



HAL
open science

Chimio-radiothérapie des tumeurs cérébrales : intérêt de l'injection intratumorale de drogues antinéoplasiques.

Julia Rousseau

► To cite this version:

Julia Rousseau. Chimio-radiothérapie des tumeurs cérébrales : intérêt de l'injection intratumorale de drogues antinéoplasiques.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00274902

HAL Id: tel-00274902

<https://theses.hal.science/tel-00274902>

Submitted on 21 Apr 2008

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

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

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Discipline : Physique pour l'instrumentation

Thèse soutenue publiquement par

Julia Rousseau

le 29 octobre 2007

Chimio-radiothérapie des tumeurs cérébrales : intérêt de l'injection intra-tumorale de drogues antinéoplasiques

Directeurs de thèse : Dr. Hélène Elleaume et Pr. François Estève

Composition du jury

Jean DOUCET Directeur de recherche <i>Laboratoire de Physique des Solides, Université Paris XI, Orsay</i>	Rapporteur
Claude LE SECH Professeur des universités <i>Laboratoire des Collisions Atomiques et Moléculaires, Université Paris XI, Orsay</i>	Rapporteur
José BARUCHEL Physicien, chef du groupe <i>Imaging</i> <i>European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble</i>	Examineur
Antoine CARPENTIER Professeur des universités, praticien hospitalier <i>Hôpital Avicenne et Faculté de médecine Paris 13, Bobigny</i>	Examineur
Jean-François LE BAS Professeur des universités, praticien hospitalier <i>Centre Hospitalier Universitaire et Université Joseph Fourier, Grenoble</i>	Examineur
Hélène ELLEAUME Ingénieur de recherche <i>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 836 - équipe 6, Grenoble</i>	Directrice de thèse

Chimio-radiothérapie des tumeurs cérébrales : intérêt de l'injection intratumorale de drogues antinéoplasiques.

Les gliomes de haut grade sont des tumeurs cérébrales particulièrement agressives et les traitements actuels demeurent uniquement palliatifs. L'efficacité des radiothérapies est sévèrement limitée par la tolérance des tissus sains, l'enjeu est donc d'accroître la dose et la toxicité en ciblant le tissu tumoral. Une des méthodes proposées repose sur l'association de drogues anticancéreuses localisées au sein de la tumeur et d'une irradiation X. Au niveau cérébral, l'accumulation d'un agent injecté usuellement par voie systémique, est rendue difficile par la présence de la barrière hémato-encéphalique, qui filtre le passage des molécules à travers l'endothélium vasculaire. Des techniques d'injection ont été développées récemment pour délivrer des drogues directement dans le lit tumoral. Parmi elles, la méthode de *convection-enhanced delivery* (CED) permet d'obtenir une distribution de drogue homogène et contrôlée. Les objectifs de cette thèse étaient de mettre en place et caractériser la CED puis de l'appliquer au traitement des gliomes par des études précliniques. Plusieurs agents ont été testés : cisplatine, carboplatine, oxaliplatine et iodo-désoxyuridine et deux modalités d'irradiation ont été évaluées : la radiothérapie stéréotaxique en rayonnement synchrotron (monochromatique <100 keV) et l'irradiation haute énergie (6 MV) sur un accélérateur médical usuel. Les résultats obtenus révèlent que l'efficacité du traitement combinant drogue platinée et rayons X est étroitement liée à celle de la chimiothérapie seule et ne dépend pas de l'énergie du rayonnement utilisé. Ces résultats sont très prometteurs et ouvrent des perspectives nouvelles pour la recherche clinique.

Mots-clefs : gliomes, radiothérapie, rayonnement synchrotron, chimiothérapie intracérébrale, convection-enhanced delivery (CED), drogue platinée, iodo-désoxyuridine (IUdR), pompe osmotique

Brain tumor chemo-radiotherapy: a study of direct intratumoral perfusion with antineoplastic drugs.

High grade gliomas are aggressive tumors for which current treatments remain palliative. Radiotherapy efficacy is restricted by the surrounding brain tissue tolerance. One method based on the concomitant use of chemotherapeutic drugs and external photon irradiation has been proposed to improve the treatment outcome.

The systemic administration of drugs is not effective in achieving the therapeutic level of drug needed for brain tumor treatment. This is due to the blood brain barrier (BBB) that prevents molecules passing through the vascular endothelium. Recent methods have been developed to circumvent the BBB. Among them, convection-enhanced delivery (CED) relies on the continuous infusion of a fluid containing a therapeutic agent, under a pressure gradient. It permits a homogeneous and controlled drug distribution. The aims of this study were to characterise the CED method, and then to utilise it for glioma treatment in preclinical studies. Several drugs were tested: cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, and iodo-deoxyuridine. Two radiation modalities were evaluated: synchrotron stereotactic radiotherapy (monochromatic beam <100 keV) and high energy irradiation (6 MV) obtained with a conventional medical linear accelerator. The results obtained reveal that the effectiveness of the combined treatment (platinated drug plus photon irradiation) is highly related to that of the chemotherapy. The data, obtained with the platinated chemotherapy, also show that high-energy X-ray irradiation (6 MV) is as effective as synchrotron X-ray irradiation. The results broaden the applicability of this chemotherapeutic approach to clinical trials.

Keywords: gliomas, radiotherapy, synchrotron radiation, intracerebral chemotherapy, convection-enhanced delivery (CED), platinated drug, iodo-deoxyuridine (IUdR), osmotic pump

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à ce travail, m'ont aidée, soutenue et encouragée durant ces trois années.

Messieurs Claude Le Sech et Jean Doucet ont eu la gentillesse d'accepter d'être les rapporteurs de ce travail. Merci également à Jean-François Le Bas, Antoine Carpentier et José Baruchel pour leur participation à mon jury de thèse.

Je remercie mes directeurs de thèse Hélène Elleaume et François Estève, ainsi que tous les membres de l'unité INSERM 836-équipe 6 « Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale », ceux de la ligne médicale ID17 de l'ESRF et j'adresse un petit clin d'œil aux habitants d'ID19. Je remercie également chaleureusement les différents laboratoires qui ont accepté de collaborer, plus particulièrement le Professeur Barth qui a soutenu ce travail pendant la dernière année.

Je tiens à remercier plus personnellement Hélène qui a su me faire confiance et avec qui j'ai beaucoup apprécié de travailler ou discuter, ainsi que Caroline toujours disponible et volontaire lorsque nous n'étions pas si nombreux(ses) pour manipuler. Je salue amicalement Jérôme, Zuzanna et Géraldine à qui je souhaite bonne route. Je citerais Thierry, Dominique, Nadine et Régine pour leur consciencieuse disponibilité et leur gentillesse ; le « room service » composé de Pierrick et Raphaël, mais bien souvent orchestré par Pauline ; puis terminerais par Manu, Jeff et Elodie inévitables côté bonne humeur.

Un grand merci à tous les petits Ratatouille qui ont rendu ce travail possible.

J'adresse des remerciements sincères à mes parents, mes grands-parents et ma sœur pour leur soutien inconditionnel. Merci à mes amis : grimpeurs ou non, grenoblois ou plus lointains mais incontournables.

Enfin, merci Pierrot alias *l'homme à la chemise à carreaux*, 🎵 « je sais je suis trop naïve, de dresser la liste non exhaustive, de toutes ces choses que je voudrais faire avec toi » 🎵.

LISTE DES ACRONYMES ET ABRÉVIATIONS

%ILS : pourcentage d'augmentation de survie (acronyme anglais de *increased life span*).

ADN : acide désoxyribonucléique

BBB : *blood brain barrier*

BHE : barrière hémato-encéphalique

CED : *convection-enhanced delivery*

CHU : centre hospitalier universitaire

CNS : système nerveux central

CT : *computed tomography*

DEF : *dose enhancement factor*

DSB : cassure double-brin (*double strand break*)

ESRF : *European Synchrotron Radiation Facility*, installation européenne pour l'utilisation du rayonnement synchrotron.

eV : électron-Volt

FReLoN : *Fast readout low noise*

HPGe : *high-purity germanium*, détecteur au germanium haute pureté

HPLC-MS/MS : chromatographie haute performance couplée à un spectromètre de masse en mode tandem

i.c. : intracérébral

i.ca. : intra-carotidien

i.p. : intra-péritonéal

i.t. : intratumoral

i.v. : intra-veineux

ICP-MS : spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (*induced coupled plasma-mass spectrometer*)

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IRM : imagerie par résonance magnétique

IUDR : Iodo-desoxyuridine

La-ICP-MS : rassemblement d'une ablation laser et d'une spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (*Laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry*)

MeST : survie médiane (median survival time)

MST : survie moyenne (mean survival time)

nbr : nombre

o.p. : pompe osmotique

pb : paire de bases

PIXE : fluorescence X induite par particules chargées (*Particle induced X-ray emission*)

ppb : partie par milliard

ppm : partie par million

RT : radiothérapie

ROI : région d'intérêt

RSRM : rayonnement synchrotron et recherche médicale

SIMS : spectrométrie de masse d'ions secondaires

SPECT : tomographie à émission monophotonique

SSB : cassure simple brin (*single strand break*)

SSR : *synchrotron stereotactic radiotherapy*

stdev : déviation standard

TEP : tomographie par émission de positons

TQRS : tomographie quantitative en rayonnement synchrotron

SOMMAIRE

I	INTRODUCTION	1
II	PROBLÉMATIQUE	5
	II.1 Les gliomes	5
	II.2 Méthode de « Convection-Enhanced Delivery » (CED).....	16
	II.3 Agents pharmacologiques	31
	II.4 Rayons X et atomes lourds présents dans l'ADN	53
III	TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES	61
	III.1 Le rayonnement synchrotron et la ligne médicale de l'ESRF	61
	III.2 Tomographie quantitative en rayonnement synchrotron (TQRS).....	69
	III.3 Modèle expérimental de tumeur.....	74
IV	RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	89
	IV.1 Distribution obtenue par CED : imagerie	89
	IV.2 Essais précliniques de chimio-radiothérapie	109
	IV.3 Quantification.....	162
V	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	179
	V.1 Imagerie et caractéristiques de la CED	179
	V.2 Essais précliniques de chimio-radiothérapie	181
	V.3 Vers une application clinique	183
VI	RÉFÉRENCES	185
VII	TABLE DES MATIÈRES	199
VIII	ANNEXE : Publications	

I INTRODUCTION

La thématique de recherche à laquelle s'intègre ce travail de thèse concerne le traitement des tumeurs cérébrales par chimio- et radiothérapie. Le rôle central du cerveau et les conséquences fonctionnelles d'un dysfonctionnement neuronal explique la gravité des tumeurs cérébrales primaires. Leur malignité est certes variable, mais même les formes dites « bénignes » peuvent être létales du fait de leurs propriétés infiltrantes et leur capacité à évoluer vers des formes sévères. Le glioblastome est la tumeur primaire maligne la plus fréquente chez l'adulte. Malgré les avancées thérapeutiques, les traitements ne sont guère que palliatifs. La survie médiane des patients est généralement inférieure à 12 mois à partir du diagnostic, et même pour les cas les plus favorables, la plupart des patients décèdent dans les 2 ans. Les traitements consistent souvent en une résection chirurgicale qui se veut la plus complète possible, mais n'est pas toujours envisageable, suivie de radiothérapie. Bien que la chimiothérapie adjuvante semble prendre de l'importance, notamment aux Etats-Unis, le bénéfice thérapeutique par rapport à la radiothérapie n'est pas encore démontré [Stupp 2005]. Les radiothérapies classiquement mises en œuvre pour le traitement des gliomes utilisent des faisceaux polychromatiques de photons de haute énergie (6 à 25 MeV) et délivrent une dose de 58 à 60 Gy, en fractions de 1,8 à 2 Gy [Behin 2003]. La plupart du temps, elles contrôlent de façon transitoire seulement la croissance tumorale, puisque les récurrences sont fréquentes et surviennent dans un périmètre de 2 à 3 cm autour de la cavité de résection. L'efficacité des radiothérapies est sévèrement limitée par la tolérance des tissus sains très sensibles qu'il faut préserver. L'enjeu est donc d'accroître le différentiel entre la dose et la toxicité déposées au niveau tumoral et celles délivrées aux tissus sains environnants.

Une des méthodes proposées pour augmenter cet effet différentiel, consiste à injecter un élément de numéro atomique élevé au sein de la tumeur. L'irradiation par un rayonnement X de basse énergie (50 à 100 keV) entraîne un dépôt de dose élevé et localisé résultant de l'effet photoélectrique sur les atomes lourds présents. Une autre approche repose sur la combinaison pertinente de drogues antinéoplasiques avec une irradiation X. Ces deux techniques sont développées par l'unité INSERM 836, équipe 6, à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble), sur la ligne de lumière ID17, dédiée aux applications médicales. Elles sont rassemblées sous l'appellation générique *SSR* pour *synchrotron stereotactic radiotherapy* et leur efficacité est évaluée sur des rongeurs porteurs d'un modèle de gliome.

L'accumulation d'un élément lourd ou d'un agent de chimiothérapie au niveau cérébral, en l'injectant par voie systémique, est rendue difficile par la présence de la barrière hémato-encéphalique, dont le rôle est de filtrer et contrôler le passage des molécules à travers l'endothélium vasculaire. Si la perméabilité des capillaires tumoraux est augmentée, permettant aux agents pharmacologiques de s'accumuler préférentiellement dans la tumeur par rapport aux tissus sains, la barrière hémato-encéphalique n'est que partiellement rompue [Walter 1995]. Les distributions de drogues sont par conséquent inhomogènes, et les concentrations ne sont pas assez élevées au sein de la tumeur, pour que l'effet thérapeutique soit effectif. Des méthodes ont été mises au point récemment pour délivrer localement et directement la drogue dans le lit tumoral ou la cavité de résection, évitant également la toxicité systémique. On citera parmi elles les matrices polymères. La plupart de ces techniques sont basées sur le phénomène de diffusion ; leur efficacité reste donc sévèrement limitée car les agents pharmacologiques ne diffusent pas au-delà de quelques millimètres dans le tissu cérébral. Une autre approche, développée dans les années 90s, consiste à appliquer un gradient de pression, il s'agit de la méthode appelée « CED » pour *convection-enhanced delivery* [Bobo 1994]. L'utilisation de la convection permet l'avantage, par rapport à la diffusion, d'obtenir une distribution de drogue plus homogène et contrôlée avec une concentration élevée sur un volume plus étendu.

Ce travail de thèse porte sur la mise en place de la technique de *convection-enhanced delivery* et son application aux traitements des gliomes par chimio-radiothérapie. Il a été réalisé au sein de l'unité INSERM 836, équipe 6, « rayonnement synchrotron et recherche médicale ». Cette équipe qui est associée au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, regroupe à la fois des médecins, physiciens et biologistes. Ces compétences pluridisciplinaires doivent permettre une meilleure compréhension des mécanismes intervenant dans le traitement des tumeurs cérébrales par chimio- et radiothérapie.

Le second chapitre de ce document introduit les spécificités des tumeurs cérébrales et les obstacles aux traitements par chimiothérapie, inhérents à ce type de tumeur. La CED qui apparaît dans ce contexte comme une méthode prometteuse est détaillée. Ce chapitre décrit également les propriétés des drogues antinéoplasiques que nous avons utilisées au cours de cette étude : agents platinés usuels (cisplatine, carboplatine, oxaliplatine) et iodo-désoxyuridine (IUdR), ainsi que leur utilisation par voie intra-cérébrale dans la littérature.

La troisième section décrit les principales techniques expérimentales utilisées. Le rayonnement synchrotron y est brièvement exposé, ainsi que le principe de l'imagerie par tomographie quantitative en rayonnement synchrotron utilisée sur la ligne médicale de l'ESRF. Enfin, cette section présente les techniques nécessaires pour les études précliniques de traitement des tumeurs cérébrales, c'est-à-dire le modèle expérimental de gliome F98, les protocoles d'irradiation et le suivi des animaux.

Le développement de la méthode CED et les résultats expérimentaux obtenus sont exposés dans le chapitre IV. Il contient une étude d'imagerie de la CED par tomographie quantitative en rayonnement synchrotron ainsi que les essais précliniques de chimio-radiothérapie réalisés. Ce chapitre comporte également les aspects de matériels et méthodes qui ont évolué au cours des expériences et au vu des premiers résultats. Par souci de clarté et logique, les études précliniques sont présentées dans un ordre chronologique. Enfin, des résultats préliminaires de quantification par différents procédés d'analyse sont exposés.

Pour finir, une conclusion résume les principaux résultats et évoque les perspectives pour les traitements par chimio-radiothérapie combinés. Ce travail de thèse a donné lieu à deux publications qui sont jointes en annexe à ce document. Une troisième décrivant les résultats obtenus avec l'IUdR vient d'être soumise à IJRB.

II PROBLÉMATIQUE

II.1 Les gliomes

Durant ces dernières décennies, des avancées médicales et chirurgicales ont permis une augmentation globale de la survie des patients atteints de cancers hors du système nerveux central. Cependant, la survie des patients atteints de gliomes malins est restée quasiment inchangée.

II.1.1 Epidémiologie

II.1.1.1 Désignation et classification des tumeurs cérébrales

Bien que les tumeurs cérébrales soient relativement rares comparées à d'autres types de cancers comme celui de la prostate, des poumons ou du sein, elles constituent une importante source de mortalité et d'invalidité. D'après le *Central Brain Tumor Registry of the US*, l'incidence des tumeurs primaires du système nerveux central est de 14,1 pour 100 000 personnes ; parmi ces lésions, plus de 36 % sont des gliomes malins. Les néoplasmes gliaux (*glial neoplasm*) ou gliomes représentent les tumeurs cérébrales primaires les plus courantes chez les adultes (50 %), suivies par les méningiomes (~25 %) [Bernstein 2000, chapitre 1]. Cependant, la catégorie des gliomes est très hétérogène, comprenant des lésions aussi bien bénignes que hautement malignes [Rainov 2006; Chinot 1996, chapitre 2].

Le type de tumeur est presque toujours établi par examen histologique. Le diagnostic pathologique comprend alors une classification, c'est-à-dire la désignation d'un type de tumeur selon la *World Health Organization* (WHO), et un grade qui évalue la malignité de la lésion (grade I étant biologiquement bénin et grade IV étant hautement malin).

Histologiquement, on distingue trois catégories principales de tumeurs cérébrales gliales (ou gliomes), toutes dérivées de cellules gliales : les astrocytomes (les plus fréquentes), les oligodendrogliomes, les oligoastrocytomes ; chacune de ces catégories pouvant évoluer vers la forme la plus maligne : les glioblastomes. On rencontre parfois un sens plus restreint des gliomes qui désigne uniquement les tumeurs dérivées des astrocytes (astrocytomes et glioblastomes), tumeurs primitives du système nerveux central les plus fréquentes chez l'enfant comme chez l'adulte [Chinot 1996, chapitre 1].

Parmi les gliomes, il faut distinguer les gliomes bien délimités qui sont pour la plupart bénins et soignés par résection chirurgicale (les plus courants étant les astrocytomes pilocytiques, WHO grade I), des gliomes dits « diffus », cas les plus fréquents dans les hémisphères cérébraux des patients mais non résécables.

Les gliomes diffus sont ensuite classés par critères histologiques afin d'estimer leur évolution biologique et le pronostic vital. Cette classification histo-pronostique en grades permet de proposer la stratégie thérapeutique la mieux adaptée. La WHO classe les gliomes en « *low grade* » (grade II), anaplasique (grade III), et glioblastomes (grade IV) ; les gliomes de grades III et IV sont communément appelés gliomes malins ou de haut grade.

II.1.1.2 Caractéristiques des gliomes malins (anaplasique et glioblastome)

Au moins 80 % des gliomes malins sont des glioblastomes. Les gliomes peuvent apparaître n'importe où dans le cerveau mais ils affectent généralement les hémisphères cérébraux. Le ratio homme/femme parmi les personnes touchées est de 3:2. Les astrocytomes anaplasiques apparaissent vers 40-50 ans alors que les glioblastomes surviennent vers 60-70 ans [DeAngelis 2001].

Les gliomes malins surviennent typiquement dans les lobes de la matière blanche ou dans la matière grise profonde. Ils sont caractérisés par une expansion infiltrante diffuse. Autrement dit, ces gliomes sont constitués de cellules non seulement hautement proliférantes mais également exceptionnellement migrantes et possédant de nombreuses altérations génétiques, ce qui les rend très résistantes aux thérapies antiprolifératives.

Par conséquent, aucune délimitation nette n'existe entre la tumeur et les tissus sains environnants d'où la difficulté d'une résection chirurgicale complète. Un autre problème se pose lors de l'imagerie de ces tumeurs, que ce soit par tomographie X ou IRM, car seules les parties ayant une densité élevée de cellules tumorales ou une forte néoangiogenèse sont repérées ; les zones à faibles densités de cellules invasives ainsi que les capillaires néoplasiques restent quant à eux invisibles.

II.1.1.3 Incidence des gliomes

L'incidence représente le nombre de nouveaux cas d'une maladie dans une population donnée et pendant un période fixée. Les incidences calculées sont basées sur des études cliniques qu'il est difficile de synthétiser, puisqu'elles diffèrent par leurs critères d'inclusion, leur population de référence, la période d'étude et les critères histologiques. Des tendances peuvent être relevées mais il n'est pas étonnant de voir varier l'incidence globale des gliomes de 1,45 à 6,5/an et pour 100 000 personnes, suivant les études ; il en va de même pour les glioblastomes dont l'incidence est estimée entre 1,25 et 4,05/an et pour 100 000 personnes [Chinot 1996].

II.1.1.4 Pronostic vital

Malgré les avancées technologiques en médecine et chirurgie ainsi que la meilleure compréhension de la génétique des cellules tumorales, la survie des patients atteints de gliomes malins est restée quasiment inchangée ces dernières décennies. La médiane de survie est généralement de 18 à 20 mois pour les astrocytomes anaplasiques (WHO grade III), et 8 à 12 mois pour les glioblastomes (WHO grade IV).

Jusqu'à présent, le traitement des gliomes de haut grade demeure essentiellement palliatif, puisque même la résection la plus radicale ne peut qu'augmenter faiblement la durée de vie du patient. A l'heure actuelle, aucun traitement n'est capable d'arrêter la progression de ce type de tumeur ou sa récurrence.

II.1.2 Développement tumoral et barrière hémato-encéphalique

II.1.2.1 Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique normal de développement ou de cicatrisation de blessure, qui implique la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants. L'angiogenèse représente également une étape fondamentale du passage des tumeurs d'un état de dormance à un état malin. Il s'agit alors du développement anarchique d'une néovascularisation qui va permettre l'apport d'éléments nutritifs et d'oxygène indispensables à la croissance tumorale et à la dissémination métastatique [Carmeliet 2000].

II.1.2.2 Barrière hémato-encéphalique : structure et fonction

La barrière hémato-encéphalique (BHE ou BBB pour l'acronyme anglais *Blood Brain Barrier*) a été découverte en 1885 par Paul Ehrlich. Celui-ci remarqua qu'en injectant un colorant bleu dans le sang des lapins, presque tous les organes se coloraient, excepté le cerveau et la moelle épinière. Par la suite, il a été montré que la BHE sert à protéger le fonctionnement du cerveau, de la moelle épinière et des racines nerveuses intradurales, en empêchant les molécules d'une certaine taille de passer à travers l'endothélium vasculaire [Lo 2001]. Ainsi, elle assure un environnement stable nécessaire au bon fonctionnement des neurones. Pour cela, les cellules endothéliales des capillaires cérébraux présentent des jonctions très serrées (Figure II-1) et résistantes qui les rendent moins perméables aux larges molécules que la plupart des autres vaisseaux sanguins du corps [Bernstein 2000, chapitre 5; Rautio 2004; Jain 2007].

D'un point de vue physiologique, un lien existe entre la solubilité lipidique d'une drogue et sa capacité à passer la BHE. On peut distinguer plusieurs fonctions de la BHE :

- contrôler les échanges de nutriments entre le sang et le système nerveux central ;
- transporter sélectivement certaines molécules à travers l'endothélium par des systèmes de transports spécialisés ;
- modifier ou métaboliser certaines substances dans le sang ou le CNS (système nerveux central).

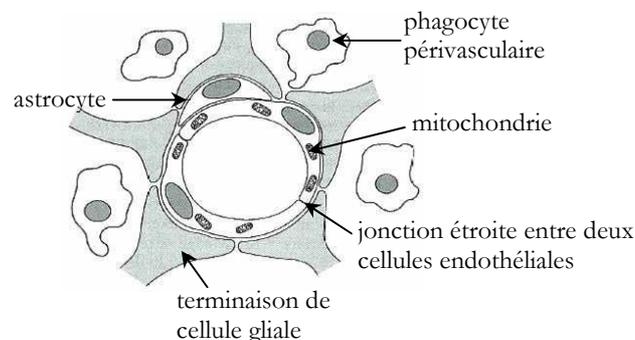


Figure II-1 : Schéma d'un capillaire du système nerveux central. Les cellules endothéliales séparées par des jonctions étroites forment la barrière hémato encéphalique (*d'après [Bernstein 2000, chapitre 5]*).

II.1.2.3 Altération de la BHE et effet des tumeurs

La BHE peut être rompue dans des conditions bien particulières comme l'hypertension, l'inflammation ou l'hyperthermie. La plupart des tumeurs cérébrales produisent des facteurs stimulant l'angiogenèse, ce qui engendre une prolifération des capillaires à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la tumeur. La perméabilité de ces capillaires est augmentée par rapport à des capillaires normaux, on parle alors de BHE lésée, rompue ou perméable ; ce phénomène va

faciliter le passage des agents de contraste utilisés en tomographie X ou en IRM et permettre par là même d'identifier les zones tumorales. Il est aussi possible de léser temporairement la BHE, par l'irradiation ou en utilisant des agents osmotiques comme le mannitol [Yang 1996; Adam 2003a].

Cependant, des mesures quantitatives de la perméabilité des capillaires, sur modèle animal ou sur gliomes humains, ont montré que la perméabilité de la BHE dans les gliomes varie et augmente de 10 à 30 fois par rapport au cerveau sain [van Vulpen 2002; Bernstein 2000, chapitre 5]. D'autre part, la perméabilité des vaisseaux tumoraux est hétérogène : elle présente de fortes variations temporelles et spatiales [Jain 1999; Jain 2007]. Ainsi, bien que les capillaires fuient, la perméabilité de la BHE reste modeste quant à certains composés solubles dans l'eau, gênant l'action d'agents antinéoplasiques administrés par voie systémique [Walter 1995]. De plus, certaines cellules cancéreuses gliales peuvent migrer à distance des zones où la BHE est altérée.

II.1.3 Traitements conventionnels

Les tumeurs néoplasiques du système nerveux central ont des caractéristiques bien particulières qui les distinguent des autres tumeurs. Ainsi, elles conduisent au décès du patient pour différentes raisons :

- elles grossissent dans un espace confiné et peuvent comprimer des fonctions vitales qui ne sont pas forcément touchées par la tumeur,
- elles peuvent envahir des centres nerveux critiques.

D'autre part elles sont souvent accompagnées d'œdèmes qui peuvent avoir le même effet que la masse tumorale [Prados 1996].

Le traitement conventionnel des tumeurs cérébrales consiste en une résection chirurgicale si elle est possible ; le plus souvent, l'association radiothérapie-chimiothérapie est réalisée. Les stratégies sont variables selon le grade et la localisation [Collins 2007].

II.1.3.1 Ablation chirurgicale

L'ablation chirurgicale doit être la plus totale possible, ce qui est souvent rendu impossible par l'aspect infiltratif des lésions. Les gliomes primaires ne métastasent quasiment jamais, c'est pourquoi les critères d'opérabilité sont liés à la position (par rapport à des centres critiques comme le tronc cérébral (*brain stem*), la profondeur et l'infiltration de la tumeur. Cette modalité de traitement ne contrôle la maladie que durant quelques mois chez les patients atteints de glioblastomes.

II.1.3.2 Radiothérapie

La chirurgie est généralement suivie de radiothérapie adjuvante, ce qui augmente significativement la survie dans le cas des gliomes anaplasiques. La plupart des patients reçoivent une dose totale de 55 à 60 Gy, souvent par fractions de 2 Gy, sur une région englobant la tumeur avec une marge latérale additionnelle de 2 cm [Bernstein 2000, chapitre 15]. Des efforts ont été menés pour intensifier la radiothérapie de façon très localisée dans le lit tumoral, notamment avec des techniques comme la brachythérapie, des radio-sensibilisateurs ou des sources radioactives, mais cela n'a pas conduit à une augmentation supplémentaire de la survie.

II.1.3.3 Chimiothérapie

Enfin, l'utilisation additionnelle de la chimiothérapie avec une irradiation cérébrale, demeure controversée. Les drogues sont utilisées seules ou combinées car leurs mécanismes d'action diffèrent. Cependant, aucune combinaison ne s'est révélée vraiment efficace pour traiter les tumeurs du CNS. L'agent le plus étudié et le plus efficace pour le moment reste la carmustine (BCNU) [DeAngelis 2001]. Si cette drogue nitrosurée est souvent prescrite de façon adjuvante aux Etats-Unis, le bénéfice thérapeutique par rapport à la radiothérapie seule n'a pas été prouvé ; bien qu'on constate davantage de survivants à long terme, la différence de survie n'est pas significative [Stupp 2005].

La plupart des patients ont des récurrences tumorales, dans une zone de 2 cm autour de la cavité de résection chirurgicale originale. Dans ce cas, une seconde résection est envisagée, tout comme de la radiochirurgie stéréotaxique pour des récurrences localisées. Le traitement au témozolomide, administré oralement, est utilisé également : il a donné pour l'instant les meilleurs résultats de survie [Stupp 2005] (voir paragraphe ci-après). Malgré les traitements agressifs décrits précédemment, la plupart des patients décèdent de la maladie, avec une médiane de survie d'environ 3 ans pour les patients atteints d'astrocytomes anaplasiques et de seulement 1 an pour ceux atteints de glioblastomes [Bernstein 2000, chapitre 24].

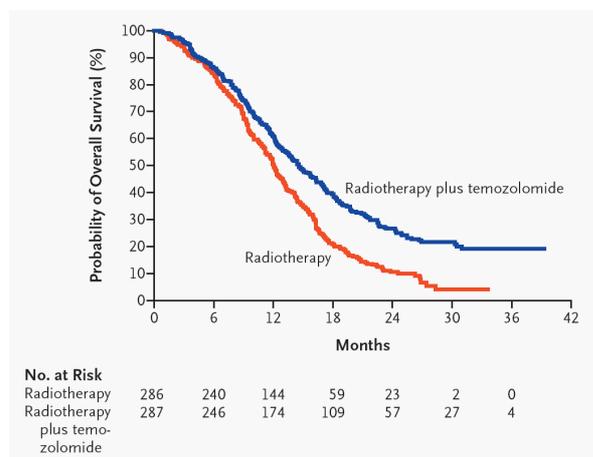
II.1.3.4 Témzolomide

L'essai clinique de phase 2 réalisé par Stupp *et al.* [Stupp 2005], compare radiothérapie seule (RT) et radiothérapie accompagnée de témozolomide en chimiothérapie concomitante ou adjuvante (Figure II-2). Le témozolomide est un médicament anticancéreux de synthèse de la famille des alkylants, utilisé par voie orale. Cette étude, menée sur des groupes de 286 et 287 patients, a montré un bénéfice thérapeutique statistiquement significatif du traitement combiné, avec peu de toxicité additionnelle. Le taux de survie à deux ans est de 26,5 % pour la

combinaison contre 10,4 % pour la RT seule. L'espérance de survie moyenne pour le traitement combiné n'est cependant augmentée que de 2,5 mois. Aucune toxicité additionnelle n'a été observée pour le moment.

Il s'agit à ce jour, de la meilleure association thérapeutique pour la prise en charge de patients atteints de glioblastomes. Des essais précliniques sont également menés afin de délivrer cette drogue directement par injection intracérébrale [Heimberger 2000].

Kaplan–Meier Estimates of Overall Survival According to Treatment Group.
The hazard ratio for death among patients treated with radiotherapy plus temozolomide, as compared with those who received radiotherapy alone, was 0.63 (95 percent confidence interval, 0.52 to 0.75; $P < 0.001$).



Overall and Progression-free Survival According to Treatment Group.*

Variable	Radiotherapy (N=286)	Radiotherapy plus Temozolomide (N=287)
	<i>value (95% CI)</i>	
Median overall survival (mo)	12.1 (11.2–13.0)	14.6 (13.2–16.8)
Overall survival (%)		
At 6 months	84.2 (80.0–88.5)	86.3 (82.3–90.3)
At 12 months	50.6 (44.7–56.4)	61.1 (55.4–66.7)
At 18 months	20.9 (16.2–26.6)	39.4 (33.8–45.1)
At 24 months	10.4 (6.8–14.1)	26.5 (21.2–31.7)
Median progression-free survival (mo)	5.0 (4.2–5.5)	6.9 (5.8–8.2)
Progression-free survival (%)		
At 6 months	36.4 (30.8–41.9)	53.9 (48.1–59.6)
At 12 months	9.1 (5.8–12.4)	26.9 (21.8–32.1)
At 18 months	3.9 (1.6–6.1)	18.4 (13.9–22.9)
At 24 months	1.5 (0.1–3.0)	10.7 (7.0–14.3)

* A total of 160 patients in the radiotherapy group and 60 patients in the radiotherapy-plus-temozolomide group received temozolomide as salvage therapy. CI denotes confidence interval.

Figure II-2 : Comparaison de la survie des patients traités avec de la radiothérapie seule ou combinée à du témozolomide : courbes de Kaplan-Meier et tableau statistique associé [Stupp 2005].

Au total, malgré de très nombreux travaux, aucune méthode ne présente aujourd'hui d'efficacité thérapeutique en terme de survie au long cours [Jain 2007; Collins 2007].

II.1.4 Vers de nouvelles stratégies pour délivrer efficacement des drogues

II.1.4.1 Quels sont les obstacles à la chimiothérapie intracérébrale ?

La thérapie conventionnelle des tumeurs cérébrale consiste en une chirurgie suivie d'une irradiation, l'administration de chimiothérapie étant toujours controversée. Les recherches s'intensifient donc, à la fois pour trouver de nouvelles drogues, mais aussi pour optimiser les moyens d'injection : la drogue doit être délivrée de façon contrôlée et localisée.

L'ingestion orale et l'injection intraveineuse sont les méthodes habituelles pour délivrer des agents pharmacologiques. Elles ne permettent cependant pas d'obtenir des concentrations élevées

de drogues dans les tumeurs intra crâniennes, à cause notamment de la BHE, et s'accompagne d'un niveau élevé de toxicité systémique.

Nous avons vu précédemment que la BHE empêchait la plupart des drogues de passer l'endothélium capillaire. D'autre part, les micro-vaisseaux tumoraux ont tendance à être anormaux (Figure II-3), souvent dilatés et tortueux, ce qui va modifier le flux sanguin et la pression interstitielle [Carmeliet 2000; Lesniak 2004]. En général, comme les vaisseaux sanguins fuient de plus en plus, la pression interstitielle intratumorale augmente [Rautio 2004; Jain 2007]. Cette surpression engendre un flux net de liquide depuis le centre vers la périphérie de la tumeur et les tissus environnants. Certains vaisseaux tumoraux ont un diamètre réduit. Par conséquent, le flux et la pénétration des agents pharmacologiques depuis le sang vers le parenchyme tumoral est fortement limité.

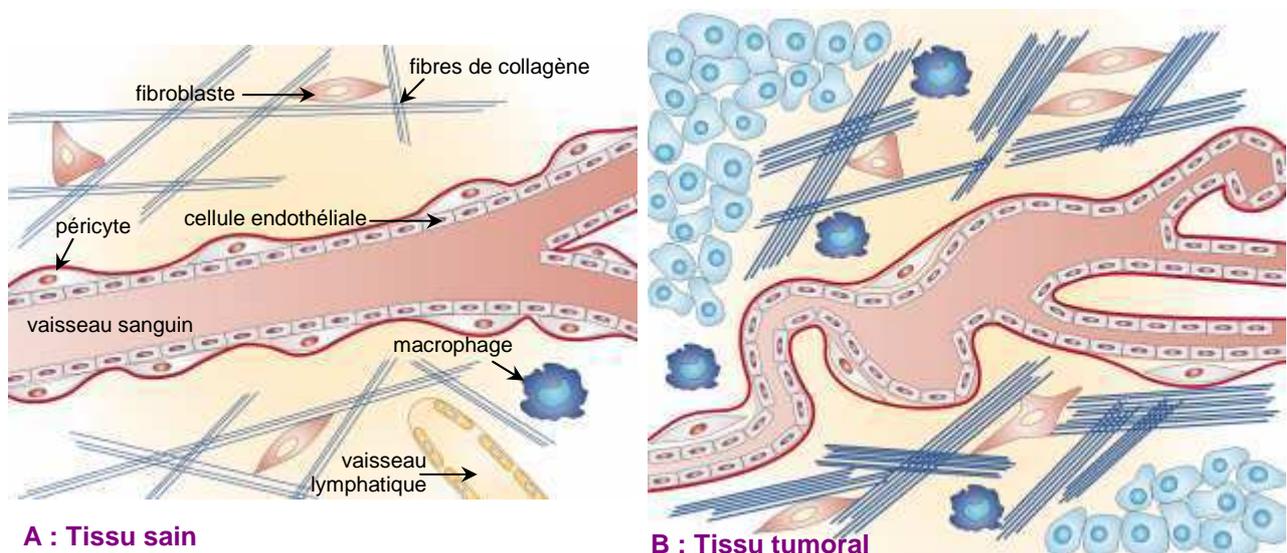


Figure II-3 : Différences structurales entre les tissus sains et tumoraux (*d'après [Heldin 2004]*).

(A) Dans les tissus sains, les cellules endothéliales des vaisseaux présentent des jonctions serrées et forment une couche lisse. La matrice extracellulaire est composée d'un réseau de collagène peu dense et contient peu de fibroblastes et macrophages. Des vaisseaux lymphatiques sont présents.

(B) Les vaisseaux sanguins des tissus tumoraux fuient, et leur forme irrégulière induit un flux sanguin inefficace. On trouve peu de vaisseaux lymphatiques. Le réseau de collagène est dense et rigidifie le tissu tumoral. Le nombre croissant de fibroblastes augmente la tension entre les fibres de collagène. Ces modifications entraînent notamment une augmentation de la pression interstitielle dans le tissu tumoral.

II.1.4.2 Stratégies développées

En raison de ces barrières naturelles, qui rendent ineffectives les chimiothérapies systémiques, de nouvelles méthodes d'injection sont développées. Il s'agit d'obtenir une haute concentration de la drogue dans la tumeur tout en évitant la toxicité systémique associée. On peut distinguer les cinq approches différentes décrites ci-après :

- augmenter la pénétration de la drogue à travers la BHE

Il s'agit là de modifier les propriétés chimiques et/ou structurelles de la drogue pour qu'elle pénètre davantage tout en restant efficace du point de vue pharmacologique (Figure II-4, A).

Cette technique a été utilisée notamment pour la carmustine (BCNU), en créant 2 variantes lipophiles : la lomustine et la semustine. Malheureusement, lors d'essais cliniques, aucun bénéfice thérapeutique n'a été révélé par rapport à la carmustine.

Une alternative pour augmenter l'aspect lipophile d'une drogue, consiste à l'encapsuler dans une sphère lipidique appelée liposome. Des essais précliniques sur modèle animal (9L, C6) ont été menés dans ce sens avec différents produits : drogue antinéoplasique (cisplatine, doxorubicin, paclitaxel), ou traceurs (fluorophore, gadolinium). Ces études ont montré que les liposomes permettaient une réelle accumulation des agents (drogue et traceur) au sein de la tumeur et une augmentation de la survie des rats traités [Huynh 2006]. D'autre part, lors d'essais cliniques de phase I/II chez des patients atteints de tumeurs cérébrales, il a été montré que ces liposomes stabilisaient la maladie et prolongeaient la survie [Lesniak 2004].

Parmi les techniques basées sur une approche chimique autre que les analogues lipophiles, on peut citer également l'utilisation des prodrogues [Rautio 2004; Misra 2003]. Il s'agit de substances pharmacologiques inactives lorsqu'elles sont administrées et qui doivent subir une biotransformation dans l'organisme pour que s'exerce leur activité. Les propriétés pharmacodynamiques intrinsèques de la molécule ne sont pas modifiées, à la différence de ses propriétés pharmacocinétiques. Cette approche avec des prodrogues nécessite souvent l'intervention de « transporteurs » et récepteurs de l'organisme (en anglais, on parle de *carrier/vector and receptor mediated transport*).

- lésier temporairement la BHE

En utilisant des agents osmotiques tels que le mannitol, il est possible de faire sortir l'eau des cellules endothéliales, les rendant ainsi plus étroites, et élargissant le gap qui les sépare (Figure

II-4, B). Le RMP-7, agoniste¹ du récepteur B₂ de la bradykinine², permet également de rompre la BHE [Misra 2003]. Cet analogue de la bradykinine a été développé pour stimuler les récepteurs des cellules endothéliales qui composent la BHE tumorale, et ainsi augmenter la perméabilité de la barrière [Dean 1999; Bartus 2000; Emerich 2000]. Les études expérimentales ont montré (pour le mannitol et le RMP-7) une augmentation de la pénétration des drogues dans le parenchyme cérébral, mais cela ne s'est pas encore traduit en réel bénéfice du point de vue clinique [Lesniak 2004].

– utiliser des cathéters placés dans le tissu interstitiel

Dans ce cas, on s'affranchit directement de la BHE (Figure II-4, C). Cette technique a été utilisée notamment en implantant dans les ventricules cérébraux des cathéters reliés à des réservoirs contenant la drogue (BCNU ou cisplatine, par exemple). Elle s'est montrée effective dans des cas ponctuels mais n'a pas prouvé son efficacité pour des essais cliniques à grande échelle.

– placer des polymères ou des puces directement dans le lit tumoral

L'utilisation des polymères est décrite depuis 1976. Ils permettent une libération progressive et contrôlée de macromolécules qui vont diffuser au travers des micropores d'une matrice (Figure II-4, D) [Sampath 1998]. Composé toxique et de demi-vie très courte lorsqu'il est injecté par voie intra veineuse, la carmustine a prouvé son efficacité et sa non-toxicité lorsqu'elle est incorporée dans des polymères. Par conséquent, des essais cliniques de phases I/II puis III ont été menés, consistant après ablation chirurgicale de la tumeur, à placer des polymères de carmustine dans la cavité tumorale.

– injecter par Convection enhanced delivery (CED)

La CED représente une méthode potentielle pour administrer des drogues dans des régions du cerveau difficilement opérables, comme le tronc cérébral. L'agent pharmacologique est délivré par convection, non par diffusion, ce qui permet de s'affranchir de paramètres tels que le poids moléculaire de la drogue. De fortes concentrations peuvent être atteintes dans de larges volumes, tout en minimisant les effets de toxicité systémique. Cette technique récente est décrite plus précisément dans le paragraphe II.2, p.16.

¹ Un agoniste est une substance qui se lie à un récepteur et déclenche sa réponse.

² La bradykinine est un polypeptide endogène, vasodilatateur. La stimulation du récepteur B₂ augmente la perméabilité capillaire.

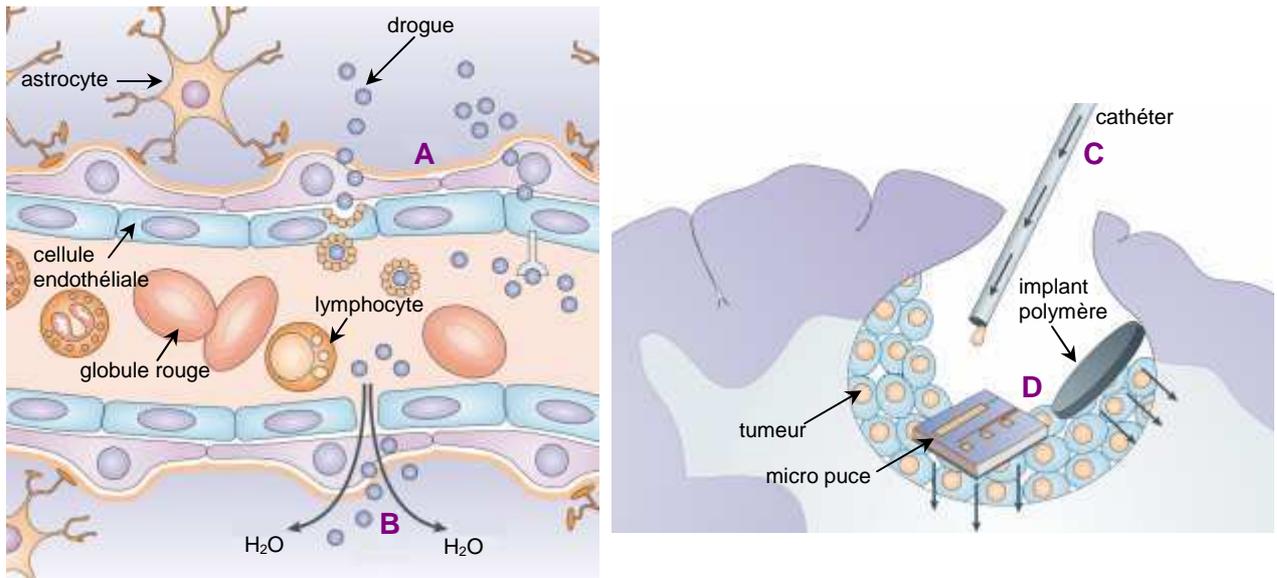


Figure II-4 : La barrière hémato-encéphalique (BBE) est formée de jonctions étroites entre les cellules endothéliales, et empêche le passage de molécules thérapeutiques. Différentes stratégies sont envisageables pour administrer des drogues au niveau du système nerveux central : augmenter la perméabilité des drogues à travers la BBE (A), léser temporairement la BBE (B), implanter directement des cathéters dans le tissu interstitiel (C), placer des implants polymères ou des micro-puces dans le lit tumoral (D).

d'après [Lesniak 2004].

II.2 Méthode de « Convection-Enhanced Delivery » (CED)

II.2.1 Définitions

II.2.1.1 Terminologie

La CED est une approche relativement nouvelle, introduite par Bobo, Oldfield, Morrison et leurs collaborateurs en 1994, pour délivrer des drogues dans le cerveau [Bobo 1994; Morrison 1994]. Elle permet la distribution par convection, de fortes concentrations de drogues, et ceci dans de larges volumes tissulaires, tout en évitant la toxicité systémique.

Plusieurs termes sont utilisés dans la littérature pour décrire cette micro-infusion générant un gradient de pression, *convection-enhanced (drug) delivery* (CED) étant le plus fréquent [Bobo 1994]. On rencontre également les expressions *high-flow microinfusion delivery* [Morrison 1994], *high-flow interstitial brain infusion* [Kroll 1996], *intraparenchymal controlled-rate infusion* [Broadus 1998], ou encore *positive-pressure infusion* [Prabhu 1998 ; Chen 2002], et enfin *intracerebral chysis* [Bruce 2000; Kaiser 2000].

II.2.1.2 Contexte : s'affranchir de la barrière hémato-encéphalique (BHE)

Le fait que la plupart des drogues pénètrent difficilement dans le système nerveux central, lorsqu'elles sont administrées par voie systémique, est connu depuis la mise en évidence par Ehrlich de la BHE en 1885. Cette limitation est d'autant plus prononcée que les molécules sont polarisées et ont un poids moléculaire élevé, ce qui est le cas pour de nombreuses drogues. Une des possibilités pour y remédier est de contourner la BHE et de délivrer directement la drogue dans le fluide cérébrospinal ou le parenchyme cérébral. Cependant, la distribution dans le parenchyme de beaucoup de composés est sévèrement limitée cette fois-ci par la diffusion, phénomène faible dans les tumeurs et le tissu interstitiel cérébral, mais également lent relativement à la clairance dans les tissus.

II.2.1.3 Diffusion

II.2.1.3.1 Diffusion de la matière et lois de Fick

En sciences des matériaux, la diffusion désigne la migration d'espèces chimiques dans un milieu. On distingue deux types de diffusion de la matière. Si elle est régie uniquement par le mouvement d'une espèce à cause de l'agitation thermique (ou mouvement brownien), on parle d'auto-diffusion. Lorsque la migration a lieu sous l'effet d'une force (électrostatique pour des espèces

chargées, chimique, à cause d'un gradient de température et/ou de concentration), elle se combine à l'auto-diffusion et est appelée simplement diffusion.

Phénoménologiquement, la diffusion suit les lois de Fick. La première énonce que le flux de diffusion est proportionnel au gradient de concentration. Mathématiquement, si on considère une espèce chimique i dans un milieu m , une surface S , et $C_i(x,y,z)$ la concentration de i en un point donné, on peut décrire le vecteur *densité de courant de particules* \vec{j}_i (molécule.s⁻¹.m⁻²) par l'équation suivante :

$$\vec{j}_i = -D_i^m \cdot \overrightarrow{\text{grad}}(C_i) \quad \text{équation II-1}$$

où D_i^m (m².s⁻¹) est le coefficient de diffusion de l'espèce i dans le milieu m ; il dépend de la matière étudiée ainsi que des paramètres thermodynamiques comme la température. Le signe négatif dans l'équation indique que physiquement, le flux de diffusion se fait dans le sens contraire du gradient : de la zone la plus concentrée en soluté, vers la zone la moins concentrée.

La seconde loi est dérivée de la première et applique la loi de conservation des espèces selon laquelle la variation de quantité d'espèce dans un volume donné est égale au bilan des flux entrant et sortant de ce volume. Elle s'exprime par :

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \text{div} \cdot \vec{j}_i = 0 \quad \text{équation II-2}$$

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \text{div} \cdot (-D_i^m \cdot \overrightarrow{\text{grad}}(C_i)) = 0 \quad \text{équation II-3}$$

II.2.1.3.2 Diffusion d'un composé dans un tissu biologique

La diffusion d'un composé dans un tissu donné dépend essentiellement de 2 paramètres : le gradient de concentration présent et la diffusivité de ce composé dans ce tissu. La diffusion des composés à fort poids moléculaire est faible et leur distribution va donc être restreinte. A contrario, les composés de faible poids moléculaire ont une diffusivité plus élevée mais ils sont repris plus facilement par les capillaires et le métabolisme, conduisant de la même façon à une distribution peu étendue.

II.2.1.4 Convection d'une solution

II.2.1.4.1 Convection et transfert de matière

Le transport par convection se caractérise par un transfert de matière. Pour expliquer simplement ce phénomène, on peut faire l'analogie avec le cas de la chaleur : la convection désigne un

transfert thermique qui s'effectue avec transfert de matière (les autres modes étant la conduction ou le rayonnement). On distingue alors la convection naturelle : lorsqu'une zone de fluide change de température, sa masse volumique se trouve modifiée par rapport à celle du fluide environnant induisant un mouvement spontané lié à la poussée d'Archimède. On parlera de convection forcée lorsque le mouvement est provoqué par une circulation artificielle du fluide, notamment grâce à des systèmes de pompes.

II.2.1.4.2 Convection d'un fluide dans les tissus biologiques

La convection d'un fluide, désignée en anglais par *fluid convection* ou *bulk flow*, dans les tissus est un phénomène qui résulte d'un gradient de pression. Il est à noter que le transport du fluide interstitiel cérébral peut se faire par convection en conditions normales, ou en cas d'œdème vasogénique. L'idée a donc été d'appliquer et de maintenir un gradient de pression lors d'une injection interstitielle cérébrale afin de transporter le fluide (et donc la drogue) par convection.

Pour décrire le transport d'un fluide de concentration C_i par convection, on utilise l'équation suivante :

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \text{div} \cdot \vec{j}_i = 0 \quad \text{avec} \quad \vec{j}_i = C_i \vec{v}_i$$

équation II-4

$$\text{soit} \quad \frac{\partial C_i}{\partial t} + \text{div} \cdot (C_i \vec{v}_i) = 0$$

où \vec{v}_i est le vecteur vitesse du fluide.

II.2.1.5 Comparaison convection/diffusion

Pour administrer un agent pharmacologique dans le cerveau, de nombreuses méthodes sont basées sur la diffusion, notamment les techniques utilisant les polymères [Sipos 1997; Sampath 1998; Storm 2002] ou certaines injections locales [Vogelbaum 2005]. Il a été montré que dans les tissus cérébraux, les composés ne diffusent pas au-delà de quelques millimètres du point source.

Ceci pose 2 problèmes :

- si l'agent antinéoplasique est administré dans la cavité tumorale (après résection), par exemple avec des wafers ou des matrices polymères, son périmètre d'action va couvrir seulement quelques millimètres alors que l'on sait que les récurrences tumorales ont lieu dans une zone s'étalant sur 2 cm (voire 4 cm) autour de la cavité [Bruce 2000];
- si la chimiothérapie se fait par voie directe intracérébrale, la diffusion ne permet pas d'atteindre les cellules infiltrantes, éloignées de la masse tumorale.

