chen J., Balmaceda C., Bruce J. N., Huang M., Desai M., Sisti M. B., McKhann G. M., Goodman R. R., Bertino J. S., Jr., Nafziger A. N., Fetell M. R. (2006).

Randomized study of paclitaxel and tamoxifen deposition into human brain tumors: implications for the treatment of metastatic brain tumors. *Clin Cancer Res*, **12**, 19, pp.5770-6.

51. Ali M. J., Navalitloha Y., Vavra M. W., Kang E. W., Itskovich A. C., Molnar P., Levy R. M., Groothuis D. R. (2006).

Isolation of drug delivery from drug effect: problems of optimizing drug delivery parameters. *Neuro Oncol*, **8**, 2, pp.109-18.

52. Nakagawa H., Fujita T., Izumoto S., Kubo S., Nakajima Y., Tsuruzono K., Kodama K., Higashiyama M., Doi O., Hayakawa T. (1993).

cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) therapy for brain metastasis of lung cancer. I. Distribution within the central nervous system after intravenous and intracarotid infusion. *J Neurooncol*, **16**, 1, pp.61-7.

53. Boyle F. M., Eller S. L., Grossman S. A. (2004).

Penetration of intra-arterially administered vincristine in experimental brain tumor. *Neuro Oncol*, **6**, 4, pp.300-5.

54. Dukic S. F., Heurtaux T., Kaltenbach M. L., Hoizey G., Lallemand A., Vistelle R. (2000).

Influence of schedule of administration on methotrexate penetration in brain tumours. *Eur J Cancer*, **36**, 12, pp.1578-84.

55. Stewart D. J., Molepo J. M., Eapen L., Montpetit V. A., Goel R., Wong P. T., Popovic P., Taylor K. D., Raaphorst G. P. (1994).

Cisplatin and radiation in the treatment of tumors of the central nervous system: pharmacological considerations and results of early studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **28**, 2, pp.531-42.

56. Stewart D. J., Molepo J. M., Green R. M., Montpetit V. A., Hugenholtz H., Lamothe A., Mikhael N. Z., Redmond M. D., Gadia M., Goel R. (1995).

Factors affecting platinum concentrations in human surgical tumour specimens after cisplatin. *Br J Cancer*, **71**, 3, pp.598-604.

- 57.** Laske D. W., Youle R. J., Oldfield E. H. (1997).
Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. *Nat Med*, **3**, 12, pp.1362-8.
- 58.** Rousseau J. (2007).
Chimio-radiothérapie des tumeurs cérébrales : intérêt de l'injection intra-tumorale de drogues antinéoplasiques, Université Joseph Fourier, Grenoble,
- 59.** Rousseau J., Boudou C., Esteve F., Elleaume H. (2007).
Convection-Enhanced Delivery of an Iodine Tracer Into Rat Brain for Synchrotron Stereotactic Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Bio Phys*, **68**, 3, pp.943-951.
- 60.** McDannold N., Vykhodtseva N., Raymond S., Jolesz F. A., Hynynen K. (2005).
MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. *Ultrasound Med Biol*, **31**, 11, pp.1527-37.
- 61.** Neuwelt E. A., Barnett P. A., McCormick C. I., Remsen L. G., Kroll R. A., Sexton G. (1998).
Differential permeability of a human brain tumor xenograft in the nude rat: impact of tumor size and method of administration on optimizing delivery of biologically diverse agents. *Clin Cancer Res*, **4**, 6, pp.1549-55.
- 62.** Neuwelt E. A., Barnett P. A., Glasberg M., Frenkel E. P. (1983).
Pharmacology and neurotoxicity of cis-diamminedichloroplatinum, bleomycin, 5-fluorouracil, and cyclophosphamide administration following osmotic blood-brain barrier modification. *Cancer Res*, **43**, 11, pp.5278-85.
- 63.** Bernier J., Hall E., Giaccia A. (2004).
Radiation oncology: a century of achievements. *Nature Reviews Cancer*, **4**, pp.737-747.
- 64.** Odratzka K., Petera J., Zouhar M., Vosmik M., Vaculikova M., Dolezel M., Kohlova T., Filip S., Ceral J., Hobza V., Rehak S., Dolezal J. (2005).
Clinical results of intensity-modulated radiation therapy (IMRT) for tumors of the head and neck region. *Neoplasma*, **52**, 2, pp.85-94.
- 65.** Schultheiss T., Kun L., Ang K., Stephens L. (1995).
Radiation Response of the Central Nervous System. *Int J Radiat Oncol Bio Phys*, **31**, 5, pp.1093-1112.
- 66.** Fine H. A., Dear K. B., Loeffler J. S., Black P. M., Canellos G. P. (1993).
Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer*, **71**, 8, pp.2585-97.
- 67.** Stewart L. A. (2002).
Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*, **359**, 9311, pp.1011-8.
- 68.** Stupp R., Mason W., van den B., MJ., Weller M., Fisher B., Taphoorn M., Belanger K., Brandes A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R., Ludwin S., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J., Eisenhauer E., Mirimanoff R. (2005).
Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med*, **352**, 10, pp.987-996.
- 69.** Tong R. T., Boucher Y., Kozin S. V., Winkler F., Hicklin D. J., Jain R. K. (2004).
Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res*, **64**, 11, pp.3731-6.
- 70.** Marchandise X. (2006)

Biophysique pour les sciences de la vie et de la santé. Omniscience, Sophia-Antipolis.