La CED permet quant à elle d'obtenir des volumes de distribution 5 à 10 fois plus grands qu'avec une diffusion seule, suivant les paramètres choisis pour créer la convection [Morrison 1994; Lieberman 1995]. D'autre part, au niveau de la forme de la distribution de drogue, une diffusion pure conduit à un gradient de concentration qui décroît de façon exponentielle depuis la pointe d'injection vers les tissus environnants (Figure II-5). La convection permet d'obtenir une concentration élevée sur une plus grande distance (par rapport au point d'injection) ; le profil de concentration ressemble à un plateau et décroît de façon abrupte sur les bords [Morrison 1994; Lieberman 1995; Lonser 2002; Yang 2002].

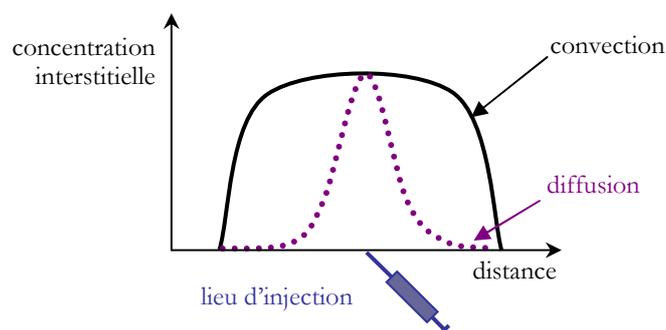


Figure II-5 : Schéma des profils de concentration obtenus en administrant une drogue par convection ou diffusion. La convection permet d'obtenir une concentration élevée plus étendue, la diffusion est associée à une décroissance exponentielle depuis le point d'injection (*d'après [Raghavan 2006]*).

II.2.1.6 Reflux

Avant de détailler les variables principales qui régissent la CED, il faut définir la notion de reflux (en anglais *leakage*, *leakback* ou *backflow*). Il s'agit d'une remontée plus ou moins importante du liquide infusé le long de l'aiguille d'injection, dans un espace entre la surface externe de l'aiguille et les tissus environnants (et non dans le « trou » laissé par le passage de l'aiguille) [Morrison 1999; Vogelbaum 2007]. Le liquide « enveloppe » tout d'abord l'aiguille, puis se disperse dans les tissus voisins avec un débit non contrôlé qui diffère de celui fixé à la pointe de l'aiguille. Ce reflux conduit à une perte de la solution injectée dans d'autres zones du cerveau que le tissu ciblé (voir Figure II-6 p.21 & Figure II-7 p.22) [Chen 1999].

Ce phénomène de reflux peut se produire pour deux raisons différentes. La première, et la plus évidente, est liée aux dommages tissulaires que l'on crée en implantant une aiguille d'injection [Raghavan 2006]. Si le cathéter a mécaniquement rompu les tissus, et ce de façon trop importante (ou irréversible), cela peut engendrer un espace vide (entre la surface externe de l'aiguille et les tissus), laissant la place à du reflux. La deuxième raison est intrinsèque au processus d'injection par convection et peut se produire sans l'espace vide décrit précédemment. La pression

hydrostatique associée à l'injection repousse les tissus qui se décolent petit à petit de l'aiguille [Morrison 1999]. La modélisation de ce phénomène est présentée au paragraphe II.2.3, p.24.

II.2.2 Paramètres importants : approche empirique

Oldfield *et al.* ont introduit cette notion de CED pour des applications en neuro-oncologie [Bobo 1994; Morrison 1994]. De nombreuses études précliniques et cliniques ont suivi pour tenter d'optimiser la CED et comprendre les facteurs complexes qui peuvent l'influencer. Plusieurs variables importantes ont ainsi été mises en avant et sont détaillées ci-après. Leurs conséquences sur la distribution de l'agent injecté ont d'abord été montrées expérimentalement sur modèle animal [Chen 1999]. On notera que des études plus récentes testent certains paramètres d'injection sur des gels d'agarose [Chen 2002; Chen 2004; Krauze 2005b].

Morrison *et al.* ont ensuite développé un modèle mathématique simple pour établir le lien entre le diamètre du cathéter, le débit d'injection, et les paramètres qui vont décrire le flux hydraulique ainsi que la déformation des tissus qui en résultent [Morrison 1999]. Ce modèle est décrit au paragraphe II.2.3, p.24.

II.2.2.1 Débit d'infusion

Le gradient de pression qui va générer le mouvement convectif, est égal à la différence entre la pression intracrânienne et la pression d'injection. Le débit d'injection est donc un paramètre critique pour créer la convection, il est dicté par la résistance des tissus considérés (des différences de résistance ont notamment été décrites entre la matière blanche et la matière grise). Pour obtenir une convection effective, chez un modèle de petit animal, il a été montré que le débit d'injection doit être compris entre 0,5 et 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ [Bobo 1994; Morrison 1994]. En effet, des débits plus faibles limitent l'étendue du volume de distribution, tandis que des débits trop élevés favorisent le reflux. D'autre part, il n'est pas raisonnable d'utiliser des débits supérieurs car la pression hydrostatique générée peut blesser directement les tissus [Krauze 2005b].

Ainsi, Chen *et al.* ont montré (sur des rats Sprague-Dawleys) qu'un débit de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ induisait une perte par reflux de $30,3 \pm 7,8 \%$ du liquide injecté (avec une aiguille 32 gauge) [Chen 1999]. Lors de cette étude prise comme référence dans la littérature, les débits de 0,1 et 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ n'ont entraîné que $4,0 \pm 3,6 \%$ et $5,2 \pm 3,6 \%$ de perte par reflux, respectivement et le liquide injecté

était contenu presque uniquement dans le tissu ciblé (Figure II-6). Par conséquent, $0,5 \mu\text{l}/\text{min}$ est un débit souvent choisi pour les injections par CED chez le rat [Nguyen 2001; Lonser 2002; Degen 2003; Croteau 2005].

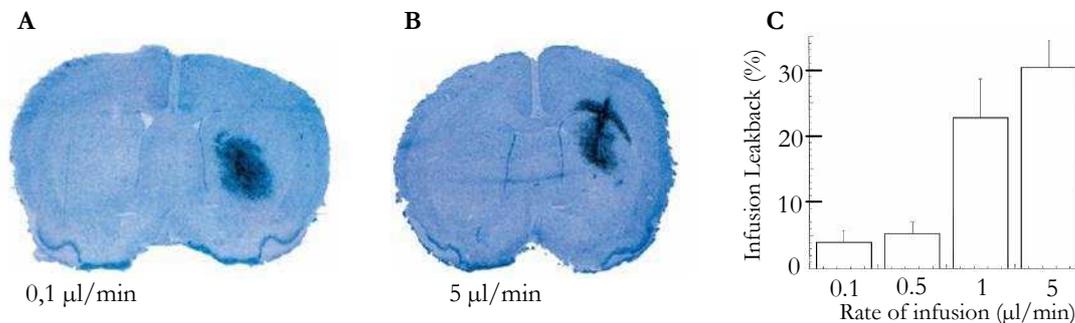


Figure II-6 : Illustration de l'influence du débit d'injection sur la distribution. A et B : superposition d'une coupe coronale et de l'autoradiographie correspondante (étude chez le rat). Pour un débit de $0,1 \mu\text{l}/\text{min}$, le liquide infusé reste confiné dans le *striatum* (A); pour un débit de $5 \mu\text{l}/\text{min}$, l'agent est en partie perdu dans la matière blanche entourant le *striatum* (B). C : graphique indiquant la quantité d'agent perdu par reflux en fonction du débit utilisé. Les autres paramètres d'injection sont inchangés (aiguille 32 gauge, $V_i = 4 \mu\text{l}$) [Chen 1999].

Concernant les études cliniques, des débits allant jusqu'à $10 \mu\text{l}/\text{min}$ ($0,3$ à $0,6 \text{ ml}/\text{h}$) ont été utilisés pour des injections intratumorale et péritumorale [Laske 1997; Rand 2000]. Cependant, les débits les plus élevés (*i.e.* supérieurs à $6,2 \mu\text{l}/\text{min}$) ont provoqué davantage de reflux, notamment dans l'espace subarachnoïde, ce qui peut engendrer une toxicité locale [Kanner 2007].

II.2.2.2 Diamètre de l'aiguille ou de la canule

Plus le diamètre de la canule d'injection est élevé et plus la résistivité des tissus est modifiée. En effet, si on augmente la surface de contact entre les tissus et la canule, la force que les tissus exercent sur la canule est diminuée et la probabilité de reflux est favorisée [Vogelbaum 2005]. Il semble que la taille critique pour éviter le reflux soit d'environ 27 à 28 gauge [Chen 1999]. Il est toutefois préférable d'utiliser des diamètres inférieurs, comme 32 ou 33 gauge, qui permettent de travailler avec des débits supérieurs sans provoquer de reflux (Figure II-7). La conversion pour les diamètres des gauges aux millimètres est explicitée dans le Tableau II-1.

D'autre part, plus le diamètre de la canule est élevé, plus les tissus peuvent être lésés mécaniquement lorsqu'elle est implantée (une valeur de 26 gauge est déjà élevée relativement à la

taille d'un cerveau de rat). Nous avons vu (§ II.2.1.6, p.19) que ces déformations sont l'une des causes possibles du reflux.

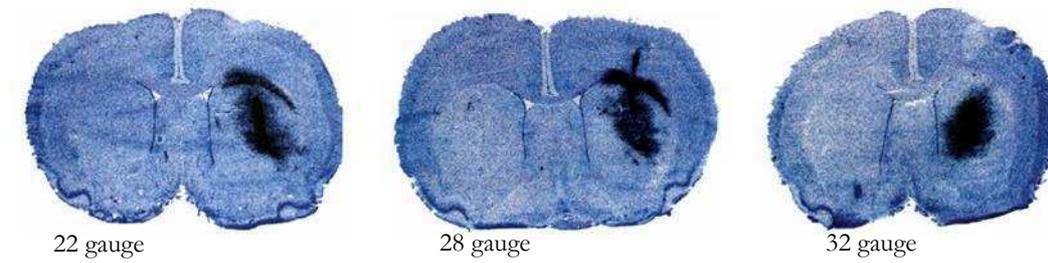


Figure II-7 : Influence de la taille de la canule sur la distribution et la quantité de reflux. Chaque image est la superposition d'une coupe coronale et de l'autoradiographie correspondante (étude chez le rat). La quantité d'agent administré perdue par reflux est de $21,1 \pm 7,5 \%$, $35,7 \pm 8,1 \%$ et $5,2 \pm 3,6 \%$ pour des canules de 22, 28 et 32 gauge, respectivement. Le débit est fixé à $0,5 \mu\text{l}/\text{min}$ et V_i à $4 \mu\text{l}$ [Chen 1999].

Pour l'application clinique, l'utilisation de canules très fine (> 27 gauge) n'est pas toujours aisée, car si la longueur nécessaire est élevée (par exemple < 6 cm), elle peut facilement dévier du plan de sa trajectoire (à moins d'utiliser un matériau très rigide) [Vogelbaum 2005]. Le développement de cathéters spécifiques est donc indispensable au niveau clinique [Krauze 2005b].

Gauge	diamètre nominal [mm]		épaisseur [mm]
	externe	interne	
32	0,24	0,11	0,05
30	0,31	0,16	0,08
28	0,36	0,18	0,09
26s	0,47	0,13	0,18
26	0,46	0,26	0,10
22s	0,72	0,15	0,28
22	0,72	0,41	0,15

Tableau II-1: Taille des aiguilles usuelles : épaisseur et conversion gauge-millimètre.

II.2.2.3 Concentration du composé

Pour calculer le volume de distribution V_d d'un composé, on définit généralement un seuil égal à un pourcentage (classiquement entre 5 et 15 %) de la concentration injectée, ou du signal maximal obtenu dans une image. Il a été montré par Chen *et al.* que la concentration de la solution injectée n'a pas d'influence sur le volume V_d calculé (Figure II-8), ni sur la forme de la distribution obtenue, ou le pourcentage de récupération (pour les expériences réalisées avec des agents radioactifs) [Chen 1999].

On peut expliquer cela grâce aux propriétés intrinsèques de la convection. L'administration d'un agent pharmacologique, par convection, est basée sur un transport de matière (flux de liquide) à travers l'interstitium : le soluté est transporté par le fluide [Prabhu 1998]. Ceci est très différent de la diffusion, phénomène dépendant d'un gradient de concentration.

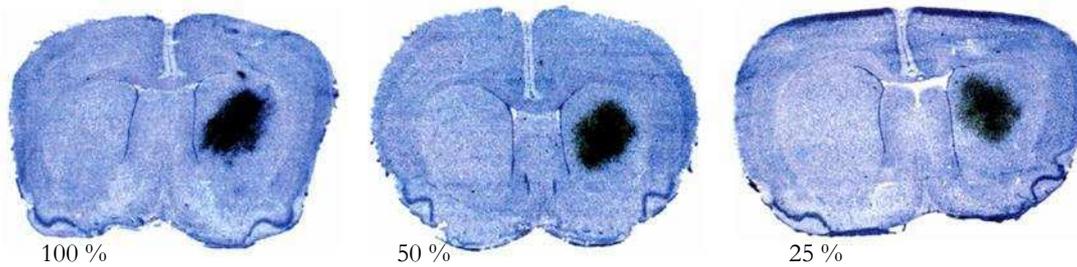


Figure II-8 : Influence de la concentration de l'agent infusé sur la distribution. Chaque image est la superposition d'une coupe coronale et de l'autoradiographie correspondante. Les rats ont été perfusés avec une aiguille de 32 gauge, à un débit de $0,5 \mu\text{l}/\text{min}$ avec $4 \mu\text{l}$ d'une solution de concentration nominale (100 %) ou diluée (50 % et 25 %). Les volumes de distributions calculés pour les 3 concentrations ne sont pas significativement différents ($p > 0,05$) [Chen 1999].

II.2.2.4 Volume de distribution et rapport V_d/V_i

Le volume de distribution V_d obtenu par CED est linéairement lié au volume injecté. Le coefficient de détermination r^2 de la régression linéaire est très proche de 1, que ce soit pour des injections au niveau du tronc cérébral chez le rat [Sandberg 2002] ou le singe [Lonser 2002], au niveau du *striatum* [Saito 2004a] ou du noyau caudé chez le rat [Yang 2002], ou encore dans la matière blanche chez le singe (Figure II-9) [Croteau 2005].

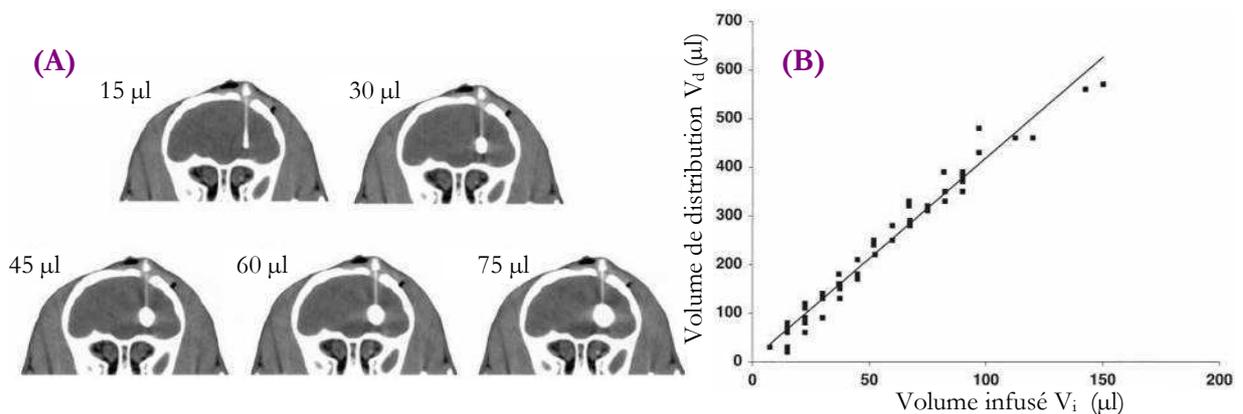


Figure II-9 : Relation linéaire entre volume d'injection (V_i) et volume de distribution (V_d). **(A)** Images tomographiques coronales obtenues au cours d'une injection d'ioipamidol par CED chez un primate. La distribution est sphérique et bien définie. **(B)** Dans cette même étude, V_d a ensuite été tracé en fonction de V_i (pour $n = 4$ primates), démontrant une relation linéaire ($r^2 = 0,97$). Le ratio V_d/V_i calculé est $4,1 \pm 0,7$ (moyenne \pm stdev). Le seuil est fixé à 10 % du signal maximal enregistré [Croteau 2005].

II.2.2.5 Nature de l'agent perfusé

On soulignera que des travaux plus récents montrent l'influence de certaines propriétés de la solution et des molécules injectées, sur la distribution obtenue par CED. Ainsi, la convection est d'autant plus efficace que la solution est visqueuse : l'étendue de la distribution est améliorée tandis que le reflux est minimisé [Mardor 2005; Vogelbaum 2007]. Pour des nanoparticules (20, 40 ou 100 nm) injectées par CED dans le striatum de rats, le volume de distribution calculé est inversement proportionnel à la taille de ces nanoparticules et dépend de leur état de surface [Chen 2005; MacKay 2005].

II.2.3 Modèle mathématique du reflux donné par Morrison *et al.*

Morrison et ses collaborateurs précisent qu'ils ont choisi d'établir un modèle mathématique le moins compliqué possible, qui puisse servir de première approche pour prévoir des paramètres d'expériences faisant appel à la CED. Ce modèle simple s'applique à la matière grise du cerveau (et donc au noyau caudé), plus isotrope que la matière blanche [Morrison 1999].

Certaines théories plus anciennes décrivant les *high flow infusions* dans le tissu interstitiel cérébral, portaient de l'hypothèse suivante : la solution est délivrée à partir d'un point ou d'une petite source sphérique centrée sur l'extrémité du cathéter. Morrison *et al.* introduisent une notion supplémentaire autorisant le reflux : ils considèrent que la pression hydrostatique imposée par le liquide sur le tissu, peut repousser le tissu de la surface du cathéter, et ouvrir un espace annulaire le long du cathéter (Figure II-10).

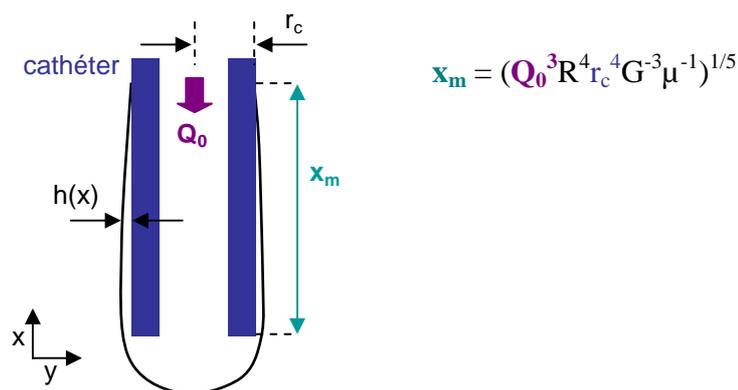


Figure II-10 : Modélisation du reflux liquide survenant autour d'un cathéter (de rayon r_c) placé dans un tissu de résistance R . L'agent pharmacologique (de viscosité μ) est injecté avec un débit Q_0 ; le reflux s'étend sur une distance x_m et forme une couche annulaire d'épaisseur $h(x)$; G est le module de cisaillement (*d'après [Morrison 1999]*).

Afin de garder une mécanique des tissus aussi simple que possible, le modèle se base sur l'approximation suivante : le tissu a un comportement élastique assimilé à une dilatation radiale depuis la surface du cathéter, dans un volume de matière grise environnante, considérée comme un milieu semi-fini et isotrope.

La description mathématique s'appuie sur deux équations qui décrivent le flux dans l'anneau (d'après l'équation de Stokes) et dans le tissu poreux qui l'entoure (d'après la loi de Darcy en milieu poreux); une troisième équation définit la déformation du tissu cérébral sous la pression du fluide.

En résolvant ces équations, on obtient la distance finie x_m parcourue par le reflux :

$$x_m = \text{constante} \times (Q_0^3 R^4 r_c^4 G^{-3} \mu^{-1})^{1/5} \quad \text{équation II-5}$$

où :

- Q_0 est le débit volumique d'injection ($\mu\text{l}/\text{min}$)
- R est la résistance hydraulique du tissu (poreux) ($\text{cm}^{-4} \cdot \text{dyn} \cdot \text{s}$)
- r_c est le rayon du cathéter (cm)
- G est le module de cisaillement des tissus de la matière grise (dyn/cm^2)
- μ est la viscosité à 37 °C ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

Les dynes (dyn) sont une unité cgs de force.

Cela implique donc que le reflux puisse être minimisé en utilisant une aiguille de petit diamètre et un débit d'injection peu élevé, confirmant les résultats expérimentaux présentés précédemment.

Cependant, lorsque l'on injecte de larges volumes, le liquide peut couvrir plusieurs couches successives de tissus différents et traverser la frontière entre matière blanche et matière grise. Dans ce cas, le modèle doit tenir compte du flux du liquide qui suit préférentiellement les fibres, modifiant la géométrie régulière et sphérique obtenue dans un milieu parfaitement isotrope. Dans le cadre de notre étude, ce problème a été rencontré lors d'injections de gros volumes dans le noyau caudé des rongeurs, car le liquide peut s'échapper dans le corps calleux.

II.2.4 Distribution d'une drogue

II.2.4.1 Phénomènes physiologiques modifiant la distribution de drogue

La CED permet d'optimiser la distribution « initiale » (immédiatement après la fin de l'injection) de la drogue à partir de laquelle elle va pouvoir agir sur les tissus. Ainsi, la forme et l'étendue du volume tissulaire couvert par la drogue (*i.e.* juste après la fin de l'injection) dépendent des

paramètres choisis pour établir la convection. A partir de cette distribution, la diffusion, le métabolisme et la perméabilité des capillaires vont prendre le relais et agir différemment suivant les propriétés pharmacologiques de l'agent considéré (Figure II-11).

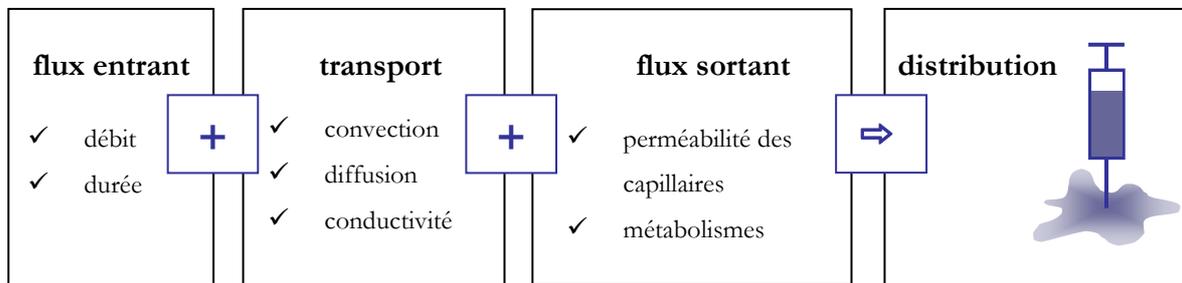


Figure II-11 : Phénomènes impliqués dans la distribution d'une drogue administrée par CED.

Lorsque le gradient de pression (et donc la vitesse associée du fluide) diminue, le produit perfusé disparaît à une vitesse liée à la diffusion, la dégradation lente et la résorption capillaire [Lieberman 1995]. La distribution de drogue initiale est modifiée en conséquence comme illustré sur la Figure II-12.

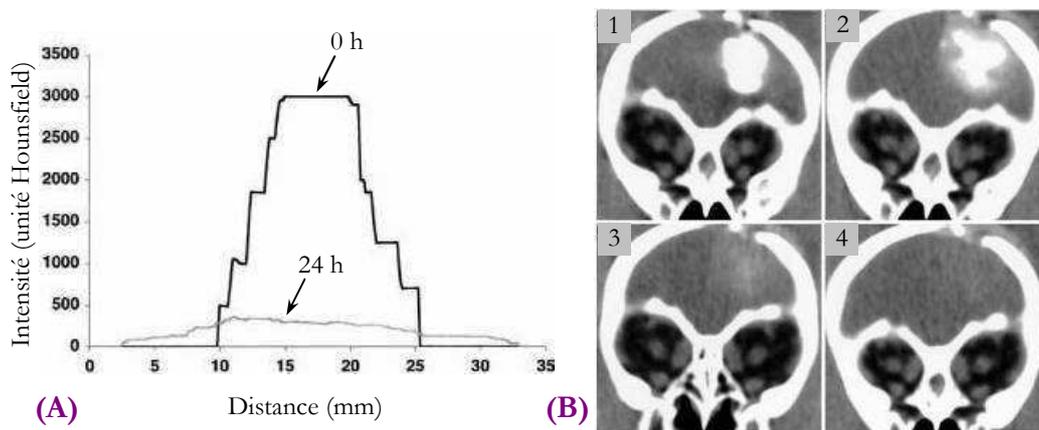


Figure II-12 : Evolution post-injection de la distribution d'un agent. **(A)** Profils de concentrations obtenus sur des images tomographiques (CT) acquises immédiatement ou 24 h après la fin d'une injection d'iopamidol chez un primate. La concentration initiale est relativement uniforme et décroît de façon abrupte, puis s'aplatit à cause de la diffusion et la clairance tissulaire. **(B)** Images CT coronales enregistrées immédiatement (1), 24 h (2), 48 h (3) et 72 h (4) après la fin d'une injection de 150 µl. L'intensité du signal décroît de façon significative à partir de 24 h jusqu'à disparaître à 72 h [Croteau 2005].

II.2.4.2 Evolution temporelle de la concentration

En s'appuyant sur le travail de L.T. Baxter et R.K. Jain [Baxter 1989], Morrison *et al.* décrivent le changement temporel de concentration C en drogue par unité volumique δ de tissu par l'équation suivante [Morrison 1994] :

$$R_d \frac{\partial C_\delta}{\partial t} = D_e \vec{\nabla} \cdot (\Phi \vec{\nabla} C_\delta) - \vec{\nabla} \cdot (\Phi \vec{v}_\delta C_\delta) - \left[\frac{L_p s (1 - \sigma) (p_e - p_\delta)}{e^{Pe_{mv}} - 1} \right] C_\delta - k_{irr} C_\delta \quad \text{équation II-6}$$

(i) (ii) (iii) (iv)

$R_d C_\delta$ représente la concentration totale « libre et liée » dans les espaces intra- et extra-cellulaires. Cette équation de conservation montre que dans un élément volumique différentiel de tissu cérébral, l'évolution de la concentration d'un soluté infusé dépend :

- de la diffusion nette dans cet élément (terme *i* de l'équation). On reconnaît les équations de Fick (décrites au § II.2.1.3.1 p.16) avec D_e la constante de diffusion dans l'espace extra cellulaire et Φ la fraction extra-cellulaire ;
- du gain net apporté par la convection (*i.e.* au flux de matière ou *bulk flow*) liée ici à l'injection (terme *ii*). \vec{v}_δ est le vecteur vitesse du liquide injecté;
- des pertes par diffusion ou convection à travers la microvascularisation (terme *iii*) : il s'agit des échanges à travers la paroi des capillaires. L'objet n'est pas ici de détailler ce terme complexe ; on remarquera simplement qu'il fait intervenir le nombre de Peclet (Pe) qui permet de comparer l'importance de la convection et de la diffusion d'un écoulement (un nombre Pe petit indique un régime diffusif, un nombre Pe élevé indique un régime convectif). Pe_{mv} désigne donc le nombre de Peclet de la microvascularisation ; p_δ est la pression interstitielle, p_e la pression de Starling, L_p est la conductivité hydraulique des capillaires, s leur surface par unité volumique de tissu, p la perméabilité microvasculaire des tissus cérébraux et σ un coefficient de réflexion ;
- des pertes irréversibles dues au métabolisme (terme *iv*). k_{irr} est une constante de dégradation.

Cette équation permet de décrire non seulement la phase de perfusion, qui dépend principalement de la convection (donc du terme *ii*) mais également la phase suivante où le transport diffusif (terme *i*) beaucoup plus lent, devient prépondérant. Pour connaître toute la zone couverte par un agent injecté, il faut donc considérer l'effet pharmacologique pendant la phase de perfusion, ainsi que les phénomènes de « re-distribution » et clairance qui surviennent après. Morrison *et al.* précisent que l'on peut calculer un profil de concentration s'élargissant (du fait de la diffusion), en considérant le profil à la fin de l'injection comme une série de petites sources instantanées, chacune s'étalant par diffusion (pendant la période *post-injection*).

II.2.5 Utilisation préclinique et clinique de la méthode CED

II.2.5.1 Des applications précliniques variées

Les toutes premières recherches sur la CED (1990s), ainsi que la plupart de celles qui ont suivi, étaient motivées par la difficulté de délivrer des drogues dans le cerveau. Il s'agit généralement d'améliorer le traitement des glioblastomes, ou plus rarement de maladies telles que le parkinsonisme [Lonser 1999; Bankiewicz 2000]. Le Tableau II-2 recense les essais précliniques (imagerie et/ou thérapie) étudiant la CED en présence de modèle tumoral. On remarquera que d'autres études exploitant également le transport d'agents pharmacologiques par convection, concernent la moelle épinière [Lonser 1998b ; Wood 1999; Sarntinoranont 2003], ou le système nerveux périphérique (nerf tibial ou sciatique) [Lonser 1998a; Ratliff 2001]. L'objectif reste le même : délivrer une drogue de façon contrôlée, localisée, avec une concentration élevée et éviter la toxicité systémique.

II.2.5.2 Limitations du modèle animal et difficultés de l'application clinique...

Les paramètres tissulaires influençant la CED ont été essentiellement étudiés sur modèle de petit animal et presque exclusivement dans le tissu cérébral sain. On sait que le tissu tumoral est très hétérogène, qu'il peut présenter des zones nécrotiques et possède une pression interstitielle élevée augmentant avec la taille de la tumeur [Hall 2003]. Cette pression interstitielle peut d'ailleurs être responsable de distributions de drogues plus ou moins inhomogènes et ne couvrant pas complètement la masse tumorale [Lopez 2006; Sampson 2007]. Ce phénomène a été montré sur le modèle RG-2 de gliome implanté chez des rats Fischer 344 [Vavra 2004]. Il est par conséquent très difficile de modéliser les caractéristiques des tumeurs, surtout si elles sont infiltrantes.

Les recherches utilisant la CED pour le traitement des tumeurs cérébrales, ont été menées presque exclusivement sur des animaux ayant un cerveau relativement petit (Tableau II-2). Cela restreint considérablement les possibilités de modéliser les volumes de distribution de drogue, nécessaires pour traiter efficacement les tumeurs humaines. Lopez *et al.* suggèrent la nécessité de développer chez de plus gros animaux, un modèle de gliome réaliste du point de vue histopathologique [Lopez 2006].

La faisabilité de l'approche CED chez l'homme a été démontrée dans le cadre de plusieurs essais cliniques, que ce soit pour des injections intratumorales ou dans le parenchyme cérébral (injections péri-tumorales) [Laske 1997; Rand 2000; Voges 2003; Weber 2003]. Ces essais ont aussi mis en avant certaines difficultés, notamment pour le placement critique du ou des cathéter(s)

(profondeur d'insertion, distance aux cavités, à la surface piale ou à l'espace subarachnoïde) pour éviter le reflux [Kanner 2007; Lidar 2004; Kunwar 2007; Sampson 2007]. Le type de traitement (chronique ou non) et la nature du tissu ciblé doivent être pris en compte. Les propriétés physiques de la canule d'injection ont également leur importance : taille, forme, et surtout nombre d'ouvertures qu'elle possède [Vogelbaum 2007]. Il est difficile de savoir si l'inefficacité des traitements par CED est liée aux molécules elles-mêmes, ou à l'incapacité de couvrir correctement la zone ciblée si elle est inhomogène [Voges 2003 ; Sampson 2003]. Enfin la CED peut s'accompagner de complications (infections, détériorations neurologiques réversibles, hémorragies) [Ram 2003; Lidar 2004].

II.2.5.3 Développements nécessaires de l'imagerie

Bien que plusieurs années se soient écoulées depuis les années 1990s, la technique de CED demeure expérimentale, et ce pour deux raisons principales. La première est l'absence de drogue approuvée pour être délivrée directement dans le parenchyme cérébral. La seconde vient de la difficulté de garantir une distribution parfaitement délimitée de drogue dans une région donnée du cerveau, malgré les modèles analytiques existants et les nombreuses simulations numériques réalisées. Il semblerait aujourd'hui que les développements clés résident dans les techniques d'imagerie, et particulièrement dans l'imagerie en vue d'implémenter les données d'entrée des modèles mathématiques [Voges 2003; Raghavan 2006]. C'est en identifiant de façon non-invasive (méthodes IRM, SPECT ou TEP, par exemple) des paramètres critiques que l'on peut améliorer les dosages ou ajuster le placement des cathéters, afin de développer des protocoles thérapeutiques standardisés [Jacobs 2003].

L'imagerie en temps réel est fondamentale pour permettre :

- de mieux comprendre comment se répandent les agents pharmacologiques et ainsi essayer de mieux les contrôler ;
- modifier ou arrêter une injection pendant qu'elle a lieu (*i.e.* pendant un traitement).

Lonser *et al.* ont utilisé un traceur macromoléculaire à base de gadolinium et montré chez des singes que l'IRM était une technique non-invasive permettant d'imager en temps réel la CED [Lonser 2002]. Les liposomes contenant du gadolinium sont également des traceurs potentiels efficaces pour l'IRM en temps réel [Saito 2005]. De la même façon, Croteau *et al.* ont vérifié (chez des primates non-humains) que la tomographie X était une technique appropriée pour contrôler en temps réel la CED [Croteau 2005].

Référence	Titre	Modèle animal	Modèle tumoral	Objet de l'étude (imagerie/survie)	Physiologie	Composé(s)
[Bruce 2000]	Intracerebral clysis in a rat glioma model.	rat	C6 (gliome)	mesure de pression, microscopie UV / survie	noyau caudé	(FITC)-dextran, BCNU (nitrosourea)
[Heimberger 2000]	Temozolomide delivered by intracerebral microinfusion is safe and efficacious against malignant gliomas in rats.	rat	D54-MG (gliome humain)	histologie / survie	noyau caudé	bleu d'Evans, temozolomide (TMZ)
[Kaiser 2000]	Tissue distribution and antitumor activity of topotecan delivered by intracerebral clysis in a rat glioma model	rat	C6 (gliome)	survie / histologie	noyau caudé	topotecan
[Yang 2002]	Convection-enhanced delivery of boronated epidermal growth factor for molecular targeting of EGF receptor-positive gliomas	rat	♣ & gliome (F98 _{EGFR} , F98 _{WT})	autoradiographie	noyau caudé	¹²⁵ I-BD-EGF (boronated EGF)
[Degen 2003]	Safety and efficacy of convection-enhanced delivery of gemcitabine or carboplatin in a malignant glioma model in rats	rat	♣ & 9L gliome	toxicité et survie / histologie	striatum, brainstem	carboplatine, gemcitabine
[Grossi 2003]	Efficacy of intracerebral microinfusion of trastuzumab in an athymic rat model of intracerebral metastatic breast cancer	rat	MCF-7/HER2-18 (*)	autoradiographie / survie		trastuzumab ¹²⁵ I- trastuzumab
[Barth 2004]	Neutron capture therapy of epidermal growth factor (+) gliomas using boronated cetuximab (IMC-C225) as a delivery agent	rat	F98 _{EGFR} , F98 _{WT} (gliome)	quantification (DCP-AES) / survie (BNCT)	noyau caudé	Boronated-cetuximab
[Kawakami 2004]	Distribution kinetics of targeted cytotoxin in glioma by bolus or convection-enhanced delivery in a murine model	souris nude	♣ & U251 (glioblastome)	immunohistochimie	parenchyme normal & tumeur	Interleukin-13 cytotoxin
[Mamot 2004]	Extensive distribution of liposomes in rodent brains and brain tumors following convection-enhanced delivery.	souris (nude), rat	♣ & U87 (gliome)	IRM, fluorescence	striatum	liposomes (avec diverses molécules)
[Saito 2004a]	Distribution of liposomes into brain and rat brain tumor models by convection-enhanced delivery monitored with magnetic resonance imaging	rat	♣ & gliomes C6, 9L-2	IRM, histologie, fluorescence	striatum & tumeur	Liposomes (Gd/DiI-DS) + Doxil
[Saito 2004b]	Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model	rat nude	♣ & U87MG (gliome humain)	histologie / tolérance / survie	striatum & tumeur	TRAIL, temozolomide (TMZ)
[Schmidt 2004]	Antiangiogenic therapy by local intracerebral microinfusion improves treatment efficiency and survival in an orthotopic human glioblastoma model	souris nude	U87 (gliome humain)	survie	left forebrain	murine endostatin
[Vavra 2004]	Comparative pharmacokinetics of ¹⁴ C-sucrose in RG-2 rat gliomas after intravenous and convection-enhanced delivery	rat	RG-2 (gliome)	autoradiographie	<i>flanc</i> & noyau caudé	¹⁴ C-sucrose
[Yang 2005]	Development of a syngeneic rat brain tumor model expressing EGFRvIII and its use for molecular targeting studies with monoclonal antibody	rat	gliomes: F98 _{WT} , F98 _{npEGFRvIII}	biodistribution par comptage gamma à scintillation	noyau caudé	mAb L8A4, ¹³¹ I-L8A4

Tableau II-2 : Etudes pré-cliniques utilisant la CED comme méthode pour délivrer un composé dans le cerveau. Ne sont présentées ici que les études réalisées sur modèle tumoral (précisé dans la colonne grisée) chez le rat ou la souris *nude*. Les références sont classées par ordre chronologique. ♣ signale qu'une partie de l'étude est faite sur des rats sains ; (*) cellules humaines du cancer du sein.

II.3 Agents pharmacologiques

Après avoir décrit les méthodes d'injection, nous abordons dans ce chapitre les drogues utilisées dans le cadre de cette étude.

II.3.1 Cisplatine

II.3.1.1 Découverte

Si le *cis*-diamminedichloroplatinum(II) ou cisplatine (molécule présentée Tableau II-3) a été synthétisé pour la première fois en 1847 sous le nom de « sel de Peyrone », son action antitumorale n'a été découverte fortuitement que dans les années 1960 par Barnett Rosenberg [McAuliffe 1991; Brabec 2005]. Ce dernier remarqua une inhibition de la croissance bactérienne lorsque le milieu de culture d'*Escherichia coli* contenait du chlorure d'ammonium et était soumis à un courant électrique établi entre deux électrodes de platine ; il montra que cet effet était dû à la formation du complexe dichlorodiamine-platine. Suite à cette observation, il mena une série d'expériences à l'Université du Michigan pour mettre en évidence l'activité antinéoplasique du cisplatine ainsi que d'autres complexes platinés chez l'animal (sur des sarcomes implantés artificiellement chez le rat) puis chez l'homme. Le cisplatine s'avéra être le plus efficace et reçut l'agrément de l'agence américaine *Food and Drug Administration* en 1978.

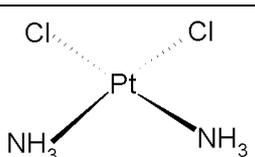
Nom	Cisplatine <i>cis</i> -diamminedichloroplatinum(II) ou CDDP
Formule chimique	Cl ₂ H ₆ N ₂ Pt
Structure	
Poids moléculaire	300,04 g/mol
Pharmacodynamie	Antinéoplasique cytostatique ³ (mécanisme d'action similaire à celui des alkylants)

Tableau II-3 : Présentation du *cis*-diamminedichloroplatinum (II) ou cisplatine.

II.3.1.2 Mécanisme d'action du cisplatine

Le mode d'action du cisplatine n'est toujours pas parfaitement compris mais semble dépendre entre autres, de réactions intra-cellulaires d'hydrolyse et de sa capacité à former avec l'ADN des adduits non réparables.

³ Un agent cytostatique est un agent dont le principal effet est de stopper la prolifération des cellules, plutôt que de provoquer directement leur mort.

II.3.1.2.1 Pharmacologie cellulaire

Le cisplatine s'administre usuellement en perfusion intraveineuse et diffuse dans les tissus avant d'être éliminé essentiellement par le rein. Dans le plasma riche en chlore, il reste stable sous la forme bichlorure. Les premières études suggéraient qu'il pénétrait dans la cellule par diffusion passive. Plus récemment il semblerait que son entrée dans la cellule soit liée au transport et au métabolisme du cuivre. Une fois passé dans l'espace intracellulaire où la concentration en chlore est beaucoup plus faible, le cisplatine se transforme facilement en composé hydraté chargé positivement : le groupe -Cl est remplacé par une molécule aqueuse (Figure II-13). Le produit résultant ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ ou $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)_2]^{2+}$) est appelé forme hydratée ou forme *aqua* ; il s'agit d'une espèce chimique beaucoup plus réactive que la forme chlorure [Wang 2005].

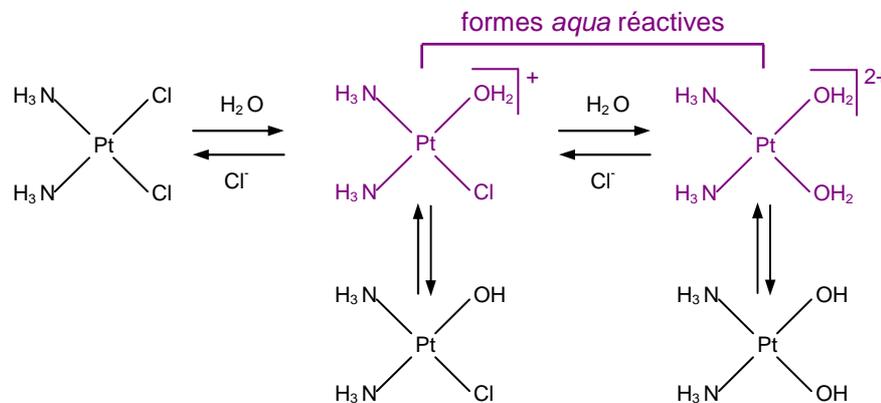


Figure II-13 : Equilibre du cisplatine en milieu aqueux et en présence de chlorure. Les formes hydratées sont beaucoup plus réactives que la forme chlorure.

Le complexe platiné sous forme *aqua* va ensuite se fixer par liaisons covalentes aux molécules qu'il rencontre. Il cible essentiellement l'ADN des noyaux mais peut également réagir avec d'autres composés cellulaires, notamment ceux possédant des atomes de soufre comme le glutathion cytoplasmique. La position *cis* des radicaux chlore et nitrate assure une planéité à la molécule et est indispensable à l'action du cisplatine.

II.3.1.2.2 Interactions du cisplatine avec l'ADN

Le complexe se lie aux atomes d'azote des nucléotides formant l'ADN, principalement les atomes N⁷ des bases purines (*i.e.* guanine et adénine). La plupart du temps, un adduit monofonctionnel entre la forme *aqua* et l'ADN n'est que transitoire : le platine perd son deuxième atome de chlore et établit une liaison avec une autre base (Figure II-14). On distingue alors les adduits ou ponts « intrabrins » si les deux bases appartiennent au même brin d'ADN, des adduits ou ponts appelés

« interbrins » lorsqu'elles sont situées sur l'un et l'autre brin [McAuliffe 1991; Wang 2005; Kelland 2007]. Leur répartition est la suivante :

- ❑ environ 90 % sont des adduits intrabrin entre deux purines adjacentes. Il existe deux configurations possibles : d(GpG) entre deux guanines successives (60 à 65 % de tous les adduits), ou moins fréquemment d(ApG) entre une guanine et une adénine voisine (20 à 25 % de tous les adduits) ;
- ❑ entre 2 et 10 % sont des adduits intrabrin entre deux guanines séparées par une base : d(GpXpG) ;
- ❑ les pontages interbrins et les adduits monofonctionnels sont beaucoup plus rares.

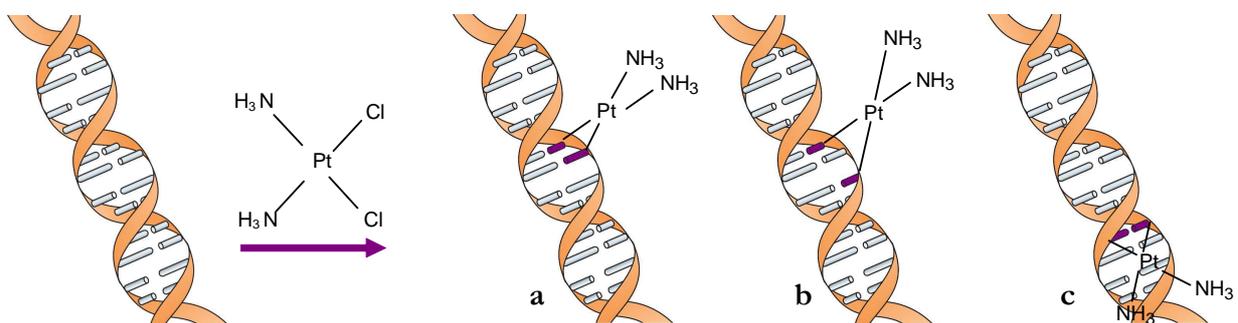


Figure II-14 : Différents adduits possibles après exposition de l'ADN au cisplatine. L'adduit 1,2-intrastrin (a) entre deux purines voisines est le plus fréquent. Les adduits 1,3-intrastrin (b) et inter-brin (c) sont plus rares. Il existe également des pontages monofonctionnel ou bifonctionnel sur protéine non représentés ici.

Les adduits formés par le CDDP modifient la structure secondaire de l'ADN. Les mécanismes de réplication et de transcription de l'ADN, ainsi que d'autres fonctions nucléaires sont inhibés à cause de ces adduits, ce qui conduit à la mort cellulaire s'ils ne sont pas éliminés. La prolifération des cellules cancéreuses se trouve par conséquent bloquée, et par la même la croissance tumorale. L'efficacité des complexes pour éliminer les cellules tumorales, va résulter de leur capacité à créer plusieurs types d'adduits avec l'ADN.

Du fait de l'existence des enzymes de réparation de l'ADN (ligase, endonucléase), les adduits mono-fonctionnels peuvent ne pas entraîner de mort cellulaire et favoriser au contraire l'apparition d'ADN porteur de malformation, susceptible de dégénérer ensuite en cancer chimio-induit.

A la différence de l'isomère *cis*, cytotoxique pour les cellules cancéreuses, l'isomère *trans* n'a pas d'activité antitumorale. Il est cependant toxique d'où la nécessité de tester (par HPLC) la pureté du cisplatine lors de sa synthèse.

II.3.1.3 Utilisation clinique du cisplatine

Le cisplatine est l'un des agents cytotoxiques les plus efficaces et les plus utilisés pour traiter les tumeurs du testicule, de l'ovaire, du col de l'utérus, de l'endomètre, de la sphère ORL, de l'œsophage, de la vessie, les cancers épidermoïdes, bronchiques, et de l'estomac. Il est habituellement prescrit en poly-chimiothérapie, en association avec d'autres médicaments antinéoplasiques [Vidal 2004; Brabec 2005].

Son utilisation clinique est cependant fortement limitée par les réactions sévères qu'il peut engendrer ; parmi les effets indésirables reconnus, on compte la toxicité rénale (provenant de dommages sur le système de tubulures) qui nécessite une hyper hydratation, la toxicité gastro-intestinale, la neuropathie périphérique, la toxicité hématopoïétique, l'asthénie et l'ototoxicité (perte de l'audition uni- ou bilatérale) qui s'aggrave avec la répétition des doses.

Il arrive que les tumeurs développent une résistance au cisplatine, ce qui représente une limitation clinique importante de cette drogue antinéoplasique [Boulikas 2003]. Les cellules cancéreuses peuvent notamment, créer des barrières membranaires qui vont limiter l'accumulation du cisplatine à l'intérieur de la cellule, ou réparer plus rapidement les adduits de cisplatine. Pour remédier à cela, une des stratégies de traitement consiste à combiner les drogues platinées à d'autres drogues anticancéreuses.

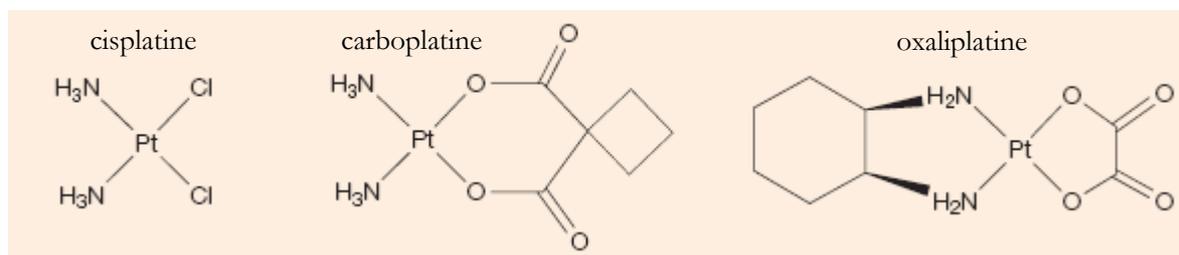
II.3.2 Autres complexes platinés : carboplatine et oxaliplatine

Le premier complexe platiné introduit en thérapeutique a été le cisplatine, suivi par le carboplatine, mais bien d'autres ayant une activité anti-tumorale ont été synthétisés. Seuls le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine sont actuellement commercialisés en France.

II.3.2.1 Analogie structurelle avec le cisplatine

Comme on peut le remarquer dans le Tableau II-4, ces trois complexes antinéoplasiques actifs ont une structure commune constituée d'un atome de platine généralement à l'état II, lié de façon covalente à quatre substituants dont deux azotés peu labiles et deux labiles (chlorure ou oxygène). Si les molécules environnantes sont nucléophiles, c'est-à-dire ont beaucoup d'affinité pour les sites chargés positivement, elles tendent à former avec le platine de nouvelles liaisons covalentes, entraînant le départ des substituants labiles Cl ou OH.

Dans les milieux biologiques, les formes mono- ou bishydratées du carboplatine et de l'oxaliplatine sont très réactives, comme le sont celles du cisplatine décrites précédemment.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
cisplatine	NH ₃	NH ₃	Cl	Cl
carboplatine	NH ₃	NH ₃	Groupe 1,1 cyclobutanedicarboxylate	
oxaliplatine	Groupe 1,2 diamminocyclohexane (DACH)		Groupe oxalate	

Tableau II-4 : Analogie structurelle entre le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine. Cisplatine et carboplatine ont tous deux des groupements (NH₃) en position *cis*.

Les toxicités de ces trois complexes varient car leur distribution tissulaire est probablement différente. La pharmacologie reste difficile à établir car la méthode de dosage (spectrométrie d'absorption atomique) n'est pas assez sensible et ne permet pas de séparer les différents métabolites formés.

II.3.2.2 Particularités du carboplatine

Le carboplatine (molécule présentée Tableau II-5) forme le même type d'adduits que le cisplatine, avec toutefois quelques différences séquentielles minimales. Il est plus stable que la molécule de cisplatine, car l'atome de platine se trouve au sein d'un cycle ; ainsi, le ligand cyclobutanedicarboxylate est moins labile que les groupes chlore du cisplatine, c'est pourquoi l'hydrolyse du carboplatine est plus lente. De plus, des concentrations environ deux fois supérieures sont nécessaires pour obtenir un taux de platination de l'ADN équivalent au cisplatine [Brabec 2005]. En utilisant un plasmide ADN (pUC18), Hongo et ses collaborateurs ont pu démontrer que le carboplatine provoquait les mêmes adduits que le cisplatine, mais qu'il nécessitait un temps d'incubation 7,5 fois plus long, ainsi qu'une concentration 10 fois plus élevée pour induire le même degré de changement de conformation du plasmide ADN [Hongo 1994]. Les pharmacocinétiques du cisplatine et du carboplatine diffèrent de façon significative. La

stabilité plus élevée du carboplatine dans le plasma humain semble engendrer moins de liaisons irréversibles avec des protéines [McAuliffe 1991].

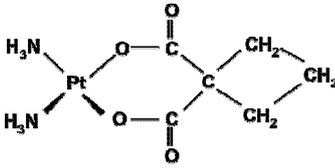
Nom	Carboplatine <i>Cis</i> -diammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate platinum(II)
Formule chimique	$C_6H_{12}N_2O_4Pt$
Structure	
Poids moléculaire	371,25 g/mol
Pharmacodynamie	Antinéoplasique et immunomodulateur, Cytostatique dont les propriétés biochimiques sont similaires à celles du CDDP

Tableau II-5 : Présentation du *cis*-diammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate platinum(II) ou carboplatine.

L'action du carboplatine est proche de celle du cisplatine, il est préconisé pour traiter les carcinomes de l'ovaire (d'origine épithéliale), bronchique à petites cellules, épidermoïde des voies aérodigestives supérieures [Vidal 2004]. Si les toxicités rénale et neurologique sont beaucoup moins fréquentes qu'avec le cisplatine, la toxicité hématologique représente le risque majeur [Boulikas 2003].

D'autre part, le carboplatine présente malheureusement une résistance tumorale commune (*cross-resistance*) avec le cisplatine.