71. Evans R. (1955)

The Atomic Nucleus. Krieger Publishing Company.

72. Coequyt S. (2005). Radiobiologie. Faculté de médecine de Lille.

73. Tubiana M., Dutreix J., Wanmbersie A. (1986)

Radiobiologie. Editions Hermann.

74. Joubert A. (2004).

Radiothérapie par rayonnement synchrotron présence d'agent de contraste iodé. Essais précliniques, effets moléculaires et sur l'endothélium vasculaire., These de doctorat - Université Joseph Fourier, Grenoble,

75. Favaudon V. (2000).

[Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]. *Cancer Radiother*, **4**, 5, pp.355-68.

76. Slatkin D. N., Spanne P., Dilmanian F. A., Gebbers J. O., Laissue J. A. (1995).

Subacute neuropathological effects of microplanar beams of x-rays from a synchrotron wiggler. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 19, pp.8783-7.

77. Laissue J., Blattmann H., Di Michiel M., Slatkin D. N., Luybimova N., Guzman R., Zimmermann W., Birrer S., Bley T., Kircher P., Stettler R., Le Duc G., Nemoz C., Renier M., Thomlinson W., Stepanek J., Wagner H.-P. (2001)

The weanling piglet cerebellum : a surrogate for tolerance to MRT (microbeam radiation therapy) in pediatric neuro-oncology.

In, Washington, pp.65-73.

78. Laissue J. A., Geiser G., Spanne P. O., Dilmanian F. A., Gebbers J. O., Geiser M., Wu X. Y., Makar M. S., Micca P. L., Nawrocky M. M., Joel D. D., Slatkin D. N. (1998).

Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays. *Int J Cancer*, **78**, 5, pp.654-60.

79. Serduc R., Verant P., Vial J. C., Farion R., Rocas L., Remy C., Fadlallah T., Brauer E., Bravin A., Laissue J., Blattmann H., van der Sanden B. (2006).

In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **64**, 5, pp.1519-27.

80. Ricard C. (2005).

Effets de la Radiothérapie par Microfaisceaux sur la Microvascularisation et les Tissus Cérébraux Sains et Tumoraux. Rapport de stage de Master2,

81. Adam J. (2004).

Tumeurs cérébrales & rayonnement synchrotron : développements méthodologiques en imagerie quantitative de la perfusion et en radiothérapie renforcée par effet photo-électrique., These de doctorat - Université Joseph Fourier, Grenoble,

82. Biston M. (2004).

Radio-chimiothérapie par photoactivation synchrotron de drogues platinées anticancéreuses., These de doctorat - Université Joseph Fourier, Grenoble,

83. Corde S. (2002).

Développement méthodologique de l'application d'agents pharmacologiques renforceurs de l'effet photoélectrique pour l'utilisation du rayonnement synchrotron en radiothérapie anticancéreuse, These de doctorat - Université Joseph Fourier, Grenoble,

- 84.** Corde S., Balosso J., Elleaume H., Renier M., Joubert A., Biston M. C., Adam J. F., Charvet A. M., Brochard T., Le Bas J. F., Esteve F., Foray N. (2003). **Synchrotron photoactivation of cisplatin elicits an extra number of DNA breaks that stimulate RAD51-mediated repair pathways.** *Cancer Res*, **63**, 12, pp.3221-7.
- 85.** Rousseau J., Boudou C., Esteve F., Elleaume H. (2007). **Convection-enhanced delivery of an iodine tracer into rat brain for synchrotron stereotactic radiotherapy.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **68**, 3, pp.943-51.
- 86.** Rosenberg B., Van Camp L., Grimley E. B., Thomson A. J. (1967). **The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum(IV) complexes.** *J Biol Chem*, **242**, 6, pp.1347-52.
- 87.** Wang D., Lippard S. J. (2005). **Cellular processing of platinum anticancer drugs.** *Nat Rev Drug Discov*, **4**, 4, pp.307-20.
- 88.** Marshall N. E., Ballman K. V., Michalak J. C., Schomberg P. J., Burton G. V., Sandler H. M., Cascino T. L., Jaeckle K. A., Buckner J. C. (2006). **Ototoxicity of cisplatin plus standard radiation therapy vs. accelerated radiation therapy in glioblastoma patients.** *J Neurooncol*, **77**, 3, pp.315-20.
- 89.** Boulikas T., Vougiouka M. (2003). **Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review).** *Oncol Rep*, **10**, 6, pp.1663-82.
- 90.** Zak M., Drobnik J. (1971). **Effect of cis-dichlorodiamine platinum (II) on the post-irradiation lethality in mice after irradiation with X-rays.** *Strahlentherapie*, **142**, 1, pp.112-5.
- 91.** Douple E., Richmond R., Logan M. (1977). **Therapeutic potentiation in a mouse mammary tumor and an intracerebral rat brain tumor by combined treatment with cis dichlorodiammineplatinum (II) and radiation.** *Journal of Clinical Hematology and Oncology*, **7**, pp.585-603.
- 92.** Kaneko S., Clendenon N. R., Kartha M. (1983). **[Experimental study in a rat brain tumor by combined treatment with cis-DDP and irradiation].** *Neurol Med Chir (Tokyo)*, **23**, 12, pp.917-23.
- 93.** Kimler B. F., Liu C., Evans R. G., Morantz R. A. (1993). **Combination of aziridinylbenzoquinone and cis-platinum with radiation therapy in the 9L rat brain tumor model.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **26**, 3, pp.445-50.
- 94.** (1991). **Cisplatin does not enhance the effect of radiation therapy in malignant gliomas. EORTC Brain Tumor Group.** *Eur J Cancer*, **27**, 5, pp.568-71.
- 95.** Freeman C. R., Kepner J., Kun L. E., Sanford R. A., Kadota R., Mandell L., Friedman H. (2000). **A detrimental effect of a combined chemotherapy-radiotherapy approach in children with diffuse intrinsic brain stem gliomas?** *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **47**, 3, pp.561-4.
- 96.** Boiardi A., Silvani A., Pozzi A., Farinotti M., Fariselli L., Broggi G., Salmaggi A. (1997). **Advantage of treating anaplastic gliomas with aggressive protocol combining chemotherapy and radiotherapy.** *J Neurooncol*, **34**, 2, pp.179-85.
- 97.** Corde S., Biston M. C., Elleaume H., Esteve F., Charvet A. M., Joubert A., Ducros V., Bohic S., Simionovici A., Brochard T., Nemoz C., Renier M., Tropres I., Fiedler S., Bravin A., Thomlinson W., Le Bas J. F., Balosso J. (2002).