II.3.2.3 Particularités de l'oxaliplatine

La molécule d'oxaliplatine est présentée dans le Tableau II-6. La connaissance des lésions qu'elle engendre est largement basée sur une extrapolation des connaissances sur le cisplatine, aux composés possédant un groupement diamminocyclohexane (DACH). Dans ce sens on pourrait penser qu'il est aussi efficace que lui ; pourtant, l'oxaliplatine forme significativement moins d'adduits avec l'ADN à concentrations équimolaires (concentrations externes) ou cytotoxiques égales [Woynarowski 2000; Raymond 2002; Kweekel 2005]. Il est vraisemblable que le faible taux de formation des adduits reflète la dissociation lente du ligand oxalate en conditions physiologiques. Enfin, il semble que les mécanismes impliqués pour réparer les dommages créés sur l'ADN, ne soient pas exactement les mêmes que pour les lésions provoquées par le cisplatine.

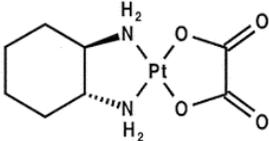
Nom	Oxaliplatine Diamminocyclohexane(DACH)-oxalato platinum(II)
Formule chimique	$C_8H_{14}N_2O_4Pt$
Structure	
Poids moléculaire	397,29 g/mol
Pharmacodynamie	Cytotoxique, antinéoplasique

Tableau II-6 : Présentation du Diamminocyclohexane(DACH)-oxalato platinum(II) ou oxaliplatine.

L'oxaliplatine est indiqué principalement pour le traitement du cancer colorectal métastatique, cancer où le cisplatine et le carboplatine n'ont pas d'action efficace. Il est alors utilisé en combinaison avec le 5-fluorouracile et l'acide folinique [Brabec 2005]. Bien que moins toxique pour les reins (l'hyperhydratation n'est pas nécessaire) ou la moëlle osseuse que le cisplatine, il l'est davantage que lui sur le plan neurologique. Enfin, l'oxaliplatine ne présente pas de résistance tumorale commune (*cross-resistance*) avec le cisplatine [Kelland 2007].

II.3.3 Injection intracérébrale de drogues platinées *in vivo* : revue de la littérature

Dans la littérature, peu d'études décrivent l'utilisation de cisplatine ou carboplatine en solution pour des injections intracérébrales. Certains essais précliniques ont notamment été faits avec des polymères biodégradables [Olivi 1996] ou des liposomes dans lesquels est incorporé le platine. L'utilisation de ces complexes est en fort développement afin de diminuer la toxicité engendrée par les drogues platinées. Seules les études précliniques réalisées chez des rats, avec cisplatine ou carboplatine en solution injecté directement i.c. (ou par voie intrathécale) sont reportées dans ce chapitre.

On peut déjà noter qu'Olivi *et al.* ont montré une augmentation significative de la médiane de survie (53 jours contre 16 jours pour les contrôles) lorsque des polymères chargés en carboplatine étaient implantés 5 jours après inoculation de 10^4 cellules gliomales F98 chez le rat [Olivi 1996].

II.3.3.1 Cisplatine et carboplatine : toxicité pour le système nerveux central

Olivi *et al.* ont examiné la toxicité du cisplatine et du carboplatine en injectant différentes doses de ces drogues dans 20 μ l de solution saline, directement dans le liquide cébrospinal, chez des rats Fischer 344 [Olivi 1993]. Chaque injection a été faite 3 jours après implantation d'un cathéter intrathécal qui permet de délivrer la drogue dans le liquide céphalorachidien. La toxicité a été évaluée par des observations et tests neurologiques *in vivo* d'une part, par des examens neuropathologiques et microscopie électronique (*post mortem*) d'autre part.

Deux sortes de toxicité ont été constatées (Tableau II-7). La première est la toxicité aiguë, qui se manifeste par de la léthargie, un état non-réactionnel progressif, des crises de contractions et la plupart du temps, par la mort de l'animal dans les 96 heures qui suivent l'injection. La seconde est la (neuro)toxicité chronique, qui correspond au développement d'une paralysie permanente d'un ou plusieurs membres.

	Dose (dans 20 μ l)		Toxicité		survivants	HNTD	TD
	[nmol]	[μ g]	aiguë	chronique			
Cisplatine (MW : 300,04 g/mol)	10	3	0/4	0/4	4/4	10 nmol 3 μ g	20 nmol 6 μ g
	20	6	0/4	1/4	4/4		
	40	12	1/4	1/4	3/4		
	80	24	3/3	1/3	1/3		
Carboplatine (MW : 371,25 g/mol)	20	7,4	0/4	0/4	4/4	80 nmol 29,7 μ g	160 nmol 59,4 μ g
	40	14,9	0/4	0/4	4/4		
	80	29,7	0/4	0/4	4/4		
	160	59,4	2/4	0/4	4/4		
	240	89,1	2/4	0/4	2/4		
	320	118,1	2/2	0/2	0/2		

Tableau II-7 : Toxicité intrathécale du cisplatine et du carboplatine. L'étude est faite sur des rats Fischer. HNTD désigne la dose maximale n'engendrant aucune toxicité (ni aiguë ni chronique) ; TD désigne la dose la plus faible pour laquelle a été observée une toxicité (*d'après* [Olivi 1993]).

Les doses les plus élevées pour lesquelles il n'a pas été vu de toxicité (HN^{TD}) sont 10 nmol (3 µg) et 80 nmol (29,7 µg) pour le cisplatine et le carboplatine, respectivement (Tableau II-7). Seuls les animaux ayant reçu du cisplatine ont montré des changements au niveau de leur moëlle épinière, selon les études histologiques ou en microscopie électronique. D'autre part, les tissus du CNS semblent mieux tolérer une exposition au carboplatine puisque aucune toxicité chronique n'a été observée jusqu'à ce que la dose létale soit atteinte.

II.3.3.2 Cisplatine : toxicité et survie chez des rats porteurs de gliome

Avant de présenter les essais de chimiothérapie où le cisplatine est délivré par injection intracérébrale, on citera juste une étude publiée dès 1983 sur le modèle F98, combinant irradiation et cisplatine administré par *voie systémique*. Les résultats montrent que l'association chimio-radiothérapie induit une augmentation de 77,4 % de la survie médiane (MeST = 55 jours contre 31 jours pour les rats non traités) et que l'effet thérapeutique est significatif relativement au groupe ayant reçu l'irradiation seule [Kaneko 1983].

II.3.3.2.1 Chimiothérapie sur modèle 9L (1992)

Dès 1992, Kimler *et al.* ont étudié l'effet du cisplatine (ainsi que d'autres drogues antinéoplasiques), en injections intra péritonéale (i.p.) et intracérébrale (i.c.), sur un modèle de gliome (9L) implanté chez le rat [Kimler 1992]. La dose de 8 mg/kg de cisplatine, délivrée i.p. en fraction unique, n'a pas induit d'augmentation significative de la survie (ILS⁴ : 7 %). La drogue a été injectée aux mêmes coordonnées stéréotaxiques que les cellules 9L. Différentes doses entre 10 µg et 3 µg de cisplatine ont été testées, toujours diluées dans 5 µl de solution, mais le débit d'injection n'est pas précisé. Bien qu'ils concluent que le cisplatine i.c. n'a qu'un effet marginal sur la survie des rats, il est utile de souligner certains résultats importants pour nos propres expériences, notamment en terme de :

- i. toxicité/mort précoce,
- ii. survivants à long terme,
- iii. reproductibilité.

Du point de vue de la toxicité, tous les dosages (*i.e.* 10 µg, 5 µg, 4 µg ou 3 µg dans 5 µl) ont conduit à la mort précoce⁵ de plusieurs rats. Cela touche notamment jusqu'à 60 %, 33 % et 55 % d'entre eux pour des doses respectives de 10 µg / 5 µl, 5 µg / 5 µl ou 4 µg / 5 µl. L'ILS associé

⁴ ILS pour *increased life span* : pourcentage d'augmentation de la survie médiane par rapport à la survie médiane du groupe contrôle.

⁵ On parle ici de mort précoce lorsque les rats décèdent avant que les rats non traités ne commencent à mourir.

aux 10 µg est d'ailleurs négatif (ILS : -32 %). Seule une expérience sur les trois conduites avec 3 µg / 5 µl n'a pas montré ce phénomène.

Néanmoins, il est important de remarquer que pour les plus fortes doses de cisplatine, c'est-à-dire 10 µg ou 5 µg, plusieurs rats ont survécu « à long terme », et un animal dans chacun des groupes n'avait plus de tumeur à la fin de l'expérience, soit à 100 jours après l'inoculation des cellules tumorales.

Le dosage de 3 µg a été utilisé au cours de trois expériences différentes et soulève le problème de la reproductibilité des études de survie, que ce soit en terme de toxicité, de guérison de la tumeur, ou d'ILS, compte tenu du petits nombre d'animaux par groupe. En effet, les résultats indiquent une variabilité de 0 à 30 % de morts précoces, une augmentation de survie (ILS) de 5 à 52 % et l'existence ou non de survivants à long terme, suivant l'expérience considérée. On peut l'expliquer en partie par le nombre relativement peu élevé de rats par groupe (entre 9 et 10), qui ne permet pas d'avoir une statistique assez conséquente. Si le nombre de rats morts précocement est important (60 % par exemple), le nombre de rats pouvant potentiellement bénéficier du traitement n'est plus statistiquement représentatif. Ainsi, le seul groupe où une augmentation significative de la survie médiane (52 %) a pu être observée, est un groupe où seul un rat est mort de façon précoce.

II.3.3.2.2 Chimiothérapie combinée à une irradiation au ^{137}Cs sur modèle 9L (1993)

Kimler *et al.* (1993) ont ensuite testé l'effet de la chimiothérapie combinée à de la radiothérapie (source de césium-137 ; énergie : 514 keV), toujours sur le modèle 9L implanté chez le rat [Kimler 1993]. En injectant les drogues directement de façon intra-cérébrale, on évite la toxicité systémique mais il existe toujours un risque d'induire une neuro-toxicité locale qui peut être létale. Dans le cas des traitements combinés, chimio et radiothérapies par exemple, il faut essayer d'utiliser les doses maximales tolérables et avoir des toxicités respectives qui ne soient pas additives.

Les doses i.c. de 4, 5 et 10 µg de cisplatine ayant produit une létalité forte de 55, 33 et 60 % respectivement (cf. [Kimler 1992] et § II.3.3.2.1), une dose plus faible de 3 µg / 5 µl a été délivrée, suivie 2 heures plus tard par une dose de rayonnement de 16 Gy. Cette expérience a été reproduite, et les résultats suivants ont été obtenus (les données entre crochets correspondent à l'expérience 2) :

- la chimiothérapie seule (3 µg / 5 µl) donne un ILS = 6 % [13 %];
- la radiothérapie seule (16 Gy) donne un ILS = 44 % [74 %];

- le traitement combiné donne relativement à la radiothérapie seule, un ILS-RT = 64 % ce qui est significatif, $p = 0,049$ [18 % non significatif, $p = 0,71$].

II.3.3.2.3 Chimiothérapie combinée à une irradiation synchrotron sur modèle F98 (2004)

Plusieurs essais précliniques de chimiothérapie avec du cisplatine, combinée ou non à de la radiothérapie synchrotron (SSR), ont été effectués sur des rats porteurs de gliome F98 au sein de notre laboratoire, dans le cadre de la thèse de Marie-Claude Biston [Biston 2004a, b]. Treize jours après implantation de 10^3 cellules F98, deux dosages différents de cisplatine (*i.e.* 3 μg ou 5 μg dans 5 μl de solution isotonique de NaCl) ont été injectés *i.c.* en mode « bolus⁶ » aux coordonnées d'implantation de la tumeur. Les irradiations étaient réalisées 24 heures plus tard, sur la ligne médicale de l'ESRF, en mode tomographie. Le faisceau était réglé à 78,0 ou 78,8 keV (soit 400 eV en dessous ou au dessus du seuil K du platine) et la dose délivrée était de 5, 10 ou 15 Gy en une fraction.

Les résultats obtenus pour les différentes combinaisons thérapeutiques sont les suivants : la médiane de survie des rats contrôles (MeST) est 26 jours ; les 3 μg et 5 μg de cisplatine *i.c.* augmentent significativement la survie ($p < 0,0018$) puisque les MeST associées sont respectivement 37 jours (ILS : 42 %) et 39,5 jours (ILS : 52 %) ; des irradiations de 5, 10 et 15 Gy donnent des MeST de 31, 36 et 48 jours (ILS : 19 %, 38 % et 85 %) ; des MeST de 50 et 68 jours (ILS : 92 % et 162 %) sont obtenues pour des doses de 5 et 10 Gy combinées à 5 μg de cisplatine. Enfin, les MeST les plus élevées ont été observées pour 3 μg de cisplatine suivis de 15 Gy : 214 jours (ILS : 723 %) à 78,0 keV et 194 jours (ILS : 646 %) à 78,8 keV ; 33 % des rats (6 sur 18) ayant reçu ce traitement (toute énergie confondue) étaient toujours en vie au bout d'un an et ont été euthanasiés. L'analyse histo-pathologique a révélé une éradication de la tumeur.

La combinaison thérapeutique s'étant révélée la plus efficace (3 μg de cisplatine suivis de 15 Gy) a été à nouveau testée au cours d'une seconde expérience : un taux de 36 % de rats survivants à un an et une MeST de 110 jours (soit un ILS : 323 %) ont été obtenus ($n = 11$ rats en combinant les deux énergies 78,0 et 78,8 keV).

On peut noter que les taux de survie pour la combinaison de 3 μg de cisplatine injectés *i.c.* et de 15 Gy (mode tomographie, rayonnement synchrotron monochromatique de 78,0 ou 78,8 keV), sont les meilleurs décrits dans la littérature sur ce modèle de gliome (F98).

⁶ le piston de la seringue Hamilton (\emptyset de l'aiguille : 26s-gauge) est poussé manuellement par l'expérimentateur en ~ 1 minute.

II.3.3.3 Carboplatine : toxicité et survie chez des rats porteurs de gliome

II.3.3.3.1 Toxicité et chimiothérapie sur modèle 9L (2003)

Degen *et al.* ont étudié la faisabilité ainsi que la toxicité de l'injection intracérébrale de carboplatine par CED, et ceci dans deux zones distinctes du cerveau : le *striatum* pour évaluer la concentration maximale tolérée au niveau de la matière grise, et le tronc cérébral (*brainstem*) pour déterminer la toxicité au sein de la matière blanche et de zones fonctionnelles importantes [Degen 2003]. Ensuite, en utilisant les résultats obtenus, ils ont testé l'efficacité de cette chimiothérapie sur des gliomes malins (cellules 9L) implantés chez le rat.

Toxicité pour le striatum :

Un volume de 10 µl a été administré par CED (débit : 0,5 µl/min, Ø aiguille : 32 gauge) dans le striatum de 12 rats sains, répartis en 3 groupes suivant des concentrations croissantes de carboplatine : 0,1 - 1 - 10 mg/ml. Les rats ont été observés cliniquement puis euthanasiés 3 jours après l'injection pour des analyses histologiques. Les 4 rats ayant reçu la plus forte concentration (*i.e.* 10 mg/ml soit 100 µg de carboplatine dans 10 µl) sont décédés dans les 24 heures (2 rats) ou dans les 72 heures (2 rats) après l'injection. Aucun des autres rats n'a présenté de signes de toxicité, que ce soit au niveau clinique (léthargie, paralysie, perte de poids significative) ou ensuite histologique. Seules quelques réactions minimales d'inflammations ont été remarquées dans la région de l'aiguille d'injection.

Toxicité au niveau du tronc cérébral :

La concentration la plus élevée tolérée lors de l'étude précédente, c'est-à-dire 1 mg/ml, a été choisie pour perfuser le tronc cérébral de 8 rats sains. Les rats ont reçu une injection de 10 µl par CED (débit : 0,5 µl/min ; Ø aiguille : 32 gauge) ; ils ont été euthanasiés 3 jours (4 rats) ou 6 semaines (4 rats) après l'injection. Aucun n'a présenté de signes de toxicité clinique ou histologique, que ce soit à court ou long terme.

Efficacité thérapeutique :

L'efficacité thérapeutique du carboplatine administré *i.c.* par CED (débit : 0,5 µl/min ; Ø aiguille : 32 gauge), a été testée sur des rats porteurs de gliome 9L (coordonnées d'implantations : 5.0 mm de profondeur ; 0,5 mm antérieur et 2,5 mm à droite par rapport au bregma). Sept jours après implantation de $5 \cdot 10^4$ cellules, les rats ont été répartis suivant les 3 groupes (4 rats/groupe) de traitement⁷ suivants : injection *i.c.* par CED de 40 µl de PBS (groupe témoin), injection *i.c.* par CED de 40 µl de carboplatine (1 mg/ml), injection *i.p.* de carboplatine (60 mg/kg). Tous les rats

⁷ Des traitements avec la gemcitabine ont également été testés mais ne sont pas détaillés ici.

ayant reçu du PBS i.c. ou le carboplatine par voie systémique (i.p.) sont décédés dans les 20 jours après implantation. Concernant le groupe « carboplatine CED », un seul rat est décédé au 19^{ème} jour, les autres ont survécu à long terme, soit 75 % de survie à la fin de l'étude (120 jours). Les analyses histologiques ont révélé que la tumeur était éradiquée.

Informations complémentaires :

Le neurochirurgien Russell R. Lonser nous a également apporté quelques précisions concernant les différents volumes injectés dans cette étude [note personnelle]. Pour les essais de toxicité, un volume de 10 µl a été choisi afin de couvrir complètement chacune des 2 structures évaluées (*i.e.* le *striatum* ou le tronc cérébral). Pour l'étude de survie, la tumeur 9L a été perfusée avec 40 µl, volume de drogue qui devrait approximativement couvrir un hémisphère (l'agent est donc *a priori* en excès).

II.3.3.3.2 Chimio-radiothérapie (SSR ou haute énergie) sur modèle F98 (2004)

Plusieurs études de survie avec du carboplatine ont été réalisées dans l'équipe préalablement à cette thèse, sur des rats porteurs de gliome F98 [Biston 2004a]. La chimiothérapie (40 µg de carboplatine dans 5 µl de solution) a été administrée 13 jours après inoculation de 10³ cellules F98 dans le noyau caudé droit, suivie 24 heures plus tard d'une irradiation de 15 Gy. Deux modalités de radiothérapie ont été testées :

- rayonnement monochromatique de $78,4 \pm 0,4$ keV (sur la ligne médicale ID17 de l'ESRF, Grenoble), irradiation en mode tomographie (SSR) ;
- rayonnement haute énergie 6 MV (sur un accélérateur médical linéaire conventionnel).

Il est reporté que l'injection seule de carboplatine a donné un taux assez élevé de morts précoces (20 %) et une MeST⁸ de 49 jours. Les MeST obtenues avec les traitements combinés sont de 110 et 83,5 jours pour les irradiations SSR (78,4 keV) et haute énergie (6 MV), respectivement.

II.3.3.4 Localisation et quantification du platine après injection intracérébrale par pompe osmotique

II.3.3.4.1 Cisplatine (1982)

Lors d'une étude publiée en 1982, Kroin et Penn ont étudié comment se répartissait le cisplatine après injection intracérébrale (localisation : cervelet ou cortex) dans du tissu sain, chez des rats Wistar [Kroin 1982]. L'idée était d'évaluer si l'on peut atteindre des concentrations de drogues raisonnablement élevées du point de vue thérapeutique et dans des volumes du cerveau

⁸ Temps de survie médian.

suffisamment importants. La drogue de chimiothérapie (concentration $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) a été administrée par mini pompe osmotique pendant des périodes de 100 à 168 heures (soit 4 à 7 jours), avec un débit de $0,9 \mu\text{g}/\text{heure}$ de cisplatine, ce qui équivaut à $0,585 \mu\text{g}/\text{heure}$ de l'élément platine. Les tissus ont été prélevés immédiatement après la fin de l'injection ; des coupes de 1 mm ont ensuite été analysées par spectroscopie d'absorption atomique.

Les résultats ont tout d'abord révélé que pour des injections dans le cervelet, 26 à 27 % de la quantité totale de platine injectée y restait localisé. Les analyses effectuées à différents délais (*i.e.* entre 100 et 168 heures) ont montré que les tissus n'étaient toujours pas saturés en platine après une injection de 100 heures, c'est-à-dire après injection d'environ $90 \mu\text{g}$ de cisplatine soit $58,5 \mu\text{g}$ de l'élément platine.

D'autre part, au niveau du cervelet (Figure II-15, A), il a été mesuré une concentration en platine de $2 \mu\text{g}/\text{g}$ de masse humide de tissu cérébral, sur une région de 1 cm de diamètre centrée au site d'injection. En ce qui concerne le cortex cérébral (Figure II-15, B), les concentrations mesurées sont de l'ordre de $1,2$ à $2 \mu\text{g}/\text{g}$, à 5 mm du point source. En considérant que le cisplatine est resté sous forme active, ce taux de $2 \mu\text{g}/\text{g}$ correspondrait à une concentration de drogue de $10 \mu\text{M}$. Il est important de noter que pour cette concentration et *in vitro*, le cisplatine a montré un effet thérapeutique sur plusieurs lignées cancéreuses.

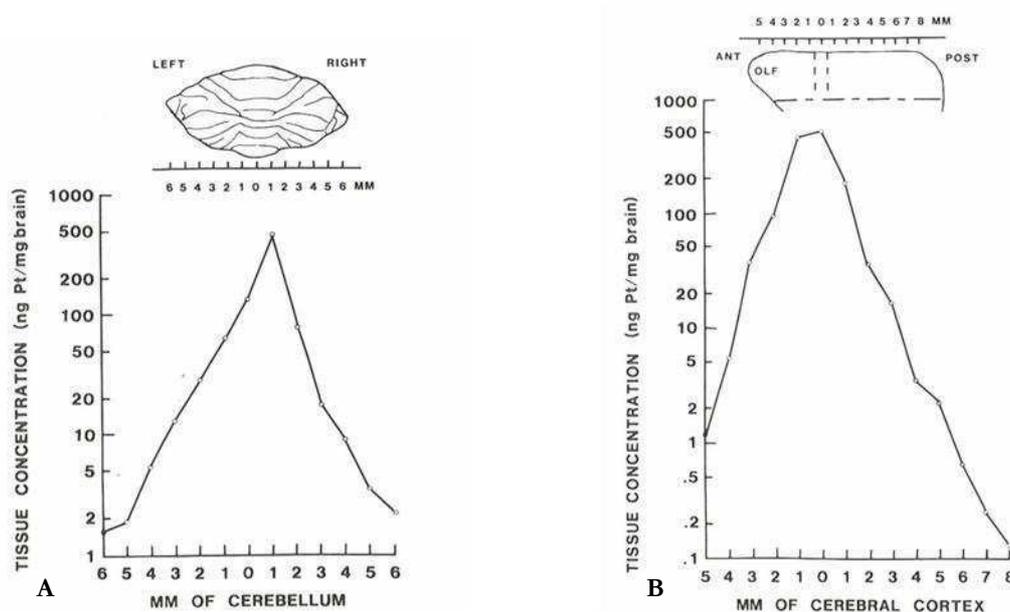


Figure II-15 : Profils de concentration en platine obtenus dans les tissus après injection intracérébrale de cisplatine. (A) la drogue a été injectée par pompe osmotique durant 160 heures, dans le cervelet (1 mm à droite); (B) elle a été délivrée pendant 168 heures dans le cortex frontal. Les schémas morphologiques indiquent comment le cervelet et le cortex frontal ont été coupés pour être analysés. Les concentrations sont données en nanogrammes de platine par milligramme de masse humide de cerveau [Kroin 1982].

Ce traitement délivrant du cisplatine (0,5 mg/ml) par pompe osmotique (0,9 μ l/h) a été testé par la même équipe [Penn 1983], sur des rats porteurs de tumeur 9L. L'injection débutait 8 jours après inoculation de 10^5 cellules 9L dans le cervelet, et s'étendait sur 7 jours. Une augmentation peu élevée mais statistiquement significative de la survie a été observée (%ILS = 27 % ; $p < 0,05$).

II.3.3.4.2 Carboplatine (2002)

Carson *et al.* ont réalisé le même type d'étude, en quantifiant cette fois-ci du carboplatine, dans du tissu cérébral tumoral chez des rats Fischer 344 [Carson 2002]. Après implantation de cellules F98 au niveau du tronc cérébral (*brainstem*), les rats ont reçu 0,2 ml d'une solution de carboplatine à 0,5 mg/ml délivrée par pompe osmotique pendant 7 jours à un débit de 1 μ l/heure. Des coupes coronales de 1 mm ont ensuite été analysées par spectroscopie d'absorption atomique, le dosage des tissus étant réalisé plus de 14 jours après la fin des injections.

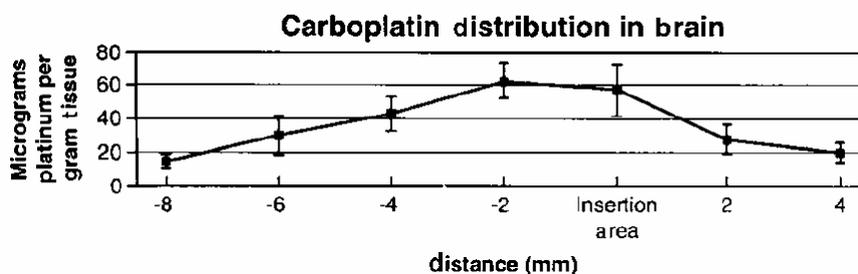


Figure II-16 : Concentrations de platine obtenues sur des coupes coronales (1 mm) de tissu cérébral, plus de 2 semaines après injection intracérébrale de carboplatine par pompe osmotique (concentration : 0,5 mg/ml, débit : 1 μ l/h, durée : 7 jours). Les concentrations sont données en microgrammes de platine par gramme de tissu humide, la limite de détection est de 5 μ g/g. Les mesures ont été faites sur 3 rats [Carson 2002].

La forme de la distribution obtenue lors de ces expériences suit une courbe en cloche (Figure II-16), avec une concentration maximale au niveau du point d'injection. Des taux de platine de 40 μ g/g et 10 μ g/g de masse humide de tissu ont été détectables à respectivement 4 mm et 8 mm, du point d'injection. En considérant que les concentrations de platine mesurées correspondent au carboplatine actif, les résultats suggèrent que ces infusions par pompes osmotiques ont permis de couvrir un volume de 5 mm de diamètre avec une concentration d'au moins 135 μ M, et une sphère de 1 cm avec plus de 30 μ M de drogue.

Carson *et al.* précisent que la quantité de drogue mesurée dans un rayon de 2 à 3 mm de la pointe d'injection est supérieure à celle nécessaire pour avoir une activité cytolytique. En effet *in vitro*, 55 à 75 μ g/ml de carboplatine suffisent par exemple pour inhiber à 70 % la croissance cellulaire de plusieurs lignées de gliome.

II.3.3.4.3 Carboplatine (2005)

Plus récemment (2005), Khan *et al.* ont étudié l'influence du débit d'injection sur la répartition du platine en tissu tumoral (F98) [Khan 2005]. Pour cela, des rats porteurs de gliomes F98 ont reçu une quantité totale de carboplatine de 100 µg, délivrée par pompe osmotique pendant 7 jours à un débit de 1 µl/heure ou 10 µl/heure.

Le platine a ensuite été mesuré par spectroscopie d'absorption massique, sur des coupes de 1 mm. La concentration mesurée était maximale sur la coupe correspondant au site d'injection de la drogue (Figure II-17). D'autre part, les taux de platine étaient en moyenne plus élevés avec le débit le plus rapide (*i.e.* 10 µl/heure), mais ceci de façon non significative.

Le graphique présenté indique que 5 à 6 µg/g de platine sont présents sur la coupe du point d'injection. Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de Carson *et al.* [Carson 2002], puisque le délai entre la fin des injections et les dosages n'est pas précisé. On peut cependant noter que dans un rayon de 3 mm autour du point d'injection, on mesure encore 1 à 2 µg/g de platine pour le débit de 1 µl/heure, et jusqu'à 2,5 µg/g pour 10 µl/heure.

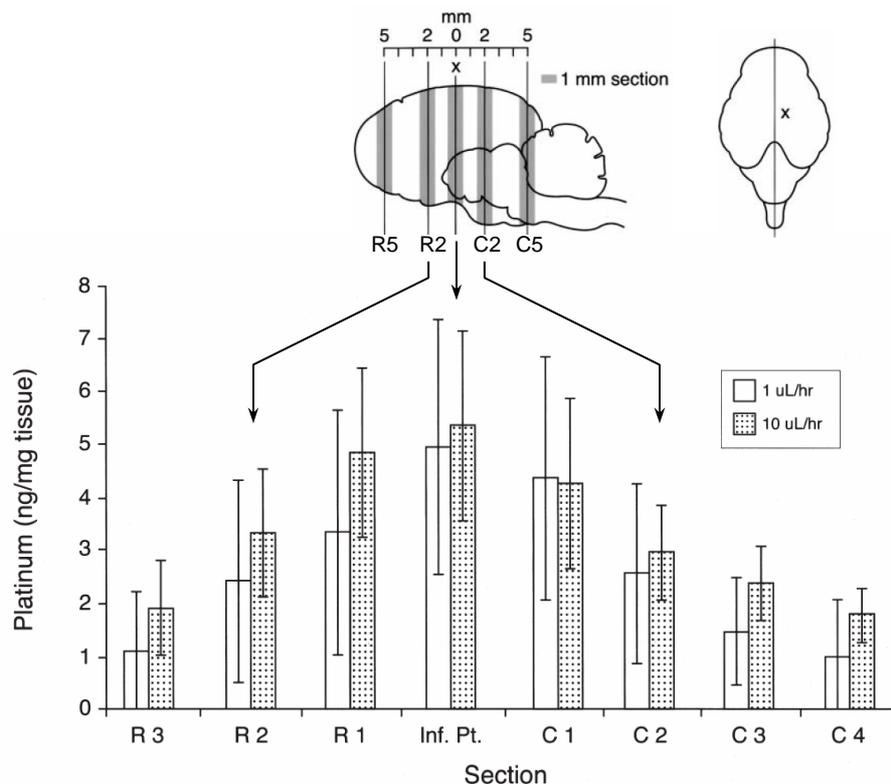


Figure II-17 : Distribution de platine, après injection intracérébrale de carboplatine, chez des rats porteurs de tumeur F98. Deux débits ont été testés (1 µl/h et 10 µl/h) grâce à des pompes osmotiques délivrant la drogue sur 7 jours. Le schéma représente les coupes coronales rostrales (R) et caudales (C), faites autour du point d'injection (X). Les résultats sont exprimés en moyenne (sur 3 coupes) ± déviation standard (*d'après Khan 2005*).

II.3.4 L'iodo-désoxyuridine, analogue de la thymidine

II.3.4.1 Généralités

L'IUdR (5-Iodo-2'désoxyuridine, ou Iodo-désoxyuridine) a été décrit pour la première fois en 1959 par Prussof, en tant que marqueur de la prolifération cellulaire et vecteur potentiel de radio-isotope dans l'ADN. Ces propriétés de radiosensibilisateur ont été démontrées peu de temps après.

De formule chimique $C_9H_{11}IN_2O_5$ et de masse molaire $354,10 \text{ g.mol}^{-1}$, l'IUdR est un analogue de la base thymidine, dans lequel le groupement 5-méthyle (CH_3) de l'anneau pyrimidine est remplacé par un atome d'iode (Figure II-18). Les rayons de Van der Waals du groupe CH_3 et de l'atome d'iode étant similaires ($2,0 \text{ \AA}$ et $2,15 \text{ \AA}$, respectivement) [Rodriguez 1994], l'IUdR peut entrer en compétition avec la thymidine pour s'incorporer dans l'ADN, au moment de la phase de synthèse⁹ (phase S) du cycle cellulaire, ou pendant la réparation (phase G_1). Le taux d'incorporation est directement proportionnel au nombre de cellules en division. Même s'il est plus faible que celui de la thymidine, une quantité importante d'IUdR peut pénétrer dans l'ADN de cellules en division, et rester ensuite de façon stable pendant toute la durée de vie de la cellule ou de sa progéniture [Kassis 1998]. Cependant *in vivo* dans la circulation sanguine, si l'IUdR n'est pas incorporé dans l'ADN, il est rapidement déhalogéné ou déglycosylé en iodo-uracile.

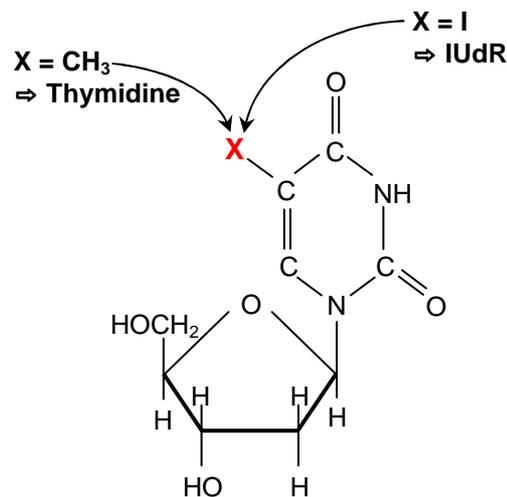


Figure II-18 : Analogie structurelle de la thymidine et de l'iodo-désoxyuridine.

⁹ La phase S (*S pour synthèse*) du cycle cellulaire correspond à la phase de réplication semi-conservative de l'ADN. Les brins de chaque chromosome sont séparés par coupure des liaisons hydrogènes et un nouveau chromosome (ou chromatide) est reconstruit sur chaque brin par apport des bases complémentaires. La phase S assure la pérennité de l'information génétique des cellules filles et se termine lorsque chaque chromosome est remplacé par deux chromatines sœurs.

Dans une tumeur, où la croissance cellulaire est rapide, il existe en permanence des cellules qui accomplissent un cycle cellulaire et qui sont donc capables d'incorporer l'IUdR dans leur ADN lors de leur passage en phase S. Etant donné que les cellules du cerveau se divisent peu ou pas, les tumeurs cérébrales représentent une cible potentielle privilégiée pour l'IUdR.

II.3.4.2 Problème de toxicité pour une application clinique

Bien que l'IUdR cible les cellules proliférant rapidement, et privilégie donc les cellules cancéreuses, son utilisation clinique se heurte à plusieurs limitations importantes.

Tout d'abord, la dégradation biologique de l'IUdR est rapide ; il est instable *in vivo* puisque sa demi-vie moyenne dans la circulation sanguine est inférieure à 5 minutes chez l'homme et 7 minutes chez la souris [Kassis 1998]. D'autre part, l'IUdR s'incorpore dans les cellules en division, qu'elles soient saines ou cancéreuses. Ainsi, s'il est administré par voie systémique, tous les tissus sains dont le renouvellement cellulaire est rapide (*i.e.* : la moelle osseuse, la rate, l'intestin, l'estomac ou la peau), vont subir une toxicité élevée. Enfin, si l'IUdR agit sur l'ADN des cellules tumorales engagées en phase S, et s'il peut éventuellement avoir un effet sur des cellules procédant à des réparations de leur ADN, il ne ciblera pas toutes les cellules se trouvant dans une autre phase du cycle cellulaire, c'est-à-dire la majorité des cellules cancéreuses.

Dans le cadre d'une thérapie du glioblastome, tumeur à croissance rapide et particulièrement agressive, ces limitations peuvent être contournées de diverses façons. Dans un premier temps une administration locorégionale, intra-cavitaire ou intra-tumorale par exemple, semble indispensable car elle favorise le ciblage des cellules tumorales et contourne le problème de la dégradation systémique rapide. Cela évite également une trop grande dispersion dans l'ensemble de l'organisme et permet de protéger les tissus normaux à prolifération rapide. Dans un deuxième temps, une infusion prolongée continue ou séquentielle cible davantage de cellules cancéreuses (voire toutes) puisqu'elle permet d'exposer les cellules tumorales au fur et à mesure qu'elles s'engagent en phase de synthèse du cycle cellulaire [Sgouros 1998].

II.3.4.3 Rôle des radio-isotopes

Le marquage de l'IUdR par les radio-isotopes de l'iode tels que l'iode 131 (¹³¹Iode), l'iode 125 (¹²⁵Iode) et l'iode 123 (¹²³Iode) est fréquemment reporté dans la littérature. Ces radio-isotopes peuvent présenter un intérêt clinique diagnostique, ou même thérapeutique du fait de leur toxicité biologique.

L'iode 131 est émetteur de rayonnements β^- , qui agissent dans un rayon de 100 μm à 200 μm . Ainsi, 99 % de l'énergie est dispersée dans les cellules environnantes et l' ^{131}I n'est très probablement pas toxique pour les cellules dans lesquelles il est incorporé [Mairs 2000; Dupertuis 2003]. Il semble approprié pour des masses tumorales, plutôt que pour des cellules cancéreuses éparses dans des tissus sains.

Les radio-isotopes de l'iode émetteurs de rayonnements Auger, c'est-à-dire l' ^{125}I et ^{123}I , offrent sans doute une meilleure sélectivité sur des cellules en prolifération. En effet, les électrons Auger émis possèdent un périmètre d'action bien plus restreint (quelques nanomètres seulement) et les dommages engendrés se situent dans la proximité immédiate du site de désintégration. Si le radionucléide ($^{125}\text{IUdR}$ par exemple) est incorporé au sein de l'ADN, la cassure du double brin d'ADN produite est généralement irréparable et conduit à la mort de la cellule ciblée, d'où l'importance de la localisation du radionucléide dans l'ADN du noyau. Le potentiel thérapeutique de $^{125}\text{IUdR}$ et de $^{123}\text{IUdR}$ est reconnu chez la souris porteuse de cancer ovarien ou le rat ayant des métastases leptoméningéales. L'efficacité de $^{125}\text{IUdR}$ sur les gliomes est étudiée, et la méthode d'injection locorégionale (*i.e.* intratumorale) semble une donnée primordiale [Kassis 1998].

II.3.4.4 Taux d'incorporation de l'IUdR

II.3.4.4.1 Relations avec la durée du cycle cellulaire *in vitro* et *in vivo*

Une corrélation directe a été établie entre le pouvoir radiosensibilisant et le pourcentage de remplacement de la base thymidine dans l'ADN se répliquant [Williams 1998; Doiron 1999; Rodriguez 1994]. Par conséquent l'efficacité des analogues de la thymidine dépend à la fois du nombre de substitutions qui vont avoir lieu au sein de l'ADN d'une seule cellule néoplasique, et de la proportion de cellules qui vont être touchées par ces modifications. Ces deux taux de substitution sont importants et une corrélation existe avec à la fois la concentration et la durée d'exposition à la pyrimidine halogénée.

Lawrence *et al.* ont montré qu'après plusieurs jours d'exposition au BrdU¹⁰ ou à l'IUdR, le taux d'incorporation des cellules *in vitro* pouvait atteindre un plateau : 35 % ou 30 %, respectivement, après quatre jours d'incubation pour des cellules HT29 de carcinome humain du

¹⁰ La bromodeoxyuridine (5-bromo-2-deoxyuridine ou BrdU) est une pyrimidine halogénée, analogue de la thymidine qui peut se substituer à cette base pendant la phase de synthèse de l'ADN, tout comme l'IUdR.

colon [Lawrence 1990]. Comparativement aux données *in vitro*, le temps de doublement *in vivo* des cellules tumorales étant plus élevé, une durée d'exposition plus longue est sans doute nécessaire pour atteindre le taux maximal de remplacement de la thymidine. D'après Rodriguez *et al.*, la saturation obtenue suit une cinétique de type exponentielle, dont la demi-vie est de l'ordre du temps de doublement de la population cellulaire tumorale. Cette loi semble se vérifier pour les deux taux de substitution (*i.e.* le nombre de thymidines remplacées au sein d'une seule cellule et la proportion de cellules tumorales touchées) [Rodriguez 1994]. Il semblerait également qu'il soit plus important de toucher une large population de cellules avec un taux de remplacement de thymidine faible, plutôt que d'avoir peu de cellules ciblées avec beaucoup de thymidine substituée par l'IUdR.

II.3.4.4.2 Conséquences cliniques

Sur un modèle de tumeur humaine implantée en sous-cutanée chez la souris, Rodriguez *et al.* ont réussi à cibler 94 % des cellules tumorales et à remplacer 2 % des bases thymidine par l'IUdR, ceci après une exposition de 120 heures. Ces données peuvent être raisonnablement extrapolées aux tumeurs solides chez l'homme dont le temps de doublement est de l'ordre de 3 à 10 jours. Dans ce cas, si la relation exponentielle est applicable, il faut envisager des injections continues de 15 à 50 jours pour obtenir des taux de remplacement significatifs et efficaces

Bien que des infusions continues aient été utilisées en clinique, aucune n'était aussi longue que 5 à 6 fois le temps de doublement, ce qui représente la durée nécessaire pour qu'une fraction suffisante de cellules soit touchée et que la radiosensibilisation soit efficace [Kinsella 1998]. On notera d'ailleurs qu'il est particulièrement difficile d'exposer les cellules pendant plusieurs divisions cellulaires par voie veineuse, étant donné la dégradation rapide du composé dans la circulation sanguine. Ainsi lors d'essais cliniques, des biopsies de tumeurs ont révélé que le taux d'incorporation de pyrimidine halogénée (après injection systémique) était de l'ordre de 4 % [Williams 1998], ce qui est particulièrement faible.

Plusieurs études précliniques ont été conduites pour déterminer un mode d'injection loco-régional prolongé efficace pour optimiser la radiosensibilisation des cellules tumorales (implants polymères [Williams 1998], liposomes [Harrington 2004], pompes osmotiques [Deutsch 1989; Deutsch 1990; Rodriguez 1994; Kassis 1998; Mairs 2000]). Des efforts de recherches sont toujours menés dans ce sens.

II.3.4.5 Dosages utilisés *in vivo* et résultats de survie obtenus dans la littérature

Seuls les essais de thérapie pré-clinique utilisant une injection d'IUdR sont présentés ici : on ne décrira pas les dosages utilisés pour déterminer les taux d'incorporation de l'IUdR *in vivo*.

II.3.4.5.1 $^{125}\text{IUdR}$ (pompe osmotique)

Avec des injections d'IUdR radiomarqué à l'iode 125, Kassis *et al.* ont observé une augmentation de survie réelle ainsi que des survivants à long terme. L'étude a été conduite sur des rats porteurs de gliosarcome 9L (2.10^4 cellules dans le noyau caudé), deux traitements par pompe osmotique (modèle 1007D ; 0,5 $\mu\text{l/h}$) ont été évalués. Le premier consiste en une infusion de 5,7 μM d' $^{125}\text{IUdR}$ (dans 20 μl) pendant 34 heures (soit 40,3 ng d' $^{125}\text{IUdR}$), 1 jour après inoculation des cellules tumorales. La survie médiane des rats traités est de 26 jours (contre 18 jours pour les non-traités) ce qui représente un pourcentage d'augmentation de survie (ILS) de 50 % ; 20 % des rats survivent au-delà de 85 jours. Le second traitement débute 9 jours après inoculation des cellules, le dosage d' $^{125}\text{IUdR}$ est de 1,33 μM (dans 86 μl) pendant 6 jours (soit 40,5 ng d' $^{125}\text{IUdR}$). L'ILS associé est modeste (22%), mais 10 % des rats survivent au-delà de 65 jours (fin de l'étude) [Kassis 1998].

II.3.4.5.2 Combinaison IUdR (pompe osmotique) et radiothérapie

Deutsch *et al.* ont montré que la radiothérapie associée à de l'IUdR stable pendant 7 jours augmentait de façon significative la survie de rats porteurs de tumeur cérébrale 9L [Deutsch 1989; Deutsch 1990].

Une première étude est reportée pour des rats ayant reçu 5.10^5 cellules 9L dans le fluide cérébrospinal (CSF) du ventricule latéral. L'IUdR est administré (dans le CSF) à partir du jour d'implantation et en continu grâce à une pompe osmotique (modèle 2001 ; 1 $\mu\text{l/h}$). Le dosage est de 8,4 mg dans 168 μl (*i.e.* 1,2 mg/jour et 50 mg/ml). La radiothérapie (4 MV) est délivrée en 3 fractions (8 Gy) 4, 6 et 7 jours après inoculation des cellules. L'IUdR seul ne prolonge pas la survie des rats. La radiothérapie seule permet une augmentation modeste mais significative de la survie médiane, cependant aucun rat ne survit à long terme. La combinaison IUdR et irradiation augmente davantage la survie et 1/10 rat est toujours en vie 8 mois plus tard [Deutsch 1989].

Une seconde étude similaire a été réalisée en implantant cette fois-ci 5.10^4 cellules 9L dans le noyau caudé. Les rats ont ensuite été traités par : 8,4 mg d'IUdR (168 μl) sur 7 jours comme décrit précédemment, irradiation X (4 MV) du cerveau entier avec une dose de 24 Gy en 3 fractions (4, 6 et 7 jours après implantation) ou la combinaison des deux. L'IUdR et l'irradiation

provoquent chacun une augmentation faible et non significative ($p > 0,05$) de la survie médiane. La combinaison engendre une augmentation significative (relativement aux témoins ou à chacune des modalités), cependant aucun rat ne survit au-delà de 54 jours [Deutsch 1990].

II.3.4.5.3 Combinaison IUdR et radiothérapie synchrotron (SSR)

Un étude préliminaire de l'efficacité de l'IUdR stable a été réalisée sur des rats porteurs de gliome F98 (10^3 cellules dans le noyau caudé) dans le cadre de la thèse de Jean-François Adam. Les rats ont reçu 10 mM d'IUdR (dans 5 μ l d'eau stérile ; soit 17,7 μ g d'IUdR) intra-tumoral en mode « bolus » (voir § IV.1.2.1 p.91), 13 jours après implantation de la tumeur, suivie 24 heures plus tard d'une irradiation SSR (50 keV) de 10 Gy. Les survies médiane et moyenne sont respectivement de 37 jours (ILS = 52 %) et $39 \pm 6,7$ jours (ILS 52 %) pour ce traitement combiné ; contre 35,5 et $36,2 \pm 6,1$ jours pour une irradiation seule de 10 Gy [Adam 2003a, p233-235]

II.3.4.5.4 Combinaison IUdR (liposomes) et radiothérapie

Harrington et ses collaborateurs ont testé plusieurs sortes de traitements : IUdR encapsulé ou non dans des liposomes (PLIUdR), associé ou non à différents protocoles de radiothérapie (source ^{137}Cs), sur des souris nude femelles ayant reçu $5 \cdot 10^6$ cellules (HNSCC KB¹¹) dans le flanc (injection sous-cutanées). L'IUdR est administré par des injections (1 ou 4) *bolus* intra-veineuses (i.v.) ou en continu par voie sous-cutanée (pompe osmotique : 48 mg/kg sur 7 jours), le PLIUdR a été testé en i.v. uniquement. Les injections *bolus* i.v. d'IUdR ou PLIUdR, consistent en une dose de 24 mg/kg 16 h avant irradiation ou 4 doses de 12 mg/kg réparties sur 7 jours avant irradiation. La radiothérapie est délivrée en une seule fraction (4,5 et 9 Gy), ou plusieurs (9 Gy sur 3 jours [3 fractions de 3 Gy] et 15 Gy sur 5 jours [5 fractions de 3 Gy]). Bien qu'il ne s'agisse pas d'un modèle de tumeur cérébrale, les résultats et conclusions de cette étude sont intéressants. Lorsque l'IUdR (ou le PLIUdR) est injecté en un seul *bolus* i.v., il n'a aucun effet sur la radiothérapie en fraction unique. Par contre, lorsque le PLIUdR est injecté sur 7 jours, il augmente significativement l'effet d'une irradiation par fraction unique de 4,5 Gy ($p < 0,01$) ou fractionnée (9 et 15 Gy) [Harrington 2004].

¹¹ HNSCC signifie *head and neck squamous cell carcinoma*, il s'agit donc de cellules squameuses humaines du cancer tête et cou.

II.4 Rayons X et atomes lourds présents dans l'ADN

Il est utile de définir quelques notations avant d'aborder cette partie : *pb* signifie paire de bases, *Gpb* (G pour giga) désignera 10^9 paires de bases ; *DSB* (acronyme anglais de *double strand break*) est utilisé pour cassure double brin, *SSB* pour cassure simple brin.

Il est également intéressant de préciser ce qu'est un radiosensibilisant. Il s'agit d'un composé qui va accroître l'effet des radiations. Pour certains, le terme radiosensibilisation n'est utilisable que si l'augmentation de l'effet des radiations est obtenu avec une drogue (sensibilisante) absolument non-toxique au dosage où elle est utilisée [Nias 1985]. Il est important de garder en mémoire cette définition au sens strict pour aborder le cas du platine sous forme de cisplatine, agent connu pour son extrême toxicité.

II.4.1 Rapides notions sur les radiations ionisantes

La relaxation d'atomes excités par des photons à leur énergie d'absorption, influence les dommages biologiques causés par l'irradiation elle-même. Dans la gamme d'énergie que nous utilisons (30 à 100 keV), les interactions photons-matières prédominantes sont l'effet Compton (pour des électrons peu liés) et l'effet photo-électrique (pour des électrons fortement liés). Lorsqu'un électron d'une couche interne est arraché par l'une de ces interactions, il en résulte une vacance électronique qui est comblée par un électron d'une couche plus externe ; l'énergie excédentaire peut être libérée par un processus radiatif (fluorescence) ou non-radiatif conduisant à l'émission d'électrons (effet Auger appelé aussi cascade Auger). Ces électrons ont généralement un faible parcours (échelle nanométrique) et génèrent des dépôts d'énergie élevés et localisés.

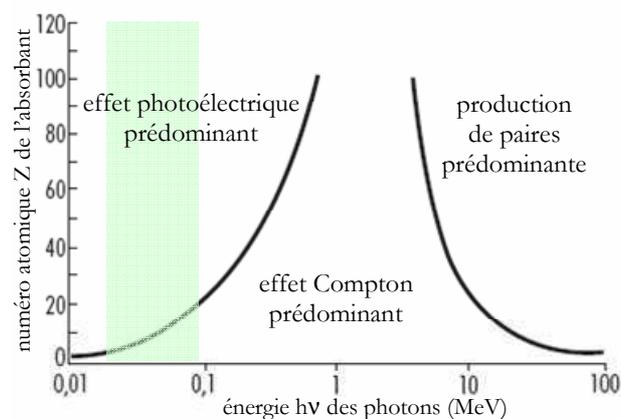


Figure II-19 : Zones de prédominance des interactions en fonction de l'énergie des photons et du numéro atomique. Les lignes d'isoprobabilités d'apparition des effets sont représentées. La zone verte correspond aux énergies utilisées dans le cadre de nos études en rayonnement synchrotron (*d'après [Cherry 2007]*).

Le diagramme de la Figure II-19 montre l'importance relative des différentes interactions photon-matière en fonction de l'énergie et du numéro atomique. L'effet photoélectrique est prédominant à basse énergie (< 100 keV) et sa probabilité d'apparition augmente avec le numéro atomique de la cible. Les sections efficaces de photo-absorption des couches K et L des atomes de platine et iode, en fonction de l'énergie des photons incidents sont représentées Figure II-20.

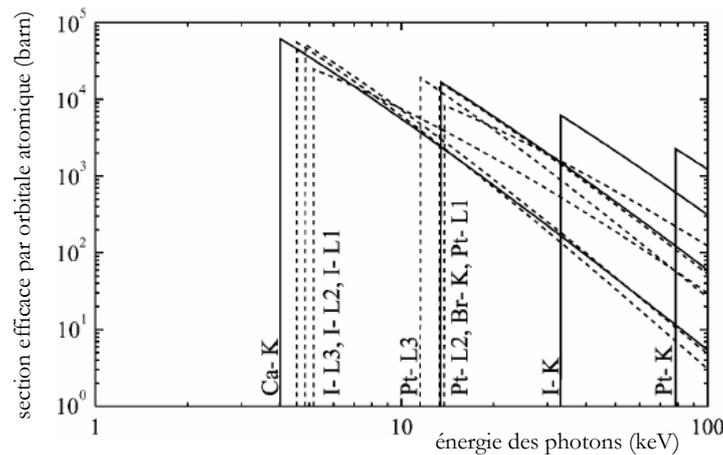


Figure II-20 : Section efficace de photo-absorption des couches internes (K en trait plein et L en pointillés) des éléments Ca, Br, I et Pt [Bernhardt 2004].

II.4.2 Effet Auger et énergie d'irradiation

Les électrons Auger sont des particules de faible énergie et faible parcours (typiquement quelques nanomètres). Ces électrons possèdent donc un très haut transfert d'énergie linéique (TEL), et sont capables de créer des cassures du double brin de l'ADN, s'ils sont générés à proximité [Fairchild 1982; Karnas 1999; Goorley 2000; Le Sech 2001; Pignol 2003; Usami 2005].

Trois phénomènes physiques peuvent générer l'émission d'électrons Auger :

- la capture électronique, qui désigne une réaction de physique nucléaire au cours de laquelle un noyau atomique capture un électron venant de l'extérieur du noyau ;
- la conversion interne, processus de désexcitation d'un noyau d'atome qui transfère tout ou partie de son énergie d'excitation à un électron des couches K ou L. Cette énergie, si elle est supérieure à l'énergie de liaison de l'électron, permet son expulsion de l'atome ;
- l'effet photoélectrique en couche atomique profonde, durant lequel un photon est absorbé par un atome qui expulse alors un électron des couches K, L, M ou N.

L'effet photoélectrique peut être déclenché par un rayonnement X externe. Sa probabilité d'apparition est alors étroitement liée à l'énergie des photons et à l'atome considéré que l'on

cherche à exciter. D'autre part, la probabilité de désexcitation non-radiative (effet Auger) varie en fonction du numéro atomique de l'élément ciblé (la voie radiative étant la fluorescence).

L'objectif est donc d'incorporer un élément (platine ou iode dans notre cas) au sein des cellules tumorales, au plus près de l'ADN et de l'irradier par une source externe de rayonnement X. Les ionisations en couche L sont largement plus favorables qu'en couche K pour engendrer une désexcitation non-radiative, et cet effet s'accroît pour les éléments de numéro atomique élevé ($Z > 50$) [Corde 2002a]. Dans le cas du platine ($Z = 78$; énergie du seuil K : 78,395 keV), la création d'une lacune en couche K conduit à 96,3 % de fluorescence et 3,7 % de processus non-radiatifs, tandis qu'une lacune en couche L_I génère 11,4 % de fluorescence et 88,6 % de désexcitation non-radiative. Cependant pour une application clinique, l'excitation (par effet photoélectrique) des raies L du platine n'est pas envisageable, car elle nécessite d'utiliser des rayons X trop peu pénétrants (L_I : 13,880 keV ; L_{II} : 13,273 keV ; L_{III} : 11,564 keV). Pour les irradiations monochromatiques en mode tomographie réalisées au synchrotron en présence de platine, l'énergie choisie est donc de 78,8 keV (*i.e.* juste au dessus du seuil K).

Dans le cas de l'iode ($Z = 53$; énergie du seuil K : 33,169 keV), une lacune en couche K provoque 88,4 % de fluorescence et 11,6 % de désexcitation non-radiative tandis qu'une lacune en couche L engendre 4,4 % et 95,6 % de processus respectivement radiatifs et non-radiatifs. On rappellera que les énergies des couches L de l'iode (L_I : 5,188 keV ; L_{II} : 4,852 keV ; L_{III} : 4,557 keV) sont encore plus faibles que celle du platine. Il a été montré que l'augmentation de dépôt de dose liée à la présence de l'atome d'iode n'était pas maximale à 33 keV (*i.e.* juste au dessus du seuil K) mais à 50 keV [Karnas 1999]. Cette énergie sera donc choisie pour les irradiations monochromatiques en présence d'IUDR.

II.4.3 Simulations Monte-Carlo à l'échelle de l'ADN et en présence d'atomes lourds

Bernhardt *et al.* ont cherché à tester l'importance biologique des ionisations internes, à l'aide de simulations Monte-Carlo. Ils ont quantifié le nombre d'ionisations et relaxations des atomes propres à la molécule d'ADN et de celles engendrées par des atomes externes liés à l'ADN, iode (I), platine (Pt), brome (Br) et calcium (Ca). Ils ont également calculé l'énergie locale déposée par toutes ces interactions.

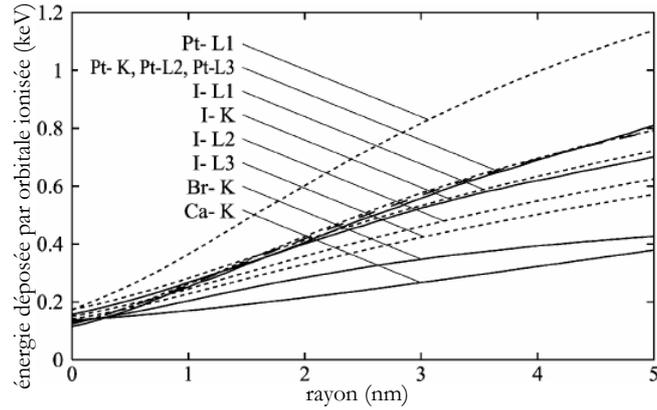


Figure II-21 : Energie déposée par ionisation en fonction de l'orbitale touchée (K en trait plein, L en pointillés), pour des atomes Ca, Br, I et Pt. L'énergie est calculée à l'intérieur d'une sphère autour de l'atome qui relaxe, en fonction du rayon de cette sphère [Bernhardt 2004].

Pour des atomes de platine, et dans un domaine d'action sphérique (de rayon < 5 nm), ils montrent que l'ionisation en couche L1 génère un plus grand dépôt d'énergie qu'une vacance en couche K (Figure II-21). La relaxation d'un atome de Pt ionisé en couche K, émet des particules d'énergie totale 78 keV, mais seulement 0,8 keV (*i.e.* 1%) est absorbée dans une sphère de 5 nm.

D'autre part, le calcul du nombre de photo-absorptions par Gy et pour 10^9 atomes liés montrent que les relaxations (des atomes liés) sont peu nombreuses par rapport aux cassures doubles brins (DSB) produites par une irradiation X (environ 5-10 DSB/Gy et Gpb) [Prise 1998]. De part et d'autre du seuil K du Pt, moins de 1 relaxation/Gy et Gpb est obtenue Figure II-22.

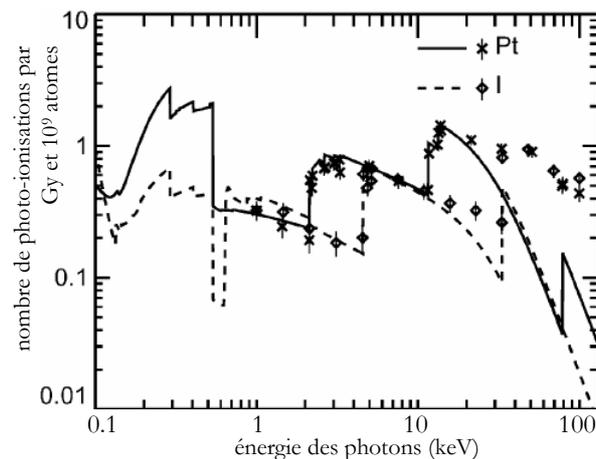


Figure II-22 : Nombre de photoabsorptions par Gy et pour 10^9 atomes liés (I et Pt), en fonction de l'énergie des photons incidents. Les lignes représentent les sections efficaces, les symboles sont les résultats de la simulation (les barres sont les déviations standards dues à la statistique) [Bernhardt 2004].

Ainsi, dans le cas décrit par Le Sech *et al.* où une concentration maximale de 0,2 atomes de platine par paire de bases est atteinte (soit $1,2 \times 10^9$ atomes de Pt liés pour tout le noyau d'une cellule humaine, qui contient 6 Gpb) [Le Sech 2000], l'efficacité est maximale autour d'une énergie d'excitation de 0,25-0,55 keV, avec 3 relaxations/Gy et Gpb (Figure II-22).

On notera que ces travaux ont été réalisés avec la chloroterpyridine platine (PtTC), complexée à l'ADN de plasmides. Une saturation de l'ADN en PtTC est observée pour un ratio = (nombre d'atomes Pt)/(nombre d'atomes de phosphore dans l'ADN) = 1/10, équivalent à une moyenne de 1 molécule de PtTC toutes les 5 paires de bases. Cela correspond à une quantité très importante d'atomes de Pt intégré à l'ADN ($1,2 \times 10^9$ atomes de Pt liés pour une cellule). Dans le cas du cisplatine, les quantités de Pt tolérables *in vivo* sont beaucoup plus faibles [Corde 2002a].

Bernhardt et ses collaborateurs concluent que le nombre de relaxations des couches internes (produites par une irradiation avec des photons) est généralement petit en comparaison avec le nombre total des cassures double-brin produites par l'irradiation elle-même. Cela suggère que la relaxation des couches internes des atomes présents dans l'ADN a peu d'influence sur les dommages induits sur l'ADN par l'irradiation. Si on fait l'hypothèse que la relaxation d'un atome de Z élevé ionisé engendre une DSB dans son voisinage, une relaxation (par Gy et Gpb) d'un atome lié n'augmentera que très peu le nombre de DSB (par Gy et Gpb) induites par l'irradiation même (5 à 10 DSB/Gy et Gpb ; [Prise 1998]). Cela est dû au faible nombre d'atomes liés par paire de bases, pourtant déjà très élevé.

Il est intéressant de mettre en parallèle ces résultats de simulation avec d'autres études réalisées ultérieurement au niveau cellulaire ou moléculaire dans l'équipe.

II.4.4 Irradiation monochromatique d'atomes de platine présents dans l'ADN

II.4.4.1 Echelle cellulaire

L'étude présentée ici a été réalisée dans le cadre de la thèse de Stéphanie Corde, sur des cellules SQ20B, lignée dérivant d'un carcinome humain du larynx. Le premier critère pour connaître l'efficacité d'un traitement combinant cisplatine et irradiation monochromatique 400 eV au-dessus ou en dessous du seuil K du platine (78,39 keV), a été la survie cellulaire (tests de clonogénicité). La distribution subcellulaire du platine a été étudiée par SR-XRF¹², et a permis de vérifier une localisation dans le noyau. La corrélation entre la toxicité du cisplatine et le contenu

¹² Cette technique de microanalyse repose sur l'induction de fluorescence X par rayonnement synchrotron (*Synchrotron Radiation induced X-Rays Fluorescence*).

intra-cellulaire en platine (mesure ICP-MS¹⁵) est montrée pour différentes expositions des cellules au cisplatine (Tableau II-8). La survie cellulaire est de 100 % pour les cellules contrôles ; elle n'est plus que de 66 % et 17 % (*i.e.* toxicité intrinsèque de 34 % et 83 %), pour respectivement 0,1 μM de cisplatine pendant 48 heures, et 1 μM pendant 12 heures.

Aucune différence de taux de survie des cellules n'est apparue entre les irradiations d'énergie légèrement supérieure et inférieure au seuil d'absorption K du platine. L'hypothèse la plus probable est que la quantité d'atomes de platine n'est pas suffisante au très proche voisinage de l'ADN [Corde 2002a; Corde 2002b]. On remarquera que les calculs de Bernhardt *et al.* présentés précédemment (§ II.4.3) ont été réalisées pour des cellules contenant $1,2 \times 10^9$ atomes de Pt liés à l'ADN et que le nombre d'atomes de Pt par cellule SQ20B n'est ici que $4,5 \times 10^6$ pour une survie spécifique de 17 %.

Exposition au cisplatine		Survie spécifique (%)	Nombre d'atomes de Pt par cellule
concentration	durée		
0,1 μM	48 heures	66	$7,0 \times 10^4$
3 μM	6 heures	25	$4,0 \times 10^6$
1 μM	12 heures	17	$4,5 \times 10^6$
10 μM	6 heures	0,8	$7,5 \times 10^6$
3 μM	12 heures	0,4	$9,0 \times 10^6$

Tableau II-8 : Contenu intra-cellulaire de platine (mesure ICP-MS), en fonction de l'exposition des cellules SQ20B au cisplatine, et survie spécifique associée [Corde 2002a].

II.4.4.2 Echelle moléculaire

Il s'agissait dans cette étude [Corde 2002a, Corde 2003b], d'observer les taux de cassures de brins de l'ADN (SSB et DSB) engendrés par une irradiation monochromatique de part et d'autre du seuil K du platine (78,39 keV). Pour des cellules SQ20B préalablement traitées avec 0 ou 3 μM de cisplatine pendant 6 heures, les irradiations réalisées à une énergie légèrement supérieure ou inférieure au seuil K du platine ne produisent pas de différence significative du taux de SSB générées. Par contre, les cellules incubées avec 30 μM de cisplatine pendant 6 heures et irradiées à 78,8 keV (16 Gy) présentent 4 fois plus de SSB et 3 fois plus de DSB que les cellules irradiées à 78,0 keV. On sait que la survie spécifique cellulaire est de 25 % pour 3 μM pendant 6 heures (et 0,8 % pour 10 μM pendant 6 heures); on remarquera que la survie spécifique (et donc la toxicité intrinsèque) pour 30 μM pendant 6 heures n'est pas précisée (le nombre d'atomes de Pt par cellule est de 3×10^8).

¹⁵ Il s'agit d'une technique de spectrométrie de masse où un spectromètre de masse quadripolaire est couplé à une torche à plasma (*Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer*).

Dans une autre étude [Biston 2004a, Biston 2004b], des cellules F98 ont été traitées avec 30 μ M de cisplatine pendant 6 heures, avant de recevoir une dose de 30 Gy. La production de DSB induite par l'irradiation à 78,0 keV et 78,8 keV est respectivement 2 et 3 fois supérieure à celle engendrée aux autres énergies testées (30, 40 et 85 keV). Il y a donc un rapport de 1,5 entre 78,8 et 78 keV pour ces cellules F98. Le cisplatine seul n'induit aucune DSB détectable.

II.4.4.3 Survie animale

On rappellera simplement ici que les travaux antérieurs réalisés sur des rats porteurs de gliomes F98 (voir § II.3.3.2.3) n'ont montré aucune différence de survie animale entre des irradiations à 78,0 ou 78,8 keV. Pour un traitement combiné de 3 μ g de cisplatine i.c. suivi de 15 Gy, les survies médianes sont de 214 jours (ILS : 723 %) à 78,0 keV et 194 jours (ILS : 646 %) à 78,8 keV ; avec 33 % des rats toujours en vie à 365 jours [Biston 2004 a, b]. L'expérience répétée a donné des résultats similaires ($p > 0,6$).

III TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

III.1 Le rayonnement synchrotron et la ligne médicale de l'ESRF

III.1.1 Généralités

Mis en évidence pour la première fois en 1947 sur un synchrotron de General Electric aux Etats-Unis, le rayonnement synchrotron était alors considéré comme une émission secondaire parasite, responsable d'une grande perte d'énergie des électrons. Aujourd'hui, des machines sont dédiées à l'usage exclusif du rayonnement synchrotron, considéré comme un outil privilégié de recherches fondamentales et appliquées.

III.1.1.1 Principe du rayonnement synchrotron

D'après les équations de Maxwell, toute particule chargée dont la vitesse varie, en valeur absolue ou en direction, émet un rayonnement électromagnétique. Lorsque l'on considère des électrons relativistes et que la déviation de trajectoire est produite par des structures magnétiques particulières (aimants de courbures, *wigglers* ou onduleurs), on parle de rayonnement synchrotron. L'émission de rayonnement se fait tangentiellement à la trajectoire des électrons, et le spectre continu s'étend de l'infrarouge aux X durs avec une très grande intensité.

III.1.1.2 Production et modes de fonctionnement

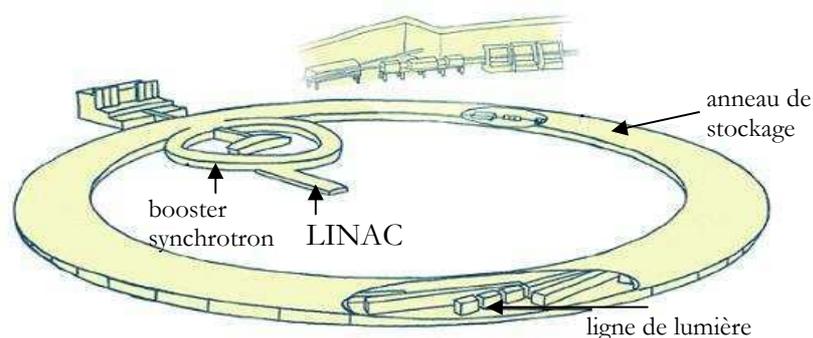


Figure III-1: les différents éléments du synchrotron grenoblois. (d'après www.esrf.fr).

Les électrons, initialement émis par un canon, sont ensuite accélérés en deux étapes. En effet, ils traversent tout d'abord un accélérateur linéaire appelé LINAC (Figure III-1) qui les porte à une énergie de 200 MeV ; puis ils passent dans un accélérateur circulaire appelé booster pour atteindre

une énergie de 6 GeV. Ils sont alors injectés dans l'anneau de stockage de 840 m de circonférence où ils sont maintenus à énergie constante.

L'anneau de stockage n'est pas parfaitement circulaire : il est constitué d'une succession de parties courbes et de segments de droite. Il contient également quelques cavités radiofréquences pour permettre de restituer aux électrons l'énergie perdue par l'émission de rayonnement synchrotron (ou par les collisions qui se produisent avec des molécules résiduelles d'air malgré le vide poussé qui règne dans le tube).

A la jonction entre 2 sections rectilignes, un aimant de courbure est placé, qui génère un champ magnétique orienté perpendiculairement à la trajectoire des électrons (Figure III-2, A). Ce champ force les électrons à suivre une trajectoire courbe (force de Lorentz) et les aligne dans l'axe du segment suivant. La déviation des électrons conduit à l'émission de rayonnement synchrotron, tangentielllement à la courbure de la trajectoire.

Dans les sections droites de l'anneau, on trouve des éléments d'insertion (*wiggler* ou onduleur) composés d'une succession de petits aimants de polarité alternée (Figure III-2, B). Ces champs magnétiques forcent les électrons à osciller légèrement autour de leur trajectoire pour produire un rayonnement cohérent, intense et très peu divergent. La différence entre les *wigglers* et les onduleurs réside dans la période d'oscillation du champ alternatif, qui influe sur le spectre du faisceau synchrotron émis.

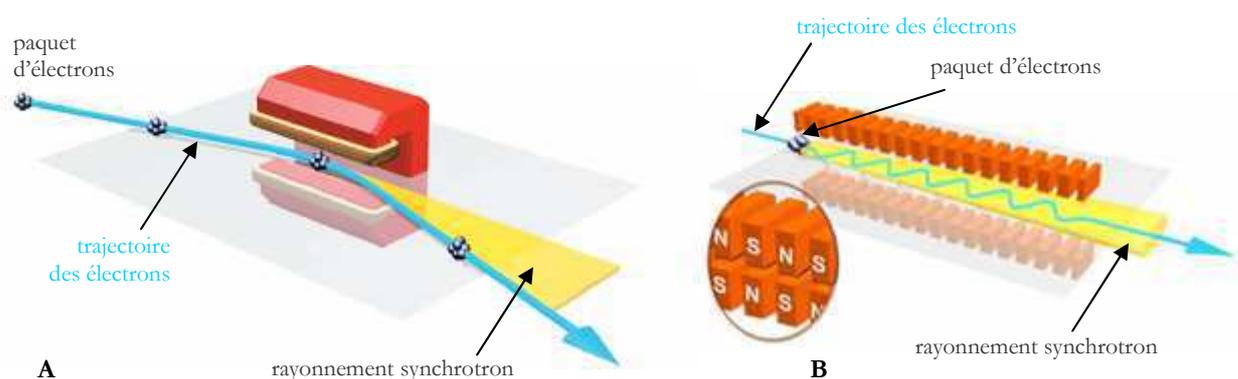


Figure III-2 : Production du rayonnement synchrotron par un aimant de courbure (A) et par un onduleur ou *wiggler* (B).

III.1.2 Organisation de la ligne expérimentale ID17

Les lignes d'expérimentation ou « lignes de lumière » sont organisées en plusieurs compartiments :

- la cabine optique où est conditionné le faisceau suivant les besoins de la ligne,
- la cabine expérimentale où se trouvent échantillons et détecteurs,
- la cabine de contrôle.

Sur ligne de lumière ID17 (pour *Insertion Device 17*) dédiée aux applications médicales, deux salles d'expériences fonctionnant alternativement ont été prévues, leur instrumentation étant adaptée à des besoins spécifiques. La première, plus proche de l'anneau de stockage, concerne la thérapie préclinique par micro faisceaux. La deuxième, située dans un bâtiment satellite à 150 m du *wiggler* source est consacrée à l'imagerie médicale, plus particulièrement à l'angiographie ou la tomographie, ainsi qu'à la radiothérapie renforcée par éléments lourds.

III.1.2.1 Caractéristiques du faisceau

Le rayonnement synchrotron permet de dépasser certaines limites des sources de rayons X conventionnelles (Figure III-3). Il présente en effet, une très haute intensité puisque le flux de photons sur la ligne ID17 par exemple, est supérieur d'un facteur 10^5 à celui d'un tube à rayons X, et couvre un large spectre en énergie. Ainsi, grâce à l'utilisation de monochromateurs, on peut sélectionner un faisceau X de largeur spectrale très restreinte (environ 100 eV dans le cas présent) et dont l'intensité est suffisante pour l'imagerie médicale.

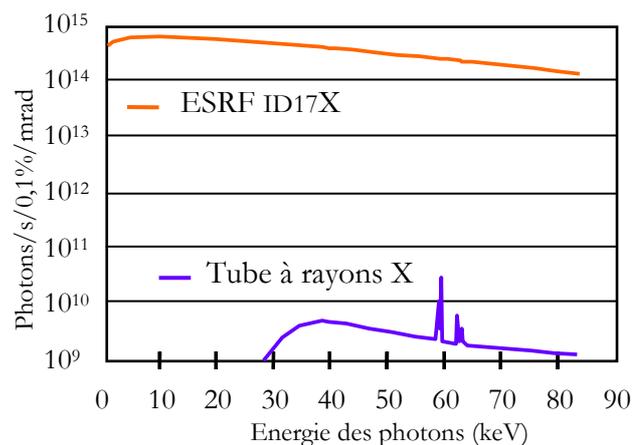


Figure III-3 : Comparaison des spectres issus du *wiggler* ID17 (à 200 mA – Wiggler : 1,4 T - 1,6 m - 150 mm/source) et d'un tube à rayons X classique (110 kV - 2,5 mm Al à 1 m/source).

Le faisceau synchrotron se caractérise également par sa géométrie parallèle très peu divergente. Le bâtiment satellite se trouve donc à 150 m du *wiggler* pour bénéficier d'un faisceau de largeur horizontale ajustable jusqu'à 150 mm et de hauteur n'excédant pas 10 mm.

III.1.2.2 Monochromateur

Un monochromateur est un dispositif optique permettant de sélectionner une bande d'énergie dans un rayonnement à spectre large. Deux monochromateurs sont disponibles sur la ligne expérimentale *ID17*, seul le monochromateur «*fixed exit*» utilisé en mode tomographie est considéré ici. Il est constitué de deux cristaux de silicium d'orientation cristalline 111, légèrement courbés, utilisés en géométrie de Laue (*i.e.* en transmission). Cette configuration permet d'obtenir un faisceau monochromatique, de direction parallèle au faisceau blanc incident, à une hauteur quasi identique (40 ± 3 mm) quelle que soit l'énergie.

Le faisceau blanc incident est diffracté par le premier cristal et une longueur d'onde λ est sélectionnée selon la loi de Bragg :

$$\lambda = \frac{2d_h}{n} \sin \theta \quad \text{où } \lambda \text{ est la longueur d'onde des rayons X diffractés, } d_h \text{ est la distance entre les}$$

deux plans du réseau cristallographique, n est un entier (≥ 1) représentant l'ordre de diffraction, θ est le demi angle de déviation (*i.e.* l'angle entre le faisceau incident et le cristal).

Le second cristal ramène le faisceau quasi monochromatique (de largeur de bande environ 100 eV) dans le plan parallèle au faisceau blanc incident (Figure III-4).

Ce monochromateur est ajustable pour des énergies allant de 20 keV à 90 keV environ.

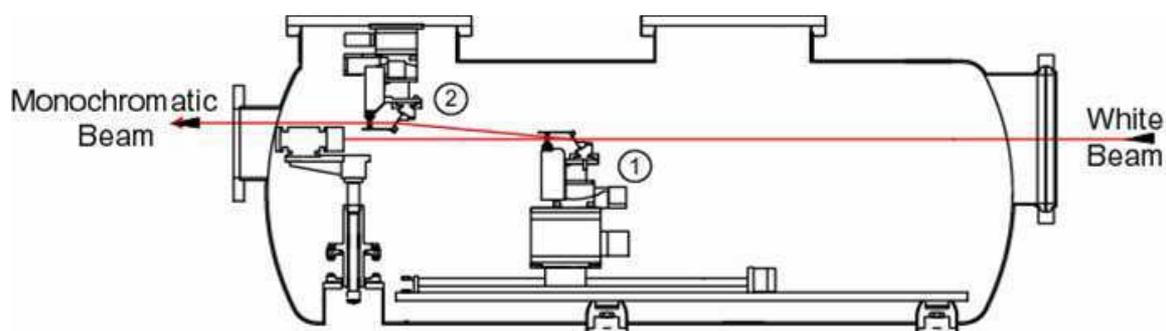


Figure III-4 : Double monochromateur en géométrie de Laue (cristaux en position 1 et 2) installé sur la ligne médicale pour les expériences en mode tomographie.

III.1.2.3 Ajustement du faisceau et système de positionnement

Au niveau de l'échantillon, le faisceau peut atteindre une largeur de 15 cm et une hauteur de 1 à 3 mm suivant l'énergie considérée. Quatre plaques en tungstène de 3 mm d'épaisseur, placées en sortie du monochromateur, permettent d'ajuster finement le faisceau aux dimensions voulues.

Le faisceau étant statique, un dispositif de positionnement sophistiqué a été développé afin d'imager des patients. Ce système précis possède sept degrés de liberté et une excellente rigidité mécanique lors des mouvements de translation ou de rotation (Figure III-5). Pour l'irradiation en mode tomographie, le système permet de positionner l'échantillon dans le champ d'irradiation, de le faire tourner, de le translater verticalement afin de couvrir un volume supérieur à la hauteur du faisceau qui excède rarement 2 mm. Il peut également être synchronisé avec le détecteur afin d'acquérir les profils d'atténuation suivant les incidences souhaitées. L'axe de rotation est contenu dans un cylindre de confusion de moins de 400 μm , tandis que la vitesse de rotation peut atteindre 180 $^\circ/\text{s}$. Enfin, la translation verticale s'effectue avec une précision de 0,5 % sur une hauteur de 200 mm et une vitesse maximale de 500 mm/s.

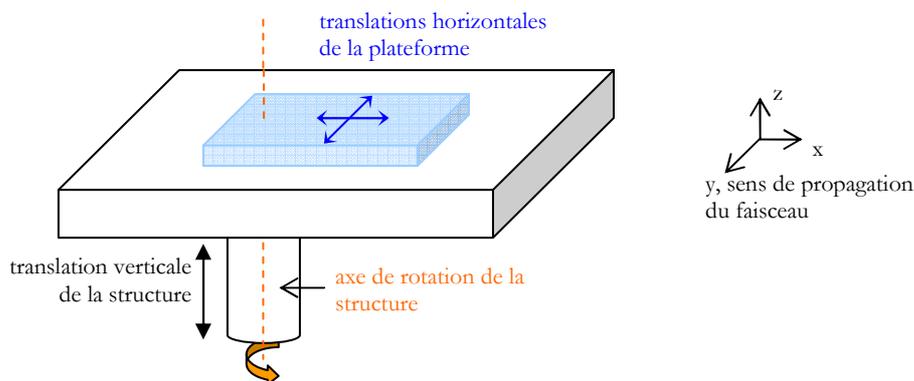


Figure III-5 : Système de positionnement : les échantillons sont placés sur la plateforme tournante (surface colorée), où ils sont maintenus grâce à des supports adaptés. La plateforme peut également être translaturée dans les directions x, y et z (*schéma d'après [Boudou 2006]*).

III.1.2.4 Système de détection

III.1.2.4.1 Détecteur germanium

Il s'agit d'un détecteur germanium haute pureté (HPGe) utilisé pour l'imagerie et la dosimétrie (Eurisys Mesures[®], Lingolsheim, France), associé à une électronique de mesure (Novelec[®], Meylan, France) de grande dynamique (16 bits) qui fonctionne en mode intégration de courant [Elleume 1999].

Ce détecteur a été conçu à partir d'un cristal de Germanium de type P monolithique, d'épaisseur 2 mm, de longueur 160 mm et de hauteur 25 mm (Figure III-6). Cette barrette unique est segmentée électriquement en deux lignes parallèles de 432 pixels chacune, séparées de 0,5 mm. En mode angiographie, les deux rangées permettent de mesurer simultanément les deux faisceaux d'énergies différentes (méthode de soustraction K-edge), alors qu'en mode tomographie (méthode de soustraction temporelle), une seule ligne est utilisée. Chaque pixel a une taille de 10 mm de haut et une largeur de 350 μm ; les résolutions spatiales horizontale et transverse des images tomographiques obtenues avec ce détecteur sont donc 350 μm et 10 mm, respectivement. Plus précisément, la résolution verticale est donc définie par la hauteur du faisceau (souvent fixée à 1 mm pour nos applications). Le cristal est protégé par deux fenêtres de béryllium de 0,5 mm d'épaisseur. Il présente une excellente efficacité aux énergies considérées (99% à 33 keV ; 97% à 50 keV et environ 62 % à 80 keV). Le détecteur est refroidi à la température de l'azote liquide pour limiter les courants de fuite ($< 5\text{pA}/\text{pixel}$).

Dans ce type de détecteur, la conversion photons-électrons est directe ce qui permet d'obtenir un très faible niveau de bruit (équivalent ici à quelques photons de 33 keV). D'autre part, l'énergie des photons est déposée dans le détecteur principalement par l'effet photoélectrique, qui représente 80 % des interactions à 33 keV ; le libre parcours moyen des photoélectrons dans le germanium est très faible ; la diaphonie, c'est-à-dire l'échange de signal entre pixels (appartenant ou non à la même ligne de détection) est ainsi quasiment négligeable.

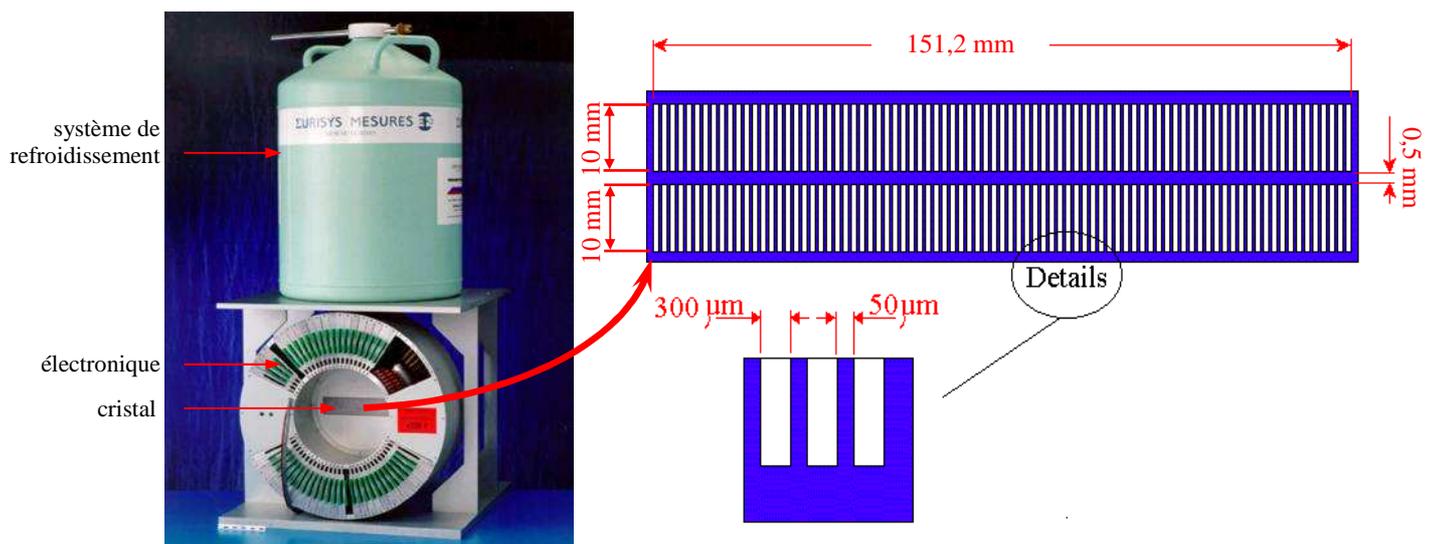


Figure III-6 : Le détecteur germanium HPGe. Vue d'ensemble (à gauche) et détails du cristal (à droite) : les deux lignes de détections (en haut) et les pixels qui la composent (en bas).

Le gain de l'électronique peut être ajusté sur 8 valeurs (de 1 à 128 avec un facteur 2 entre deux gains consécutifs) ce qui permet de couvrir une très large gamme d'intensité photonique (de quelques photons à $9,47 \times 10^6$ photons de 33 keV /pixel). La linéarité a été vérifiée sur plusieurs décades. Le temps d'intégration est aussi ajustable entre 0,8 ms et 130 ms (temps mort faible de 10 μ s).

Le détecteur est monté sur un système de translations pour permettre de l'aligner par rapport au faisceau.

III.1.2.4.2 Caméra FReLoN

La caméra CCD (*Charge-Coupled Device*) FReLoN (*Fast Readout Low Noise*) est un détecteur à lecture rapide et faible bruit qui a été développé à l'ESRF pour les applications nécessitant une résolution spatiale très fine (Figure III-7) [Labiche 1996; Bravin 2002].

Les photons X sont convertis en lumière visible grâce à un écran fluorescent de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Tb}$ de 100 μm d'épaisseur (densité 5 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; efficacité de 40 % à 33 keV). La surface active du détecteur est de $94 \times 94 \text{ mm}^2$. Un réseau de fibres optiques réductrices (facteur de réduction de 3,2 :1) permet ensuite à cette lumière d'être guidée vers la matrice CCD constituée de 2048×2048 pixels de dimensions $14,7 \times 14,7 \mu\text{m}^2$. La taille effective des pixels est donc de $47 \times 47 \mu\text{m}^2$ [Coan 2006].

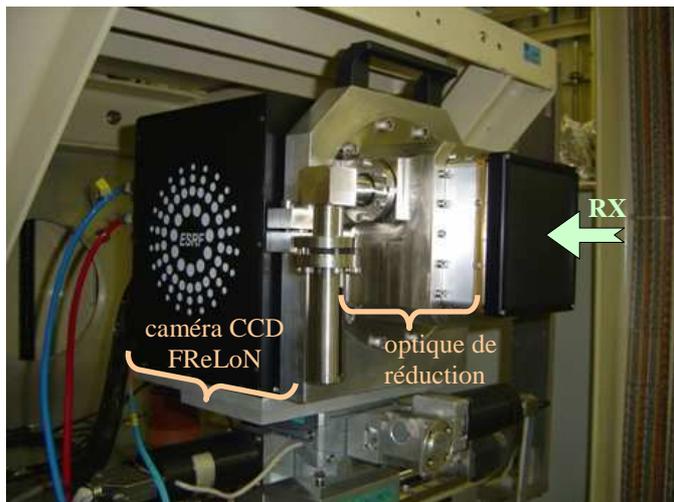


Figure III-7 : La caméra FReLoN.

La qualité de l'optique et de l'électronique, associée au refroidissement Peltier (-18°C) de la caméra CCD, assure un niveau de bruit de lecture et un courant d'obscurité relativement faibles.

L'efficacité globale du système « écran-fibres optiques réductrices » est de l'ordre de 25 % à 33 keV. D'autre part, la vitesse maximale de lecture (20 Mpixels/s) en utilisant quatre sorties de lecture, garantit la possibilité d'imager rapidement (4,2 projections/s).

Il existe trois modes d'acquisition des données, dont le mode « *pipeline* » utilisé pour nos mesures. Le détecteur reste fixe tandis que l'échantillon tourne et est déplacé verticalement dans le faisceau. Les mêmes lignes de la caméra sont donc continûment exposées aux rayons X, leur nombre est déterminé par la hauteur du faisceau. Elles sont transférées vers les deux sorties de lecture les plus proches, tandis que les lignes inutiles (« *lost lines* ») ne sont ni lues ni transférées vers l'ordinateur de stockage des données. La lecture des lignes de la caméra se fait de façon synchronisée avec la rotation. Ainsi, le nombre de données n'est pas limité par la capacité mémoire de la caméra car les données sont lues instantanément et stockées dans l'ordinateur. Par contre, un temps mort de 850 μ s entre l'acquisition de deux lignes est nécessaire pour permettre le transfert et la lecture des données.

Problème : L'efficacité de l'écran de conversion X-lumière n'étant pas de 100 %, des photons X transmis noircissent le système optique, qui se dégrade au fur et à mesure. Le nombre de photons reçus par les cellules CCD est ainsi sous-estimé. Pour remédier à ce problème, la caméra est régulièrement exposée aux rayons ultraviolets.

Un *chopper*, placé entre la source et les collimateurs, bloque le faisceau pendant le temps de lecture du détecteur [Renier 2005]. Ce système permet de ne pas exposer inutilement les lignes de la caméra, par conséquent le bruit est minimisé et la résolution spatiale est augmentée. D'autre part, la dose X déposée à l'échantillon est réduite, paramètre important pour les études précliniques.

III.2 Tomographie quantitative en rayonnement synchrotron (TQRS)

La tomographie par rayons X est une technique d'imagerie non destructive, donnant une information morphologique sous forme de coupes, d'un échantillon donné. La tomographie *quantitative* va nous permettre d'obtenir des cartographies de la pathologie cérébrale tumorale, résolues en concentration d'agent de contraste (*i.e.* en concentration d'iode dans le cas de nos études). Le principe général de la tomodensitométrie quantitative par rayonnement synchrotron (TQRS) ou SRCT pour *synchrotron radiation computed tomography* est donc présenté ci-après.

III.2.1 Principe général de la tomographie par rayons X

III.2.1.1 Transmission de l'énergie et coefficients d'atténuation

L'atténuation d'un rayonnement traversant une cible mince d'épaisseur x résulte de la totalité des interactions survenues dans le matériau : diffusion cohérente (Rayleigh), effet photoélectrique, diffusion incohérente ou effet Compton, création de paires. L'occurrence de ces événements dépend fortement du milieu traversé et de l'énergie des photons incidents. La loi de Beer-Lambert (équation III-1) est la loi logarithmique qui permet d'exprimer le nombre N de particules détectées à la sortie de cette cible mince :

$$N = N_0 e^{-n(\sigma + \tau + \kappa)x} \quad \text{équation III-1}$$

avec,

- N_0 le nombre de particules incidentes
- x l'épaisseur de la cible [cm]
- n le nombre d'atomes par m^3 contenus dans la cible
- σ , τ et κ , les sections efficaces respectives de la diffusion (Rayleigh et Compton), de l'effet photoélectrique et de l'effet de matérialisation.

L'expression du coefficient total d'atténuation linéique μ_{tot} simplifie la relation précédente :

$$N = N_0 e^{-\mu_{\text{tot}} x} \quad \text{équation III-2}$$

Ce coefficient μ_{tot} a donc la dimension inverse d'une longueur, il dépend de l'énergie E des photons incidents ainsi que de la nature du matériau traversé. Afin de s'affranchir de la dépendance de ce coefficient avec l'état physique du matériau, on préfère souvent utiliser

$\left(\frac{\mu_{\text{tot}}}{\rho}\right)$ le coefficient massique d'atténuation totale, où ρ est la densité du matériau composant la cible. L'équation III-2 devient alors :

$$N = N_0 e^{-\left(\frac{\mu_{\text{tot}}}{\rho}\right) \cdot \rho x} \quad \text{équation III-3}$$

Les coefficients $\left(\frac{\mu_{\text{tot}}}{\rho}\right)$ sont donnés dans des tables, ils sont souvent exprimés en $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, avec ρ en $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ et x en cm.

Si le matériau cible est constitué de n composés élémentaires, le coefficient massique d'atténuation totale se définit grâce aux fractions massiques w_i de chaque élément i du mélange :

$$\left(\frac{\mu_{\text{tot}}}{\rho}\right)_{\text{mélange}} = \sum_{i=1}^n w_i \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_i \quad \text{avec } w_i = \frac{m_i}{M} \quad \text{équation III-4}$$

Dans cette expression, m_i est la masse de l'élément i et M est la masse totale du mélange.

III.2.1.2 Acquisition tomographique

La tomodynamométrie (ou scanner) est basée sur l'enregistrement multi-angulaire des profils d'atténuation de rayons X, transmis au travers d'un échantillon donné (Figure III-8). On obtient des profils suivant plusieurs incidences en faisant tourner l'échantillon d'un pas angulaire fixe. On désignera par projection, le profil d'atténuation associé à un angle particulier.

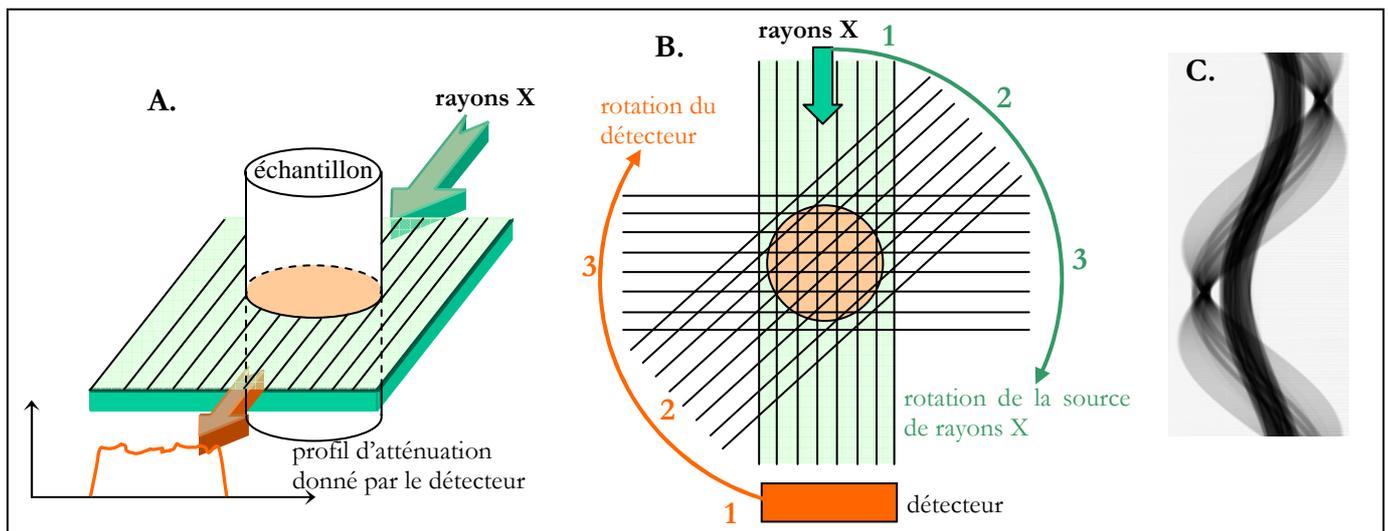


Figure III-8 : Principe de l'acquisition tomographique. Les rayons X sont recueillis par le détecteur après traversée de l'échantillon, on obtient ainsi un profil d'atténuation (A). Le couple source-détecteur tourne pour acquérir des profils sous plusieurs incidences (B). L'ensemble des profils d'atténuation forme un sinogramme (C).

Les données sont ensuite enregistrées dans une matrice appelée sinogramme où chaque ligne est une projection monodimensionnelle. Par conséquent, les nombres de lignes et de colonnes correspondent respectivement au nombre d'angles de mesure, et au nombre de pas spatiaux d'échantillonnage (*i.e.* au nombre de pixels du détecteur).

III.2.1.3 Reconstruction

Un algorithme standard de rétroprojection filtrée permet de reconstruire l'objet à partir de ses projections, c'est-à-dire de son sinogramme. Cet outil mathématique réalise une rétropropagation de chaque profil d'atténuation selon son angle d'incidence dans une matrice de pixels vierges qui sera l'image finale. La contribution de cette rétropropagation dans les pixels non concernés de l'image peut être éliminée en convoluant chaque projection avec un filtre rampe.

Chaque tissu possède un coefficient d'atténuation propre μ_{tot} qui dépend de la densité du tissu considéré et de l'énergie du faisceau incident. L'intensité (c'est-à-dire le nombre N de photons) mesurée sur le détecteur, correspond à l'atténuation du faisceau primaire due à la somme, le long du trajet du faisceau, des différents μ_{tot} des matériaux composants l'objet. Ainsi :

$$N = N_0 \exp\left(-\int \mu_{\text{tot}}(z) dz\right) \quad \text{équation III-5}$$

C'est ensuite la transformée de Fourier inverse de l'intensité transmise mesurée qui va permettre de remonter à μ_{tot} en chaque point de l'objet.

Les images obtenues sont donc représentatives du coefficient d'atténuation μ_{tot} de chaque voxel de la coupe imagée, et cartographient ainsi la densité des matériaux.

Ces opérations mathématiques sur les sinogrammes acquis à l'ESRF sont faites grâce au programme SNARK [Herman 1989].

III.2.1.4 Utilisation d'agents de contraste

Un traceur permet d'étudier certaines propriétés précises d'un système ; indicateur du paramètre à mesurer, il ne doit être ni produit, ni détruit par le système. Les agents de contraste choisis en tomodensitométrie sont constitués d'atomes plus lourds que les composés organiques, le plus couramment utilisé étant l'iode ($Z = 53$). En effet, l'atténuation des rayons X sera renforcée dans les zones de numéros atomiques les plus élevés c'est-à-dire là où l'agent de contraste est présent. Les caractéristiques physiques de l'iode sont reportées dans le Tableau III-1. La propriété suivante est fondamentale : au-dessus de l'énergie de son seuil K (Figure III-9), l'agent de contraste présente un coefficient d'atténuation nettement supérieur à celui des os ou des tissus

mous. Il en résulte un fort contraste entre les zones où se trouve l'agent de contraste et les tissus avoisinants.

Numéro atomique	53
Masse atomique	126,9
Densité (g.cm ⁻³)	4,92
Energie E _K du seuil K (keV)	33,169
$\frac{\mu_{\text{att}}}{\rho}$ (cm ² .g ⁻¹) de l'iode pour une énergie E < E _K	6,55
$\frac{\mu_{\text{att}}}{\rho}$ (cm ² .g ⁻¹) de l'iode pour une énergie E > E _K	33,169
$\frac{\Delta\mu_{\text{att}}}{\rho}$ (cm ² .g ⁻¹) de l'iode	29,36
$\frac{\mu_{\text{att}}}{\rho}$ (cm ² .g ⁻¹) des tissus	0,330
$\frac{\mu_{\text{att}}}{\rho}$ (cm ² .g ⁻¹) de l'os	0,630

Tableau III-1 : Propriétés physiques de l'iode autour de son énergie de liaison K (d'après [Elleaume 2002]). Les coefficients d'atténuation μ_{att}/ρ des tissus et de l'os sont donnés au seuil K de l'iode (E_K). $\Delta\mu_{\text{att}}/\rho$ est la différence du coefficient massique d'atténuation de l'iode autour du seuil K.

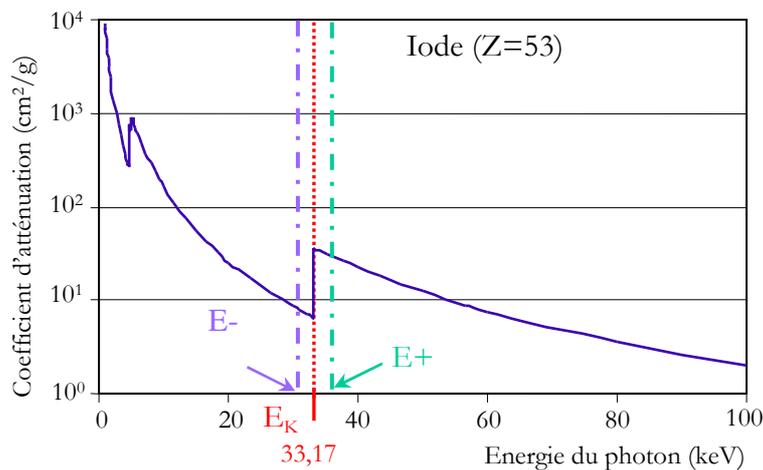


Figure III-9 : Coefficient d'atténuation massique de l'iode en fonction de l'énergie des photons.

III.2.2 Qu'est ce que la tomographie quantitative par RS?

III.2.2.1 Avantage du rayonnement monochromatique

Comme nous l'avons précisé précédemment, les coefficients μ_{tot} sont fonction du matériau traversé, et de l'énergie E des photons incidents. Si le rayonnement X utilisé est monochromatique, alors les images tomographiques obtenues seront une mesure absolue des valeurs de ces coefficients. On peut aussi noter que l'utilisation d'un rayonnement monochromatique permet de s'affranchir du problème de durcissement de faisceau, qui se produit lorsque le faisceau X présente un spectre étendu. En effet le spectre se modifie lorsque le faisceau traverse la matière puisque les composantes basses énergies sont atténuées prioritairement, induisant ainsi une augmentation de l'énergie moyenne du faisceau.

III.2.2.2 Mesure de concentration d'agent de contraste

Dans l'équation III-4
$$\left(\frac{\mu_{\text{tot}}}{\rho}\right)_{\text{mélange},E} = \sum_{i=1}^n w_i \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{i,E},$$

les coefficients $\left(\frac{\mu_{\text{tot}}}{\rho}\right)_{\text{mélange},E}$ et $\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{i,E}$ dépendent de l'énergie E considérée.

Le coefficient d'atténuation massique (à une énergie E) d'un tissu perfusé en agent de contraste peut être estimé par la somme pondérée des coefficients d'atténuation massique (à l'énergie E) de l'iode (I) et des tissus (T). L'équation III-4 devient :

$$\left(\frac{\mu_{\text{tot}}}{\rho}\right)_{\text{mélange},E} = w_I \cdot \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{I,E} + w_T \cdot \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{T,E} = \frac{m_I}{M} \cdot \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{I,E} + \frac{m_T}{M} \cdot \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{T,E} \quad \text{équation III-6}$$

En multipliant chaque membre par le rapport $\frac{M}{V}$ de la masse totale (M) et du volume total (V) du *mélange* (tissu perfusé), on obtient :

$$\frac{M}{V} \cdot \left(\frac{\mu_{\text{tot}}}{\rho}\right)_{\text{mélange},E} = C_I \cdot \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{I,E} + C_T \cdot \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{T,E} \quad \text{équation III-7}$$

où C_i sont des concentrations massiques.

On en déduit l'expression de la concentration en iode en fonction des coefficients linéiques d'atténuation $\mu_{\text{mélange},E}$ et $\mu_{T,E}$, valeurs directement mesurables dans l'image tomographique :

$$C_I = \frac{\mu_{\text{mélange},E} - \mu_{T,E}}{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{I,E}} \quad \text{équation III-8}$$

[Elleaume 2002; Oelckers 1996].

III.3 Modèle expérimental de tumeur

Certains aspects expérimentaux sont davantage spécifiques à certaines études ou ont évolué au cours des différents essais menés. Ils sont dans ce cas décrits au chapitre IV.2.

III.3.1 Modèles animal et tumoral

III.3.1.1 Nécessité d'un modèle animal

Depuis les années 60s, les modèles animaux des tumeurs cérébrales humaines, sont un véritable enjeu en neuro-oncologie expérimentale. Bien qu'il n'existe aucun modèle qui simule parfaitement le comportement des gliomes humains de haut grade, les modèles de rongeur permettent tout de même de mettre au point des stratégies thérapeutiques innovantes. Idéalement, les modèles valides de tumeur cérébrale doivent dériver de cellules gliales, se développer *in vitro* et *in vivo* de façon prédictible et reproductible, être faiblement ou idéalement pas du tout immunogéniques, avoir une croissance ainsi qu'une réponse aux thérapies qui ressemblent à celles des cellules gliomales humaines [Barth 1998].

III.3.1.2 Structures cérébrales : quelques définitions

Il est sans doute utile de donner ici quelques définitions et décrire brièvement les structures neurologiques d'intérêt citées par la suite. Les repérages en coordonnées stéréotaxiques sont pris relativement à la position du bregma dans le plan horizontal (Figure III-10), et par rapport à la surface de l'os dans le plan vertical.

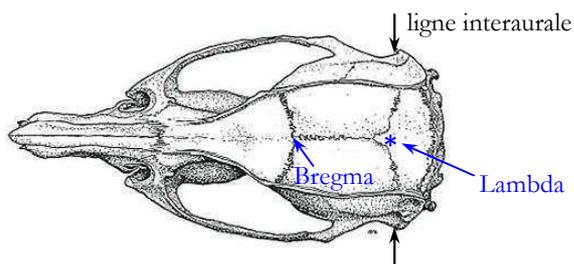


Figure III-10 : Vue dorsale d'un crâne de rat Wistar permettant de repérer le bregma et le lambda [Paxinos 1986].

La Figure III-11 illustre notre zone d'intérêt : il s'agit d'une coupe frontale prise quasiment aux coordonnées d'injection des cellules tumorales ou de la chimiothérapie (à 0,48 mm du bregma contre 0 mm pour nos injections). L'aiguille est descendue délicatement dans le noyau caudé (*Cpu* sur la Figure III-11) droit : 3,5 mm à droite (le 0 horizontal sur la Figure III-11, B correspondant à la position de la ligne médiane du crâne, *i.e.* la ligne qui joint le Bregma et le Lambda) et à 5,5 ou 5,0 mm (selon les expériences) de profondeur par rapport à la surface du crâne. Il faut simplement noter que cet atlas a été réalisé à partir de rats Wistar [Paxinos 1986], et que nous avons travaillé sur des rats Fischer 344, peu différents du point de vue morphologique.