Lack of cell death enhancement after irradiation with monochromatic synchrotron X rays at the K-shell edge of platinum incorporated in living SQ20B human cells as cis-diamminedichloroplatinum (II). *Radiat Res*, **158**, 6, pp.763-70.

98. Kimler B. F., Liu C., Evans R. G., Morantz R. A. (1992).
Intracerebral chemotherapy in the 9L rat brain tumor model. *J Neurooncol*, **14**, 3, pp.191-200.

99. Gastaldo J. (2007).
Photoactivation d'éléments lourds par rayonnement X : effets biologiques et notion de cotoxicité.
Université Joseph Fourier, Grenoble,

100. Gastaldo J., Viau M., Bencokova Z., Joubert A., Charvet A. M., Balosso J., Foray N. (2007).
Lead contamination results in late and slowly repairable DNA double-strand breaks and impacts upon the ATM-dependent signaling pathways. *Toxicol Lett*, **173**, 3, pp.201-14.

101. Santiago Ramon Y Cajal (1911)
Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés. A. Maloine, Paris.

102. Denk W., Strickler J. H., Webb W. W. (1990).
Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, **248**, 4951, pp.73-6.

103. Goepfert-Mayer M. (1931).
Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.*, 9, pp.273-295.

104. Becherrawy T. (2006)
Optique géométrique. De Boeck, Bruxelles (LMD Sciences).

105. Lichtman J., Conchello J.-A. (2005).
Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, **2**, 12, pp.910-919.

106. Dunn K. W., Sandoval R. M., Kelly K. J., Dagher P. C., Tanner G. A., Atkinson S. J., Bacallao R. L., Molitoris B. A. (2002).
Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, 3, pp.C905-16.

107. Baatz H., Steinbauer M., Harris A. G., Krombach F. (1995).
Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp*, **15**, 2, pp.85-91.

108. Johnson L. V., Walsh M. L., Chen L. B. (1980).
Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 2, pp.990-4.

109. Fritschy J., Hartig W. (2001)
Immunofluorescence. Nature Publishing Group (Nature Encyclopedia of Life Sciences).

110. Conchello J.-A., Lichtman J. (2005).
Optical sectioning microscopy. *Nature Methods*, **2**, 12, pp.920-931.

111. Tomita Y., Kubis N., Calando Y., Tran Dinh A., Meric P., Seylaz J., Pinard E. (2005).
Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, **25**, 7, pp.858-67.

112. König K. (2000).
Multiphoton microscopy in life sciences. *Journal of Microscopy*, **200**, pp.83-104.

113. Schenke-Layland K., Riemann I., Damour O., Stock U. A., König K. (2006).

- Two-photon microscopes and in vivo multiphoton tomographs - Powerful diagnostic tools for tissue engineering and drug delivery.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**, pp.878-896.
- 114.** Helmchen F., Denk W. (2005).
Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, **2**, 12, pp.932-40.
- 115.** Soeller C., MB. C. (1999).
Two-photon Microscopy : imaging in scattering samples and three-dimensionally resolved flash-photolysis. *Microsc Res Tech*, **47**, pp.182-195.
- 116.** Mohler W., Millard A. C., Campagnola P. J. (2003).
Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods*, **29**, pp.97-109.
- 117.** Pena A. M. (2006).
Génération de seconde harmonique par le collagène et application à l'étude de fibres par microscopie multiphoton, Ecole Polytechnique,
- 118.** Zipfel W. R., Williams R. M., Christie R., Nikitin A. Y., Hyman B. T., Webb W. W. (2003).
Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *PNAS*, **100**, 12, pp.7075-7080.
- 119.** Boulesteix T., Pena A.-M., Pagès N., Godeau G., Sauviat M.-P., Beaurepaire E., Schanne-Klein M. C. (2005).
Micrometer scale ex vivo multiphoton imaging of unstained arterial wall structure. *Cytometry*, **69**, pp.20-26.
- 120.** Williams R. M., Zipfel W. R., Webb W. W. (2005).
Interpreting second-harmonic images of collagen I fibrils. *Biophysical Journal*, **88**, pp.1377-1386.
- 121.** Debarre D., Supatto W., Pena A. M., Fabre A., Tordjmann T., Combettes L., Schanne-Klein M. C., Beaurepaire E. (2006).
Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. *Nat Methods*, **3**, 1, pp.47-53.
- 122.** Oheim M., Beaurepaire E., Chaigneau E., Mertz J., Charpak S. (2001).
Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *J Neurosci Methods*, **111**, 1, pp.29-37.
- 123.** Zoumi A., Lu X., Kassab G. S., Tromberg B. J. (2004).
Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, **87**, pp.2778-2786.
- 124.** Pena A. M., Fabre A., Debarre D., Marchal-Somme J., Crestani B., Martin J. L., Beaurepaire E., Schanne-Klein M. C. (2007).
Three-Dimensional Investigation and Scoring of Extracellular Matrix Remodeling During Lung Fibrosis Using Multiphoton Microscopy. *Microsc Res Tech*, **70**, pp.162-170.
- 125.** Chaigneau E., Oheim M., Audinat E., Charpak S. (2003).
Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 22, pp.13081-6.
- 126.** Grutzendler J., Gan W.-B. (2006).
Two-photon Imaging of Synaptic Plasticity and Pathology in the Living Mouse Brain. *NeuroRX*, **3**, pp.489-496.
- 127.** Levene M. J., Dombeck D. A., Kasischke K. A., Molloy R. P., Webb W. W. (2004).

- In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue.** *J Neurophysiol*, **91**, 4, pp.1908-12.
- 128.** Misgeld T., Kerschensteiner M. (2006).
In vivo imaging of the diseased nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, **7**, pp.449-463.
- 129.** Svoboda K., Yasuda R. (2006).
Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron*, **50**, 6, pp.823-39.
- 130.** Lendvai B., Szabo G., Barth A., Zelles T., Vizi E. (2006).
Application of two-photon microscopy to the study of cellular pharmacology of central neurons. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**, pp.841-849.
- 131.** Mainen Z. F., Maletic-Savatic M., Shi S. H., Hayashi Y., Malinow R., Svoboda K. (1999).
Two-Photon Imaging in Living Brain Slices. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology*, **18**, pp.231-239.
- 132.** Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Kerr J. N., Helmchen F. (2004).
Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature Methods*, **1**, pp.31-37.
- 133.** Jiang J., Eisenthal K. B., Yuste R. (2007).
Second harmonic generation in neurons: electro-optic mechanism of membrane potential sensitivity. *Biophys J*, **93**, 5, pp.L26-8.
- 134.** Zuo Y., Yang G., Kwon E., Gan W.-B. (2005).
Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature*, **436**, pp.261-265.
- 135.** Tian G. F., Takano T., Lin J., Wang X., Bekar L., Nedergaard M. (2006).
Imaging of cortical astrocytes using 2-photon laser scanning microscopy in the intact mouse brain. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**, pp.773-787.
- 136.** Hirase H., Qian L., Bartho P., Buzsaki G. (2004).
Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol*, **2**, 4, pp.E96.
- 137.** Simard M., Arcuino G., Takano T., Liu Q. S., Nedergaard M. (2003).
Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci*, **23**, 27, pp.9254-62.
- 138.** Zhou W., Ge W.-P., Zeng S., Duan S., Luo Q. (2007).
Identification and two-photon imaging of oligodendrocyte in CA1 region of hippocampal slices. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **352**, pp.598-602.
- 139.** Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F. (2005).
Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, **308**, 5726, pp.1314-8.
- 140.** Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J., Zuo Y., Jung S., Littman D., Dustin M., Gan W.-B. (2005).
ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, **8**, 6, pp.752-758.
- 141.** Serduc R., Verant P., Vial J., Farion R., Rocas L., Remy C., Fadlallah T., Brauer E., Bravin A., Laissue J., Blattmann H., B. v. d. S. (2006).
In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **64**, pp.1519-1527.