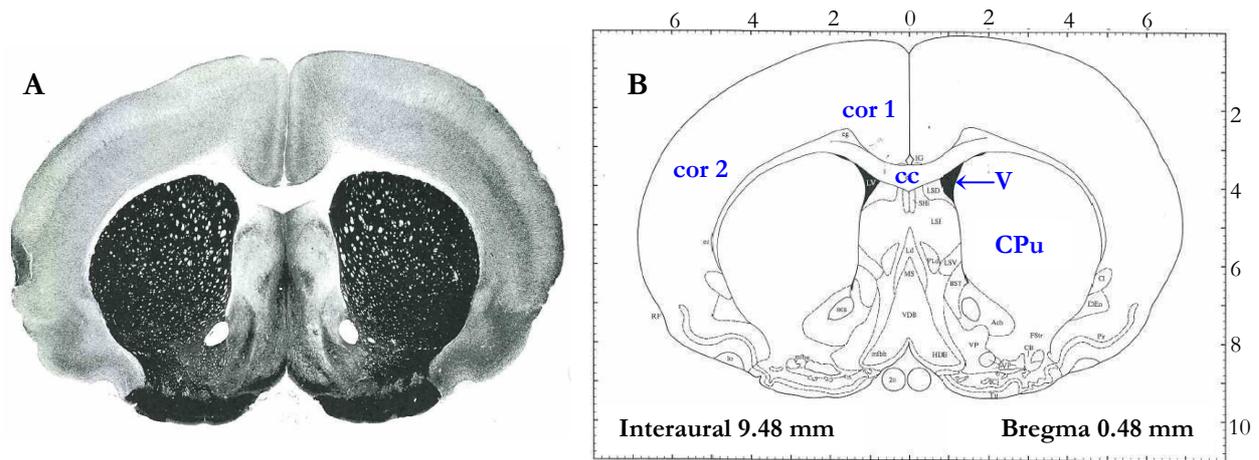


Figure III-11 : Structures cérébrales chez le rat. D'après l'atlas de Paxinos présentant à la fois des coupes histologiques (A) et les schémas structurels correspondants (B) [Paxinos 1986]. On distingue notamment : le corps calleux (*corpus callosum* : cc), le noyau caudé (*caudate putamen* : CPu), le ventricule (V), le cortex frontal (cor 1) et le cortex pariétal (cor 2).

III.3.1.2.1 *Le striatum*

Le *striatum* est une structure paire sous corticale du cerveau, qui regroupe le noyau caudé (*caudate nucleus*) et le putamen. Il est désigné par *Cpu* sur la Figure III-11.

III.3.1.2.2 *Le corps calleux*

Le corps calleux (*corpus callosum*) est une structure qui relie les deux hémisphères cérébraux chez les mammifères. Il est constitué d'un réseau de fibres nerveuses (*i.e.* d'axones) transversales qui s'étendent d'un hémisphère cérébral à l'autre. Il forme une structure large et plate située juste en dessous du cortex et représente la plus grande partie de la matière blanche. Il s'agit également de la commissure du cerveau la plus importante car elle relie les 4 lobes (frontal, temporal, pariétal et occipital) entre eux, assurant ainsi le transport inter hémisphère des informations.

III.3.1.2.3 *Interstitium*

Il s'agit de l'espace entre les capillaires et les cellules, espace variable d'un tissu à l'autre. Dans la peau par exemple, il représente 50 % du volume tissulaire, alors qu'il est très faible dans le cerveau.

III.3.1.3 Caractéristiques du modèle F98

Initialement, le modèle de tumeur F98 a été créé par Wechsler (au laboratoire du Dr Koestner ; Ohio State University) en injectant par voie intraveineuse, une dose unique de nitrosuré (N-ethyl-N-nitrosourea) à une rate Fischer gestante. Cela a induit sur la portée, des tumeurs spontanées qui ont été isolées et classées en diverses lignées cellulaires, dont le gliome F98. Son analyse

histopathologique *in vivo* a permis de le classer en tant que gliome anaplasique ou indifférencié [Ko 1980; Barth 1998].

Ce modèle F98 très agressif grossit de façon invasive et ce, dès le début de son développement. Il est également faiblement immunogénique¹⁴, ce qui le rapproche des gliomes humains. Les études histologiques révèlent également des infiltrations dans la matière blanche, et la présence de foyers microscopiques éloignés de la masse tumorale [Clendenon 1990; Matalka 1994].

Il est reporté dans la littérature que d'autres types de tumeurs, notamment les gliosarcomes C6 et 9L qui sont immunogéniques, ne sont pas de bons modèles pour les études sur rats immunocompétents si l'objectif est de prolonger et mesurer la survie des animaux. En effet, lors de certaines études il a été remarqué que les modèles C6 et 9L pouvaient déclencher une réponse immune spécifique et régresser spontanément [Barth 1998; Barth 2003]. Avec le modèle de gliome F98, l'injection d'une centaine de cellules tumorales suffit à provoquer le décès de 100 % des rats non traités [Barth 2000]. Ainsi, une augmentation de la médiane ou de la moyenne de survie des animaux ne peut être attribuée qu'au traitement testé.

L'étude histologique de ce modèle F98, réalisée par Fournier *et al.*, révèle que la tumeur est extrêmement invasive très rapidement [Fournier 2003]. Son volume croît de façon exponentielle, à partir du 7^{ème} jour suivant l'inoculation de 1000 cellules (Figure III-12). Selon cette étude, entre J13 et J14, le volume tumoral est estimé entre 20 et 30 μl et la tumeur a une dimension de 3 à 4 mm.

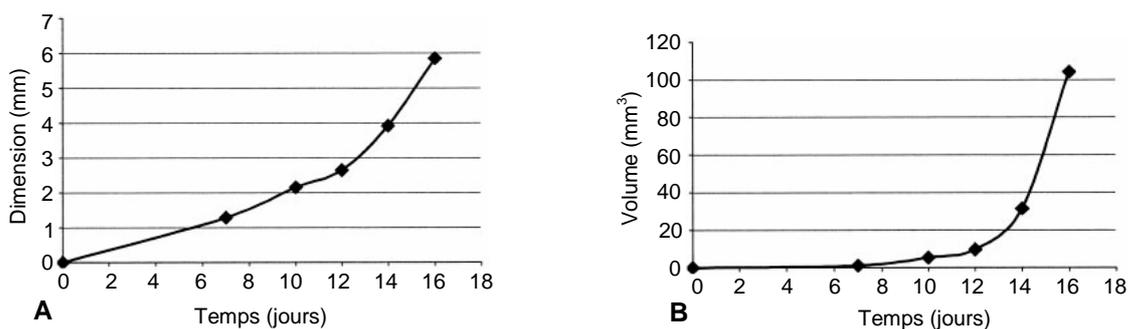


Figure III-12 : Paramètres de croissance du modèle de gliome F98. 10^3 cellules ont été inoculées dans le noyau caudé de rats Fischer (0,2 mm postérieur au bregma ; 3,00 mm latéral à la suture sagittale ; 5,00 mm de profondeur). L'étude histologique décrite par Fournier *et al.* a permis : de déterminer la dimension de la tumeur en fonction du temps (A), et de calculer son volume en l'approximant à une sphère (B) [Fournier 2003].

¹⁴ Un élément est dit immunogène lorsqu'il est reconnu comme étranger par l'organisme, c'est-à-dire qu'il provoque la formation d'un anticorps spécifique capable de le neutraliser.

III.3.1.4 Protocole initial d'inoculation des cellules tumorales

III.3.1.4.1 Culture cellulaire

Les cellules F98 (American Type Culture Collection ; ATCC-LGC Promochem, Molsheim, France) sont adhérentes et se multiplient en monocouches dans des flasques en plastique ; elles sont incubées dans une étuve à 37 °C en atmosphère humide (95 % d'air et 5 % de CO₂). Le milieu de culture, du DMEM (*Dublbecco's Modified Eagle's Minimum medium* ; Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France), est complété par 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco) et 1 % d'un mélange d'antibiotiques : la pénicilline et la streptomycine. Lorsqu'elles arrivent à confluence dans les flasques, les cellules sont repiquées (généralement au 1/3) par application de trypsine (Trypsin-EDTA, Eurobio) ; cette opération de réensemencement se fait environ 2 fois par semaine.

III.3.1.4.2 Anesthésie

Les rats étaient initialement anesthésiés par une inhalation brève d'isoflurane suivie d'une injection intrapéritonéale (i.p.) de chloral hydrate à 4 % (1 ml pour 100 g de poids de rat). Cette procédure maintient usuellement le rat anesthésié pendant 2 à 3 heures. Nous avons ensuite préféré adopter un protocole d'anesthésie permettant un effet analgésique. Le chloral hydrate a donc été remplacé par un mélange de xylozine (5 à 10 mg/kg) et kétamine (40 à 80 mg/kg) injecté (i.p.). Pratiquement, préparer 10 ml du mélange suivant : 4 ml de kétamine (à 10,0 g pour 100 ml) + 2,5 ml de xylozine (à 2,0 g pour 100 ml) + 3,5 ml de solution saline ou eau pour préparation injectable (ppi), et injecter (i.p.) 0,1 à 0,2 ml pour 100 g de poids de rat. Cette procédure maintient usuellement le rat anesthésié pendant 40 minutes à 1 heure ; des injections supplémentaires sont parfois nécessaires pour maintenir l'anesthésie tout au long de la procédure chirurgicale. Un gel oculaire lubrifiant est également appliqué sur les yeux des rats.

III.3.1.4.3 Protocole initial d'implantation de la tumeur

Seul le protocole initial est décrit dans ce paragraphe. Les rats sont tout d'abord anesthésiés puis les cellules tumorales sont inoculées suivant la méthode décrite dans les travaux de Benabid *et al.* [Benabid 1986]. Une fois le dessus du crâne rasé, chaque rat est positionné dans un cadre stéréotaxique (Kopf Instruments ; Figure III-13). Une incision est faite sur le dessus du crâne, des masselottes sont posées afin de maintenir la peau écartée et dégager ainsi le bregma. A l'aide des translations micrométriques du cadre, un repère est marqué sur le crâne, 3,5 mm à droite du bregma ; un trou d'environ 0,5 mm de diamètre est percé dans l'os au niveau de ce repère, en prenant soin de ne pas léser la dure-mère.

Les cellules sont injectées avec une seringue Hamilton (modèle 701 N), dont l'aiguille associée a un diamètre de 26s-gauge. Cette seringue est placée dans un dispositif de translation verticale du cadre stéréotaxique. Elle est tout d'abord descendue dans le noyau caudé à 6 mm de profondeur par rapport à la surface du crâne, puis remontée à 5,5 mm de profondeur afin de créer une « poche » où sont déposées les cellules tumorales. 1000 cellules F98 contenues dans 5 μ l de DMEM sans sérum sont ensuite injectées doucement par l'expérimentateur en 1 minute environ. La seringue laissée en place 1 à 2 minutes après l'injection, est remontée lentement ; le trou est rebouché au moyen de cire à os, le scalp est désinfecté puis suturé.

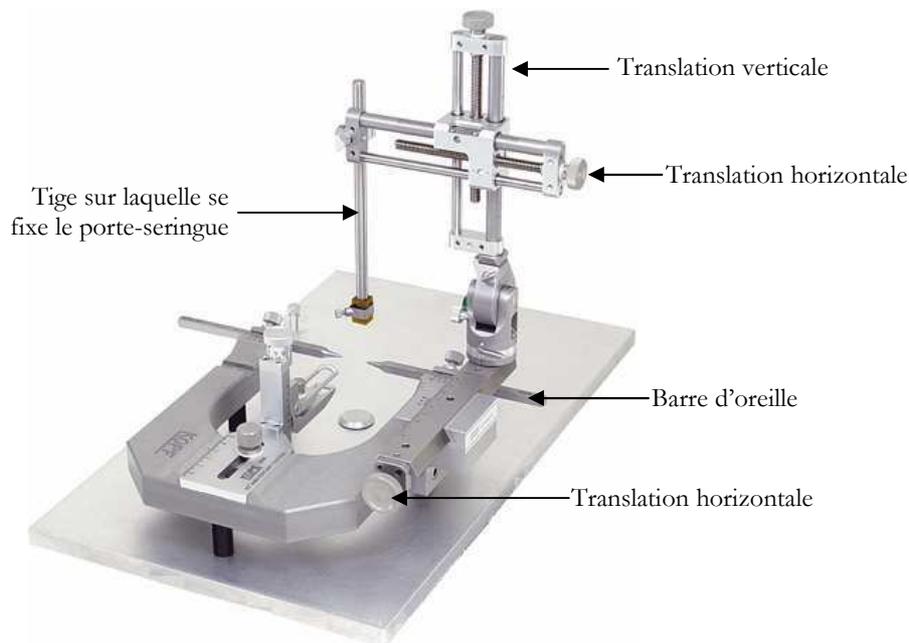


Figure III-13 : Cadre stéréotaxique Kopf®. Les translations micrométriques permettent un repérage précis.

III.3.1.4.4 Modifications apportées au protocole

Au cours des différentes expériences, nous avons été amenés à modifier le protocole décrit précédemment (voir Tableau III-2). On distinguera les paramètres suivants :

- le volume contenant les cellules tumorales (5 μ l ou 10 μ l) ;
- le nombre de cellules F98 (1000 ou 4000) ;
- la vitesse d'injection (\sim 5 μ l/min ; 2,5 μ l/min ou 36,41 μ l/min) et l'utilisation ou non de l'injecteur ;
- la présence ou non d'agarose dans le milieu injecté ;
- la profondeur d'implantation dans le noyau caudé (5,0 ou 5,5 mm) ;
- le modèle de seringue Hamilton (701N d'aiguille 26s-gauge ou 702N d'aiguille 22s gauge)

Pour chaque expérience, le choix de ces variables est explicité sous forme de tableau, et les modifications nécessaires apportées au protocole sont détaillées.

Expériences	Ref*	injecteur	seringue	durée d'injection	agarose	volume [μl]	nbr de cellules	profondeur
Mars & déc 2005	IV.2.1, IV.2.2	non	Hamilton 701 N	~ 1 minute	-	5	1000	- 5,5 mm
Avril & juillet 2006	IV.2.3, IV.2.4, IV.2.5	2,5μl/min	Hamilton 701 N	2 minutes	-	5	1000	-5,5 mm
Nov 2006	IV.2.6	36,41 μl/min	Hamilton 702 N	16 secondes	oui	10	4000	-5,0 mm
Déc 2006 & mars 2007	IV.2.7, IV.2.8	36,41 μl/min	Hamilton 702 N	16 secondes	oui	10	1000	-5,0 mm

Tableau III-2 : Récapitulatif des différents paramètres utilisés pour injecter les cellules gliomales F98, au cours des différentes expériences présentées dans la section IV-2. * indique le numéro de sous-chapitre correspondant.

III.3.1.5 Référence commerciale des drogues antinéoplasiques platinées utilisées

Les agents anticancéreux platinés ont été fournis par la pharmacie du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble. Les produits commerciaux utilisés au cours de ce travail sont les suivants :

- Cisplatine Merck[®] (100 mg/100 ml ; Merck génériques, Lyon, France),
- Cisplatyl[®] (cisplatine 10 mg/10 ml ; Laboratoire Aventis, Paris, France),
- Carboplatine Faulding (10 mg/ml ; Faulding Pharmaceuticals S.A., Asnières, France),
- Eloxatine[®] (oxaliplatine 5 mg/ml ; Sanofi - Synthélabo, France),
- Glucose Aguettant 5 % (solution pour perfusion i.v. ; Laboratoire Aguettant, Lyon, France) pour diluer le carboplatine.

III.3.2 Protocole d'irradiation synchrotron

III.3.2.1 Dosimétrie

Lors de l'irradiation des échantillons (des rats), une chambre d'ionisation PTW sert à calibrer le faisceau et les chambres secondaires. Le détecteur HPGe aligné dans le faisceau, permet un contrôle du débit de dose pendant les expériences.

Il faut également adapter la vitesse de rotation de la plateforme à la valeur du courant dans l'anneau et à la dose voulue au niveau de l'échantillon. Un facteur F est calculé :

$$F = \dot{D}_{\text{eau,éch}} \times A \quad \text{équation III-9}$$

où $\dot{D}_{\text{eau,éch}}$ (Gy/mA/s) est le débit de dose dans l'eau et A est un facteur qui dépend de la géométrie de l'échantillon : il représente le rapport des débits de dose entre le centre de la zone d'intérêt à irradier et celui mesuré en entrée. En première approximation (valable pour les objets de petites tailles), on considère la $\frac{1}{2}$ atténuation moyenne de l'objet. En toute rigueur, ce rapport A devrait être calculé par simulation Monte-Carlo.

III.3.2.1.1 Chambre d'ionisation PTW

La chambre PTW 31002 (Freiburg, Allemagne) sert de détecteur de référence ; elle est calibrée dans l'air pour des énergies comprises entre 30 keV et 50 MeV et est positionnée là où sera irradié l'échantillon. Le débit de dose dans l'eau ($\dot{D}_{\text{eau,éch}}$ en Gy/mA/s) est estimé d'après la lecture de l'électromètre auquel elle est reliée, en tenant compte de la température et de la pression [Boudou 2006]. Cette chambre permet de calibrer le faisceau.

D'autre part, deux chambres d'ionisation sont placées en permanence sur le parcours du faisceau et permettent de vérifier la dose délivrée à l'échantillon au cours d'une irradiation ; elles sont calibrées grâce à la chambre PTW 31002 (en enregistrant leur réponse lors de la calibration du faisceau).

III.3.2.1.2 Détecteur HPGe

Le détecteur germanium (décrit au paragraphe III.1.2.4.1 , page 65) permet aussi d'obtenir le débit de dose (Gy/mA/s) dans l'eau à l'échantillon d'après la formule :

$$\dot{D}_{\text{eau,éch}} = \frac{\text{bits} - \text{peds}}{I} K(E) \frac{1}{G \cdot \Delta t \cdot h} \cdot \frac{1}{\exp(-\mu_{\text{air},E} d)} \cdot 1,04 \quad \text{équation III-10}$$

avec :

- *bits* : lecture d'une moyenne de valeurs de pixels du détecteur ayant vu le faisceau ;
- *ped* : lecture d'une moyenne des valeurs de pixels du détecteur sans rayonnement ;
- *I* : courant électronique dans l'anneau au moment de la mesure (exprimé en mA) ;
- *K(E)* : facteur propre au détecteur permettant la conversion du nombre de bits lus en dose suivant l'énergie *E* des photons incidents ;
- *G* : gain du détecteur (égal à 2^n , avec *n* entier $\in [0;7]$) ;
- Δt : temps d'intégration (exprimé en s) ;
- *h* : hauteur mesurée du faisceau (exprimée en mm) ;
- $1/\exp(-\mu_{\text{air},E} d)$: facteur correctif lié à l'atténuation dans l'air des photons incidents d'énergie *E*, sur le parcours *d* entre l'échantillon et le détecteur ($d \approx 6$ m) ;
- *1,04* : facteur correctif lié à la divergence latérale du faisceau (fluence au niveau de l'échantillon, légèrement plus élevée que celle enregistrée sur le détecteur à la distance *d*).

III.3.2.2 Irradiation stéréotaxique (*SSR*)

Il s'agit de radiothérapie en mode tomographique : le faisceau X reste fixe tandis que le patient tourne, l'axe de rotation étant réglé au centre du volume tumoral à traiter et la taille du faisceau ajustée à la taille de la tumeur. Toutes les irradiations sont effectuées avec le monochromateur « fixed exit » de tomographie (décrit au § III.1.2.2, p.64 et Figure III-4). Les dimensions du faisceau sont réglées par un jeu de fentes en tungstène/collimateur, en tenant compte de la divergence du faisceau sur la distance source-axe de rotation; pour les dimensions horizontale et verticale exactes, se référer aux paramètres choisis dans le chapitre IV.2 sur les expériences.

Après anesthésie, le rat est placé dans un cadre stéréotaxique en plexiglas, fixé en position verticale sur le support de rotation de la chaise du patient (Figure III-14 et Figure III-15). Avant l'irradiation, une série d'images tomographiques sont acquises, couvrant un volume de 1,5 à 2 cm de hauteur (15 à 20 coupes de 1 mm d'épaisseur). Ces images permettent non seulement de vérifier le bon positionnement du rat dans le cadre, mais également de repérer les os du crâne et notamment la trépanation faite lors de l'injection des cellules tumorales. De la coupe tomographique où est visible le trou, on déduit les coordonnées verticales du volume à irradier et on calcule les translations horizontales de la chaise nécessaires pour placer l'axe de rotation au centre de la tumeur (déplacements *x* et *y* dans le plan horizontal).

L'irradiation se fait ensuite par arcs de 360° , sur coupes adjacentes, l'animal est donc translaté verticalement (de la hauteur d'une coupe) entre chaque rotation de 360° . Un film GafChromic (MD-55, International Specialty Products, Wayne, NJ) est exposé afin de vérifier l'homogénéité de la dose délivrée et la jointivité (ou non-superposition) des coupes (Figure III-15). Il est placé en amont de l'animal, sur la partie fixe de la structure.

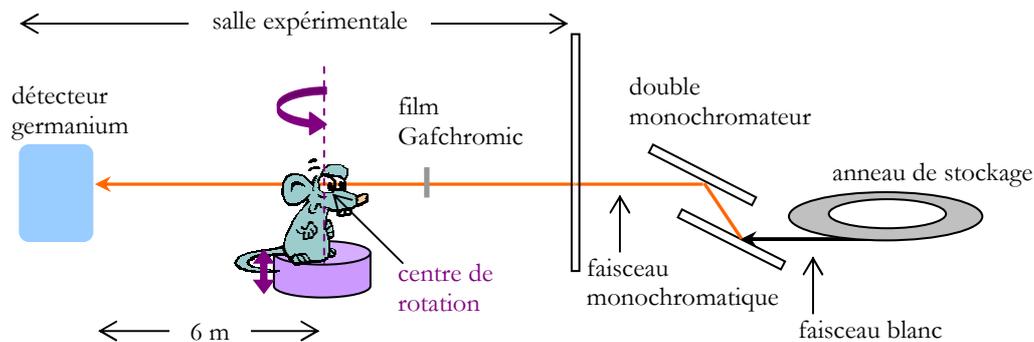


Figure III-14 : Schéma du dispositif d'irradiation utilisé en SSR. Le rat est irradié en mode tomographie avec un faisceau monochromatique. Le détecteur germanium haute pureté est situé à 6 m du centre de rotation, lui-même positionné au niveau de la tumeur.



Figure III-15 : Dispositif d'irradiation SSR : le rat est placé dans le cadre stéréotaxique en plexiglas, fixé sur la plateforme. La tumeur est positionnée sur l'axe de rotation de la structure pour une irradiation en mode tomographie. Le film Gafchromic est placé en amont du rat afin de vérifier la contiguïté des coupes d'irradiation. Le détecteur germanium permet une mesure de la dose.

Les paramètres exacts d'irradiation (dose délivrée, énergie des photons, nombre de coupes, dimensions verticale et horizontale du faisceau, présence ou non du film GafChromic), sont résumés pour chaque expérience sous forme de tableaux.

III.3.2.3 Imagerie post-irradiation

Une imagerie tomographique volumique du cerveau de l'animal est réalisée avec injection d'agent de contraste iodé pour vérifier la présence de la tumeur. En effet, l'apparition anormale d'iode dans le cerveau nous révèle que la BHE est devenue perméable, indiquant dans notre cas, la présence de la tumeur (Figure III-16).

Le rat est anesthésié, cathétérisé dans une des veines de la queue, afin d'injecter 1 ml d'agent de contraste iodé Ioméron (Bracco, Milan, Italy ; concentration nominale en iode : 350 mg/ml ; tiédi à 37 °C pour le rendre moins visqueux) suivi de 0,8 ml de sérum physiologique puis il est placé sur le cadre stéréotaxique en plexiglas. Le cadre est verticalisé une dizaine de minutes après l'injection d'Ioméron et fixé sur la chaise.

Les images sont acquises à 35 keV afin de maximiser le contraste entre l'iode et les tissus sains, 15 à 20 coupes jointives de 1 mm de hauteur permettent généralement de couvrir tout le volume tumoral.

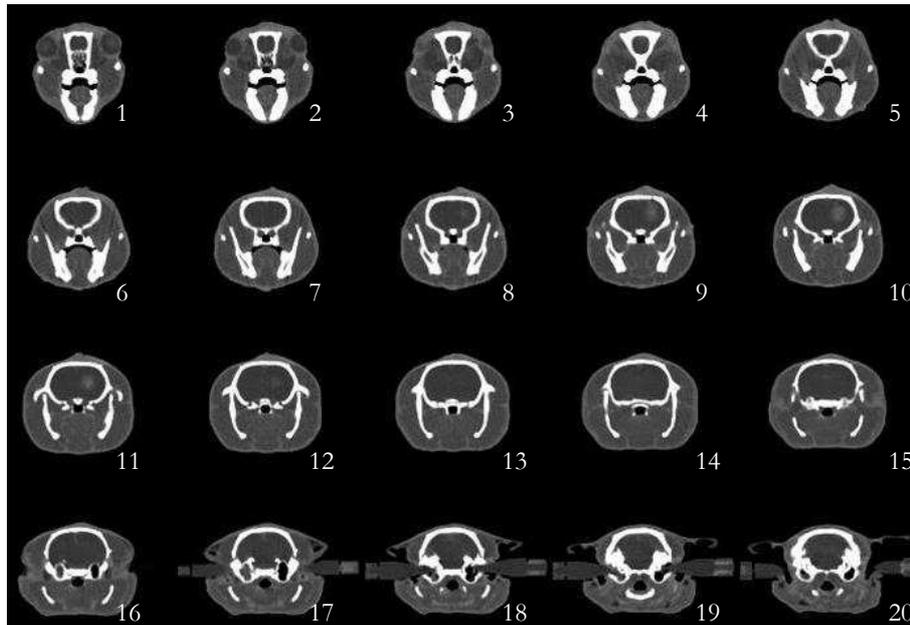


Figure III-16 : Images tomographiques d'un rat, obtenues avec le détecteur germanium, après injection d'agent de contraste (iode) par la veine de la queue. La tumeur est visible sur les coupes 8 à 12.

III.3.3 Irradiation haute énergie

Les irradiations à haute énergie sont faites au CHU de Grenoble avec un irradiateur médical, accélérateur linéaire de 6 MV (SLI, Elekta, UK). Les rats sont placés sur le ventre et irradiés deux par deux, tête-bêche dans une boîte en polystyrène (Figure III-17). La tête de chaque animal est alignée au milieu d'un unique champ de $8 \times 4 \text{ cm}^2$ défini par les collimateurs. Ce positionnement permet d'irradier uniquement l'hémisphère droit de chaque animal. Un bloc de cire, matériau équivalent au tissu à ces énergies, positionné entre les deux têtes, ainsi qu'un bolus équivalent tissus de 0,5 cm placé sur le dessus de la tête des rats permettent d'assurer l'équilibre électronique. La dose calculée (système de traitement de planning : Dosigray, Dosisoft, Cachan, France) pour une profondeur de 1,5 cm est délivrée avec un débit de 200 cGy/min.

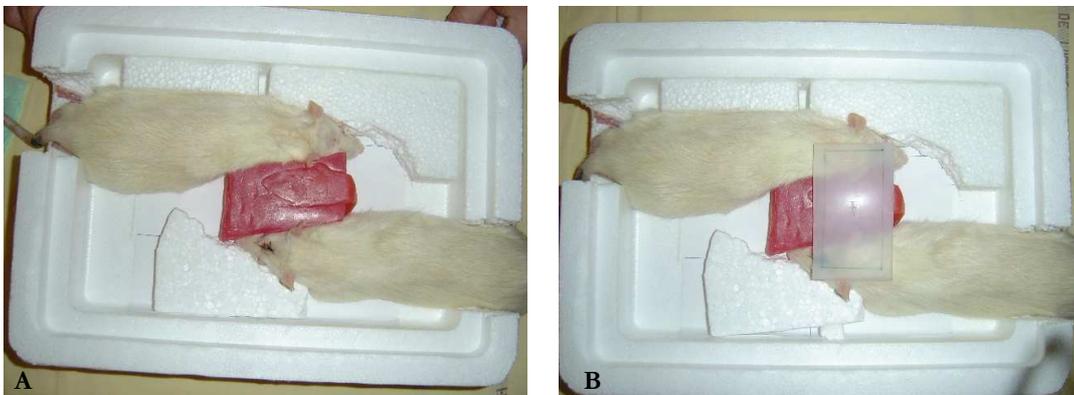


Figure III-17 : Positionnement des animaux pour l'irradiation haute énergie. **(A)** Les rats anesthésiés sont placés tête-bêche dans la boîte en polystyrène, où ils sont séparés par un bloc de cire (rose). **(B)** Le bolus, placé sur le dessus de leur tête correspond approximativement au champ d'irradiation. Ce bolus et le bloc de cire assurent l'équilibre électronique.

III.3.4 Analyse de la survie, aspects statistiques

III.3.4.1 Suivi post-traitement

Les rats sont pesés et observés quotidiennement dans les jours qui suivent le traitement, puis une à deux fois par semaine pour les rats survivant à plus long terme et ne présentant pas de troubles comportementaux ou physiques. Il a été montré que chez des rats porteurs de gliomes, la combinaison d'une perte de poids soutenue [Redgate 1991], d'ataxie¹⁵ et de chromodacryorrhée¹⁶ abondante indique une mort imminente [Yang 1997]. Dans ce cas, le rat est euthanasié par

¹⁵ L'ataxie est un trouble moteur non paralytique caractérisé par une mauvaise coordination des mouvements.

¹⁶ Il s'agit de sécrétions rouges (au niveau des yeux et du nez) qui sont provoquées par un pigment (la porphyrine) et que l'on confond avec du sang.

inhalation d'isoflurane puis injection intracardiaque de Dolethal (1 ml/1,5 kg ; Vetoquinol, Lure, France).

Le poids est un bon indicateur de la santé de l'animal ; après implantations de cellules tumorales, il évolue généralement suivant 3 phases relativement distinctes : une baisse liée à l'intervention chirurgicale et l'anesthésie (phase 1), suivie d'une reprise pondérale progressive (phase 2), et enfin une baisse liée à la progression tumorale (phase 3), accompagnée de signes distinctifs de douleurs [Redgate 1991].

Il n'est pas forcément facile de distinguer chez l'animal, la souffrance liée à la progression tumorale de celle liée à la toxicité et l'agressivité du traitement lui-même. Il semblerait d'ailleurs que les drogues platinées (cisplatine et carboplatine) administrées par voie intra-cérébrale provoquent une forme d'anorexie chez certains rats. En effet, dans les 10 à 15 jours qui suivent la chimiothérapie plusieurs d'entre eux ont présenté une baisse de poids particulièrement conséquente (perte de poids de 30 à 40 % par rapport au poids initiale mesuré le jour du traitement), les faisant passer en deçà d'un seuil parfois critique. Nous avons constaté que cette phase peut être suivie d'une reprise pondérale (certains rats ont d'ailleurs survécu ensuite à long terme) ou conduire au décès de l'animal ; elle est vraisemblablement la cause d'une partie des « morts précoces » (rats décédés avant le premier contrôle).

III.3.4.2 Analyse histopathologique

Les cerveaux des rats décédés ou euthanasiés ont été prélevés, de même ceux des rats survivants à long terme (euthanasiés en fin d'étude ; J200 généralement). Deux méthodes de conservation des tissus cérébraux ont été utilisées : la congélation ou la fixation.

III.3.4.2.1 Conservation à froid

Une fois prélevés, les cerveaux sont immédiatement trempés dans l'isopentane (refroidi à l'azote liquide) pendant 30 secondes à 1 minute, afin d'être congelés ; ils sont ensuite stockés à -80°C. Les coupes sont réalisées à l'aide d'un cryomicrotome (-20 °C) ; elles sont fixées sur lames et colorées par HE (hématoxyline - érythrosine) de façon standard. La coloration HE permet de mettre en évidence le noyau des cellules qui devient bleu-violet alors que le cytoplasme et les hématies apparaissent en rose.

III.3.4.2.2 Fixation au paraformaldéhyde

Les cerveaux prélevés sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde ; des coupes coronales de 2 mm sont réalisées antérieur et postérieur au chiasme optique. Elles sont montées dans de la paraffine, puis coupées à 4 µm et colorées par HE avant d'être observées.

Les analyses histo-pathologiques ont été réalisées par le Professeur R.F. Barth, neuro-pathologiste à l'*Ohio State University* (OH, USA).

III.3.4.3 Pourcentage d'augmentation de survie

Les durées de survie (jours) correspondent au délai entre le jour d'implantation de la tumeur (appelé J_0), et le jour du décès de l'animal. Dans le cas d'une euthanasie, la durée de survie calculée est le délai entre implantation et euthanasie, plus un jour [Yang 1997]. Tous les animaux décédés du fait des anesthésies sont exclus de l'étude et de l'analyse statistique.

Pour chaque groupe de rat (contrôle ou traitement), les courbes de Kaplan-Meier donnant la survie en fonction du temps ont été tracées. Les temps de survie médians (MeST pour *Median Survival Time*), moyens (MST pour *Mean Survival Time*) ainsi que les déviations standards¹⁷ associées (notées stdev) ont également été calculés. Le pourcentage d'augmentation de survie (%ILS pour l'acronyme anglais *Increased Life Span*), relatif au temps de survie médian (ou moyen) du groupe contrôle, est donné par l'équation suivante [Matalka 1994] :

$$\%ILS = \frac{MST - MST_{\text{Contrôle}}}{MST_{\text{Contrôle}}} \quad \text{équation III-11}$$

La moyenne d'un groupe est dite « biaisée » (*biased*) lorsque certains rats sont toujours vivants à la fin de l'étude. Dans ce cas, la moyenne estimée est inférieure à la moyenne de survie réelle, puisqu'elle est calculée avec une survie égale à la durée de l'étude pour les rats survivants.

Il faut noter qu'il peut également être intéressant de calculer un pourcentage d'augmentation de survie par rapport à un groupe de traitement, et non par rapport au groupe contrôle n'ayant reçu aucun traitement (*i.e.* par exemple : calculer l'ILS d'un groupe chimio-radiothérapie combinée relativement à une seule modalité : groupe chimiothérapie ou radiothérapie) [Kimler 1994].

¹⁷ Dans la littérature, la moyenne de survie est parfois associée de son erreur standard (SE) qui est égale à la déviation standard divisée par \sqrt{N} (avec N= le nombre de rats dans l'échantillon).

III.3.4.4 Tests statistiques

Plusieurs tests existent pour comparer des courbes de survie entre elles. Ils évaluent l'hypothèse que les fonctions de survies sont identiques pour les groupes de traitement testés. Ils font appel à une « fonction de pondération » qui dépend du temps et qui permet d'accorder plus ou moins d'importance aux différences survenant prématurément ou tardivement [Klein 2003, chapitre 7].

Le test du Log-rank est le plus couramment choisi pour l'analyse comparée des courbes de survie car il prend en compte l'ensemble de la période de suivie en donnant des pondérations équivalentes pour toutes les observations. L'avantage de ce test est que son utilisation ne nécessite aucune hypothèse sur la forme de la courbe de survie ou la distribution des temps de survie. Le logiciel JMP[®] (JMP[®], SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) permet de réaliser ce test et nous donne la valeur de χ^2 associée. Il évalue également la probabilité p pour que la valeur de χ^2 soit supérieure à celle calculée [JMP 2002], on la désignera p_{LR} . La différence statistique minimale significative est définie par une valeur de $p_{LR} < 0,05$. Le log-rank n'est pas utilisé lorsque les courbes de survie se croisent, car pour cette configuration, il n'est pas capable de détecter de différence entre les groupes considérés [Bland 2004; Simkiss 2007].

Nous avons également utilisé le test de Wilcoxon. Ce dernier donne davantage de poids aux différences entre décès observés et attendus dans l'échantillon, aux points temporels où il y a le plus de données. Par conséquent le test Wilcoxon accorde plus de poids sur les durées de vie les plus courtes, il met en valeur les différences qui surviennent rapidement. La valeur de p associée sera notée p_w , une différence significative sera également caractérisée par $p_w < 0,05$.

IV RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

IV.1 Distribution obtenue par CED : imagerie

IV.1.1 Rappels problématique

IV.1.1.1 *SSR* et distribution d'éléments dans les tumeurs

L'objet de cette étude est de mettre en place la méthode CED pour tenter d'optimiser les résultats obtenus en radiothérapie stéréotaxique en rayonnement synchrotron (*SSR* pour *synchrotron stereotactic radiotherapy*), et ceci pour les deux techniques regroupées sous le terme *SSR*.

IV.1.1.1.1 Radiothérapie par renforcement du dépôt de dose

En effet, cette méthode de perfusion cérébrale peut être appliquée à la radiothérapie par renforcement du dépôt de dose, où l'on cherche à charger les tissus tumoraux en agent de contraste iodé pour augmenter la dose locale due à la présence de l'élément lourd lors de l'irradiation [Callisen 1979; Santos Mello 1983; Mesa 1999]. C'est dans le cadre de la thèse de Jean-François Adam que cette technique de radiothérapie a été mise en place à l'ESRF sur modèle de rongeurs [Adam 2003a, b; Adam 2006]. L'agent de contraste iodé a été administré par voie veineuse jugulaire ou par voie artérielle carotidienne, en le combinant ou non à du Mannitol¹⁸ [Adam 2005]. Cette méthode systémique d'injection exploite la perméabilité de la barrière hémato encéphalique qui est plus grande au niveau de la tumeur. Afin de concentrer davantage l'élément lourd en épargnant les tissus sains, il est possible d'injecter l'agent de contraste iodé directement au sein du lit tumoral, et la méthode CED semblerait dans ce cas appropriée.

IV.1.1.1.2 Chimio-radiothérapie combinée

La seconde technique de radiothérapie, développée sur modèle de rongeur dans le cadre de la thèse de Marie-Claude Biston, combine chimiothérapie platinée (cisplatine ou carboplatine) et irradiation [Biston 2004a, b]. Les drogues antinéoplasiques sont délivrées par injection intracérébrale ce qui permet de s'affranchir de la barrière hémato-encéphalique mais également de la forte toxicité systémique associée à ces drogues.

¹⁸ Le Mannitol est un agent pharmacologique qui augmente transitoirement la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.

D'après les études décrites dans la littérature (voir § II.2.2 p.20), les paramètres d'injection utilisés lors des précédents essais précliniques menés au laboratoire (aiguille : 26s gauge ; volume : 5 μ l, débit : \sim 5 μ l/min et injection manuelle avec une aiguille fixée dans le cadre stéréotaxique) peuvent être optimisés.

IV.1.1.2 Comment connaître *in vivo* les distributions obtenues ?

Pour tester la pertinence de certaines variables d'injection par CED et optimiser les paramètres sur notre modèle de tumeur, il semblait impératif d'imager *in vivo* les distributions obtenues (en agent de contraste ou en drogue) et connaître leur évolution temporelle.

Il est possible de connaître la distribution du platine notamment par fluorescence ou par autoradiographie avec du platine radiomarqué, mais ces méthodes restent des analyses *post mortem*, sur coupes histologiques. Les agents de contrastes iodés sont quant à eux facilement quantifiables *in vivo* par TQRS (voir § III.2.1.4, p.71). Cependant, cette technique d'imagerie n'est pas envisageable avec les drogues platinées utilisées habituellement en chimiothérapie (cisplatine, carboplatine), car leur concentration en platine n'est pas assez élevée pour être détectée.

Tout en sachant que l'iopamidol n'aurait pas les mêmes propriétés (notamment de viscosité) que les solutions platinées, nous avons décidé d'analyser la distribution de ce traceur administré par CED, en faisant varier certains paramètres d'injection.

IV.1.1.3 Choix du traceur

Afin d'étudier la faisabilité de l'imagerie par CT, *in vivo* en temps réelle de la CED, Croteau *et al.* ont utilisé comme traceur iodé la molécule d'iopamidol (Figure IV-1), de formule chimique (C₁₇H₂₂I₃N₃O₈). L'imagerie a été réalisée sur des primates, mais la non-toxicité du produit injecté dans le *striatum* par CED a d'abord été vérifiée sur des rats Sprague-Dawley [Croteau 2005].

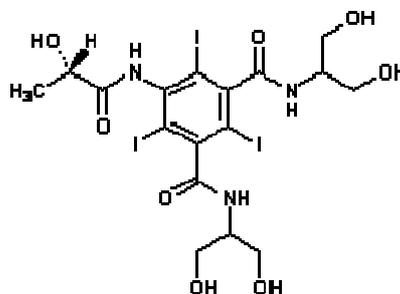


Figure IV-1 : Molécule d'iopamidol (Iopamiron® 200), utilisée comme agent de contraste iodé, pour des examens neuroradiologiques.

Nous appuyant sur ces résultats, nous avons choisi l'Iopamiron[®] 200 (Schering A.G., Berlin, Allemagne), comme produit de contraste. L'Iopamiron[®] 200 se présente sous forme de solution injectable, contenant 200 mg/ml d'iode, et 408,3 mg/ml du principe actif iopamidol. Il a été dilué dans une solution isotonique de NaCl (0,9%) pour obtenir une solution finale de concentration en iode 100 mg/ml.

D'autre part, les rats sains ayant reçu l'iopamidol en injection bolus ou CED, ont été gardés en observation pendant 6 mois. Aucun d'entre eux n'a présenté de signe clinique de toxicité [Rousseau 2007a].

IV.1.2 Groupes expérimentaux

IV.1.2.1 Choix des variables testées

Nous avons choisi d'évaluer l'influence des paramètres suivants :

- nature du tissu perfusé : tumoral ou sain ;
- type d'injection : bolus ou CED

La différence de protocole entre ces deux méthodes est explicitée plus loin. Brièvement le *bolus* correspond à une injection assez rapide de 5 µl en ~1 minute, et la CED désignera des injections faites à un débit de 0,5 µl/min avec une aiguille de 32 gauge (contre 26s gauge pour le bolus). Il faut noter qu'un débit de 5 µl/min correspond toujours à une injection par convection : d'après les débits indiqués dans la littérature [Bobo 1994; Morrison 1994], 5 µl/min correspond à la limite maximale utilisable (voir aussi § II.2.2.1 p.20). Cependant cette valeur élevée n'étant pas optimale [Chen 1999; Yang 2002], nous avons choisi de désigner l'injection correspondante par « *bolus* ». Ceci nous permettra de la distinguer des injections faites à débit optimal, appelées elles « CED ».

- volume d'injection : 5, 10, 20 µl

Cette variable va nous permettre d'évaluer le volume de distribution V_d en fonction du volume d'injection V_i . Il aurait été intéressant d'imager en temps réel l'évolution de ce rapport V_d/V_i . Cependant, le dispositif de TQRS nécessite de verticaliser l'animal (et de le mettre en rotation) ce qui ne nous permet pas d'effectuer les injections intra-cérébrales simultanément à l'imagerie.

Les rats ont été répartis dans les 8 groupes expérimentaux suivants (Tableau IV-1) :

- groupe 1 : injection intracérébrale (i.c.) bolus (durée ~1 minute) de 5 µl de iopamidol (100 mg/ml) ; rats sains.
- groupes 2-3-4 : injection CED (0,5 µl/min) de 5 µl – 10 µl – 20 µl respectivement, de iopamidol (100 mg/ml) ; rats sains

- groupe 5 : injection intra tumorale (i.t.) bolus (durée ~1 minute) de 5 µl de iopamidol (100 mg/ml) ; rats porteurs de gliomes F98.
- groupes 6-7-8 : injection CED (0,5 µl/min) de 5 µl – 10 µl – 20 µl respectivement, de iopamidol (100 mg/ml) ; rats porteurs de gliomes F98.

Chaque groupe comporte 3 à 4 rats.

Groupe	Catégorie	Méthode	Paramètres d'injection			
			Aiguille (gauge)	Débit (µl/min)	Durée (min)	Volume (µl)
1	Sain	bolus i.c.	26s	5	1	5
2	Sain	CED	32	0,5	10	5
3	Sain	CED	32	0,5	20	10
4	Sain	CED	32	0,5	40	20
5	F98	bolus i.t.	26s	5	1	5
6	F98	CED	32	0,5	10	5
7	F98	CED	32	0,5	5	10
8	F98	CED	32	0,5	40	20

Tableau IV-1 : Groupes expérimentaux et paramètres d'injection considérés dans cette étude.

IV.1.2.2 Modèle animal et tumoral

Les expériences ont été réalisées sur 28 rats Fischer 344 mâles syngéniques, âgés de 7 à 8 semaines et pesant 230 à 260 g (Laboratoires Charles Rivers France, L'Abresle, Rhône, France). Préalablement à toute intervention chirurgicale, ou imagerie, le rat est anesthésié par inhalation brève d'isoflurane suivie par une injection de xylozine et kétamine¹⁹.

L'imagerie par tomographie a été réalisée immédiatement après injection de iopamidol. Pour les rats porteurs de tumeurs au moment de l'imagerie, 1000 cellules F98 (ATCC-LGC, Promochem, Molsheim, France) ont été inoculées dans le noyau caudé droit [Barth 1998], suivant la méthode décrite au paragraphe III.3.1.4.3 p.77 [Benabid 1986], et dont les paramètres principaux sont rappelés dans le tableau ci-après (Tableau IV-2).

injecteur	seringue	durée d'injection	agarose	volume	nbr de cellules	profondeur
non	Hamilton 701 N (aiguille : 26s Gauge)	~ 1 minute	-	5 µl	1000	- 5,5 mm

Tableau IV-2 : Paramètres d'injection des cellules tumorales.

¹⁹ Pratiquement, préparer 10 ml du mélange suivant : 4 ml de kétamine (à 10,0 g pour 100 ml) + 2,5 ml de xylozine (à 2,0 g pour 100 ml) + 3,5 ml de solution saline ou eau ppi, et injecter (i.p.) 0,1 à 0,2 ml pour 100 g de poids de rat.

L'étude a été réalisée 13 jours après implantation des tumeurs. Cette date correspond habituellement à l'injection de chimiothérapie pour les traitements combinés chimio-radiothérapie. On sait d'autre part qu'avec ce protocole d'inoculation et ce nombre de cellules F98, la tumeur à J13 s'étend sur environ 3 mm et son volume atteint approximativement 20 mm³ [Fournier 2003].

IV.1.2.3 Dispositifs d'injection

Toutes les injections de iopamidol ont été faites en positionnant l'aiguille aux coordonnées stéréotaxiques d'implantation de la tumeur (*i.e.* : -5,5 mm de profondeur), que ce soit pour les rats sains ou les rats porteurs de gliome F98. Une fois l'injection terminée, la seringue a été laissée en place 1 minute puis remontée délicatement, le trou rebouché avec de la cire à os, et le scalp suturé, puis le rat était placé dans le cadre stéréotaxique en plexiglas. Cette procédure entraîne un délai de 5 à 10 minutes entre la fin de l'injection et le début de l'imagerie.

IV.1.2.3.1 Injection par CED

Pour les injections dites CED, le système de perfusion consiste en un montage parfaitement étanche. Un pousse-seringue (modèle PHD22/2000 ; Harvard Apparatus, Holliston, MA) produit un gradient constant de pression, qui est transmis à la seringue d'injection par l'intermédiaire d'un conduit hydraulique (schéma Figure IV-2) [Chen 1999; Lonser 1998a, b; Lonser 1999; Yang 2002; Wood 1999; Hamilton 2001]. Ce dernier ne se déforme pas sous les contraintes exercées. Il est composé d'un tube en polyetheretherketone (PEEK) rempli d'eau, attaché à chacune de ses extrémités à une seringue TLLX de 250 µl (gastight, modèle 1725 TLLX, Hamilton ; TLLX pour *Teflon*[®] *luer lock with stop*), par des raccords étanches adaptés (CIL Cluzeau Info Labo, Sainte-Foy-La-Grande). La première seringue TLLX est placée dans le pousse seringue tandis que la seconde est reliée au piston de la seringue d'injection, elle-même fixée dans le porte seringue du cadre stéréotaxique. La jonction entre ces deux seringues (TLLX et injection) est rendue possible grâce à la modification du piston de la seringue TLLX : l'embout est remplacé par une petite pièce métallique sur laquelle on vient accrocher le piston de la seringue d'injection. On peut noter aussi qu'un porte seringue double a été conçu spécialement pour ce montage ; il s'adapte sur le cadre stéréotaxique et permet d'aligner verticalement les deux seringues (Figure IV-3).

La seringue d'injection choisie est un modèle Hamilton RN (pour *removable needle*) de 25 µl, qui permet notamment d'adapter des aiguilles 32 gauge. Les injections sont faites en réglant le pousse seringue sur un débit de 0,5 µl/min.

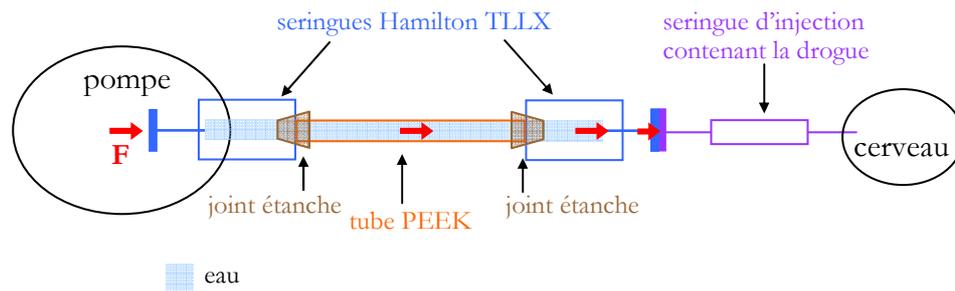


Figure IV-2 : Schéma de principe du circuit hydraulique transmettant la force (représentée par la flèche rouge) depuis la pompe jusqu'à la seringue d'injection.

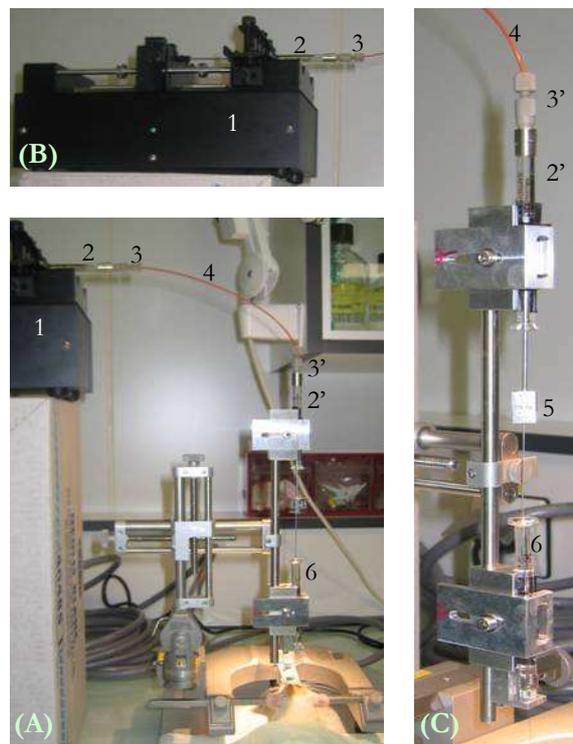


Figure IV-3 : Système d'injection par CED. L'ensemble du dispositif (A) comprend : la pompe Harvard PHD22/2000 (B) et un système hydraulique (C) permettant de transmettre la force au piston de la seringue d'injection. On distingue : la pompe (1), les seringues TLLX (2 et 2'), les connecteurs étanches (3 et 3'), le tube orange en PEEK (4), la pièce reliant les deux pistons (5), la seringue d'injection (6).

IV.1.2.3.2 Injection « bolus »

Pour les injections dites bolus, la seringue de 10 μl (modèle Hamilton 1701N ; N pour *cemented needle* signifiant que l'aiguille est intégrée à la seringue) possède une aiguille 26s gauge. Elle est directement fixée dans le porte seringue classique du cadre stéréotaxique. Son piston est poussé manuellement par l'expérimentateur en une minute environ.

IV.1.3 Acquisition des images CT et calcul des concentrations en iode

IV.1.3.1 Dispositif d'imagerie CT : rappels

Les acquisitions d'images tomographiques volumiques ont été réalisées avec le dispositif d'imagerie SRCT de la ligne expérimentale ID17 (voir paragraphe III.1.2) à l'ESRF [Elleume 1999; Thomlinson 2000]. Brièvement, le faisceau est réglé à 35 keV (largeur de bande 150 eV), c'est-à-dire juste au dessus de l'énergie du seuil K de l'iode (33,17 keV). Les coupes coronales d'épaisseur 1 mm et d'espacement 1 mm sont enregistrées sur le détecteur germanium HPGe afin d'obtenir une cartographie volumique de la répartition de l'iode dans le cerveau (Figure IV-4), et ceci avec des voxels de dimensions $0,35 \times 0,35 \times 1 \text{ mm}^3$. La reconstruction des images est faite grâce à l'algorithme de rétroprojection filtrée SNARK89 [Herman 1989].

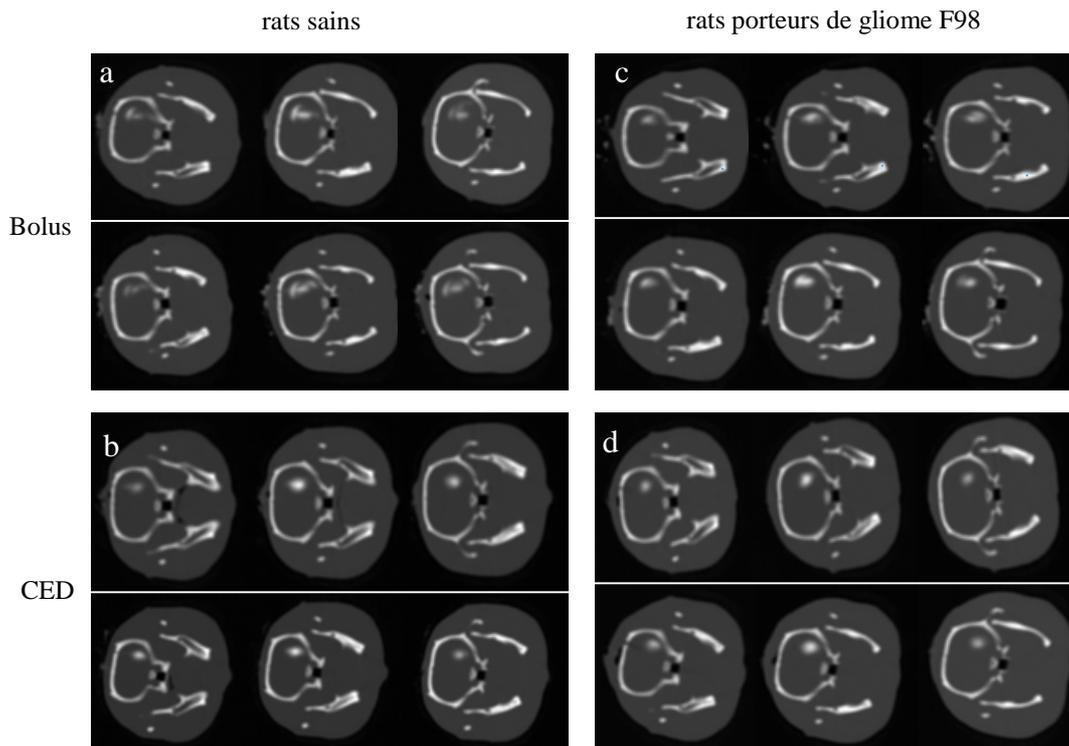


Figure IV-4 : Images CT coronales, acquises immédiatement après injection intracérébrale de $5 \mu\text{l}$ d'iopamidol (concentration en iode : 100 mg/ml). L'agent de contraste a été administré chez des rats sains (à gauche) par bolus (a) ou CED (b) ; et chez des rats porteurs de gliomes F98 (à droite) par bolus (c) ou CED (d). Sont présentées ici 3 coupes adjacentes pour 2 rats représentatifs de chaque groupe.

IV.1.3.2 Mesure de concentrations en iode

Comme il est décrit au paragraphe III.2.2.2 p.73, le calcul de concentrations *absolues* en iode à partir des images CT, est réalisable grâce à l'utilisation de rayons X monochromatiques [Oelckers 1996; Dilmanian 1997; Elleaume 2002].

L'équation III-8 p.73 nous donne l'expression de la concentration en iode C_I (g.ml^{-1}) pour chaque voxel :

$$C_I = \frac{\mu_{\text{mélange,E}} - \mu_{T,E}}{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{I,E}}$$

avec $\mu_{\text{mélange,E}}$ et $\mu_{T,E}$, les coefficients linéiques d'atténuation (en cm^{-1}) dont les valeurs sont directement mesurables dans l'image tomographique et $(\mu/\rho)_{I,E}$ le coefficient d'atténuation massique (en $\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$) de l'iode à l'énergie E.

Dans le cadre de cette étude ($E = 35 \text{ keV}$), l'équation devient :

$$C_I = \frac{\mu - \mu_0}{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{35 \text{ keV,I}}} \quad \text{équation IV-1}$$

où μ est le coefficient linéaire d'atténuation du tissu cérébral mesuré dans l'image SRCT après injection d'iode, μ_0 est le coefficient linéaire d'atténuation des tissus cérébraux sans iode à l'énergie 35 keV et $(\mu/\rho)_{I,E} = 31,23 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$ est le coefficient d'atténuation massique de l'iode à 35 keV. μ_0 a été déterminé en calculant la moyenne dans plusieurs ($n = 18$) ROIs de 36 voxels de tissu sain (*i.e.* dans le cerveau controlatéral n'ayant pas reçu d'iode), puis en moyennant ces $n = 18$ valeurs calculées ; soit $\mu_0 = 0,3149 \pm 0,0007 \text{ cm}^{-1}$.

Il est nécessaire de souligner que l'imagerie n'est pas faite simultanément à l'injection, puisqu'elle impose de verticaliser et faire tourner l'animal. Une fois les procédures chirurgicales terminées, il faut placer le rat dans le cadre en plexiglas, le verticaliser et le fixer sur la plateforme tournante. Ainsi, les images dites à t_0 ou « immédiates » après injection sont faites en réalité avec un délai de 5 à 10 minutes par rapport à la fin de l'injection, délai durant lequel la diffusion du iopamidol a commencé, mais n'est pas mesurable.

IV.1.4 Analyse de la biodistribution de l'iode : méthode

IV.1.4.1 Volume de distribution V_d et rapport V_d/V_i

L'analyse des images tomographiques a été réalisée grâce à des programmes développés spécialement, avec le langage IDL[®] (*Interactive Data Language*, RSI) [IDL 2002].

Le volume de distribution (V_d) a été calculé à partir des images acquises juste après la fin de l'injection. Il est défini comme le volume de tissu dans lequel la concentration en iode est supérieure ou égale à une valeur-seuil : 5 ou 10 % de la valeur nominale (100 mg/ml) injectée soit 5 ou 10 mg/ml, respectivement. Ce V_d est extrait du volume CT résolu en concentration d'iode, en faisant croître une région d'intérêt à partir d'un premier voxel ayant une valeur supérieure au seuil. Tous les voxels voisins du premier voxel désigné sont testés, puis inclus ou non dans le volume et ainsi de suite. Le calcul de V_d est fait à partir du nombre de voxels inclus, multiplié par le volume d'un seul voxel soit 0,1225 μl (*i.e.* $0,35 \times 0,35 \times 1 \text{ mm}^3$). Les ROIs sont vérifiées visuellement avant d'être prises en compte dans le calcul de V_d afin d'exclure des pixels comptés par erreur (notamment certains pixels de l'os).

Groupe	Catégorie	Paramètres d'injection			Seuillage 5 mg/ml		Seuillage 10 mg/ml	
		Méthode	Durée (min)	Volume (μl)	V_d (μl) (moy \pm stdev)	V_d/V_i (moy \pm stdev)	V_d (μl) (moy \pm stdev)	V_d/V_i (moy \pm stdev)
1	Sain	bolus i.c.	1	5	26,91 \pm 2,32	5,38 \pm 0,46	12,62 \pm 2,65	2,52 \pm 0,53
2	Sain	CED	10	5	19,23 \pm 1,39	3,85 \pm 0,28	10,72 \pm 1,47	2,14 \pm 0,29
3	Sain	CED	20	10	33,32 \pm 10,91	3,33 \pm 1,09	19,66 \pm 6,67	1,97 \pm 0,67
4	Sain	CED	40	20	72,73 \pm 13,31	3,64 \pm 0,67	46,76 \pm 11,09	2,34 \pm 0,55
5	F98	bolus i.t.	1	5	21,38 \pm 1,49	4,28 \pm 0,30	10,93 \pm 3,50	2,19 \pm 0,70
6	F98	CED	10	5	15,35 \pm 4,90	3,07 \pm 0,98	7,96 \pm 3,86	1,59 \pm 0,77
7	F98	CED	5	10	32,67 \pm 11,28	3,27 \pm 1,13	19,15 \pm 6,42	1,92 \pm 0,64
8	F98	CED	40	20	72,93 \pm 6,98	3,65 \pm 0,35	45,32 \pm 3,40	2,27 \pm 0,17

Tableau IV-3 : Volumes de distribution (V_d) et rapports V_d/V_i (V_i = volume d'injection) calculés après injection intracérébrale d'iopamidol ([I] = 100 mg/ml) par bolus ou CED, chez des rats sains ou porteurs de gliome F98. Les V_d s ont été déterminés à partir des images CT en choisissant un seuil de 5 ou 10 % de la concentration en iode injectée (soit 5 ou 10 mg/ml). Les moyennes (moy) et déviations standards (stdev) ont été calculées pour chaque groupe de 3 à 4 rats. (i.c. = intracérébral ; i.t. = intratumoral).

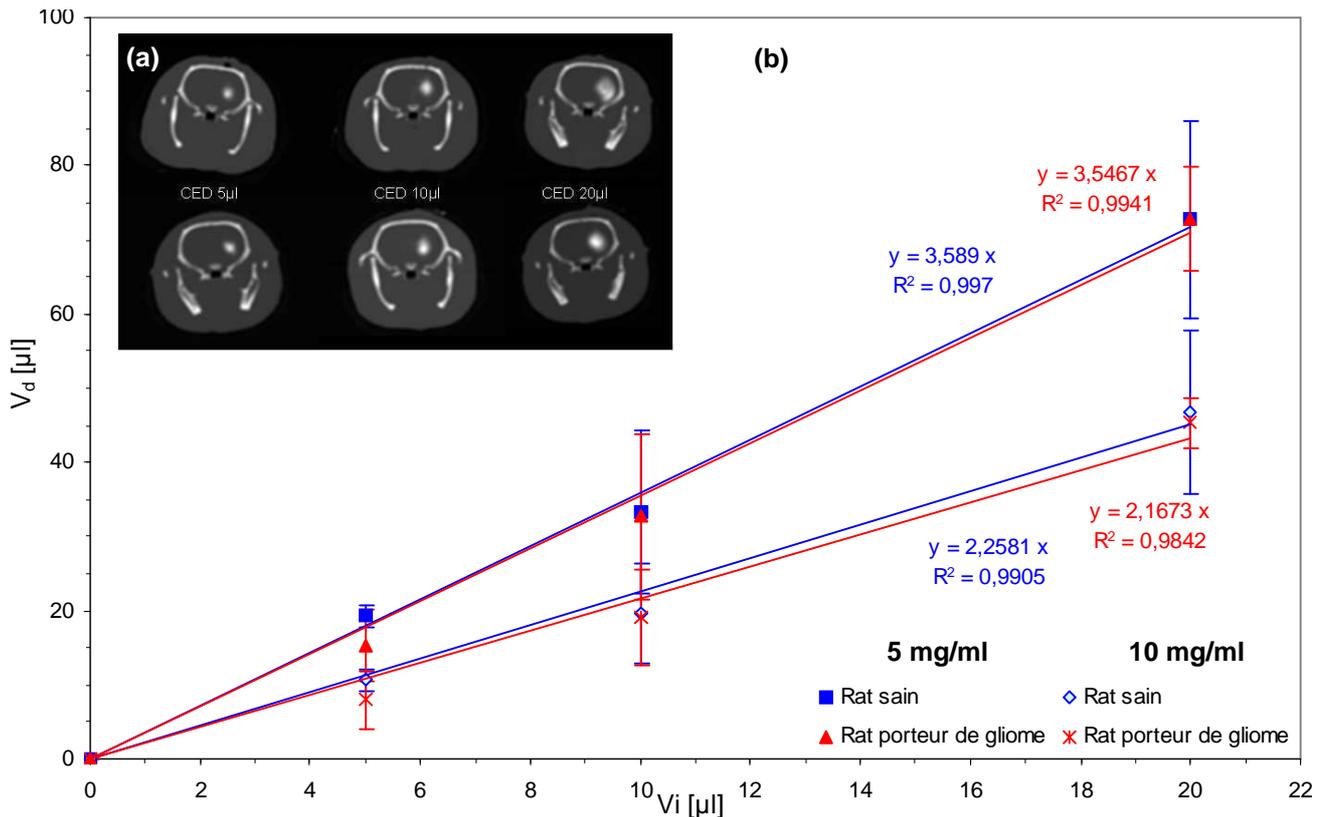


Figure IV-5 : (a) Images CT coronales immédiatement après injection de 5, 10 et 20 μl d'iopamidol ($[I]=100 \text{ mg/ml}$) par CED ($0,5 \mu\text{l/min}$). Les scans correspondent à des rats sains (haut), ou porteurs de gliomes F98 (bas). On remarquera l'absence d'iode dans le cerveau controlatéral. (b) Relation entre volume de distribution (V_d) et volume d'injection (V_i) pour des rats sains ou porteurs de gliome F98. V_d a été calculé comme le volume de tissu où la concentration en iode est supérieure 5 ou 10 % de la solution injectée (soit 5 ou 10 mg/ml). Les barres d'erreur représentent les déviations standards (2-3 rats).

IV.1.4.2 Evolution temporelle

Chaque rat a été imagé à différents délais après la fin de l'injection : t_0 (5 à 10 minutes), t_1 (15 à 20 minutes), t_3 (environ 1 heure) et t_4 (6 heures).

Pour chacune de ces mesures et pour chacun des rats, la concentration en iode maximale ($[I]_{\text{max}}$) a été mesurée afin de tracer la décroissance temporelle de la concentration en iode. Ces courbes ont ensuite été fittées grâce à une fonction exponentielle d'équation :

$$[I]_{\text{max}}(t) = y_0 + A_1 \exp(-t/T) \text{ [mg/ml]} \quad \text{équation IV-2}$$

avec t (min) le temps après injection, y_0 (mg/ml) la concentration en iode mesurée à la fin de l'étude, A_1 (mg/ml) la concentration maximale en iode à $t=0$ majorée de y_0 , et T (min) la constante de décroissance temporelle.

Pour chaque groupe de rats la valeur moyenne de ces constantes A_1 , y_0 et T ont été calculées.

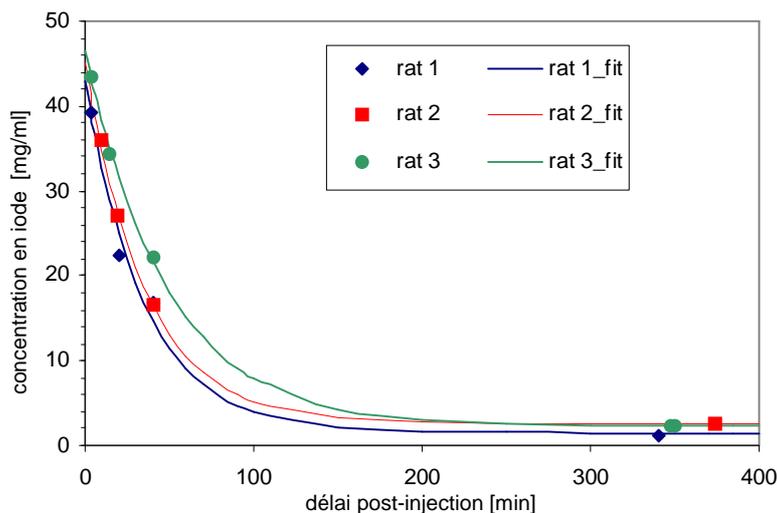


Figure IV-6 : Evolution temporelle de la concentration en iode obtenue après injection par CED de 10 μ l d'iopamidol chez un rat porteur de gliome F98. La concentration maximale en iode mesurée suit une décroissance exponentielle en fonction du temps ($r^2 > 0,99$ pour tous les rats).

Dans les images CT, la clairance du contraste due à l'iode est une donnée importante, si on envisage une radiothérapie en mode *SSR* avec renforcement de dose. En effet, ces constantes nous renseignent sur la concentration en iode que l'on peut espérer avoir dans la tumeur pendant l'irradiation.

Catégorie	Paramètres d'injection		y_0 [mg/ml] (mean \pm stdev)	A_1 (mg/ml) (moy \pm stdev)	T (min) (moy \pm stdev)
	Méthode	volume (μ l)			
Rats sains	bolus i.c.	5	1,93 \pm 0,38	28,62 \pm 6,78	49,19 \pm 7,97
	CED	5	2,21 \pm 1,01	36,89 \pm 5,92	39,20 \pm 6,56
	CED	10	2,42 \pm 1,03	36,78 \pm 5,38	39,25 \pm 3,85
	CED	20	6,56 \pm 2,10	36,88 \pm 6,94	55,57 \pm 10,70
Rats porteurs de gliome	bolus i.t.	5	1,85 \pm 0,48	30,51 \pm 5,06	38,72 \pm 15,30
	CED	5	1,71 \pm 0,45	33,02 \pm 7,05	30,95 \pm 7,24
	CED	10	2,11 \pm 0,56	42,67 \pm 1,38	40,00 \pm 7,63
	CED	20	4,08 \pm 0,33	46,06 \pm 3,95	56,68 \pm 2,73

Tableau IV-4 : Paramètres permettant de décrire l'évolution temporelle de la concentration maximale en iode $[I]_{\max}$ pour chaque groupe de rat. Pour chaque animal, $[I]_{\max}$ a été mesurée sur les images CT, tracée en fonction du temps et ajustée avec une fonction exponentielle : $[I]_{\max}(t) = y_0 + A_1 \exp(-t/T)$. Les constantes A_1 , T et y_0 ont été moyennées pour obtenir des valeurs représentatives de chaque groupe.

IV.1.4.3 Facteur d'augmentation de dose

Le facteur d'augmentation de dose (DEF pour *dose enhancement factor*) caractérise le changement de dose liée à l'incorporation d'un élément lourd dans un tissu (iode). Il est défini comme le rapport entre la dose délivrée dans un volume d'intérêt (voxel) contenant cet élément lourd et la dose délivrée dans le même volume d'intérêt sans élément lourd [Solberg 1992].

De façon générale, la dose D de rayons X délivrée à l'échantillon par unité élémentaire de volume, peut être définie par l'équation suivante :

$$D = 1000 \cdot \Phi \cdot E \cdot (\mu/\rho)_{\text{en},E} \text{ [Gy]} \quad \text{équation IV-3}$$

avec Φ (cm^{-2}) le flux de photons incidents sur le voxel d'intérêt, E (J) l'énergie du faisceau de rayons X, $(\mu/\rho)_{\text{en},E}$ ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) le coefficient massique d'absorption en énergie du voxel à l'énergie E considérée.

Si un voxel est composé de plusieurs éléments j , on calcule le coefficient massique d'absorption en énergie en sommant les coefficients $(\mu/\rho)_{\text{en},E,j}$ des éléments j , pondérés de leur fraction massique w_j dans le voxel (loi d'additivité de Bragg) [Maughan 1999]:

$$(\mu/\rho)_{\text{en},E} = \sum_j w_j \cdot (\mu/\rho)_{\text{en},E,j} \quad \text{équation IV-4}$$

Par conséquent, dans un voxel composé de tissus imprégné d'iode, le coefficient d'absorption massique en énergie devient la somme des contributions du tissu (t) et de l'iode (I) :

$$(\mu/\rho)_{\text{en},E} = w_I \cdot (\mu/\rho)_{\text{en},E,I} + w_t \cdot (\mu/\rho)_{\text{en},E,t} \quad \text{équation IV-5}$$

On en déduit aisément l'expression du DEF :

$$\text{DEF} = \frac{w_I \cdot (\mu/\rho)_{\text{en},E,I} + w_t \cdot (\mu/\rho)_{\text{en},E,t}}{(\mu/\rho)_{\text{en},E,t}} \quad \text{équation IV-6}$$

A partir des cartographies en concentration d'iode obtenues pour les rats porteurs de gliome F98, des DEFs ont été calculés dans plusieurs ROIs pour une irradiation à $E=50$ keV. Les ROIs ont été tracées, sur la coupe CT où la tumeur était la plus étendue, dans les zones suivantes : tumeur, cerveau ipsilatéral (*i.e.* tissu sain dans l'hémisphère droit où a été implantée la tumeur), cerveau controlatéral (*i.e.* tissu dans l'hémisphère gauche non touché par la tumeur), muscle.

	Nb de rats	Tumeur	Cerveau controlatéral	Cerveau ipsilatéral	Muscle
[iode] (mg/ml) \pm stdev	3	20,20 \pm 5,20	0,02 \pm 0,06	0,23 \pm 0,19	0,01 \pm 0,07
DEF moyen	3	4,07	1,00	1,04	1,00

Tableau IV-5 : Concentration en iode dans différentes zones du cerveau et facteur d'augmentation de dose (DEF) correspondant. Les concentrations en iode sont celles obtenues 10 minutes après injection de 5 μ l d'iopamidol (concentration en iode : 100 mg/ml) par CED chez des rats porteurs de gliome F98. Elles ont été mesurées sur les scans CT ; chaque point représente la moyenne arithmétique (et la déviation standard) pour $n = 3$ rats.

IV.1.4.4 Dosimétrie Monte-Carlo calculée avec *SSRdose*

Une étude dosimétrique a été faite sur un des rats du groupe 6, porteur de gliome F98 et ayant reçu 5 μ l d'iopamidol par CED, pour évaluer le gain en dose obtenu avec ce type d'injection intracérébrale.

Les systèmes de dosimétrie conventionnels ne peuvent être utilisés pour calculer correctement les distributions de dose en configuration *SSR*, car ils ne prennent pas en compte la combinaison de rayons X de basse énergie et la présence d'un élément lourd au sein de la tumeur. C'est dans le cadre de la thèse de Caroline Boudou qu'a été développé un outil tridimensionnel de dosimétrie Monte-Carlo, appelé *SSRdose*, adapté aux besoins particuliers de la *SSR* [Boudou 2005; Boudou 2006]. Il s'agit d'une interface graphique implémentée sous IDL[®] et basée sur le code de calcul MCNPX (pour *Monte-Carlo N-Particle eXtended*) version β 2.6.a. provenant du laboratoire *Los Alamos National Laboratory* (Los Alamos, NM) [Hendricks 2005]. Les images tomodensitométriques sont les données d'entrée de *SSRdose* (Figure IV-7), qui calcule et affiche la carte de dose correspondant aux paramètres d'irradiation choisis (Figure IV-8, a).

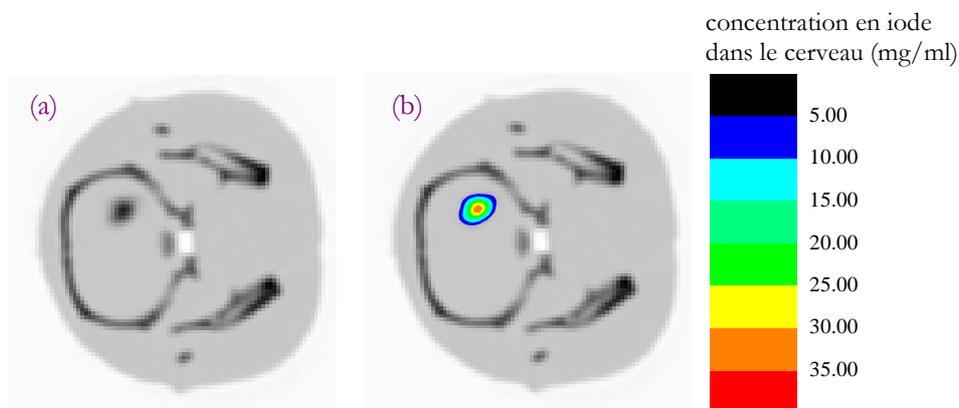


Figure IV-7 : (a) Image CT obtenue après injection de 5 μ l d'iopamidol par CED (0,5 μ l/min) chez un rat porteur de gliome F98. (b) Superposition de l'image CT (a) et de la distribution d'iode segmentée correspondante. Les images CT sont les données d'entrée de *SSRdose*.

L'irradiation SSR a été modélisée en utilisant un faisceau de rayons X monochromatiques d'énergie 50 keV, de 6 mm de large et couvrant 6 coupes CT jointives de 1 mm d'épaisseur (résolution de 350 μm dans le plan de l'image). Les photons envoyés ont été répartis de façon uniforme sur 360°, et le centre de rotation a été placé au centre du volume ciblé. Environ 11 heures de calculs (sur une station SUN V20Z) ont été nécessaires pour obtenir une incertitude statistique inférieure ou égale à 5 % dans la zone cible. La distribution de dose a ensuite été normalisée à la dose maximale obtenue dans la cible (Figure IV-8).

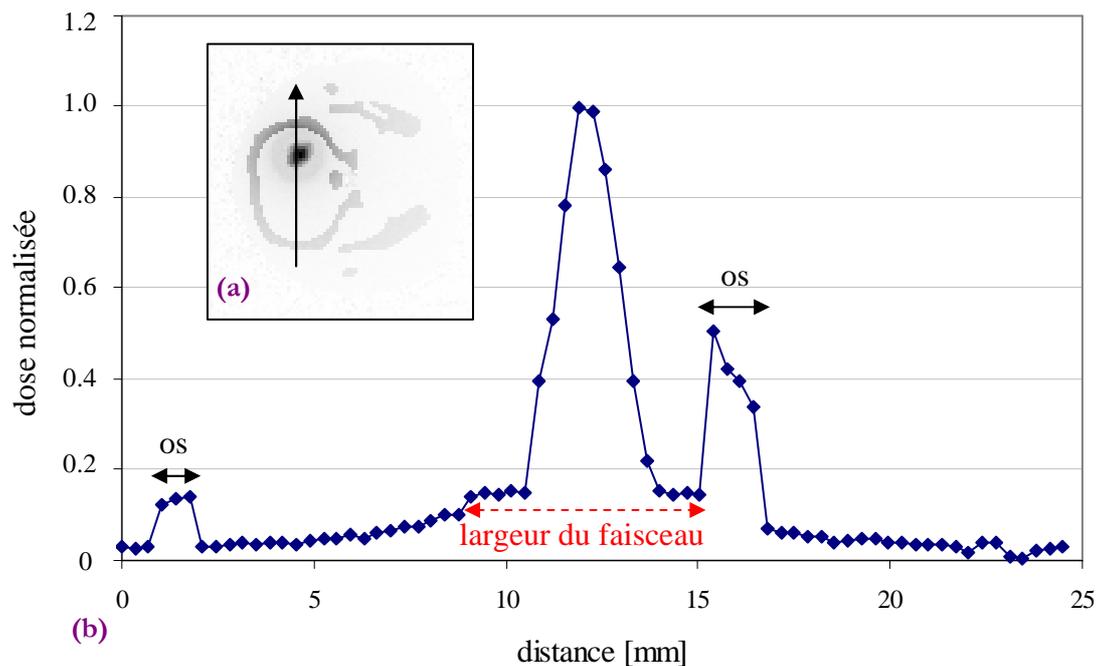


Figure IV-8 : Distribution de dose pour une irradiation SSR après injection de 5 μl d'iopamidol par CED, chez un rat porteur de gliome F98. **(a)** Distribution de dose obtenue par simulation Monte-Carlo pour un faisceau monochromatique de 50 keV et de dimensions 6 \times 6 mm². **(b)** Profil de dose associé, normalisé.

IV.1.5 Biodistribution de l'iode : résultats et discussion

Les tests d'analyse de variances (Excell 2000 ; Microsoft) ont été utilisés pour déterminer si les V_d s calculés (suivant les modes d'injection) étaient statistiquement différents. Les données sont considérées comme significativement différentes si $p < 0,05$.

IV.1.5.1 Comparaison des deux méthodes d'injection (bolus/CED)

IV.1.5.1.1 Forme de la distribution et problème de reflux

Visuellement, les distributions en iode varient suivant la méthode d'injection utilisée (voir scans CT sur la Figure IV-4 et la Figure IV-9). Bien qu'elles apparaissent nettement plus reproductibles, contrôlées et homogènes avec la méthode CED, il est difficile de trouver des paramètres pertinents pour mettre en évidence et quantifier ces caractéristiques. En CED, la géométrie de la

distribution est plus régulière, davantage sphérique, et l'iode reste contenu dans le noyau caudé droit où il a été injecté.

On note cependant que la différence (CED *versus* bolus) est moins prononcée pour les injections en tissu tumoral par rapport à celles faites dans le tissu sain, car on constate moins souvent l'apparition du phénomène de reflux. Il est difficile de savoir si cela est dû au tissu lui-même (différence de pression interstitielle, inhomogénéité) ou au nombre peu élevé de rat par groupe pour un tissu fortement inhomogène. Le phénomène de *backflow* que l'on observe aisément pour une injection bolus sur 3/3 des rats sains vient perturber le calcul du volume de distribution de l'iode. Ainsi, le volume de distribution de l'iode contenu uniquement dans le noyau caudé (*i.e.* contenu dans le tissu ciblé) droit est inférieur au V_d calculé ici. Pour 2/3 des rats porteurs de gliome F98, de l'iode était également mesurable au niveau du corps calleux.

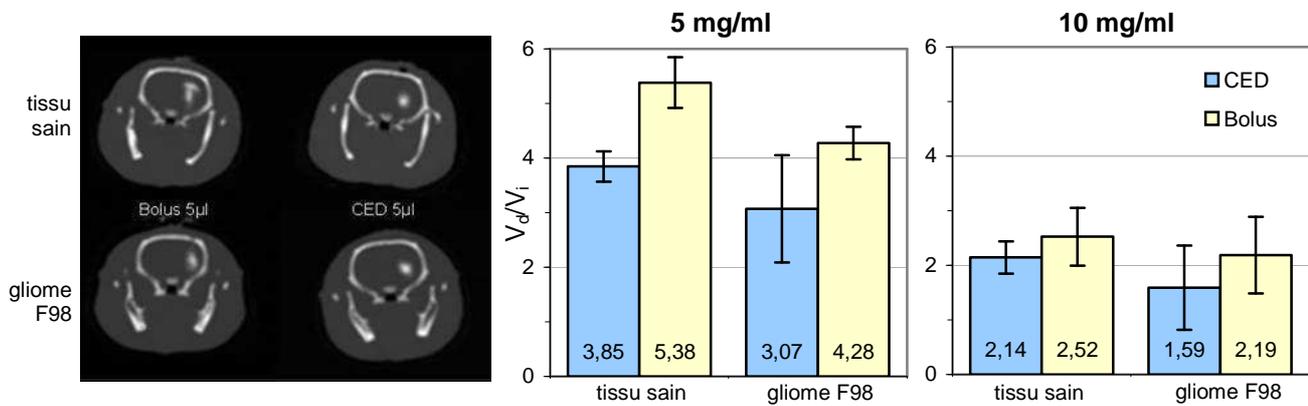


Figure IV-9 : Distribution d'iode obtenue immédiatement après injection de 5 µl d'iopamidol par bolus ou CED, chez des rats sains ou porteurs de gliome F98. CT scans et rapports V_d/V_i calculés avec un seuillage à 5 ou 10 mg/ml.

La présence de reflux lors des injections « bolus » concorde avec l'étude de Chen *et al.*. En effet, pour des injections dans le *striatum* chez des rats, ils reportent une perte de l'agent infusé dans la matière blanche de $30,3 \pm 7,8 \%$ pour un débit de 5 µl/min (aiguille 32 gauge) ce qui est significativement différent des $4,0 \pm 3,6 \%$ et $5,2 \pm 3,6 \%$ mesurés à 0,1 et 0,5 µl/min, respectivement. De même ils observent une fuite de $35,7 \pm 8,1 \%$ pour une aiguille 28 gauge (débit 0,5 µl/min), significativement plus élevée que $5,2 \pm 3,6 \%$ (aiguille 32 gauge) [Chen 1999].

On notera que dans les études précliniques antérieures [Biston 2004a; Adam 2003a], les cellules tumorales F98 sont inoculées avec les paramètres des injections « bolus » (débit et taille de l'aiguille). Le phénomène de reflux, particulièrement visible en tissu sain, peut engendrer un dépôt

aléatoire de cellules tumorales le long du trajet de l'aiguille. Les cellules peuvent également s'éparpiller dans le corps calleux et ce de façon non reproductible.

IV.1.5.1.2 Volumes de distribution

Chez les rats sains, avec un seuillage à 5 mg/ml, les V_d s calculés (bolus : $26,91 \pm 2,32 \mu\text{l}$; CED : $19,23 \pm 1,39 \mu\text{l}$) sont significativement différents ($p = 0,026$), alors qu'ils ne le sont pas pour un seuillage à 10 mg/ml (bolus : $12,62 \pm 2,65 \mu\text{l}$; CED : $10,72 \pm 1,47 \mu\text{l}$; $p = 0,437$).

Pour les rats porteurs de gliome F98, les V_d s ne sont pas significativement différents, que ce soit pour un seuil à 5 mg/ml (bolus : $21,38 \pm 1,49 \mu\text{l}$; CED : $15,35 \pm 4,90 \mu\text{l}$; $p = 0,063$) ou à 10 mg/ml (bolus $10,93 \pm 3,50 \mu\text{l}$; $7,96 \pm 3,86$; $p = 0,335$).

IV.1.5.1.3 Evolution temporelle de la concentration maximale mesurée

La concentration en iode maximale mesurable dans la zone d'injection, suit une décroissance temporelle exponentielle et ce pour tous les groupes considérés ($R^2 >$ chez tous les rats) (Figure IV-6 et constantes présentées Tableau IV-4). La concentration en iode mesurée 6 heures après y_0 est approximativement 2 mg/ml (soit $\sim 5\%$ de la concentration mesurée immédiatement après la fin de l'injection), que ce soit chez les rats sains ou porteur de gliome, pour des injections bolus et CED (5 et 10 μl). Si on considère les injections de 20 μl par CED, on observe davantage d'iode à 6 heures (5,3 mg/ml soit 11 % de la concentration initiale mesurée).

IV.1.5.2 Distribution d'iode obtenue par CED

IV.1.5.2.1 Relation linéaire entre V_d et V_i

Le volume de distribution V_d augmente linéairement avec V_i , que ce soit chez les rats sains ($R^2 = 0,9970$ et $0,9905$) ou les rats porteurs de gliome F98 ($R^2 = 0,9941$ et $0,9842$), pour des seuillages à 5 mg/ml et 10 mg/ml, respectivement (voir Figure IV-5). Nous vérifions donc la relation linéaire caractéristique de la CED, décrite fréquemment dans la littérature [Sandberg 2002; Lonser 2002; Croteau 2005; Saito 2005; Krauze 2005a].

Les V_d calculés chez les rats porteurs de gliomes F98 avec un seuillage à 5 mg/ml, ne sont pas statistiquement différents de ceux obtenus chez les rats sains : $p = 0,374$, $p = 0,953$ et $p = 0,983$ pour $V_i = 5$, 10 et 20 μl , respectivement. Pour un seuillage à 10 mg/ml, on constate identiquement que $p = 0,423$, $p = 0,937$ et $p = 0,840$ pour $V_i = 5$, 10 et 20 μl , respectivement.

De façon similaire, Saito *et al.* reportent que pour des liposomes (contenant du gadolinium : Lip/Gd/DiI-DS) injectés par CED, le volume de distribution (mesuré par IRM) est équivalent en tissu sain ou tumoral (modèles de gliome C6 et 9L-2). Cependant, ils montrent que l'homogénéité de la distribution dépend fortement de la structure de la tumeur. Ainsi, la distribution est irrégulière lorsque les liposomes sont injectés dans une tumeur hétérogène et présentant de nombreux sites de nécrose (modèle C6) ; elle est beaucoup plus uniforme pour une tumeur homogène et infiltrante (modèle 9L-2) [Saito 2004a].

IV.1.5.2.2 Evolution temporelle de la distribution

Nous avons vu précédemment que la concentration maximale en iode suivait une décroissance temporelle exponentielle (§ IV.1.5.1.3). Si on regarde maintenant la distribution de l'iode au cours du temps (Figure IV-10), elle conserve une forme gaussienne ($R^2 > 0,99$ jusqu'à 1 heure et $> 0,91$ à 6 heures pour des profils acquis dans la direction d'injection). Ceci n'est valable que pour les injections CED (les profils obtenus par bolus sont perturbés par le reflux, notamment dans le corps calleux).

On notera également que l'iode n'est jamais mesurable dans le cerveau controlatéral, quels que soient le volume injecté par CED, et le délai considéré.

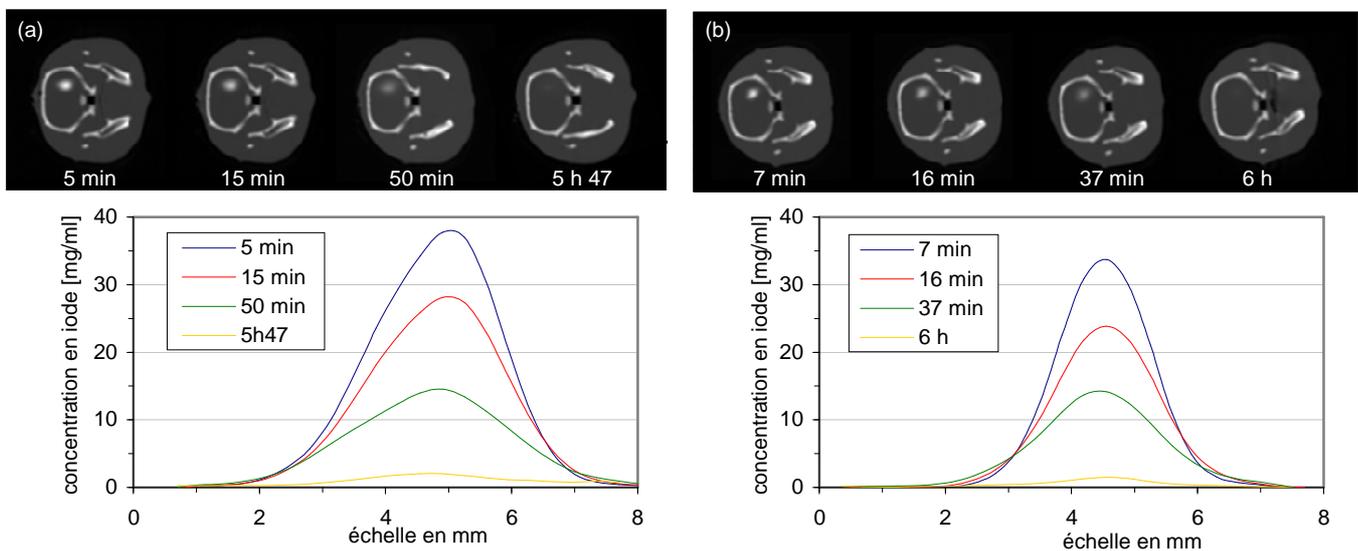


Figure IV-10 : Evolution temporelle de la concentration en iode chez deux rats représentatifs : porteur de gliome F98 (a) et sain (b), après injection de 5 μ l d'iopamidol par CED. Les profils ont été tracés sur les scans CT, dans la direction d'injection. Les profils de concentration en iode suivent une distribution gaussienne ($R^2 > 0,99$ pour les trois premiers délais et $R^2 > 0,91$ pour le délai autour de ~ 6 h).

IV.1.5.3 Renforcement de la dose X

IV.1.5.3.1 Une distribution d'iode adaptée

La SSR par renforcement de dose nécessite une quantité suffisante d'iode (>5 mg/ml) dans la tumeur. Inversement, il est nécessaire que les concentrations restent faibles dans le sang et les tissus sains afin qu'ils soient protégés du renforcement de dose. D'autre part, le niveau de concentration en élément lourd (iode) doit rester important pendant toute la durée de l'irradiation (*i.e.* approximativement 15 minutes). Les profils tracés sur les scans CT (voir exemples Figure IV-10) montrent que pour un délai de 15 minutes, une concentration en iode supérieure à 5 mg/ml est mesurable sur 3 mm pour une injection CED de 5 μ l. La concentration décroît rapidement pour devenir ensuite très faible ($<0,25$ mg/ml) et non mesurable. Ainsi, le DEF moyen calculé dans la région tumorale perfusée par l'iode, est de 4,07 pour une irradiation à 50 keV (voir Tableau IV-5). Il reste très proche de 1 dans les autres zones d'intérêt qu'il faut protéger de l'irradiation : cerveau ipsilatéral, cerveau controlatéral et muscles.

IV.1.5.3.2 Distribution de dose calculée par simulation Monte-Carlo

La distribution de dose obtenue par simulation Monte-Carlo, chez un rat porteur de gliome F98, après injection de 5 μ l d'iopamidol par CED est présentée Figure IV-8, les isodoses sont présentées Figure IV-11. La concentration élevée d'iode dans un volume bien défini engendre un gradient de dose élevée autour de la cible. On soulignera que le cerveau controlatéral ainsi que les tissus sains autour de la cible sont parfaitement protégés. Les doses élevées reçues par les os du crâne ou les mâchoires sont liées à la géométrie d'irradiation ainsi qu'à la petite taille de l'objet irradié (*i.e.* la tête du rat).

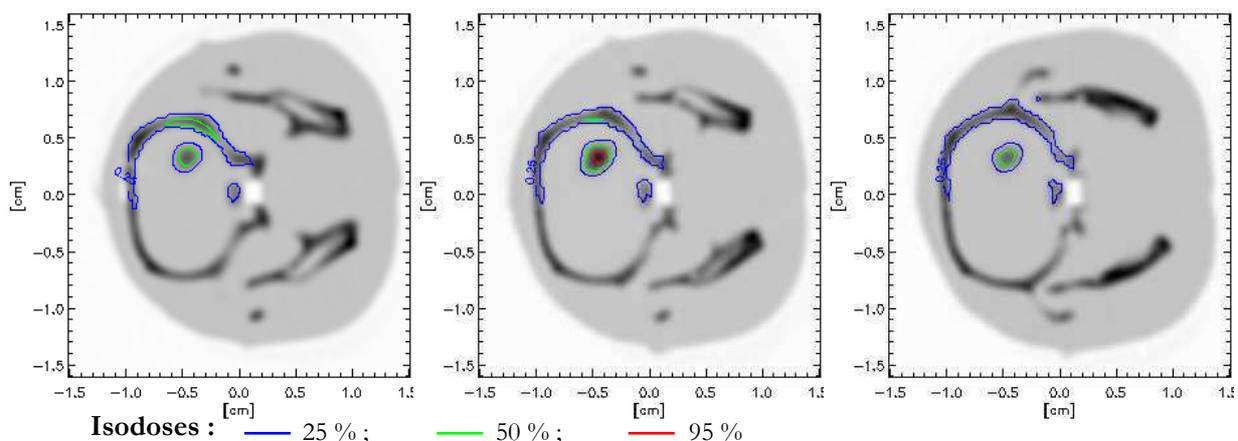


Figure IV-11 : Isodoses pour une irradiation du volume cible contenant de l'iode. La tumeur a été perfusée par CED d'iopamidol ($V_i = 5$ μ l). Les isodoses représentent les fractions de la dose maximale.

IV.1.5.3.3 *Avantage de la CED pour une irradiation SSR avec renforcement de dose*

De fortes concentrations d'iode peuvent être atteintes dans la tumeur par injection intracarotidienne (i.ca.) d'iode avec mannitol [Adam 2005]. Il a été montré que cette modalité d'injection permettait d'augmenter la survie de rats porteur de gliome F98, par rapport à une injection intra-veineuse (i.v.) ou une irradiation seule [Adam 2003a; Adam 2006]. Ainsi, les survies moyennes (\pm stdev) et les pourcentages d'augmentation de survie associés (ILS[%]) sont de : $25,6 \pm 2,4$ jours pour le groupe contrôle non traité ; $48,9 \pm 13,1$ jours (ILS = 91 %) pour les rats irradiés sans iode (15 Gy – 50 keV) ; $55,2 \pm 13,4$ jours (ILS = 116 %) pour ceux irradiés (15 Gy - 50 keV) après injection i.v. d'iode et mannitol ; $68,8 \pm 16,4$ jours pour ceux irradiés (15 Gy - 50 keV) après injection i.ca. d'iode et mannitol. Cependant, la concentration d'iode mesurée dans le sang était 3 fois supérieure aux concentrations possibles dans la tumeur, et induisait une dose d'irradiation particulièrement élevée et indésirable au niveau des vaisseaux ($DEF_{\text{sang}} = 9,9$).

Les DEFs mesurés étaient de 4,11 au niveau de la cible, 9,9 dans les vaisseaux, et 1,92 dans le cerveau ipsilatéral. Par comparaison, pour un DEF semblable au niveau de la tumeur (*i.e.* 4,07), la CED permet de minimiser l'augmentation de dose indésirable au niveau des vaisseaux (DEF = 1,0) et du cerveau ipsilatéral (DEF = 1,04).

IV.1.6 **Imagerie d'une injection par CED à haute résolution : résultats préliminaires**

Nous avons réalisé un premier essai avec la caméra FReLoN, afin d'obtenir une imagerie haute résolution (pixel : $47 \times 47 \mu\text{m}^2$) des distributions d'iopamidol administré par CED.

Un rat porteur de gliome F98 (1000 cellules F98 injectées dans le noyau caudé droit, comme décrit au § IV.1.2.2), et un rat sain ont reçu chacun une injection par CED (0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$; 32 gauge) d'un volume $V_i = 15 \mu\text{l}$ de iopamidol ($[I] = 100 \text{ mg/ml}$) dans le noyau caudé droit (aux coordonnées habituelles d'inoculation des cellules tumorales). Ils ont été imagés immédiatement après la fin de l'injection (Figure IV-12).

Etant donné le temps nécessaire pour imager complètement le cerveau d'un animal avec ce détecteur (~ 45 minutes), et les constantes de décroissances temporelles de la concentration en iode (voir Tableau IV-4), il n'est pas possible de calculer le volume de distribution obtenu. Une mesure quantitative de la concentration d'iode n'est pas non plus accessible à partir de ces images, à moins d'en dégrader la résolution [Rousseau 2004]. On restera prudent quant à

l'interprétation de ces images tomographiques volumiques puisqu'il s'agit d'un essai préliminaire sur deux rats seulement (1 rat/groupe). On pourra cependant remarquer que le phénomène de reflux survient au niveau du corps calleux, pour le cerveau sain. D'autre part, il semblerait que la distribution d'iode dans le tissu tumoral soit fortement inhomogène puisque certaines zones présentent un fort contraste et d'autres non ; la répartition de l'iode apparaît plus homogène dans le cerveau sain. Ces résultats sont proches de ceux décrits par Saito *et al.* qui obtiennent, pour des liposomes, des volumes de distribution équivalents en tissu sain ou tumoral mais remarquent des irrégularités locales de distribution, d'autant plus importantes que le tissu (tumoral) a une structure inhomogène [Saito 2004a]. Une autre étude décrit de fortes hétérogénéités dans la distribution de drogue au sein du modèle gliomal RG-2 (intra-cérébral ou sous-cutané), après administration par CED d'une solution radiomarquée [Vavra 2004]. Il semblerait, que la drogue s'accumule préférentiellement dans les parties nécrotiques ou dans la zone en bordure de la tumeur.

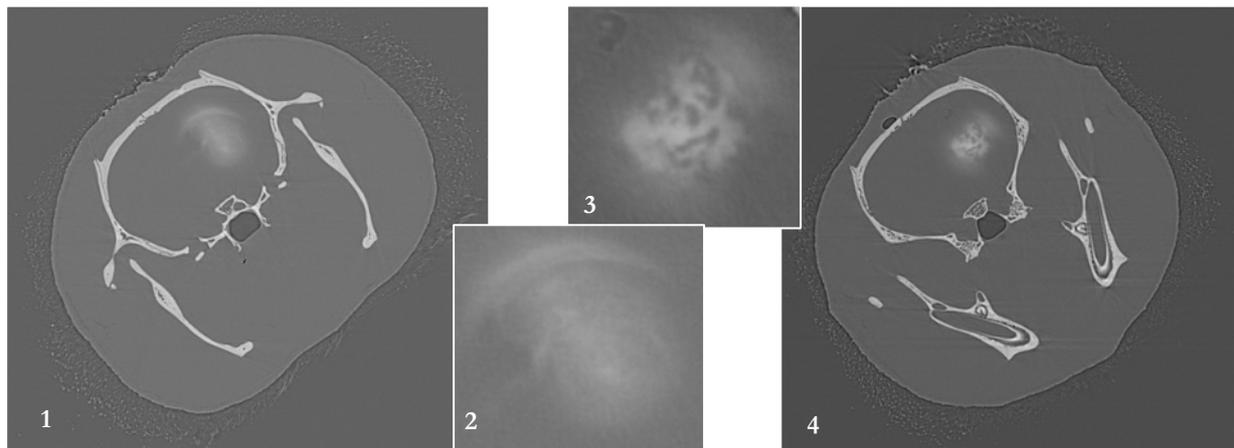


Figure IV-12 : Images haute résolution (caméra FReLoN; résolution : $47 \times 47 \mu\text{m}^2$) obtenues après injection par CED de $15 \mu\text{l}$ d'iopamidol dans le noyau caudé d'un rat sain (à gauche) ou porteur de gliome F98 (à droite). Les images 2 et 3 sont des zooms sur les zones d'intérêt des images 1 et 4, respectivement.

IV.2 Essais précliniques de chimio-radiothérapie

Au cours des essais précliniques effectués durant ce travail de thèse, nous avons fait évoluer certains paramètres expérimentaux qui nous ont semblés importants. Par souci de clarté, et pour essayer de montrer l'évolution de notre raisonnement, les différentes études sont présentées ici suivant un ordre chronologique. Les techniques expérimentales communes ont été décrites précédemment (partie III); les méthodes (et technologies) plus spécifiques sont présentées dans cette partie au fur et à mesure de leur utilisation.

IV.2.1 Premiers essais avec la méthode CED : cisplatine combiné à 15 Gy (*SSR*)

IV.2.1.1 Mise en place de la CED

IV.2.1.1.1 Objectif de ces premiers essais précliniques

Le but de cette expérience était d'utiliser la méthode CED pour injecter la chimiothérapie et d'étudier l'efficacité thérapeutique de ce traitement sur des rats porteurs de gliome F98. Il s'agissait également de savoir si cette méthode pouvait nous permettre d'injecter i.c. une quantité plus importante de platine sans engendrer davantage de toxicité létale précoce.

D'autre part, un volume de 5 μl est sans doute trop petit pour atteindre l'ensemble du volume tumoral ainsi que les cellules plus éloignées (voir § II.3.3.3.1 p.42), certes moins denses mais qui peuvent être la source d'une reprise tumorale.

IV.2.1.1.2 Choix des quantités de cisplatine injectées

Pour augmenter la quantité i.c. de platine, deux stratégies sont envisageables : augmenter la concentration C_i dans un volume d'injection donné V_i , ou choisir une concentration fixe et augmenter V_i .

Dans la littérature, on trouve relativement peu d'études où du cisplatine en solution ait été injecté par voie intracérébrale (voir revue de la littérature chapitre II.3.3 p.38). Kimler *et al.* décrivent un pourcentage élevé de létalité pour des doses comprises entre 5 et 10 μg de cisplatine dans 5 μl : 55 % et 60 % respectivement des animaux sont décédés avant le premier contrôle [Kimler 1992]. En diminuant la quantité à 3 μg , ils constatent une létalité moindre de 0 à 30 % suivant les expériences. Etant donnés ces résultats avec différentes concentrations de cisplatine dans un volume V_i fixé à 5 μl , nous avons choisi la deuxième stratégie : garder la concentration de cisplatine la moins toxique, c'est-à-dire 3 μg / 5 μl et augmenter V_i jusqu'à 15 μl .

IV.2.1.1.3 Types d'injection utilisés

Différentes injections intracérébrales ont donc été testées pour administrer la chimiothérapie lors de cette expérience. Nous avons évalué 2 méthodes : « bolus » ou CED et fait varier le débit ainsi que le volume. Les paramètres (méthode - débit - volume) choisis dans cette étude sont les suivants :

- « bolus » - 5 μ l : la seringue d'injection (Hamilton modèle 701 N ; 26s-gauge) est placée dans le porte seringue du cadre stéréotaxique ; le piston est poussé manuellement par l'expérimentateur pendant \sim 1 minute.
- CED - 0,4 μ l/min - 5 μ l : les 5 μ l de solution sont injectés en fixant le débit à 0,4 μ l/min.
- CED - rampe - 5 μ l : les 5 μ l de solution sont injectés en augmentant le débit suivant une rampe programmée. 0,2 μ l/min pendant 3 minutes (soit 0,6 μ l), puis 0,5 μ l/min pendant 4 minutes (soit 2 μ l), puis 0,8 μ l/min pendant 3 minutes (soit 2,4 μ l).
- CED - 0,4 μ l/min - 10 μ l.
- CED - 0,4 μ l/min - 15 μ l.

Les paramètres (débit/seringue) du « bolus » ont été choisis identiques à ceux utilisés dans des études précédentes [Biston 2004a, b], afin de servir de référence. Quant aux injections CED, le débit de 0,4 μ l/min a été déterminé à partir des données de la littérature, notamment l'étude de Chen *et al.* qui montre qu'un débit de 0,5 μ l/min induit une perte par *leakback* d'environ 5 % du liquide injecté [Chen 1999]. Cette perte atteint 23 % et 30 % pour des débits respectifs de 1 μ l/min et 5 μ l/min. Le diamètre de l'aiguille ayant également une forte influence sur la distribution, une aiguille de 32 gauge a été utilisée.

Il faut noter que pour des raisons techniques liées au synchrotron nous n'avons pas pu irradier les groupes comme prévu initialement, d'où des groupes de traitement « inhomogènes » comprenant 3 à 11 animaux.