- 142.** Vérant P., Serduc R., van der Sanden B., Rémy C., Vial J.-C. (2007).
A direct method for measuring mouse capillary cortical blood volume using multiphoton laser scanning microscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **27**, 5, pp.1072-1081.
- 143.** Jain R. K., Munn L. L., Fukumura D. (2002).
Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat Rev Cancer*, **2**, 4, pp.266-76.
- 144.** Carmeliet P., Jain R. K. (2000).
Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**, 6801, pp.249-57.
- 145.** Brown E. B., Campbell R. B., Tsuzuki Y., Xu L., Carmeliet P., Fukumura D., Jain R. K. (2001).
In vivo measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy. *Nat Med*, **7**, 7, pp.864-8.
- 146.** Tozer G. M., Ameer-Beg S. M., Baker J., Barber P. R., Hill S. A., Hodgkiss R. J., Locke R., Prise V. E., Wilson I., Vojnovic B. (2005).
Intravital imaging of tumour vascular networks using multi-photon fluorescence microscopy. *Adv Drug Deliv Rev*, **57**, 1, pp.135-52.
- 147.** Brown E., McKee T., diTomaso E., Pluen A., Seed B., Boucher Y., Jain R. K. (2003).
Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. *Nat Med*, **9**, 6, pp.796-800.
- 148.** Larson D. R., Zipfel W. R., Williams R. M., Clark S. W., Bruchez M. P., Wise F. W., Webb W. W. (2003).
Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science*, **300**, 5624, pp.1434-6.
- 149.** Stroh M., Zimmer J. P., Duda D. G., Levchenko T. S., Cohen K. S., Brown E. B., Scadden D. T., Torchilin V. P., Bawendi M. G., Fukumura D., Jain R. K. (2005).
Quantum dots spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu in vivo. *Nat Med*, **11**, 6, pp.678-82.
- 150.** Kantelhardt S. R., Leppert J., Krajewski J., Petkus N., Reusche E., Tronnier V. M., Huttmann G., Giese A. (2007).
Imaging of brain and brain tumor specimens by time-resolved multiphoton excitation microscopy ex vivo. *Neuro Oncol*, **9**, 2, pp.103-12.
- 151.** Leppert J., Krajewski J., Kantelhardt S. R., Schlaffer S., Petkus N., Reusche E., Huttmann G., Giese A. (2006).
Multiphoton excitation of autofluorescence for microscopy of glioma tissue. *Neurosurgery*, **58**, 4, pp.759-67; discussion 759-67.
- 152.** Bacskai B. J., Hickey G. A., Skoch J., Kajdasz S. T., Wang Y., Huang G. F., Mathis C. A., Klunk W. E., Hyman B. T. (2003).
Four-dimensional multiphoton imaging of brain entry, amyloid binding, and clearance of an amyloid-beta ligand in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 21, pp.12462-7.
- 153.** Schaffer C. B., Friedman B., Nishimura N., Schroeder L. F., Tsai P. S., Ebner F. F., Lyden P. D., Kleinfeld D. (2006).
Two-photon imaging of cortical surface microvessels reveals a robust redistribution in blood flow after vascular occlusion. *PLoS Biol*, **4**, 2, pp.e22.
- 154.** Tian G. F., Azmi H., Takano T., Xu Q., Peng W., Lin J., Oberheim N., Lou N., Wang X., Zielke H., Kang J., Nedergaard M. (2005).
An astrocytic basis of epilepsy. *Nature Medicine*, **11**, 9, pp.973-981.

- 155.** Flusberg B., Jung J., Cocker E., Anderson E., Schnitzer M. (2005).
In vivo brain imaging using a portable 3.9 gram two-photon fluorescence microendoscope. *Optics Letters*, **30**, 17, pp.2272-2274.
- 156.** Schlageter K. E., Molnar P., Lapin G. D., Groothuis D. R. (1999).
Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvasc Res*, **58**, 3, pp.312-28.
- 157.** Verant P., Serduc R., Van Der Sanden B., Remy C., Vial J. C. (2007).
A direct method for measuring mouse capillary cortical blood volume using multiphoton laser scanning microscopy. *J Cereb Blood Flow Metab*, **27**, pp.1072-1081.
- 158.** Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Kerr J. N., Helmchen F. (2004).
Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods*, **1**, 1, pp.31-7.
- 159.** Brackmann U. (2000)
Lambdachrome - Laser Dyes. 3eme édition éd., Lambda Physik.
- 160.** Raponi E., Agenes F., Delphin C., Assard N., Baudier J., Legraverend C., Deloulme J. C. (2007).
S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*, **55**, 2, pp.165-77.
- 161.** Trioulier Y., Torch S., Blot B., Cristina N., Chatellard-Causse C., Verna J. M., Sadoul R. (2004).
Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. *J Biol Chem*, **279**, 3, pp.2046-52.
- 162.** Chambers R., Kajiwarra T., Kearns D. (1974).
Effect of Dimer Formation of the Electronic Absorption and Emission Spectra of Ionic Dyes. Rhodamines and Other Common Dyes. *J. Phys. Chem.*, **78**, pp.380-387.
- 163.** Debelle L., Alix A. J. P., Wei S. M., Jacob M.-P., Huvenne J.-P., Berjot M., Legrand P. (1998).
The secondary structure and architecture of human elastin. *Eur. J. Biochem.*, **258**, pp.533-539.
- 164.** Debelle L., Tamburro A. M. (1999).
Elastin : molecular description and function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **31**, pp.261-272.
- 165.** Kielty C. M., Sherratt M. J., Shuttleworth C. A. (2002).
Elastic Fibres. *Journal of Cell Science*, **115**, pp.2817-2828.
- 166.** Ross R. (1973).
The elastic fiber : a review. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **21**, 3, pp.199-208.
- 167.** Shadwick R. E. (1999).
Mechanical design in arteries. *The Journal of Experimental Biology*, **202**, pp.3305-3313.
- 168.** Konig K., Ehlers A., Riemann I., Schenkl S., Buckle R., Kaatz M. (2007).
Clinical two-photon microendoscopy. *Microsc Res Tech*, **70**, 5, pp.398-402.
- 169.** Palero J., de Bruijn H., van der Ploeg-van den Heuvel A., Sterenborg H., Gerritsen H. (2006).
In vivo nonlinear spectral imaging in mouse skin. *Optics Express*, **14**, 10, pp.4395-4402.

- 170.** Thiberville L., Moreno-Swirc S., Vercauteren T., Peltier E., Cave C., Bourg Heckly G. (2007).
In vivo imaging of the bronchial wall microstructure using fibered confocal fluorescence microscopy. *Am J Respir Crit Care Med*, **175**, 1, pp.22-31.
- 171.** Fawcett D. W. (1994)
Bloom and Fawcett - A Textbook of Histology. Chapman & Hall, New York.
- 172.** Wheater P. (2004)
Histologie fonctionnelle. De Boeck, Bruxelles.
- 173.** Baatz H., Steinbauer M., Harris A. G., Krombach F. (1995).
Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp*, **15**, pp.85-91.
- 174.** Ffytche T. J., Shilling J. S., Chisholm I. H., Federman J. L. (1980).
Indications for fluorescein angiography in disease of the ocular fundus: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **73**, 5, pp.362-365.
- 175.** Fery Forgues S., Lavabre D. (1999).
Are fluorescence quantum yields so tricky to measure ? A demonstration using familiar stationery products. *Journal of Chemical Education*, **76**, pp.1260-1264.
- 176.** Ricard C., Vial J. C., Douady J., van der Sanden B. (2007).
In vivo imaging of elastic fibers using sulforhodamine B. *J Biomed Opt*, **12**, 6, pp.064017.
- 177.** Xu C., Webb W. W. (1996).
Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *Journal of the Optical Society of America*, **13**, 3, pp.481-491.
- 178.** König K., Schenke-Layland K., Riemann I., Stock U. A. (2005).
Multiphoton autofluorescence imaging of intratissue elastic fibers. *Biomaterials*, **26**, pp.495-500.
- 179.** Lin S.-J., Wu R.-J., Tan H.-Y., Lo W., Lin W.-C., Young T.-H., Hsu C.-J., Chen J.-S., Jee S.-H., Dong C.-Y. (2005).
Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Optics Letters*, **30**, 17, pp.2275-2277.
- 180.** Schenke-Layland K., Riemann I., Stock U. A., König K. (2005).
Imaging of cardiovascular structures using near-infrared femtosecond multiphoton laser scanning microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, **10**, 2, pp.024017.
- 181.** Débarre D., Supatto W., Pena A.-M., Fabre A., Tordjmann T., Combettes L., Schanne-Klein M.-C., Beaurepaire E. (2006).
Imaging lipids bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. *Nature Methods*, **3**, 1, pp.47-53.
- 182.** Zipfel W. R., Williams R. M., Christie R., Nikitin A. Y., Hyman B. T., Webb W. W. (2003).
Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12, pp.7075-80.
- 183.** Medeiros de Mello J., Orsi A., Padovani C., Matheus S., Eleutério M. (2004).
Structure of the Aortic Wall in the Guinea Pig and Rat. *Braz. J. morphol. Sci.*, **21**, 1, pp.35-38.

- 184.** Hayek A., Grichine A., Huault T., Ricard C., Bolze F., Van Der Sanden B., Vial J. C., Mely Y., Duperray A., Baldeck P. L., Nicoud J. F. (2007).
Cell-permeant cytoplasmic blue fluorophores optimized for in vivo two-photon microscopy with low-power excitation. *Microsc Res Tech*, **70**, 10, pp.880-5.
- 185.** Verant P., Serduc R., Sanden B. V., Chantal R., Ricard C., Coles J. A., Vial J. C. (2008).
Subtraction method for intravital two-photon microscopy: intraparenchymal imaging and quantification of extravasation in mouse brain cortex. *J Biomed Opt*, **13**, 1, pp.011002.
- 186.** Paxinos G., Franklin K. (2001)
The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (2nd Edition). Academic Press.
- 187.** van Vulpen M., Kal H., Taphoorn H., el Sharouni S. (2002).
Changes in blood-brain barrier permeability induced by radiotherapy: Implications for timing of chemotherapy? *Oncology Reports*, **9**, pp.683-688.
- 188.** Nakata H., Yoshimine T., Murasawa A., Kumura E., Harada K., Ushio Y., Hayakawa T. (1995).
Early Blood-brain Barrier Disruption after High-dose Single-fraction Irradiation in Rats. *Acta Neurochir (Wien)*, **136**, pp.82-86.
- 189.** Yuan H., Waleed Gaber M., McColgan T., Naimark M., Kiani M., Merchant T. (2003).
Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood-brain barrier: modulation with anti-ICAM-1 antibodies. *Brain Research*, **969**, pp.59-69.
- 190.** Yuan H., Waleed Gaber M., Boyd K., Wilson C., Kiani M., Merchant T. (2006).
Effects of Fractionated Radiation on the Brain Vasculature in a Murine Model: Blood-Brain Barrier Permeability, Astrocyte Proliferation, and Ultrastructural Changes. *Int J Radiat Oncol Bio Phys*, **66**, 3, pp.860-866.
- 191.** Roth N., Sontag M., Kiani M. (1999).
Early Effects of Ionizing Radiation on the Microvascular Networks in Normal Tissue. *Radiation Research*, **151**, pp.270-277.
- 192.** Akiyama K., Tanaka R., Sato M., Takeda N. (2001).
Cognitive Dysfunction and Histological Findings in Adult Rats One Year after Whole Brain Irradiation. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, **41**, pp.590-598.
- 193.** Chiang C., McBride W., Withers H. (1993).
Radiation-induced astrocytic and microglial responses in mouse brain. *Radiother Oncol*, **29**, 1, pp.60-68.
- 194.** Hwang S.-Y., Jung J.-S., Kim T.-H., Lim S.-J., Oh E.-S., Kim J.-Y., Ji K.-A., Joe E.-H., Cho K.-H., Han I.-O. (2006).
Ionizing Radiation Induces Astrocyte Gliosis Through Microglia Activation. *Neurobiology of Disease*, **21**, pp.457-467.
- 195.** Knott J., Mahesparan R., Garcia-Cabrera I., Tysnes B., Edvardsen K., Ness G., Mork S., Lund-Johansen M., Bjerkgvig R. (1998).
Stimulation of Extracellular Matrix Components in the Normal Brain by Invading Glioma Cells. *Int J Cancer*, **75**, pp.864-872.
- 196.** Tysnes B., Mahesparan R. (2001).
Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *Journal of Neuro-Oncology*, **53**, pp.129-147.
- 197.** Bernard P., Cellarier G., Cremades S., Gisserot O., De Jaureguiberry J. P. (2006).