IV.2.1.2 Matériels et méthodes

IV.2.1.2.1 Implantation de la tumeur :

Les rats ont été anesthésiés par une inhalation brève d'isoflurane suivie d'une injection intrapéritonéale de chloral hydrate à 4 % (1 ml pour 100 g de poids de rat). Cette procédure maintient usuellement le rat anesthésié pendant 2 à 3 heures. Les cellules tumorales ont été inoculées suivant la méthode décrite dans les travaux de Benabid *et al.* [Benabid 1986] et présentée au paragraphe III.3.1.4.3 p.77. Brièvement, les 1000 cellules F98, contenues dans 5 μ l de DMEM sans sérum, sont injectées (par l'expérimentateur, en 1 minute environ) à 5,5 mm de

profondeur dans le noyau caudé droit (3,5 mm à droite, au niveau du bregma). La seringue utilisée est une Hamilton, modèle 701 N, d'aiguille associée 26s-gauge. Les paramètres principaux sont explicités dans le Tableau IV-6 ci-après.

injecteur	seringue	durée d'injection	agarose	volume	nbr de cellules	profondeur
non	Hamilton 701 N	~ 1 minute	non	5 μ l	1000	-5,5 mm

Tableau IV-6 : Paramètres d'inoculation des cellules tumorales F98 (mars 2005).

IV.2.1.2.2 Dispositif pour l'injection CED

Toutes les injections (« bolus » ou CED) de drogues ont été faites en positionnant l'aiguille aux coordonnées stéréotaxiques d'implantation de la tumeur (*i.e.* : -5,5 mm de profondeur). Une fois l'injection terminée, la seringue était laissée en place 1 minute puis remontée délicatement, le trou rebouché avec de la cire à os, et le scalp suturé. Le système de perfusion par CED utilisé pour cette expérience est identique à celui décrit au paragraphe IV.1.2.3.1 p.93. Brièvement il consiste en un montage hydraulique parfaitement étanche, composé d'un pousse seringue, de seringues TLLX, de connecteurs et d'un tube en PEEK [Chen 1999; Lonser 1998a, b; Lonser 1999; Yang 2002; Wood 1999; Hamilton 2001]. La seringue d'injection choisie est un modèle Hamilton RN (pour *removable needle*), qui permet notamment d'adapter des aiguilles 32 gauge.

IV.2.1.2.3 Paramètres d'irradiation

Les rats ont été irradiés à J14 suivant la méthode décrite au paragraphe III.3.2 p.80. Les paramètres exacts sont résumés dans le Tableau IV-7 ci-après.

Dose [Gy]	Energie [keV]	Volume irradié			Film GafChromic
		Nombre de coupes	Hauteur du faisceau [mm]	Largeur du faisceau [mm]	
15	78,8	13	1	10	-

Tableau IV-7 : Paramètres d'irradiation SSR.

IV.2.1.3 Premiers résultats

IV.2.1.3.1 Toxicité

Le Tableau IV-8 recense le nombre de rats décédés précocement suivant le traitement et le pourcentage que cela représente au sein du groupe. On notera que la dose de cisplatine la plus élevée (9 μ g) est celle qui engendre le plus de toxicité. On remarquera que certains rats n'ayant

reçu que 3 µg par CED décèdent également rapidement, alors que ce n'est pas le cas pour les groupes « bolus » ou injection *post*-irradiation.

N ^a	Catégorie (masse cisplatine/volume)	masse de Pt [µg]	Morts précoces	
			<1 ^{er} témoin N (%)	= 1 ^{er} témoin N (%)
10	3 µg / 5 µl *	1,95	-	1 (10%)
9	3 µg / 5 µl ; (rampe)	1,95	-	1 (11%)
7	6 µg / 10µl *	3,90	1 (14%)	2 (28%)
3	9 µg / 15 µl *	5,85	2 (67%)	-
11	3 µg / 5 µl * + 15 Gy	1,95	2 (18%)	-
8	6 µg / 10 µl * + 15 Gy	3,90	1 (13%)	-
7	9 µg / 15 µl * + 15 Gy	5,85	2 (28%)	1 (14%)
4	3 µg / 5µl ("bolus") + 15 Gy	1,95	-	-
4	3 µg / 5 µl * injection <i>post</i> 15 Gy	1,95	-	-

Tableau IV-8 : Toxicité des différents traitements testés (chimiothérapie cisplatine, combinée ou non à une irradiation SSR de 15 Gy à 78,8 keV). Les rats décédés précocement (*i.e.* avant ou simultanément au premier témoin) sont recensés, et le pourcentage correspondant est précisé entre parenthèses.* indique un débit de 0,4 µl/min. N^a est le nombre de rats par groupe.

N ^a	Catégorie (masse cisplatine/volume)	Survie (jours après implantation)			% ILS	
		intervalle	moyenne ± stdev	médiane	moyenne	médiane
7	Témoin	25-27	25,9 ± 0,9	26,0	-	-
10	3 µg / 5 µl *	25-60	35,4 ± 14,2	27,0	36,9	3,8
9	3 µg / 5 µl ; (rampe)	25-39	31,8 ± 4,8	32,0	22,9	23,1
7	6 µg / 10 µl *	23-61	31,1 ± 13,3	27,0	20,44	3,8
3	9 µg / 15 µl *	23-68	38 ± 26,0	23,0	47,0	-11,5
11	3 µg / 5 µl * + 15 Gy	23-147	59,3 ± 35,5	47,0	129,2	80,8
8	6 µg / 10 µl * + 15 Gy	25-119	48,9 ± 29,7	41,0	89,0	57,7
7	9 µg / 15 µl * + 15 Gy	23-580 [§] (1)	119,3 ± 204,1 ^ξ	50,0	361,3 ^ξ	92,3
4	3 µg / 5 µl ("bolus") + 15 Gy	60-265	121 ± 97,4	79,5	368,0	205,8
4	3 µg / 5 µl * injection <i>post</i> 15 Gy	36-49	42,5 ± 5,3	42,5	64,4	63,5

Tableau IV-9 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats traités par chimiothérapie intracérébrale au cisplatine, combinée ou non à une irradiation SSR de 15 Gy (78,8 keV). J0 correspond à l'inoculation des 10³ cellules F98 ; la drogue est délivrée à J13, la radiothérapie à J14. Pour le groupe ayant reçu du cisplatine *post* radiothérapie, la drogue est injectée à J14, juste après la fin de l'irradiation. * indique un débit de 0,4 µl/min ; § la fin de l'expérience est choisie *arbitrairement* à J580; le rat survivant est euthanasié à cette date. ξ signale une moyenne *biaisée* ; N^a est le nombre de rats par groupe.

IV.2.1.3.2 Courbes de survie, premières observations

Les courbes de survie pour les différents groupes de chimiothérapie et chimio-radiothérapie sont présentées Figure IV-13 et Figure IV-14, respectivement ; les données de survie correspondantes sont résumées dans le Tableau IV-9. L'utilisation des tests statistiques pour des comparaisons inter-groupe est rendue difficile d'une part par le nombre de rats/groupe parfois trop petit ($n=3$) mais également par les décès précoces.

Pour les groupes de chimiothérapie CED (0,4 $\mu\text{l}/\text{min}$), on observe :

- 3 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$: $p_{\text{LR}} = 0,0145$ et $p_{\text{W}} = 0,0177$; la différence par rapport aux témoins est significative mais l'augmentation de survie observée est faible (ILS=36,9 % pour la moyenne et 3,8 % pour la médiane), du fait que 70 % des rats décèdent avant 28 jours.
- 6 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$: cette fois-ci, $p_{\text{W}} = 0,4691$ (non significatif).
- 9 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$: 2/3 sont décédés précocement, le seul survivant a vécu 68 jours. Par conséquent, la survie médiane est inférieure à celle des témoins (ILS négatif).

Pour les groupes de chimio-radiothérapie, on constate que :

- les p_{LR} (pour une courbe de survie qui ne croise pas celle des témoins) et p_{W} sont toujours $<0,016$ sauf dans le cas des 9 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ + 15 Gy ($p_{\text{W}} = 0,5124$) ;
- le groupe qui a la MeST la plus élevée est le groupe « bolus » ($n = 4$) ;
- un rat (groupe 9 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$) est toujours en vie à la fin de l'étude (J580).

Il aurait été nécessaire de considérer un groupe 15 Gy seuls afin de le comparer avec chacun des groupes de traitement combiné. Sinon, il est difficile de savoir si l'effet thérapeutique observé est lié à l'association du cisplatine et de l'irradiation.

IV.2.1.3.3 Premières interprétations

Etant donnés ces résultats, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses et soulever certains problèmes. La dose de 3 μg de cisplatine ne semble pas trop toxique, mais reste peu efficace (bien qu'une différence significative existe avec les témoins). Il est difficile de savoir si cette inefficacité provient : de la quantité de platine qui n'est pas assez élevée, ou du volume trop petit couvert par les 5 μl (par rapport à la taille de la tumeur). Il n'est pas possible d'augmenter la quantité de cisplatine dans un volume de 5 μl à cause de la toxicité [Kimler 1992]. Par contre, si on considère les résultats obtenus avec 15 μl , il apparaît judicieux d'augmenter le volume injecté. Bien que la dose de 9 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ soit la plus toxique, c'est celle qui conduit aux plus grands intervalles de survie ([23-68 jours] pour la chimiothérapie seule).

Pour la suite des expériences, le dispositif d'injection par CED a été simplifié.

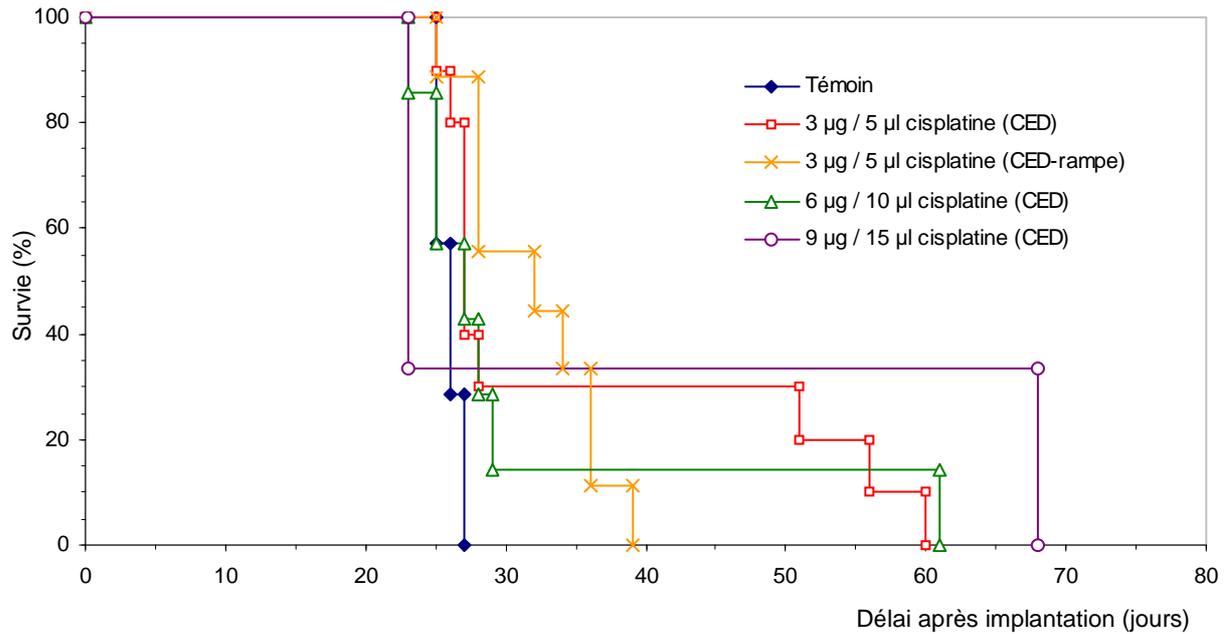
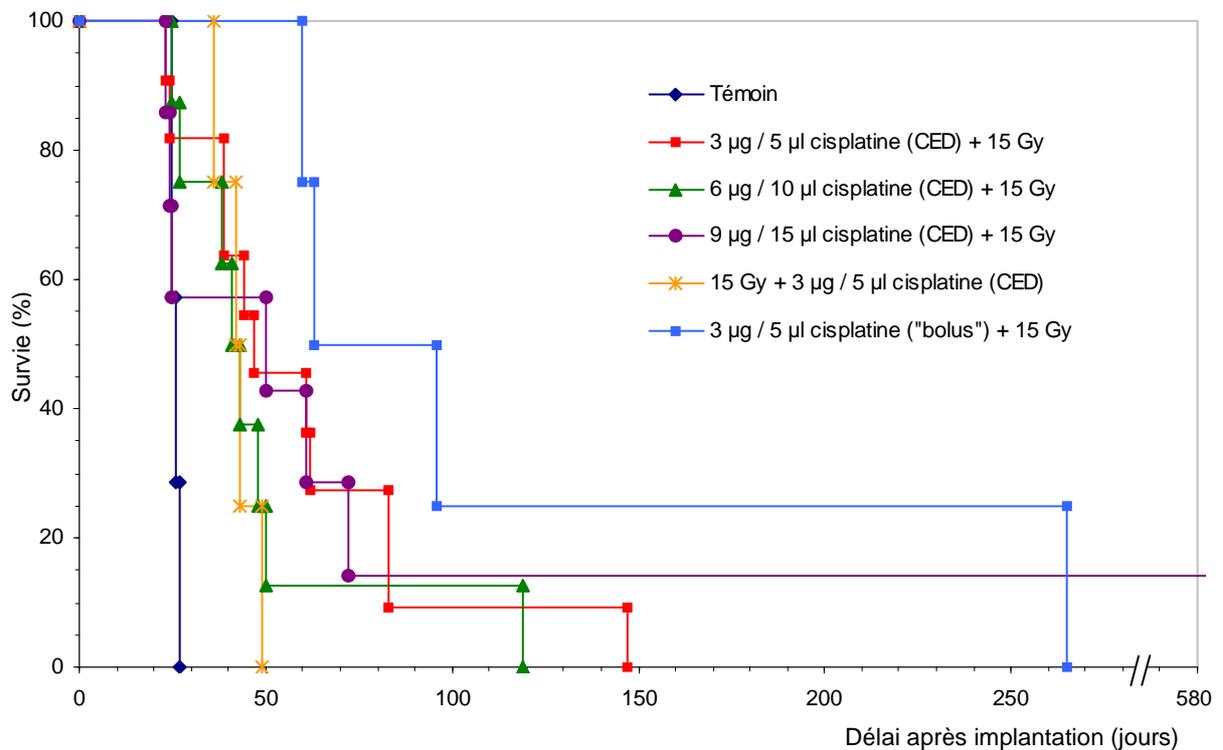


Figure IV-13 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98, traités par injection intracérébrale de cisplatine. Les temps de survie sont indiqués en jours après inoculation de 10^3 cellules F98 (J0). La chimiothérapie est délivrée à J13 par CED ($0,4 \mu\text{l}/\text{min}$) suivant différents dosages indiqués en masse de cisplatine/volume injecté.



IV.2.2 Carboplatine par CED combiné à 15 Gy *SSR* : premiers essais

IV.2.2.1 Injections de carboplatine par CED : choix des paramètres

IV.2.2.1.1 Objectif

L'objectif de cette étude était de tester l'efficacité thérapeutique de la méthode CED avec du carboplatine, combinée ou non à la radiothérapie synchrotron. Il s'agissait également de trouver un volume d'injection approprié, capable de couvrir des cellules éloignées de la masse tumorale, et de choisir une concentration non toxique pour l'animal. On souhaitait également déterminer si la concentration de la solution platinée injectée avait plus d'influence sur la toxicité que la quantité totale de platine administrée.

IV.2.2.1.2 Quantités de carboplatine injectées

Les premiers essais précliniques de traitement avec du carboplatine, ont été réalisés dans le cadre de la thèse de Marie-Claude Biston. Une dose de 40 μg / 5 μl avait été délivrée en mode « bolus²⁰ » au treizième jour après implantation des cellules tumorales, suivie 24 heures après d'une irradiation de 15 Gy ([Biston 2004a], et voir § II.3.3.3.2 p.43). Les irradiations avaient été faites avec un accélérateur médical de 6 MV ou en utilisant un rayonnement monochromatique de 78,8 keV en mode tomographique sur la ligne médicale de l'ESRF. Il est à noter qu'une dose de carboplatine de 40 μg / 5 μl (soit une concentration de 8 mg/ml) est relativement élevée puisque Degen *et al.* ont établi qu'une concentration de 10 mg/ml (injectée dans 10 μl) était toxique [Degen 2003]. Degen *et al.* ont par conséquent choisi une concentration non toxique de 1 mg/ml et injecté un volume de 40 μl , soit une quantité totale de 40 μg pour leurs études de survie. Les différents résultats concernant la toxicité du carboplatine (en injection intra-cérébrale), et issus de la littérature, sont résumés dans le Tableau IV-10.

D'après notre étude d'imagerie (voir § IV.1 p.89 et [Rousseau 2007a]) menée précédemment, un volume $V_i = 20 \mu\text{l}$ nous a semblé approprié pour couvrir correctement le noyau caudé droit et le *striatum*, ceci avec une concentration non toxique de 1 mg/ml. D'autre part, il était intéressant de savoir si l'on pouvait trouver une autre concentration non toxique comprise entre 1 et 8 mg/ml (le choix s'est porté sur 4 mg/ml). Afin de ne pas multiplier les paramètres, deux dosages de chimiothérapie (en combinaison ou non avec la radiothérapie) ont été testés :

- 20 μg / 20 μl soit une concentration de 1 mg / ml ;
- 20 μg / 5 μl soit une concentration de 4 mg / ml.

²⁰ la seringue d'injection (\emptyset de l'aiguille : 26s-gauge) est placée dans le porte-seringue du cadre stéréotaxique et le piston est poussé manuellement par l'expérimentateur en ~ 1 minute.

Paramètres	[Degen 2003]			[Biston 2004a]
	Ø (étude de toxicité)			
Cellules tumorales	CED ^ξ			F98
Type d'injection	CED ^ξ	CED ^ξ	CED ^ξ	<i>bolus</i>
Volume [μl]	10	10	40	5
[carboplatine] [mg/ml]	1	10	1	8
Dose masse (carboplatine) [μg]	10	100	40	40
masse (Pt) [μg]	5,25	52,55	21,02	21,02
Toxicité	pas de signe*	100 % des rats décédés dans les 3 jours	pas de signe*	nombreux morts précoces

Tableau IV-10 : Récapitulatif de la toxicité décrite dans la littérature pour des injections de carboplatine dans le noyau caudé de rats Fischer 344. ^ξ indique un débit de 0,5 μl/min (par opposition au *bolus* : 5 μl/min). * Les signes cliniques recherchés sont : les attaques, la léthargie, la paralysie d'un ou plusieurs membres et la perte de poids significative.

IV.2.2.2 Matériels et méthodes

IV.2.2.2.1 Implantation de la tumeur

Les rats ont été anesthésiés par une inhalation brève d'isoflurane suivie d'une injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine et kétamine²¹. Cette procédure maintient usuellement le rat anesthésié pendant 40 minutes à 1 heure ; des injections supplémentaires sont parfois nécessaires pour maintenir l'anesthésie tout au long de la procédure chirurgicale. Un gel oculaire lubrifiant a été également appliqué sur les yeux des rats.

Les cellules tumorales ont été inoculées suivant la même méthode que précédemment, détaillée au paragraphe III.3.1.4.3 p.77, les paramètres sont rappelés dans le Tableau IV-11, ci-après.

injecteur	seringue	durée d'injection	agarose	volume	nbr de cellules	profondeur
non	Hamilton 701 N	~ 1 minute	non	5 μl	1000	-5,5 mm

Tableau IV-11 : Paramètres d'inoculation des cellules tumorales F98 (décembre 2005).

IV.2.2.2.2 Injection du carboplatine par CED

Le carboplatine dilué dans une solution isotonique de NaCl, a été administré à J13 par CED (débit : 0,5 μl/min ; seringue de 25 μl Hamilton *gastight* : 1702 RN ; aiguille associée : 32 gauge),

²¹ Pratiquement, préparer 10 ml du mélange suivant : 4 ml de kétamine (à 10,0 g pour 100 ml) + 2,5 ml de xylazine (à 2,0 g pour 100 ml) + 3,5 ml de solution saline ou eau ppi, et injecter (i.p.) 0,1 à 0,2 ml pour 100 g de poids de rat.

en utilisant un pousse seringue (modèle KDS 310, GENEQ inc., Montréal, Québec, Canada). L'aiguille d'injection était placée aux coordonnées stéréotaxiques d'injection des cellules F98. Une fois l'injection terminée, la seringue était laissée en place pendant 1 minute avant d'être remontée délicatement. Le débit d'injection et le diamètre de l'aiguille ont été choisis suivant les études décrites dans la littérature (voir § II.2.2 p.20). Le montage est présenté Figure IV-15.



Figure IV-15 : Dispositif d'injection par CED. Le pousse seringue est monté sur le cadre stéréotaxique ; une aiguille de 32 gauge (montée sur une seringue Hamilton adaptée) est placée aux coordonnées stéréotaxiques voulues grâce aux translations micrométriques du cadre.

IV.2.2.2.3 Paramètres d'irradiation

Les rats ont été irradiés à J14 suivant la méthode décrite au chapitre III.3.2 p.80. Les paramètres exacts sont résumés dans le tableau ci-après.

Dose [Gy]	Energie [keV]	Volume irradié			Film GafChromic
		Nombre de coupes	Hauteur du faisceau [mm]	Largeur du faisceau [mm]	
15	78,8	11	1	10	oui

Tableau IV-12 : Paramètres d'irradiation SSR.

IV.2.2.3 Résultats

Les courbes de survie pour les groupes traités par chimiothérapie i.c. au carboplatine, combinée ou non à la radiothérapie SSR (15 Gy, fraction unique, 78,8 keV), sont présentées Figure IV-16. Les données de survie correspondantes sont résumées dans le Tableau IV-13. Sauf précision, les ILS sont calculés relativement au groupe de rats témoins non traités.

N ^a	Catégorie (masse carboplatine/ volume)	Survie (jours après implantation)			% ILS	
		intervalle	moyenne \pm stdev	médiane	moyenne	médiane
8	témoin	22-31	25,9 \pm 3,2	25,5	-	-
6	20 μ g / 20 μ l	28-69	44,7 \pm 18,1	42,0	72,6	64,7
7	20 μ g / 5 μ l	21-32	28,0 \pm 4,6	30,0	8,2	17,6
10	20 μ g / 20 μ l + 15 Gy	43-90	57,0 \pm 14,2	53,0	120,3	107,8
13	20 μ g / 5 μ l + 15 Gy	34-50	40,0 \pm 4,7	38,0	54,6	49,0

Tableau IV-13 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats traités par chimiothérapie intracérébrale au carboplatine, combinée ou non à une irradiation SSR de 15 Gy (78,8 keV). L'inoculation de 10³ cellules F98 correspond à J0 ; la chimiothérapie a été délivrée par CED (0,5 μ l/min) à J13, suivie 24 heures plus tard (J14) de radiothérapie pour les traitements combinés. N^a est le nombre de rat par groupe.

IV.2.2.3.1 Chimiothérapie seule

On peut noter qu'un seul rat est décédé précocement (à J21) dans le groupe 20 μ g/5 μ l, et aucun pour 20 μ g/20 μ l. La survie médiane (MeST) du groupe de rats témoins non traités est de 25,5 jours, la survie moyenne (MST) est de 25,9 \pm 3,2 jours. Les rats ayant reçu le dosage de carboplatine le plus concentré (20 μ g/5 μ l) ont une MeST de 30,0 jours (ILS = 17,6 %) et une MST de 28,0 \pm 4,6 jours (ILS = 8,2 %); l'augmentation de survie (médiane ou moyenne) liée à ce traitement est donc très faible ; et l'intervalle de survie [21-32 jours] est équivalent à celui des témoins [22-31 jours]. Le test du Log-rank n'est pas pertinent puisque les courbes se croisent (un rat est décédé précocement), mais le test de Wilcoxon révèle que les rats ont une survie qui n'est pas significativement différente de celle du groupe de témoins ($p_w = 0,2694$).

Pour les rats ayant reçu le dosage en carboplatine le moins concentré (*i.e.* 20 μ g/20 μ l) mais de quantité totale en carboplatine équivalente au précédent (*i.e.* 20 μ g), la MeST vaut 42 jours (ILS = 64,7 %) et la MST 44,7 \pm 18,1 jours (ILS = 72,6 %). L'effet thérapeutique par rapport au groupe témoin est cette fois significatif puisque p_{LR} et p_w valent respectivement 0,0115 et 0,0155.

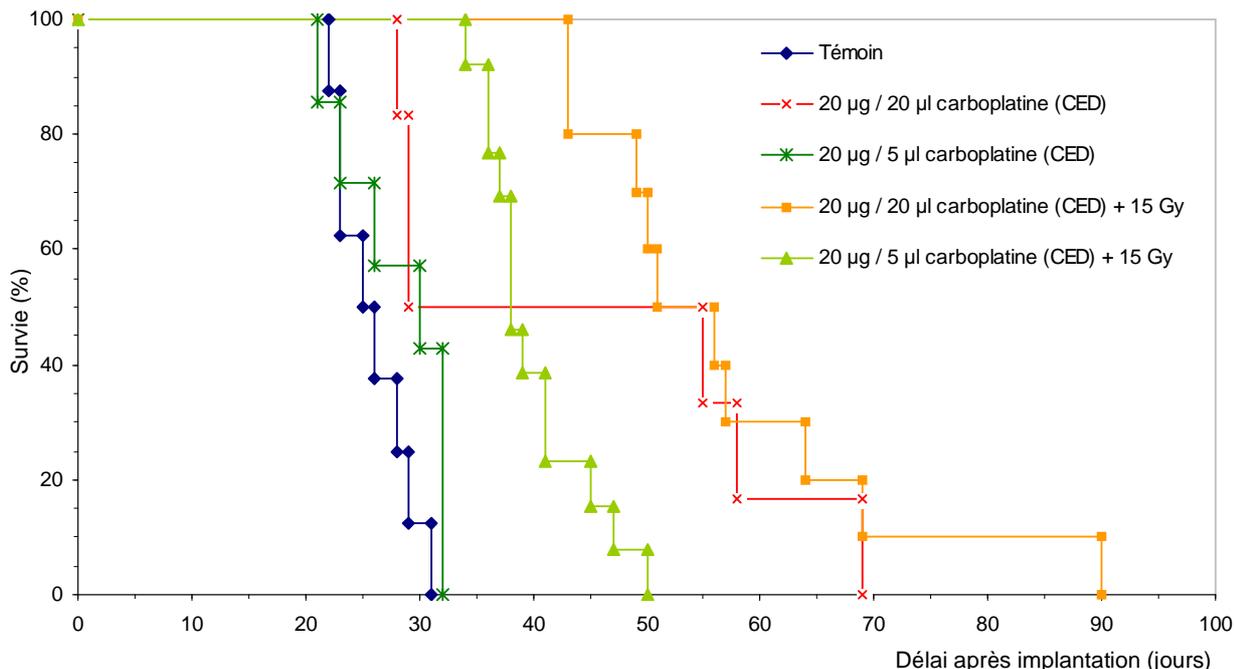


Figure IV-16 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98, traités par une injection intracérébrale de carboplatine combinée ou non à une irradiation SSR de 15 Gy (78,8 keV). Les temps de survie sont indiqués en jours après inoculation de 10^3 cellules F98 (J0). La chimiothérapie est délivrée à J13 par CED (0,5 µl/min), la radiothérapie à J14 (fraction unique). Les dosages de drogue sont indiqués en masse de carboplatine/volume injecté.

IV.2.2.3.2 Traitements combinés

Les traitements de chimiothérapie combinée à une irradiation SSR (78,8 keV) de 15 Gy augmentent la survie des rats par rapport aux rats non traités, et ce quel que soit le dosage de carboplatine utilisé ($p < 0,0001$, voir Tableau IV-14). Ainsi les MeST et MST associées à 20 µg/5 µl + 15 Gy sont de 38 jours (ILS = 49 %) et $40,0 \pm 4,7$ jours (ILS = 54,6 %), respectivement ; celles correspondant à 20 µg/20 µl + 15 Gy sont de 53 jours (ILS = 107,8 %) et $57,0 \pm 4,7$ jours (ILS = 120,3 %), respectivement.

IV.2.2.3.3 Comparaison traitement combiné et chimiothérapie seule

Pour mesurer le bénéfice thérapeutique d'un traitement combiné, il est utile de calculer les pourcentages d'augmentation de survie par rapport à une seule des modalités (*i.e.* chimiothérapie ou radiothérapie dans notre cas) [Kimler 1994]. Ces calculs sont présentés dans le Tableau IV-14. On remarquera que pour le dosage 20 µg/20 µl, la combinaison n'est pas significativement différente de la chimiothérapie seule ($p_w = 0,3109$; le Log-rank n'étant pas pertinent puisque les courbes se croisent) alors qu'elle l'est pour 20 µg/5 µl (p_w et $p_{LR} < 0,0001$). D'autre part, l'ajout de radiothérapie (15 Gy, fraction unique) n'augmente que de 27,6 % (26,2 %) la MST (*la MeST*) par rapport à la chimiothérapie seule.

N'ayant pas traité de rats par *SSR* (15 Gy) uniquement lors de cette étude, il est difficile de savoir si les %ILS (relatifs aux témoins non traités) pour le groupe 20 µg/5 µl + 15 Gy sont réellement liés au traitement combiné ou uniquement à la radiothérapie. A titre indicatif de comparaison, les MeST décrites ultérieurement pour 15 Gy (*SSR*) sont de 46 jours (ILS = 71 %) à 50 keV [Adam 2003a] et 48 jours (ILS = 85 %) à 78,8 keV [Biston 2004a].

Groupe référence	(a) Traitement combiné dosage 20 µg/5µl			(b) Traitement combiné dosage 20 µg/20 µl		
	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_W	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_W
Témoins non traités	54,6	49,0	<0,0001	120,3	107,8	<0,0001
Chimiothérapie	42,9	26,7	<0,0001	27,6	26,2	Ø et 0,3109

Tableau IV-14 : Comparaison des traitements de chimiothérapie et de chimio-radiothérapie combinée. Les pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) sont calculés par rapport aux survie moyenne et médiane du groupe de référence : témoins non traités ; chimiothérapie : 20 µg/5 µl dans le cas (a) ; 20 µg/20 µl pour le cas (b). Le test du Log-rank (Wilcoxon) indique une différence significative si p_{LR} (p_W) <0,05 ; Ø signale que le test du Log-rank n'est pas valide.

IV.2.2.4 Premières conclusions avec le carboplatine

La première chose que l'on peut souligner est l'influence du volume dans lequel est diluée une certaine quantité de platine. En effet, pour 20 µg de carboplatine et un volume d'injection (V_i) de 5 µl, on n'observe aucun effet thérapeutique (avec $p_w = 0,2694$), alors qu'une augmentation de survie importante est constatée pour $V_i = 20$ µl (ILS = 64,7 % et 72,6 % pour la MeST et la MST, respectivement). Une question reste posée : l'absence d'effet thérapeutique *visible* pour 5 µl pourrait venir d'une toxicité localement trop élevée ([carboplatine] = 4 mg/ml).

La concentration en carboplatine 1 mg/ml [Degen 2003], est appropriée : aucun rat n'est décédé précocement, que ce soit pour le groupe chimiothérapie ou chimio-radiothérapie. Ainsi, la toxicité ajoutée par l'irradiation est bien tolérée.

Pour le groupe chimiothérapie 20 µg/20 µl, on semble observer le même phénomène que Degen *et al.* : plusieurs rats décèdent rapidement (3 rats avant J30, *i.e.* dans le même intervalle que les témoins) comme si le traitement n'avait aucun effet, tandis que d'autres survivent plus longtemps (Degen *et al.* montrent dans son cas, une éradication du gliome 9L). La raison la plus probable pour expliquer cette différence (efficacité-inefficacité) est une perfusion incomplète de la tumeur.

IV.2.3 Chimiothérapie : carboplatine par CED

IV.2.3.1 Objectifs

Il s'agit ici d'une étude de chimiothérapie avec carboplatine injecté par CED. Le but de l'étude était à la fois de voir si un volume de 40 μl (avec une concentration de 1 mg/ml) pouvait améliorer l'effet thérapeutique observé lors de l'étude précédente (avec 20 μl), et quelles pouvaient être les conséquences d'une chimiothérapie plus précoce sur la survie des rats. Un délai de J8 a été choisi afin de comparer les résultats à ceux de Degen *et al.* sur le modèle 9L [Degen 2003]. D'autre part, nous voulions savoir si augmenter la concentration (de 1 à 5 mg/ml) était à la fois possible du point de vue toxicité et efficacité. Les trois traitements suivants ont donc été testés :

- 40 μg dans $V_i = 40 \mu\text{l}$ soit une concentration de 1 mg/ml, administrés à J13 ;
- 40 μg dans $V_i = 40 \mu\text{l}$, administrés à J8 ;
- 100 μg dans $V_i = 20 \mu\text{l}$ soit une concentration de 5 mg/ml, administrés à J13.

IV.2.3.2 Matériels et méthodes

IV.2.3.2.1 Implantation des cellules tumorales

L'anesthésie des rats a été réalisée selon le protocole décrit au paragraphe IV.2.2.2.1, p.116. La préparation des rats est la même que pour les expériences précédentes (IV.2.1 et IV.2.2). Par contre, la seringue d'injection (Hamilton 701 N) est placée dans l'injecteur (model KDS 310, GENEQ inc., Montréal, Québec, Canada), lui-même monté directement sur le cadre stéréotaxique. De cette façon, les cellules F98 (1000 cellules dans 5 μl de DMEM sans sérum) sont inoculées systématiquement en 2 minutes. La suite de la procédure reste inchangée. Les paramètres sont rappelés dans le Tableau IV-15 ci-après.

injecteur	seringue	durée d'injection	agarose	volume	nbr de cellules	profondeur
2,5 $\mu\text{l}/\text{min}$	Hamilton 701 N	2 minutes	non	5 μl	1000	-5,5 mm

Tableau IV-15 : Paramètres d'inoculation des cellules tumorales F98 (avril 2006).

IV.2.3.2.2 Paramètres d'injection CED

Les injections ont été réalisées en plaçant l'aiguille (32 gauge ; seringue Hamilton *gastight* de 50 μl : 1705 RN) aux coordonnées d'implantation de la tumeur. Le pousse seringue (KDS 310, GENEQ inc.) a été réglé sur un débit de 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Figure IV-15).

IV.2.3.3 Résultats

IV.2.3.3.1 Analyse de la toxicité

Le Tableau IV-16 précise le nombre de décès précoces ainsi que les pertes de poids (relativement au poids initial au 1^{er} jour de traitement), observés pour chaque groupe, dans les 7 jours qui ont suivi l'injection de carboplatine. Ainsi, dans le groupe ayant reçu 40 µg/40 µl (à J13), 3/7 rats ont perdu plus de 10 % du poids initial et un rat est décédé précocement, à J16. De même, dans le groupe 100 µg/20 µl (J13), un rat est décédé très rapidement à J16 (un autre en même temps que le premier témoin). L'analyse histo-pathologique du cerveau de cet animal a révélé un petit foyer de cellules tumorales nécrotiques, une raréfaction de la matière blanche et des micro-foyers hémorragiques ; ces données suggèrent une mort liée au traitement lui-même. De façon surprenante, pour les rats ayant reçu 40 µg/40 µl (J8), les pertes de poids mesurées sont relativement faibles (<5 % pour 7/8 rats et >10 % pour 1/8 rat uniquement) et aucune mort précoce n'a été observée.

N ^a	Traitement carboplatine (dose/volume [date])	[carboplatine] utilisée (mg/ml)	Masse Pt injectée (µg)	Rats décédés N (%)	Perte de poids		
					<5%	6-10%	11-30%
7	40 µg / 40 µl (J13)	1	21	1 (14%)	3	-	3
6	100 µg / 20 µl (J13)	5	53	1 (17%)	3	1	1
8	40 µg / 40 µl (J8)	1	21	-	7	-	1

Tableau IV-16 : Toxicité des différents dosages de carboplatine délivrés à J8 ou J13 par CED (0,5 µl/min). L'inoculation de 10³ cellules F98 correspond à J0. N^a est le nombre de rats par groupe. Ce tableau indique le nombre de rats décédés précocement (*i.e.* avant le premier témoin), le pourcentage correspondant est précisé entre parenthèses. Il recense également les pertes de poids dans les 7 jours *post*-traitement.

IV.2.3.3.2 Analyse de la survie

Les courbes de survie pour les trois groupes traités au carboplatine sont présentées Figure IV-17, les données de survie correspondantes sont résumées dans le Tableau IV-17. Le test du Log-rank, pour comparer l'efficacité des traitements relativement aux Témoins, n'est applicable qu'au groupe dont la courbe de survie ne croise pas celle des Témoins, c'est-à-dire 40 µg/40 µg (J8). Il révèle $p_{LR}=0,07$ (non significatif). Le test de Wilcoxon donne un p_W toujours supérieur à 0,05 : 0,4706 pour 100 µg/20 µl (à J13), 0,1372 pour 40 µg/40 µl à J8 et 0,4427 à J13. Le nombre de rats par groupe étant petit (N = 6 à 8), on peut difficilement tirer de conclusions quant à l'efficacité des traitements. Cependant, on notera que pour le groupe 100 µg/20 µl (J13) les

pourcentages ILS relatifs à la moyenne et la médiane sont négatifs, ce qui tend à montrer que cette dose de carboplatine est toxique. Toutefois, un rat (40 µg/40 µl - J8) était toujours en vie à la fin de l'étude (J200) ; l'analyse histo-pathologique a montré une disparition de la tumeur.

N ^a	Traitement (masse carboplatine/volume)	Survie (jours après implantation)			% ILS	
		intervalle	moyenne ± stdev	médiane	moyenne	médiane
7	Témoins	22-34	29,1 ± 4,6	30,0	-	-
7	40 µg / 40 µl (J13)	16-59	36,9 ± 15,3	32,0	26,5	6,7
6	100 µg / 20 µl (J13)	16-52	29,0 ± 12,5	26,0	-0,5	-13,3
8	40 µg / 40 µl (J8)	27-200 [§] (1)	63,6 ± 61,3 ^ξ	32,5	118,3	8,3

Tableau IV-17 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats traités par injection intracérébrale de carboplatine. L'inoculation des 10³ cellules F98 correspond à J0 ; la drogue a été délivrée par CED (0,5 µl/min) à J8 ou J13. N^a donne le nombre de rats par groupe ; [§] indique la fin de l'expérience (*i.e.* J200), le chiffre qui suit entre parenthèses précise qu'un rat était toujours vivant à cette date ; ^ξ signale que la moyenne calculée est *biaisée*.

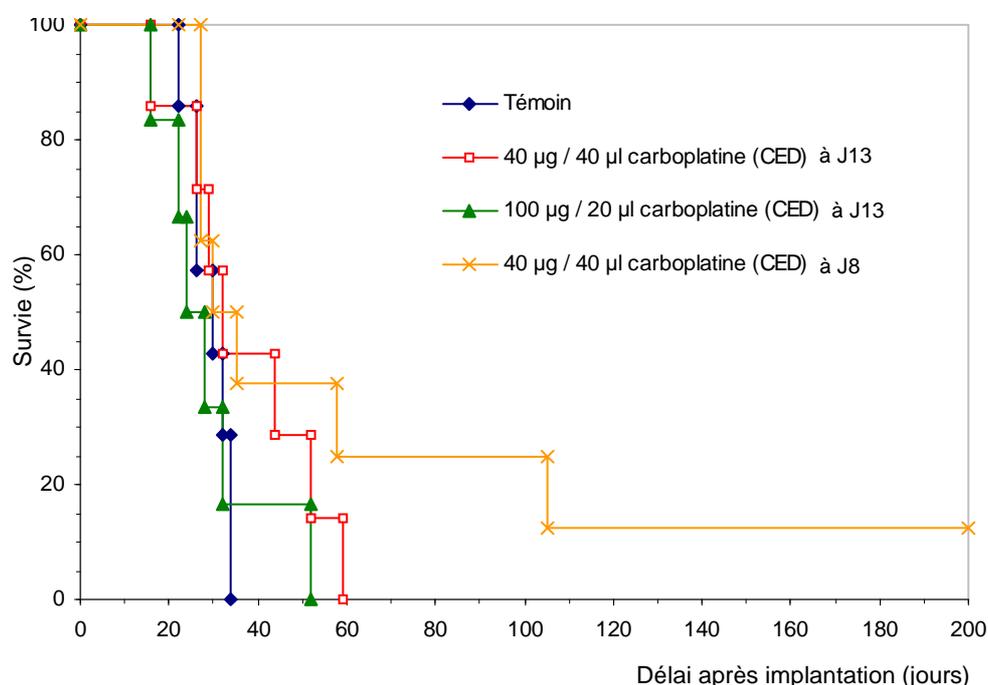


Figure IV-17 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98, traités par injection intracérébrale de carboplatine. Les temps de survie sont calculés en jours après inoculation de 10³ cellules F98 (J0). La drogue est délivrée à J8 ou J13 par CED (0,5 µl/min), les dosages sont indiqués en masse de carboplatine/volume injecté.

IV.2.3.4 Conclusion - discussion

Le dosage élevé de 100 µg/20 µl apparaît toxique lorsque l'on considère les courbes de Kaplan-Meier et les données de survie (ILS négatifs) ; ce résultat est d'ailleurs confirmé par l'analyse histo-pathologique réalisée sur un des cerveaux. On ne peut cependant pas savoir si la toxicité est provoquée par la concentration (5 mg/ml) ou la quantité totale de carboplatine (100 µg). Il faut vraisemblablement tenir compte de ces 2 facteurs.

Pour ce qui est de la date du traitement, il semblerait que le dosage 40 µg/40 µl soit plus efficace lorsqu'il est délivré à J8 plutôt qu'à J13, dans la mesure où un rat survit à long terme, mais cette différence n'est statistiquement pas significative ($p_w = 0,5617$). Cela peut venir notamment d'une meilleure perfusion du volume tumoral, puisque la taille de la tumeur est plus petite à J8 (1,5 mm) qu'à J13 (3 mm) [Fournier 2003], voir Figure III-12 p.76.

Etant donné le petit nombre de rat par groupe, il faut rester prudent quant à l'interprétation des résultats. Cependant, l'éradication tumorale, confirmée par l'analyse histo-pathologique, amène plusieurs hypothèses et questions, suggérées également par Degen *et al.* [Degen 2003]. Le gliome F98 implanté chez le rat, conduit à la mort de l'animal dans 100 % des cas (et pour une centaine de cellules seulement) ; l'éradication de la tumeur est donc liée au traitement lui-même. Il est peut probable que l'injection de carboplatine puisse être complètement curative pour certains animaux (1 dans le cadre de notre étude, 75 % pour Degen *et al.* sur le modèle 9L), et n'ait qu'un effet marginal sur d'autres, porteurs du même modèle, à moins que la tumeur ne soit pas parfaitement perfusée. Un volume de drogue de 40 µl, injecté aux coordonnées exactes d'inoculation des cellules gliomales, devrait théoriquement (à J8 et J13) couvrir tout le volume tumoral. On peut penser que des pertes sporadiques le long du trajet de l'aiguille (32 gauge pour la drogue et 26s-gauge pour les cellules) engendrent une diminution et une hétérogénéité du volume de distribution de la drogue. Enfin, il est très probable que du reflux survienne lors de l'inoculation des cellules tumorales. Cela peut entraîner la présence aléatoire de cellules F98 en dehors du noyau caudé (par exemple dans le *striatum*, ou le long du trajet de l'aiguille), non ciblées par le traitement (carboplatine par CED).

IV.2.4 Carboplatine et irradiation fractionnée : comparaison haute énergie - SSR

IV.2.4.1 Mise en place d'un schéma d'irradiation fractionnée

IV.2.4.1.1 Objectif

Le but principal était de mettre en place et observer l'effet thérapeutique d'une irradiation fractionnée afin de se rapprocher du traitement conventionnel des tumeurs cérébrales. Il s'agissait également de comparer les combinaisons chimio-radiothérapie en rayonnement haute énergie (6 MV) ou monochromatique (78,8 keV).

Le fractionnement permet d'obtenir un effet différentiel entre les tissus sains et la tumeur, plus marqué que pour une fraction unique. En effet l'irradiation engendre chez toute cellule, qu'elle soit saine ou cancéreuse, des lésions sublétales de l'ADN, c'est-à-dire des lésions qui peuvent être réparées par les mécanismes internes. Cependant, les cellules saines réparent plus efficacement et rapidement ces lésions que les cellules cancéreuses. Entre deux irradiations, les tissus sains ont donc une plus grande capacité de restauration et de prolifération que les populations tumorales. Le fractionnement exploite ce phénomène qu'il amplifie, créant un différentiel favorable qui doit aboutir au terme de l'irradiation, à la destruction complète des cellules cancéreuses ; les tissus sains auront la capacité de proliférer jusqu'à leur restauration complète.

IV.2.4.1.2 Définition du facteur équivalent de dose (BED)

Pour comparer une irradiation en 3 fractions au schéma usuel, qui consiste en une fraction unique de 15 Gy, on peut utiliser un facteur appelé BED pour *biologically equivalent* (ou *effective*) dose. Ce facteur découle du modèle linéaire quadratique (LQ) [Dale 1985; Liu 2003]. Dans un schéma de traitement fractionné, il permet de calculer la dose par fraction qui serait « biologiquement » équivalente²² à la dose délivrée en une seule fraction.

Le modèle classique LQ définit l'effet biologique par l'équation suivante :

$$E = n \cdot (\alpha d + \beta d^2) \quad \text{équation IV-7}$$

où n est le nombre de fractions, d est la dose par fraction en Gy, α et β sont deux paramètres du modèle LQ qui caractérisent la réponse aux radiations des tissus normaux ou tumoraux considérés. En divisant l'équation précédente par α , on obtient la dose biologique équivalente E/α (*i.e.* le facteur BED) qui permet de comparer différents schémas d'irradiation :

$$\text{BED} = \frac{E}{\alpha} = nd \cdot \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right) \quad \text{équation IV-8}$$

²² Deux schémas d'irradiation sont dits « équivalents » lorsqu'ils induisent les mêmes effets radiobiologiques.

Le rapport α/β est généralement choisi comme égal à 10 pour les tissus tumoraux ou très sensibles, et égal à 3 pour les tissus réagissant tardivement comme le cerveau.

Si on effectue le calcul pour une dose $d = 15$ Gy délivrée en une seule fraction ($n = 1$), on obtient un BED de 37,5 Gy pour la tumeur (*i.e.* en prenant $\alpha/\beta = 10$), et un BED de 90 Gy pour le tissu cérébral sain (pour lequel $\alpha/\beta = 3$). Si on souhaite maintenant obtenir le même BED, avec cette fois $n = 3$ fractions, on trouve la dose d par fraction correspondante:

- $d = 7,3$ Gy pour la tumeur (BED = 37,5 Gy ; $\alpha/\beta = 10$);
- $d = 8,1$ Gy pour le cerveau sain (BED = 90 Gy ; $\alpha/\beta = 3$).

IV.2.4.1.3 Chimiothérapie et irradiations fractionnées choisies

La chimiothérapie choisie consiste en une dose de carboplatine de 20 μg dans un volume de 20 μl . Une dose de 24 Gy a été délivrée en 3 fractions de 8 Gy. La chimiothérapie a été administrée au 13^{ème} jour après implantation de la tumeur, suivie de la radiothérapie fractionnée aux 14, 15 et 16^{èmes} jours.

Ce schéma d'irradiation en 3 fractions est loin d'être optimal, mais il a été imposé par le temps de faisceau qui nous était accordé à l'ESRF. Il aurait été notamment préférable de faire davantage de fractions avec une dose inférieure, de l'ordre de 2 à 5 Gy. Afin de ne pas multiplier les paramètres inconnus, nous avons également choisi de ne pas fractionner la chimiothérapie. Les deux traitements (irradiations 6 MV ou 78,8 keV) n'ont pas été réalisés simultanément, ce qui explique la présence de deux groupes témoin dans cette étude.

IV.2.4.2 Matériels et méthodes

IV.2.4.2.1 Implantation de la tumeur

Les rats ont été anesthésiés par une inhalation brève d'isoflurane suivie d'une injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine et kétamine (dosage § IV.2.2.2.1 p.116). Les cellules tumorales sont inoculées suivant la même méthode que précédemment (§ IV.2.3.2.1 p.121), les paramètres importants sont rappelés dans le Tableau IV-18 ci-après.

injecteur	seringue	durée d'injection	agarose	volume	nbr de cellules	profondeur
2,5 $\mu\text{l}/\text{min}$	Hamilton 701 N	2 minutes	non	5 μl	1000	-5,5 mm

Tableau IV-18 : Paramètres d'inoculation des cellules tumorales F98 (avril 2006).

IV.2.4.2.2 Paramètres d'injection CED

Les injections ont été réalisées en plaçant l'aiguille (32 gauge ; seringue Hamilton *gastight* de 50 µl : 1705 RN) aux coordonnées d'implantation de la tumeur. Le pousse seringue (KDS 310, GENEQ inc.) a été réglé sur un débit de 0,5 µl/min (dispositif présenté Figure IV-15).

IV.2.4.2.3 Paramètres d'irradiation (6 MV et 78,8 keV)

La radiothérapie haute énergie a été effectuée au CHU de Grenoble sur un irradiateur médical conventionnel (voir § III.3.3 p.84). Les paramètres des irradiations SSR réalisées à l'ESRF sur la ligne médicale sont explicités dans le Tableau IV-19 ci-après (voir également § III.3.2 p.80).

Dose [Gy]	Energie [keV]	Volume irradié			Film GafChromic
		Nombre de coupes	Hauteur du faisceau [mm]	Largeur du faisceau [mm]	
3×8	78,8	11	1	10	oui

Tableau IV-19 : Paramètres d'irradiation SSR.

IV.2.4.3 Résultats

Sauf précisé, les pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) sont calculés relativement à la survie médiane (MeST) ou moyenne (MST) du groupe témoin non traité de chaque étude.

Energie d'irradiation	catégorie	N ^a	Survie (jours après implantation)			% ILS	
			intervalle	moyenne ± stdev	médiane	moyenne	médiane
6 MV	témoin	9	25-36	28,9 ± 3,6	28,0	-	-
	20 µg/20 µl	10	32-120	54,7 ± 25,0	45,5	89,3	62,5
	3×8 Gy	11	35-56	43,2 ± 6,2	42,0	49,5	50,0
	20 µg/20 µl + 3×8 Gy	12	50-200 [§] (2)	96,7 ± 52,7 [§]	79,0	234,6 [§]	182,1
78,8 keV	témoin	6	26-32	28,3 ± 2,6	27,5	-	-
	3×8 Gy	11	42-65	52,3 ± 7,4	51,0	84,5	85,5
	20 µg/20 µl + 3×8 Gy	12	47-200 [§] (1)	80,6 ± 55,5 [§]	59,5	184,4 [§]	116,4

Tableau IV-20 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats traités par chimiothérapie intracérébrale au carboplatine, combinée à une irradiation fractionnée de 3 fois 8 Gy. L'inoculation des 10³ cellules F98 correspond à J0 ; la drogue a été injectée par CED (0,5 µl/min) à J13. La radiothérapie a été délivrée en mode SSR (78,8 keV), ou par un irradiateur médical (6 MV) à J14, J15 et J16. N^a donne le nombre de rats par groupe ; [§] indique la fin de l'expérience (J200), le chiffre qui suit entre parenthèses précise le nombre de rats toujours vivants à cette date; [§] signale que la moyenne calculée est *biaisée*.

IV.2.4.3.1 Analyse de la survie : irradiation haute énergie (6 MV)

Les courbes de survie pour l'étude du traitement de chimiothérapie i.c. carboplatine, combinée à une irradiation fractionnée haute énergie (6 MV), sont présentées Figure IV-18. Les données de survie associées sont résumées dans le Tableau IV-20 (en haut). On notera qu'aucun rat n'est mort précocement lors de cette étude ; les pertes de poids mesurées pour le groupe 20 µg/20 µl à J13 sont d'ailleurs faibles (toujours <10 %) [Rousseau 2007b].