[**Early myocardial infarction associated with chemotherapy for testicular cancer**]. *Rev Med Interne*, **27**, 6, pp.497-8.

198. Gerl A. (1994).

Vascular toxicity associated with chemotherapy for testicular cancer. *Anticancer Drugs*, **5**, 6, pp.607-14.

199. Saito R., Krauze M. T., Noble C. O., Drummond D. C., Kirpotin D. B., Berger M. S., Park J. W., Bankiewicz K. S. (2006).

Convection-enhanced delivery of Ls-TPT enables an effective, continuous, low-dose chemotherapy against malignant glioma xenograft model. *Neuro Oncol*, **8**, 3, pp.205-14.

200. Flusberg B. A., Jung J. C., Cocker E. D., Anderson E. P., Schnitzer M. J. (2005).

In vivo brain imaging using a portable 3.9 gram two-photon fluorescence microendoscope. *Opt Lett*, **30**, 17, pp.2272-4.

Publications

Publications

- **In vivo Imaging of Elastic Fibers using Sulforhodamine B :** Clément Ricard, Jean-Claude Vial, Julien Douady & Boudewijn van der Sanden – Journal of Biomedical Optics, 12(6), 2007.
- **Short-term Effects of Synchrotron Irradiation on Vasculature and Tissue in Healthy and Glioma Bearing Mouse Brain :** Clément Ricard, Manuel Fernández, Jérôme Gastaldo, Lucie Dupin, Laurette Somveille, Régine Farion, Herwig Requardt, Jean-Claude Vial, Hélène Elleaume, Christoph Segebarth & Boudewijn van der Sanden – article soumis.
- **Synergistic Effects of Cisplatin and Synchrotron Irradiation on F98 Gliomas Growing in Nude Mice :** Clément Ricard, Manuel Fernández, Jean-Claude Vial, Hélène Elleaume, Herwig Requardt, François Estève, Christoph Segebarth & Boudewijn van der Sanden – article soumis.
- **In and ex vivo Imaging of Arteries using Multiphoton Microscopy and Sulforhodamine B Staining :** Clément Ricard, Jean-Claude Vial, Julien Douady & Boudewijn van der Sanden – article soumis.
- **In vivo Staining of Neocortical Astrocytes via the Cerebral Microcirculation using Sulforhodamine B :** Pascale Vérant*, Clément Ricard*, Raphaël Serduc*, Jean-Claude Vial & Boudewijn van der Sanden (* : co-premiers auteurs) – article soumis.
- **A Subtraction Method for Intravital Two-photon Microscopy: Intraparenchymal Imaging and Quantification of Extravasation in Mouse Brain Cortex :** Pascale Verant, Raphael Serduc, Boudewijn van der Sanden, Chantal Remy, Clément Ricard, Jonathan Coles & Jean-Claude Vial – Journal of Biomedical Optics,13(1), 2008.
- **Cell Imaging by Coherent Backscattering Microscopy Using Frequency-shifted Optical Feedback in a Microchip Laser :** O. Hugon, IA. Paun, C. Ricard, B van der Sanden, E. Lacot, O. Jacquin & A. Witomski – Ultramicroscopy – 108:523-528 ; 2008.
- **Cell-Permeant Cytoplasmic Blue Fluorophores Optimized for In Vivo Two-Photon Microscopy with Low-Power Excitation :** Ali Hayek, Alexei Grichine, Thomas Huault, Clément Ricard, Frederic Bolze, Boudewijn van der Sanden, Jean-Claude Vial, Yves Mely, Alain Duperray, Patrice Lilian Baldeck & Jean-Francois Nicoud – Microscopy Research and Technique – 70(10):880-885 ; 2007.

Chapitres de Livres

- **Two-Photon Imaging :** Clément Ricard, Jonathan Coles, Raphael Serduc, Boudewijn van der Sanden, Pascale Verant & Jean-Claude Vial – New Encyclopedia of Neuroscience (Elsevier) – in press.

Communications Orales avec Publication

- **Imaging Elastic and Collagen Fibers with Sulforhodamine B and Second-harmonic Generation :** Clément Ricard, Jean-Claude Vial, Julien Douady & Boudewijn van der Sanden – Proceedings of Molecular Probes for Biomedical Applications II, Photonics West, 19 au 24 janvier 2008, San José, USA.
- **Novel Two-photon Absorbing Styrylpyridine-based Multi-branched Dyes : Towards pH Responsive Dyes for Biological Imaging :** André-Jean Attias, Fabrice Mathevet, David Kréher, Patrices Baldeck, Clément Ricard, Boudewijn van der Sanden – Proceedings of Organic Photonic Materials and Devices VIII, Photonics West, janvier 2006, San José, USA.

Communications Orales

- **Synergistic Effects of Cisplatin and Synchrotron Irradiation on F98 Gliomas Growing in Nude Mice :** Clément Ricard, Manuel Fernandez, Jean-Claude Vial, Hélène Elleaume, Herwig Requardt, François Estève, Christoph Segebarth & Boudewijn van der Sanden – New Prospects for Brain Tumor Radiotherapy (SyRad) , 2 et 4 juin 2008, Grenoble.
- **Microscopie Non Linéaire : de l’Histologie Classique à l’Histologie Intravitale – Application au marquage des fibres élastiques in vivo :** Clément Ricard, Jean-Claude Vial, Julien Douady, Christoph Segebarth & Boudewijn van der Sanden – Opt’Diag 2007, 15 et 16 mai 2007, Paris.
- **Etude par Microscopie Biphotonique des Effets de la Photoactivation par Irradiation Synchrotron : Développements Méthodologiques, Premiers Résultats et Perspectives :** Journée de l’Ecole Doctorale Chimie & Sciences du Vivant, 12 juin 2007, Grenoble.
- **In vivo Two-photon Microscopy of Cerebral Vascular Damage after Synchrotron Irradiation Protocols :** Boudewijn van der Sanden, Clément Ricard, Raphaël Serduc, Jean-Claude Vial, Julien Douady, Pascale Vérant, Elke Brauer-Krisch, Alberto Bravin, Jérôme Gastaldo, Manuel Fernandez, Hélène Elleaume, Herwig Requardt, Hans Blattmann, Jean Laissue & François Estève – Medical Applications of Synchrotron Radiation, 26 au 30 août 2007, Saskatoon, Canada.

Posters

- **Thérapie par Photoactivation : Mise en Evidence d’un Effet de Synergie entre le Cisplatine et l’Irradiation Synchrotron :** Clément Ricard, Manuel Fernandez, Herwig Requardt, Jean-Claude Vial, Hélène Elleaume, François Estève, Christoph Segebarth & Boudewijn van der Sanden – 3eme Journées Scientifiques du CLARA, 18 & 19 mars 2008, Lyon.

- **Short-Term Effects of a 15Gy – 79keV Synchrotron Tomographic Irradiation on Healthy Mice Brain Microvasculature :** Clément Ricard, Jean-Claude Vial, Sonia Teypez, Jerome Gastaldo, Manuel Fernandez, François Estève, Christoph Segebarth & Boudewijn van der Sanden – 13th International Congress of Radiation Research, 6-12 juillet 2007, San Francisco, USA..

- **Microscopie Biphotonique Intravitale et Neurosciences : Applications à l'Etude des Effets de la Photoactivation Therapy par Irradiation Synchrotron :** Clément Ricard, Pascale Verant, Raphael Serduc, Jean-Claude Vial, Christoph Segebarth & Boudewijn van der Sanden – Journée du Club Optique et Sciences du Vivant de la Société Française d'Optique, 30 novembre 2006, Paris.

- **Microscopie Biphotonique Intravitale et Neurosciences : Applications à l'Etude des Effets de la Photoactivation Therapy par Irradiation Synchrotron :** Clément Ricard, Jean-Claude Vial & Boudewijn van der Sanden – Journée Recherche en Biologie, 9 novembre 2006, Grenoble.

- **Multiphoton Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Healthy and Diseased Brain :** Clément Ricard, Pascale Verant, Raphaël Serduc, Jean-Claude Vial, Régine Farion, Chantal Remy, Christoph Segebarth & Boudewijn van der Sanden – European BioAlpine Convention, 6 octobre 2006, Grenoble.

- **Microscopie Biphotonique Intravitale et Neurosciences : Applications à l'Etude des Effets des Radiothérapies Synchrotron :** Clément Ricard, Raphael Serduc, Pascale Verant, Jean-Claude Vial, Christoph Segebarth & Boudewijn van der Sanden – Journée Recherche en Biologie, 4 novembre 2005, Grenoble.

- **Microscopie Optique Non-linéaire pour les Neurosciences :** Boudewijn van der Sanden, Clément Ricard, Jonathan Coles, Julien Douady, Catherine Massart, Patrice Baldeck, Mathieu Maurin, Davy Cottet, François Estève, Claude Feuerstein and Jean Claude Vial – Journée Recherche en Biologie, 8 novembre 2007, Grenoble.

- **Imagerie de Seconde-harmonique : En Avant Toute ! :** Julien Douady, Davy Cottet, Clément Ricard, Boudewijn van der Sanden & Jean-Claude Vial – Opt'Diag 2007, 15 et 16 mai 2007, Paris.

- **A Direct Method for Measuring Mouse Capillary Cortical Blood Volume using Multiphoton Laser Scanning Microscopy :** Pascale Vérant, Raphaël Serduc, Clément Ricard, Boudewijn Van Der Sanden, Chantal Rémy & Jean-Claude Vial – Rencontres Imagerie du Petit Animal, automne 2006, Marseille.

- **A differential *in vivo* 2 photon microscopy method for quantitative imaging of dye extravasation in mouse cortex :** Pascale Vérant, Jean Claude Vial, Raphaël Serduc, Clément Ricard, Jonathan Coles, Chantal Rémy, Elke Brauer, Alberto Bravin & Boudewijn van der Sanden – OSA 2006, mars 2006, Fort Lauderdale.