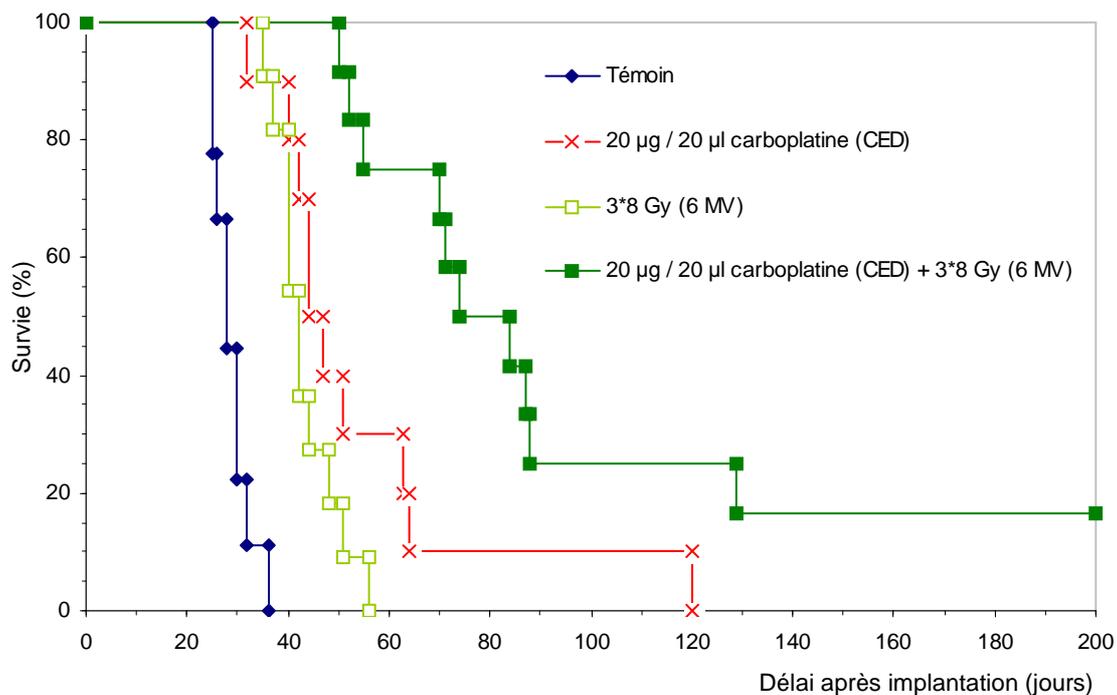


Figure IV-18 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98, traités par une injection intracérébrale de carboplatine (x), une irradiation fractionnée de 3 fois 8 Gy à 6 MV (□) ou la combinaison des deux (■). Les temps de survie sont indiqués en jours après inoculation de 10^3 cellules F98 (J0). La chimiothérapie (20 µg de carboplatine dans 20 µl) est administrée à J13 par CED (0,5 µl/min), la radiothérapie haute énergie est délivrée à J14-J15-J16 sur un irradiateur médical.

La survie médiane (MeST) des rats non traités est de 28 jours et la moyenne (MST) de $28,9 \pm 3,6$ jours. En comparaison, la MeST du groupe chimiothérapie seule (20 µg/20µl de carboplatine) est 45,5 jours (soit ILS = 62,5 %) et la MST vaut $54,7 \pm 25,0$ jours (soit ILS = 89,3 %), avec un rat vivant 120 jours ; la survie de ces rats est significativement différente de celle des témoins (p_w et $p_{LR} < 0,0001$). Pour le groupe de radiothérapie fractionnée seule (3 fois 8 Gy), la MeST et la MST sont respectivement de 42 jours (ILS = 50 %) et $43,2 \pm 6,2$ jours (soit ILS = 49,5 %) ; la survie de ce groupe est également significativement différente par rapport aux témoins (p_w et $p_{LR} < 0,0001$). Enfin, le groupe ayant reçu le traitement combiné (20 µg/20µl de carboplatine associé à 3 fois 8 Gy) a une MeST de 79 jours (ILS = 182,1 %) et une MST *biaisée* de $96,7 \pm 6,2$ jours (ILS = 234,6 %). L'augmentation de survie est significative, que ce soit par

rapport aux groupes témoins (p_W et $p_{LR} < 0,0001$), irradié (p_W et $p_{LR} < 0,0001$) ou chimiothérapie seule ($p_W = 0,0017$ et $p_{LR} = 0,0045$). Deux rats (soit 16,6 %) étaient toujours en vie à la fin de l'étude (J200) ; l'analyse histo-pathologique a révélé une éradication de la tumeur.

IV.2.4.3.2 Analyse de la survie : irradiation SSR (monochromatique ; 78,8 keV)

Les courbes de survie pour l'étude du traitement de chimiothérapie i.c. carboplatine, combinée à une irradiation fractionnée SSR (monochromatique 78,8 keV) de 3 fois 8 Gy, sont présentées Figure IV-19, les données de survie correspondantes sont résumées dans le Tableau IV-20 (en bas).

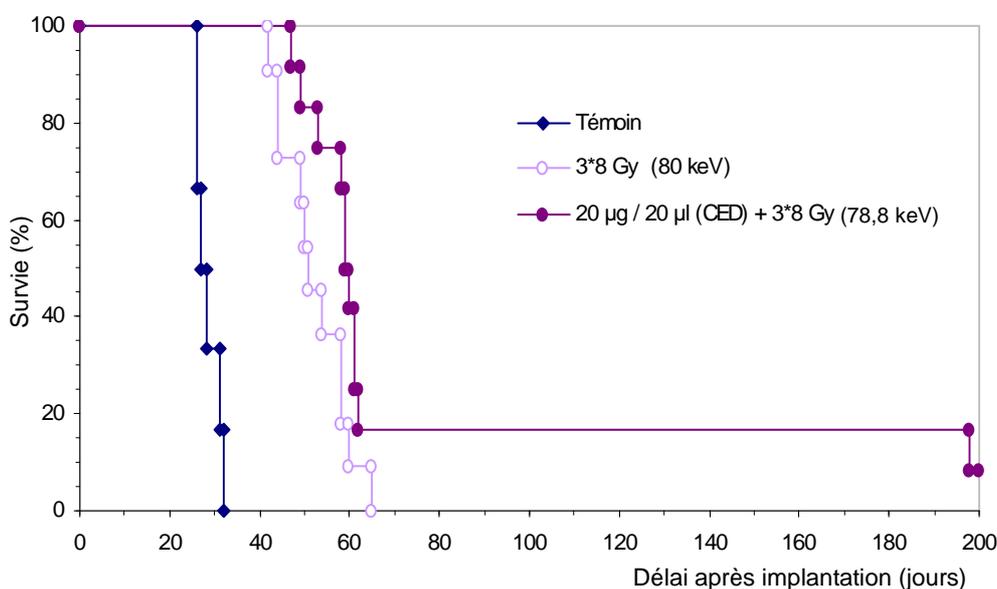


Figure IV-19 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98, traités par une irradiation SSR (78,8 keV) fractionnée de 3 fois 8 Gy (○) ou par la combinaison d'une injection intracérébrale de carboplatine et d'une irradiation SSR de 3 fois 8 Gy (●). Les temps de survie sont indiqués en jours après inoculation de 10^3 cellules F98 (J0). La chimiothérapie (20 µg de carboplatine dans 20 µl) est administrée à J13 par CED (0,5 µl/min), la radiothérapie à J14-J15-J16.

Les rats non-traités ont une survie médiane (MeST) de 27,5 jours et une survie moyenne (MST) de $28,3 \pm 2,6$ jours. Les MeST et MST du groupe traité par fractionnement seul sont de 51 jours (ILS = 85,5 %) et $52,3 \pm 7,4$ jours (ILS = 84,5 %), respectivement; le traitement a un effet thérapeutique significatif par rapport aux rats non traités (p_W et $p_{LR} < 0,0001$). De même, la MeST associée à la combinaison chimio-radiothérapie est de 59,5 jours (ILS = 116,4 %) et la MST *biaisée* vaut $80,6 \pm 55,5$ jours (ILS = 184,4 %). L'effet thérapeutique est significatif relativement aux témoins (p_W et $p_{LR} < 0,0001$) ou au groupe irradié uniquement ($p_W = 0,0315$ et $p_{LR} = 0,0408$). Un rat était toujours en vie à la fin de l'étude (J200) ; on notera également qu'un autre est décédé à

J198 ; l'examen histo-pathologique a montré une disparition de la tumeur pour ces deux animaux (aucune trace de tumeur résiduelle pour le rat décédé à J198).

IV.2.4.3.3 Comparaison des irradiations haute énergie et SSR

Le bénéfice thérapeutique apporté par la combinaison chimio-radiothérapie (6 MV ou 78,8 keV), par rapport aux rats non traités, traités par chimiothérapie seule ou radiothérapie seule est explicitée dans le Tableau IV-21. Excepté les irradiations, les deux expériences ont été faites dans les mêmes conditions (inoculation des cellules, injections par CED du carboplatine). D'autre part, les courbes de survie des deux groupes témoins non traités (relatifs à chaque expérience) se superposent, les MST et MeST (voir Tableau IV-20) sont semblables ; les tests de Log-rank et Wilcoxon indiquent que les groupes ne sont pas statistiquement différents ($p_{LR} = 0,7199$ et $p_w = 0,9531$). Par conséquent, nous sommes autorisés à effectuer des « inter-comparaisons » entre des groupes de traitement appartenant à chacune des deux expériences (6 MV ou 78,8 keV).

Les courbes de survie des groupes chimiothérapie seule (20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) et traitement combiné (mode SSR - 78,8 keV) se croisent, le test du Log-rank n'est donc pas valide ; le test de Wilcoxon révèle une différence non significative mais la valeur de p_w est tout de même très proche de 0,05 ($p_w = 0,0583$). La comparaison des groupes ayant reçu la radiothérapie fractionnée seule révèle une différence significative des traitements ($p_{LR} = 0,0050$ et $p_w = 0,0041$), avec une meilleure efficacité en irradiation SSR ; on notera toutefois que les configurations d'irradiation sont assez différentes. Enfin, il est important de souligner que les deux traitements combinant carboplatine et irradiation (SSR 78,8 keV ou à haute énergie 6 MV) ne sont pas significativement différents ($p_{LR} = 0,1729$ et $p_w = 0,1007$).

Groupe de référence	Traitement combiné 6 MV (a)			Traitement combiné SSR -78,8 keV (b)		
	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_w	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_w
Témoin non traité	234,6	182,1	< 0.0001	184,4	116,4	< 0.0001
Chimiothérapie (20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)	76,7	73,6	0,0045 et 0,0017	47,3	30,8	\emptyset et 0,0583
Radiothérapie (3 \times 8 Gy)	123,9	88,1	< 0.0001	54,2	16,7	0,0408 et 0,0315

Tableau IV-21 : Comparaison des traitements combinés (6 MV et SSR - 78,8 keV) avec les groupes non-traité, chimiothérapie seule ou radiothérapie seule correspondants. Les pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) sont calculés par rapport aux survies moyenne et médiane du groupe de référence : témoin relatif à (a) ou (b), chimiothérapie 20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ (pour a et b), radiothérapie (3 \times 8 Gy): 6 MV pour le cas (a), SSR-78,8 keV pour le cas (b). Le test du Log-rank (Wilcoxon) indique une différence significative si p_{LR} (p_w) < 0,05 ; \emptyset signale que le test du Log-rank n'est pas pertinent.

IV.2.4.4 Conclusion

Les deux traitements de chimio-radiothérapie (carboplatine) : haute énergie et SSR-78,8 keV (*i.e.* juste au dessus du seuil-K du platine) ne sont pas statistiquement différents ($p_{LR} = 0,1729$ et $p_w = 0,1007$). Les survies médianes (et les pourcentages d'augmentations de survie associés) sont de 79 jours (ILS = 182,1 %) et 59,5 jours (ILS = 116,4 %) pour les irradiation à 6 MV et 78,8 keV, respectivement. Aucune différence n'est mise en évidence par le fractionnement.

L'analyse histo-pathologique des cerveaux des rats survivants à long terme apparaît importante. Elle permet de montrer par exemple que la tumeur était éradiquée chez le rat décédé à J198 (*i.e.* juste avant la fin de l'étude).

Enfin, la chimiothérapie seule permet d'augmenter de façon significative la survie (p_w et $p_{LR} < 0,0001$). Nos données ne permettent pas de conclure si l'ajout bénéfique (du point de vue thérapeutique) de radiothérapie a un effet synergique ou simplement additif.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Clinical Cancer Research* [Rousseau 2007b].

IV.2.5 Combinaison carboplatine et 20 Gy ou oxaliplatine et 15 Gy (SSR)

IV.2.5.1 Objectifs et choix des paramètres de traitement

IV.2.5.1.1 Dose supérieure à 15 Gy

Le but de cette étude était de tester l'efficacité thérapeutique d'une dose d'irradiation supérieure à 15 Gy. En effet, les résultats antérieurs [Adam 2003a, p.213] montrent que les médianes de survie sont de 46 et 145 jours, pour respectivement 15 et 25 Gy (50 keV mode tomographie). La dose de 25 Gy semble même conduire à l'éradication de la tumeur. Cependant, il a été montré chez des rats, que des doses supérieures à 20 Gy (irradiation totale du cerveau, en une seule fraction) produisent des lésions irréversibles de la vascularisation cérébrale (oedèmes, dilatation des vaisseaux, diminution des parois vasculaires, hypertrophie des astrocytes), notamment dans la matière blanche [Wong 2004]. Le type de dommages, leur gravité et le temps de latence pour les voir apparaître dépendent de la dose d'irradiation [Calvo 1986; Calvo 1987]. Plus la dose est élevée et plus le temps de latence devient court ; il est par exemple <12 mois pour des doses >20 Gy [Calvo 1988]. La taille du volume de cerveau irradié influe également sur l'apparition de nécroses tardives [Munter 1999]. Enfin, certaines structures cérébrales sont plus sensibles que d'autres aux radiations et la progression de nécroses radio-induites y est plus rapide ; il a par exemple été observé une latence de 36 semaines pour le *fimbria-fornix* irradié avec une dose unique de 25 Gy, contre 49 semaines pour le corps calleux [Hodges 1998]. Il a également été montré que l'administration d'un radio-protecteur (Gammaphos) préalablement à une dose d'irradiation unique de 25 Gy évitait la perte des cellules endothéliales et diminuait fortement le risque d'apparition de nécroses tardives radio-induites [Lyubimova 2004].

Une dose de 20 Gy nous a semblé ici raisonnablement élevée étant donnée la tolérabilité des tissus cérébraux sains pour une dose en une seule fraction, et la toxicité supplémentaire éventuelle de la chimiothérapie. Cette dose de 20 Gy (78,8 keV) a donc été délivrée (à J14) seule ou en combinaison avec 20 µg de carboplatine dans 20 µl (dilution dans du NaCl), injectés 24 heures avant par CED.

IV.2.5.1.2 Tester une autre drogue platinée antinéoplasique

D'autre part nous avons voulu tester un autre agent pharmacologique platiné : l'oxaliplatine, connu pour son action antinéoplasique, notamment sur certains cancers résistants au cisplatine [Grolleau 2001]. Aucune étude préclinique de survie (ou de toxicité) avec de l'oxaliplatine en injection intra-cérébrale n'est reportée à notre connaissance dans la littérature. Par conséquent, il

était difficile de fixer la dose à injecter. Afin de limiter la toxicité, nous avons administré une concentration peu élevée : 2 µg d'oxaliplatine dans 20 µl d'eau ppi, combinée ou non à une irradiation de 15 Gy (78,8 keV).

IV.2.5.2 Matériels et méthodes

IV.2.5.2.1 Implantation des cellules tumorales

Les rats ont été anesthésiés par une inhalation brève d'isoflurane suivie d'une injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine et kétamine (dosages explicités § IV.2.2.2.1, p.116).

Les cellules tumorales ont été inoculées suivant la même méthode que précédemment (IV.2.3 et IV.2.4), les paramètres importants sont rappelés dans le Tableau IV-22 ci-après.

injecteur	seringue	durée d'injection	agarose	volume	nbr de cellules	profondeur
2,5 µl/min	Hamilton 701 N	2 minutes	non	5 µl	1000	-5,5 mm

Tableau IV-22 : Paramètres d'inoculation des cellules tumorales F98 (juillet 2006).

IV.2.5.2.2 Paramètres d'injection CED

Les injections ont été réalisées en plaçant l'aiguille (32 gauge ; seringue Hamilton *gastight* de 50 µl : 1705 RN) aux coordonnées d'implantation de la tumeur. Le pousse seringue (KDS 310, GENEQ inc.) a été réglé sur un débit de 0,5 µl/min (Figure IV-15, p.117).

IV.2.5.2.3 Paramètres d'irradiation

Les rats ont été irradiés à J14 suivant la méthode décrite au paragraphe III.3.2 p.80. Les paramètres exacts sont résumés dans le tableau ci-après.

Dose [Gy]	Energie [keV]	Volume irradié			Film GafChromic
		Nombre de coupes	Hauteur du faisceau [mm]	Largeur du faisceau [mm]	
20 (ou 15)	78,8	11	1	10	oui

Tableau IV-23 : Paramètres d'irradiation SSR.

IV.2.5.3 Résultats

Les courbes de survie sont présentées Figure IV-20, les données de survie correspondantes sont résumées dans le Tableau IV-24. Sauf précisé, les pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) sont calculés relativement à la survie médiane (MeST) ou moyenne (MST) du groupe témoin non traité. On remarquera qu'aucun rat n'est décédé précocement durant cette étude.

N ^a	catégorie	Survie (jours après implantation)			% ILS	
		intervalle	moyenne \pm stdev	médiane	moyenne	médiane
7	témoin	25-35	28,4 \pm 3,7	29,0	-	-
10	20 Gy (78,8 keV)	37-74	55,7 \pm 10,4	55,5	95,9	91,4
12	20 μ g/20 μ l carboplatine + 20 Gy	50-183	93,0 \pm 42,9	80,0	227,1	175,9
4	2 μ g/20 μ l oxaliplatine	28-32	30,3 \pm 2,1	30,5	6,4	5,2
5	2 μ g/20 μ l oxaliplatine + 15 Gy	39-72	56,0 \pm 12,2	57,0	97,0	96,6

Tableau IV-24 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats traités par chimiothérapie intracérébrale combinée ou non à une irradiation SSR (15 ou 20 Gy à 78,8 keV), ou par irradiation seule (20 Gy à 78,8 keV). L'inoculation des 10³ cellules F98 correspond à J0 ; les drogues sont injectées par CED (0,5 μ l/min) à J13, suivie 24 heures plus tard (J14) de radiothérapie pour les traitements combinés. N^a indique le nombre de rats par groupe.

IV.2.5.3.1 Oxaliplatine - 15 Gy

La MeST des témoins non traités ($n = 7$) est de 29 jours et la MST de $28,4 \pm 3,7$, et l'intervalle de survie est [25-35 jours]. Le groupe traité par injection i.c. d'oxaliplatine a un comportement semblable au groupe témoin : les intervalles [28-32 jours] et les courbes de survie se superposent, la MeST (30,5 jours) et la MST ($30,3 \pm 2,1$ jours) sont quasiment identiques à celles des témoins (ILS = 5,2 % et 6,4 %, respectivement ; avec $p_w = 0,3997$, et le test du Log-rank non pertinent puisque les courbes se croisent). La combinaison de l'oxaliplatine avec la SSR (78,8 keV ; 15 Gy) augmente significativement la survie puisque les ILS relatifs aux survies moyenne et médiane des témoins non traités sont respectivement de 97,0 % et 96,6 % ($p_{LR} = 0,0009$ et $p_w = 0,0028$).

Le groupe ayant été traité par radiothérapie seule ($n = 10$) a reçu une dose de 20 Gy (fraction unique). On remarquera que le traitement combiné ($n = 5$) oxaliplatine + 15 Gy se comporte de façon très semblable : mêmes intervalles de survie, courbes de survie superposées parfaitement, MeST, MST et %ILS quasiment identiques, $p_w = 0,7176$ (non significatif ; p_{LR} non exploitable).

Ce dosage d'oxaliplatine injecté par CED et combiné à une dose de 15 Gy donc eu un effet similaire à une dose de 20 Gy seule sur la survie des rats. Il aurait été pertinent d'ajouter un groupe de traitement radiothérapie seule 15 Gy, afin de déterminer si un bénéfice thérapeutique lié à l'oxaliplatine existe ou non.

IV.2.5.3.2 Carboplatine - 20 Gy

Une dose de radiothérapie de 20 Gy augmente significativement la survie des rats par rapport aux rats non traités, puisque on trouve des ILS de 95,9 % (MST) et 91,4% (MeST) et $p < 0,0001$.

Le traitement 20 µg de carboplatine (dans 20 µl) suivi d'une irradiation de 20 Gy (*SSR* ; 78,8 keV) donne une MST $93,0 \pm 42,9$ jours et une MeST élevée de 80 jours ; avec un rat survivant jusqu'à 183 jours. Le bénéfice thérapeutique est important (voir Tableau IV-25), que ce soit par rapport au groupe témoin non traité ($ILS_{MST} = 227,1$ % et $ILS_{MeST} = 175,9$ % ; $p < 0,0001$), ou au groupe radiothérapie seule ($ILS_{MST} = 227,1$ % et $ILS_{MeST} = 175,9$ % ; $p < 0,013$).

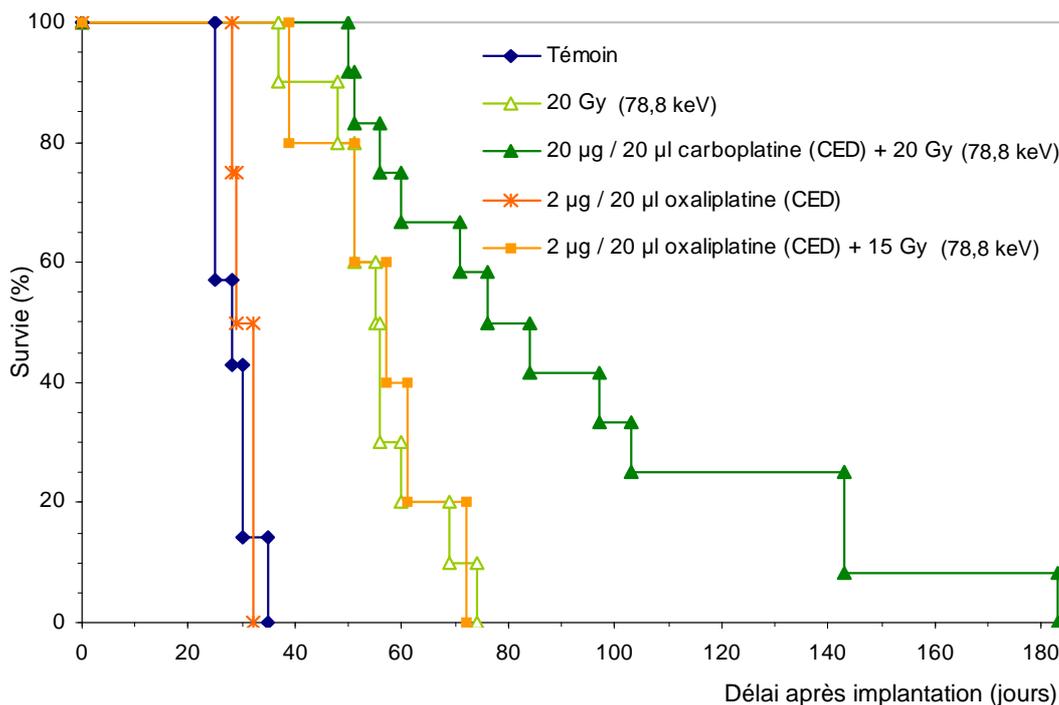


Figure IV-20 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par : irradiation de 20 Gy (Δ), injection i.c. de carboplatine (20 µg dans 20 µl) suivie d'une irradiation de 20 Gy (\blacktriangle), injection i.c. d'oxaliplatine (* ; 2 µg dans 20 µl), ou la combinaison d'une injection i.c. d'oxaliplatine et 15 Gy (\blacksquare). Les temps de survie sont indiqués en jours après inoculation de 10^3 cellules F98 (J0) ; la chimiothérapie est administrée à J13 par CED (0,5 µl/min) ; la radiothérapie *SSR* (78,8 keV) est délivrée à J14 en une fraction.

Groupe référence	Traitement combiné 20 µg/20 µl de carboplatine et 20 Gy		
	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_W
Témoin non traité	227,1	175,9	<0,0001
SSR 20 Gy (78,8 keV)	67,0	44,1	0,0033 et 0,0127

Tableau IV-25 : Efficacité thérapeutique de la chimio-radiothérapie par rapport à la radiothérapie. Les pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) sont calculés par rapport aux survies moyenne et médiane du groupe référence. Les tests de Log-rank et Wilcoxon indiquent une différence significative si $p < 0,05$.

IV.2.5.4 Conclusion

Il serait intéressant de poursuivre les essais avec l'oxaliplatine. Une étude préalable de toxicité afin d'évaluer le dosage le plus élevé non toxique, est nécessaire avant d'envisager un traitement combiné.

Pour une dose d'irradiation de 20 Gy, la survie médiane obtenue est de 55,5 jours, intermédiaires donc entre les 46 et 145 jours obtenus pour respectivement 15 et 25 Gy (SSR - 50 keV) [Adam 2003a, p.213] ; elle concorde parfaitement avec celle de 53,5 jours décrite pour une irradiation SSR à 78,8 keV [Biston, 2004a, p.125]. Le dosage de carboplatine de 20 µg/20 µl semble encore une fois approprié puisque nous n'observons pas de toxicité immédiate additionnelle et létale avec l'irradiation de 20 Gy. Le traitement combiné augmente considérablement la MeST (80 jours). L'analyse histo-pathologique pour cette étude n'a pas encore été réalisée ; elle pourrait notamment nous permettre de savoir si au-delà de 100 jours les rats décèdent tous de leur tumeur ou de lésions radio-induites.

IV.2.6 Carboplatine par pompe osmotique associé à 15 Gy (SSR) : premiers essais

IV.2.6.1 Choix des paramètres

IV.2.6.1.1 Objectifs

Cette étude avait pour but principal de mettre en place une chimiothérapie par pompe osmotique. En effet, ce système donne la possibilité d'injecter une drogue en continu pendant plusieurs jours, c'est-à-dire sur une durée couvrant plusieurs fois le temps de doublement cellulaire. On augmente ainsi la probabilité que les cellules entrent dans une phase sensible de leur cycle [Walter 1995].

D'autre part, l'étude d'imagerie décrite au chapitre IV.1 nous a montré que les paramètres d'injection (débit et seringue) utilisés pour inoculer les cellules F98, causaient une perte par reflux importante et fréquente du liquide injecté vers d'autres structures que le noyau caudé ciblé. Dans le cas d'une injection de cellules tumorales, celles-ci sont déposées aléatoirement à la fois le long de la seringue d'injection et dans le corps calleux, engendrant des tumeurs de forme variée et localisées plus ou moins précisément aux coordonnées stéréotaxiques voulues. Si ensuite on traite systématiquement ces tumeurs par CED (sans imagerie préalable à la chimiothérapie) aux coordonnées théoriques, on a de forte chance de ne pas couvrir tout le volume tumoral. Nous avons donc décidé de changer de technique d'implantation des cellules F98 afin de traiter des tumeurs les plus reproductibles possibles. Le professeur RF Barth nous a transmis son protocole où les cellules sont injectées dans un milieu agarosé gélifié [Kobayashi 1980; Clendenon 1990]. Cette technique permet d'obtenir un modèle tumoral plus reproductible, davantage sphérique et mieux délimité qu'avec les techniques utilisées précédemment.

IV.2.6.1.2 Quantités de carboplatine pour les pompes osmotiques

Plusieurs études reportent l'innocuité de ces pompes osmotiques, implantées dans le cerveau chez des rats, notamment si le débit n'est pas trop élevé [Carson 2002]. Deux questions se sont posées :

- quelle quantité de carboplatine utiliser pour que la chimiothérapie ne soit pas toxique ?
- cet agent pharmacologique restera-t-il stable tout au long de l'injection ?

Carson *et al.* ont montré par HPLC, qu'une solution de carboplatine (0,5 mg/ml dans du dextrose à 5 %), incubée à 37 °C et dans des pompes osmotiques, était toujours stable à 83 % après 12 semaines. L'étude pré-clinique associée révèle qu'une dose de 0,5 mg/ml de carboplatine, délivrée pendant 7 jours à 1 µl/heure (soit au total 100 µg de carboplatine), est bien tolérée par les rats et double le temps de survie moyen (10⁴ cellules 9L ou F98 implantées dans le tronc cérébral ; traitement commencé à J5).

IV.2.6.1.3 Groupes de traitement

Les six traitements suivants ont été évalués :

- carboplatine par CED : une solution de 20 µg dans 20 µl (dilution dans du glucose [dextrose] à 5 % pour obtenir cette concentration de 1 mg/ml) est injectée à 0,5 µl/min (soit durant 40 minutes) à J13 ;
- carboplatine par pompe osmotique (*o.p.*) : une solution à 0,5 mg/ml (dilution dans du glucose à 5 %) est infusée avec un débit de 1 µl/heure pendant 6 jours (la pompe est implantée à J7 et retirée à J13) ;
- irradiation seule de 15 Gy (mode tomographie), 78,8 keV à J14 ;
- glucose (dextrose) à 5 % par pompe osmotique (1 µl/heure pendant 6 jours de J7 à J13) suivi de 15 Gy 24 heures plus tard ;
- carboplatine par CED (20 µg/20 µl - 0,5 µl/min - J13) suivi de 15 Gy (à J14) ;
- carboplatine par pompe osmotique (0,5 mg/ml - 1 µl/heure - pendant 6 jours : de J7 à J13) suivi de 15 Gy (à J14).

IV.2.6.2 Matériels et méthodes

IV.2.6.2.1 Cellules avec de l'agarose : préparation spécifique et implantation

Les cellules sont cultivées comme usuellement jusqu'au jour de l'implantation. Elles sont ensuite préparées suivant la méthode décrite par Barth *et al.* [Kobayashi 1980; Clendenon 1990]. Brièvement, une solution de milieu DMEM sans sérum avec 1,2 à 1,4 % d'agarose LMP (*low melting point*) est préparée et maintenue à 37°C afin de rester liquide. Une fois comptées, les cellules sont mélangées au milieu agarosé et gardées à 37°C jusqu'au remplissage de la seringue. Lorsque la seringue Hamilton est remplie, il est important de la laisser à température ambiante pendant 2 à 5 minutes, afin de permettre à l'agarose de se gélifier.

Implantation de la tumeur : les rats sont anesthésiés par une inhalation brève d'isoflurane suivie d'une injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine et kétamine. La procédure de préparation des rats reste inchangée, mais la seringue d'injection des cellules (Hamilton 702 N) placée dans l'injecteur est descendue à une profondeur de -5,5 mm par rapport à la surface du crâne et remontée à -5,0 mm. Les 10 µl de solution agarosée contenant les 4000 cellules F98 sont ensuite injectés en 16 secondes, comme indiqué dans le Tableau IV-26 ci-après.

injecteur	seringue	durée d'injection	agarose	volume	nbr de cellules	profondeur
36,41 µl/min	Hamilton 702 N	16 secondes	oui	10 µl	4000	-5,0 mm

Tableau IV-26 : Paramètres d'inoculation des cellules tumorales F98 (novembre 2006).

IV.2.6.2.2 Injections par pompe osmotique

Le fonctionnement des pompes osmotiques est basé sur le principe de la pression osmotique [Theeuwes 1976]. Les pompes sont composées d'un réservoir contenant la drogue (*Test Agent*) à infuser (Figure IV-21), d'une membrane imperméable mais flexible (*Impermeable Layer*), d'une couche d'eau salée dite « couche osmotique » (*Osmotic Layer*), elle-même encapsulée par une membrane semi-perméable (*Semipermeable Membrane*) rigide et non déformable qui constitue la surface externe de la pompe. Lorsque la pompe est implantée sous la peau, une différence de pression osmotique est créée entre les tissus et le compartiment osmotique. Le gradient de pression osmotique entraîne un flux net d'eau (contenue dans le sérum physiologique des tissus) à travers la membrane semi-perméable depuis les tissus vers le compartiment osmotique. Le volume du compartiment osmotique augmente, poussant ainsi la membrane flexible imperméable et comprimant le réservoir dont le contenu va s'évacuer par le modérateur de flux (*Flow Moderator*). Ainsi, le débit d'infusion des pompes est contrôlé uniquement par la perméabilité de la membrane externe et reste indépendant de la drogue.

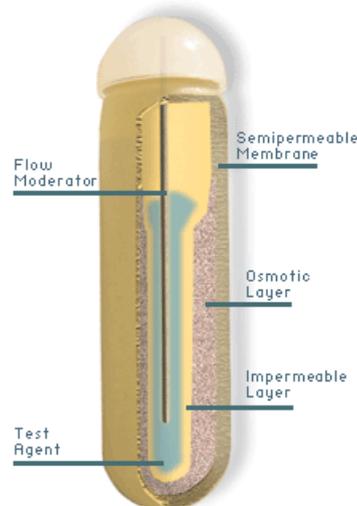


Figure IV-21 : Principe d'une pompe osmotique (d'après www.alzet.com).

Description du modèle de pompe choisi : le modèle 2001 de pompe osmotique Alzet (diamètre 0,7 mm et longueur 3 cm une fois assemblée) possède un réservoir de 200 μl ; le débit est de 1 $\mu\text{l}/\text{h}$ et la durée d'infusion est de 7 jours. Il a été montré que ce type de pompe (débit : 1 $\mu\text{l}/\text{h}$ - durée : 7 jours), implanté chez des rats pour des injections intracérébrales, était bien toléré par les tissus cérébraux [Carson 2002].

Description du kit d'infusion cérébrale : les kits d'infusion sont constitués d'une canule que l'on place dans le cerveau, d'un cathéter en vinyle qui relie cette canule au modérateur de flux, et de cales (*Depth-Adjustment Spacers*) de 0,5 mm d'épaisseur qui permettent d'ajuster la profondeur à

laquelle est implantée la canule (Figure IV-22). La canule d'infusion est en acier inoxydable, elle possède un diamètre de 28 gauge (*i.e.* diamètre interne : 0,18 mm ; diamètre externe : 0,36 mm). Elle pénètre à une profondeur de 5 mm maximum par rapport à la surface de l'os auquel elle est fixée. Ceci nous a conduit à modifier légèrement la profondeur d'implantation des tumeurs par rapport aux expériences précédentes (5 mm au lieu de 5,5 mm). Tous les matériaux sont conformes à la norme américaine *U.S. Pharmacopoeia (USP) Class VI* pour la bio-compatibilité des plastiques médicaux.

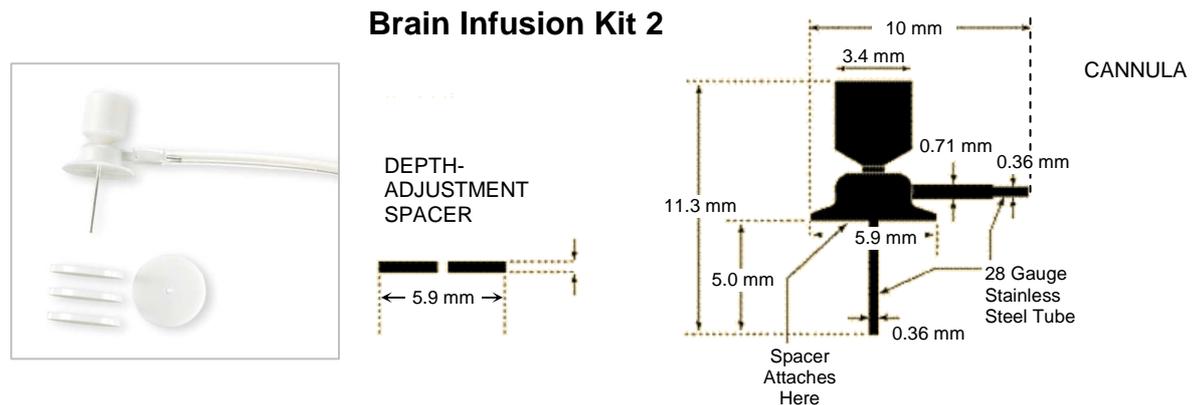


Figure IV-22 : Kit d'infusion cérébrale (*d'après www.alzet.com*). L'aiguille d'injection est implantée à une profondeur ajustable grâce aux *spacers*.

Procédure d'implantation des pompes : les pompes osmotiques sont remplies et assemblées la veille de leur implantation (Figure IV-23). Elles sont ensuite placées dans une solution saline (0,9 %) et dans un incubateur à 37 °C pendant 24 h, ceci afin de les amorcer.

Le jour de l'implantation, les rats sont anesthésiés suivant le protocole décrit au paragraphe IV.2.2.2.1, p.116 (inhalation brève d'isoflurane suivie d'une injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine et kétamine). Le crâne et le haut du dos du rat sont rasés puis désinfectés à la Bétadine. Une incision est faite sur le dessus du crâne, puis une poche sous-cutanée est créée à l'aide d'un hemostat, dans la zone médiane au niveau des omoplates (*midscapular area*). Le réservoir de la pompe est ensuite inséré dans cette poche sous cutanée et le cathéter est glissé en prenant soin de faire une boucle qui permettra la liberté de mouvements de l'animal (au niveau du cou et du dos). La surface du crâne doit être parfaitement sèche pour que le kit d'infusion soit collé correctement. La cire à os placée lors de l'implantation des cellules est retirée délicatement, afin de dégager le trou. La canule est insérée bien perpendiculairement à la surface du crâne et le kit d'infusion est fixé au moyen de colle chirurgicale (cyanocrylate, Loctite 454). Le scalp est désinfecté à la Bétadine puis suturé.

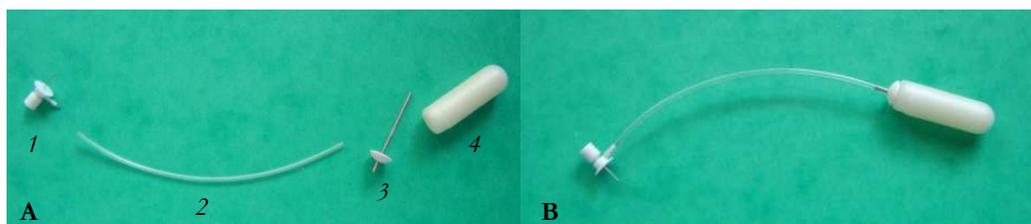


Figure IV-23 : Pomme osmotique. Avant d'assembler les différents éléments, on distingue (A) : la canule d'injection cérébrale (1), le cathéter (2), le modérateur de flux (3) et la pompe (4). Une fois remplie et assemblée (B), et avant d'être implantée, la pompe est placée dans une solution saline (0,9 %) et mise 24 heures dans l'incubateur à 37 °C.

IV.2.6.2.3 Paramètres d'injection CED

Les injections sont réalisées en plaçant l'aiguille (32 gauge ; seringue Hamilton *gastight* de 50 μ l : 1705 RN) aux coordonnées d'implantation de la tumeur. Le pousse seringue (KDS 310, GENEQ inc.) est réglé sur un débit de 0,5 μ l/min (Figure IV-15 p.117).

IV.2.6.2.4 Paramètres d'irradiation

Les rats ont été irradiés en mode SSR - 78,8 keV, à J14 suivant la méthode décrite au paragraphe III.3.2 p.80. Les paramètres exacts sont résumés dans le tableau ci-après.

Dose [Gy]	Energie [keV]	Volume irradié			Film GafChromic
		Nombre de coupes	Hauteur du faisceau [mm]	Largeur du faisceau [mm]	
15	78,8	11	1	10	oui

Tableau IV-27 : Paramètres d'irradiation SSR.

IV.2.6.3 Résultats

Les courbes de survie sont présentées Figure IV-25, les données de survie correspondantes sont résumées dans le Tableau IV-29. Sauf précisé, les pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) sont calculés relativement à la survie médiane (MeST) ou moyenne (MST) du groupe non traité.

IV.2.6.3.1 Toxicité-inocuité des traitements

Les pertes de poids enregistrées dans les 7 jours après initiation de l'injection intra-cérébrale sont présentées dans le Tableau IV-28. On remarquera qu'elles sont généralement modérées (<10 %), et relativement importantes (11 à 20 %) chez 3 rats seulement. Du point de vue comportemental, les rats dotés de pompes osmotiques n'ont montré aucun signe particulier de douleur ou de gêne pour se mouvoir ou s'alimenter. Le cas du dextrose montre que la chirurgie, les anesthésies et la

présence de la pompe engendrent une baisse pondérale indépendante du carboplatine lui-même. Enfin on notera (Tableau IV-29) qu'aucun rat n'est décédé précocement durant cette étude.

Groupe	N ^a	Perte de poids (nombre de rats)		
		<5%	6-10%	11-20%
Carboplatine CED	9	4	4	1
Carboplatine CED + 15 Gy	10	2	8	0
Dextrose <i>o.p.</i> + 15 Gy	8	7	1	0
Carboplatine <i>o.p.</i>	9	6	3	0
Carboplatine <i>o.p.</i> + 15 Gy	12	10	0	2

Tableau IV-28 : Pertes de poids mesurées dans les 7 jours suivant l'administration i.c. de carboplatine (ou dextrose) ; en pourcentage du poids initial. Le 1^{er} jour de suivi est J7 ou J13 suivant la technique d'injection : pompe osmotique (*o.p.*) ou CED. Les chiffres indiquent le nombre de rats concernés ; N^a est le nombre de rats par groupe.

IV.2.6.3.2 Chimiothérapie

Après inoculation de 4000 cellules F98, la survie médiane (MeST) des rats non traités est 22 jours et la survie moyenne (MST) est $22,2 \pm 2,4$ jours. Le carboplatine seul administré par CED (dose : 20 µg dans 20 µl à J13) a un effet important sur la survie puisque pour ce groupe, la MeST est de 40 jours (ILS = 81,8 %) et la MST *biaisée* vaut $63,6 \pm 57,0$ jours (ILS = 186,0 %) ; $p_{LR} = 0,0002$ et $p_w = 0,0003$ (Figure IV-24). Le carboplatine administré seul par pompe osmotique a un effet thérapeutique considérable puisque les survies médiane et moyenne (*biaisée*) sont élevées : 82 jours et $84,2 \pm 54,2$ jours, représentant des ILS de 272,7 % et 279,0 %, respectivement ($p < 0,0001$).

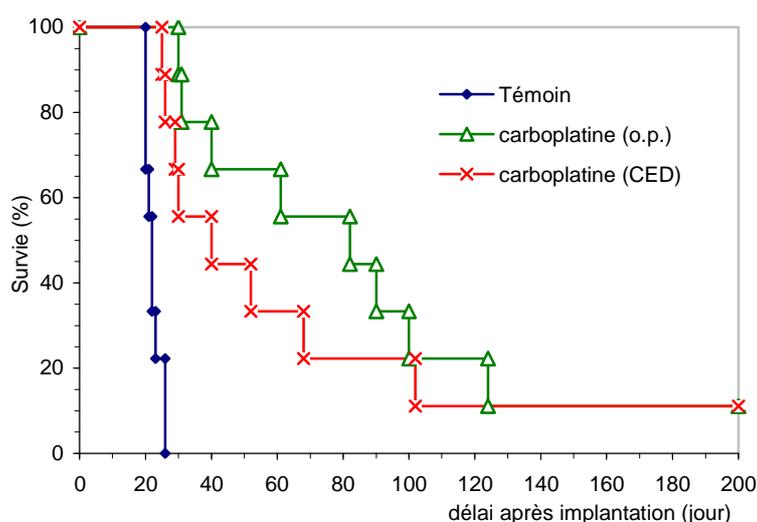


Figure IV-24 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par carboplatine seul. L'inoculation de 4.10^3 cellules F98 correspond à J0. Le carboplatine a été délivré à J13 par CED (×) (20 µg/20 µl à 0,5 µl/min) ou de J7 à J13 par pompe osmotique (*o.p.* ; Δ) (0,5 mg/ml - 1 µl/h).

Il est important de souligner que pour chacun de ces groupes de chimiothérapie un rat est toujours en vie à la fin de l'étude (J200), et plusieurs ont survécu au-delà de J100 (un décès à J102 pour la CED ; 2 décès à J100 et J124 pour les pompes osmotiques). Les deux traitements (carboplatine par pompe osmotique ou par CED) ne sont pas significativement distincts ($p_{LR} = 0,4019$ et $p_w = 0,1827$).

N ^a	catégorie	Survie (jours après implantation)			% ILS	
		intervalle	moyenne \pm stdev	médiane	moyenne	médiane
9	Témoin	20-26	22,2 \pm 2,4	22,0	-	-
9	Carboplatine <i>o.p.</i>	30-200 (1) [§]	84,2 \pm 54,2 ^ξ	82,0	279,0 ^ξ	272,7
9	Carboplatine CED	25-200 (1) [§]	63,6 \pm 57,0 ^ξ	40,0	186,0 ^ξ	81,8
6	15 Gy (78,8 keV)	31-42	38,3 \pm 3,9	39,0	72,5	77,3
8	Dextrose <i>o.p.</i> + 15 Gy	28-47	34,3 \pm 6,65	31,0	54,1	40,9
12	Carboplatine <i>o.p.</i> + 15 Gy	30-200 (5) [§]	117,1 \pm 75,4 ^ξ	86,0	426,9 ^ξ	290,9
11	Carboplatine CED + 15 Gy	30-200 (3) [§]	88,2 \pm 73,8 ^ξ	47,0	296,8 ^ξ	113,6

Tableau IV-29 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats traités par injection intracérébrale de carboplatine, combinée ou non à une irradiation SSR de 15 Gy (78,8 keV) ; *o.p.* signifie pompe osmotique. L'inoculation des 4.10⁵ cellules F98 correspond à J0 ; la chimiothérapie a été délivrée à J13 par CED (20 μ g/20 μ l à 0,5 μ l/min) ou de J7 à J13 par pompe osmotique (0,5 mg/ml - 1 μ l/h) ; la radiothérapie a été administrée à J14. N^a donne le nombre de rats par groupe ; [§] indique la fin de l'expérience (J200) et le chiffre entre parenthèses précise le nombre de rats toujours en vie à cette date ; ^ξ signale que la moyenne calculée est *biaisée*.

IV.2.6.3.3 Groupe dextrose et radiothérapie

Pour les rats traités par irradiation seule (SSR-78,8 keV, 15 Gy), les survies médiane et moyenne sont respectivement de 39 (ILS = 77,3 %), et 38,3 \pm 3,9 jours (ILS = 72,5 %). Le bénéfice thérapeutique (par rapport au groupe non traité) est significatif : $p_{LR} = 0,0003$ et $p_w = 0,0010$.

Le groupe ayant reçu du dextrose par pompe osmotique suivi de 15 Gy est un groupe témoin ; il permet de vérifier que la présence des pompes (et particulièrement la canule) pendant 6 jours ne vient pas provoquer de réponse immune. En effet, il arrive que des cathéters implantés directement dans le tissu cérébral tumoral engendrent une inflammation locale et une réponse immune [Huynh 2006]. Il nous indique également que les pompes sont bien tolérées (leur

présence pendant 6 jours, ainsi que la chirurgie nécessaire pour les implanter). En terme de survie, le groupe ayant reçu du dextrose par pompe osmotique suivi d'une dose X de 15 Gy a un comportement relativement proche du groupe 15 Gy seuls (intervalles et courbes de survie bien superposés ; MST et MeST voisines ; $p_w = 0,1546$).

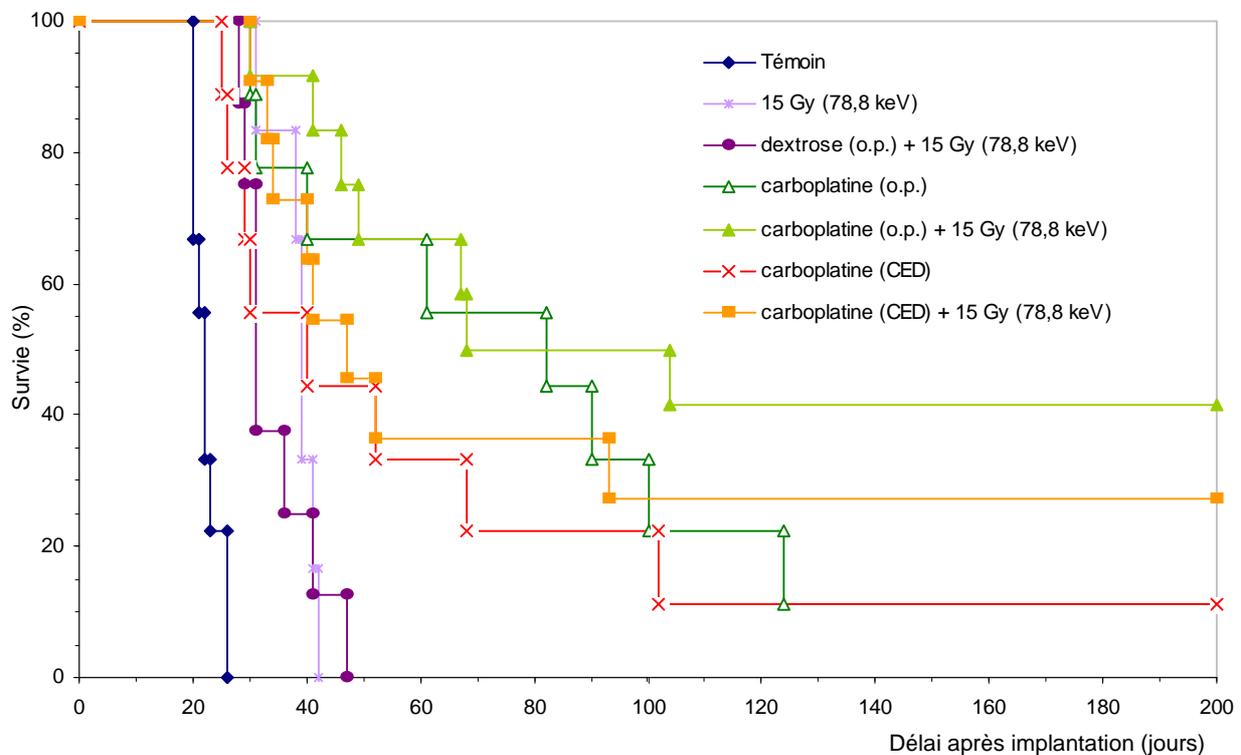


Figure IV-25 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par : une irradiation de 15 Gy (-), une injection de dextrose par pompe osmotique (*o.p.*) suivie de 15 Gy (●), une injection de carboplatine par *o.p.* (Δ) ou par CED (×), une injection de carboplatine par *o.p.* combinée à 15 Gy (▲), une injection de carboplatine par CED suivie de 15 Gy (■). Les temps de survie sont indiqués en jours après inoculation de 4.10^3 cellules F98 (J0) ; la chimiothérapie est administrée à J13 pour la CED (20 μ g dans 20 μ l - 0,5 μ l/min) et de J7 à J13 pour les *o.p.* (0,5 mg/ml - 1 μ l/h) ; la radiothérapie est délivrée en fraction unique à J14, en mode SSR (à 78,8 keV).

IV.2.6.3.4 Combinaison carboplatine *i.c.* (CED ou pompe osmotique) et 15 Gy

On commencera par souligner le nombre de rats toujours en vie à la fin de l'étude (*i.e.* à J200), et ce, pour chaque traitement combiné : 5/12 (soit 41,7 %) avec les pompes osmotiques et 3/11 (soit 27,3 %) avec la CED.

La MeST et la MST du groupe traité par carboplatine (CED) + 15 Gy sont élevées : 47 jours (ILS = 113,6 %) et $88,2 \pm 73$ jours (296,8 %) avec $p < 0,0001$. Celles du groupe ayant reçu la combinaison carboplatine (pompe osmotique) + 15 Gy le sont davantage : 86 (ILS = 290,6 %) et

117,1 ± 75,4 jours (ILS = 426,9 %), $p < 0,0001$. Les tests de Log-rank et Wilcoxon indiquent que les survies associées à ces deux traitements ne sont pas significativement distinctes : $p_{LR} = 0,2934$ et $p_W = 0,2163$.

Le Tableau IV-30 permet d'évaluer le bénéfice thérapeutique apporté par la combinaison chimio-radiothérapie, en comparaison avec chacune des modalités (chimiothérapie ou radiothérapie) et pour chaque moyen d'injection (donc dosage) du carboplatine (CED ou pompe osmotique). Il est nécessaire de souligner que la différence entre chimio-radiothérapie et chimiothérapie n'est significative ni pour la CED ($p_{LR} = 0,3572$ et $p_W = 0,2622$), ni pour les pompes osmotiques ($p_W = 0,3479$; test de Log-rank non utilisable car les courbes de survie se croisent). De même, la survie médiane des traitements combinés (relativement à la chimiothérapie correspondante) n'est augmentée que de 17,5 % (CED cas *a*) et 4,9 % (pompes osmotiques, cas *b*).

Groupe de référence	(a) Traitement combiné Carboplatine par CED [§]			(b) Traitement combiné Carboplatine par pompe osmotique [§]		
	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_W	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_W
Témoin non traité	296,8	113,6	<0,0001	426,9	290,9	<0,0001
SSR 15 Gy (78,8 keV)	130,0	20,5	∅ et 0,1580	205,4	120,5	∅ et 0,0016
Chimiothérapie [§]	38,7	17,5	0,3572 et 0,2622	39,0	4,9	∅ et 0,3479

Tableau IV-30 : Comparaison des traitements combinés (pompe osmotique et CED) avec les groupes non-traité, radiothérapie (fraction unique de 15 Gy en mode SSR-78,8 keV) et chimiothérapie (CED pour *a*, pompe osmotique pour *b*). Les pourcentages d'augmentation de survie (ILS) sont calculés par rapport aux survies moyenne et médiane du groupe de référence. Les tests du Log-rank et de Wilcoxon indiquent une différence significative si $p < 0,05$; ∅ signale que le test du Log-rank n'est pas pertinent. § précise que la MST du groupe est *biaisée*.

IV.2.6.3.5 Imagerie des rats survivants à long terme

Les 10 rats survivants à long terme (1 carboplatine CED, 1 carboplatine o.p., 3 carboplatine CED + 15 Gy, et 5 carboplatine o.p. + 15Gy) ont été ré-imaginés à J185 c'est-à-dire peu de jours avant la fin de l'étude. Pour chacun des rats, une petite prise de contraste bien délimitée (et toujours localisée au même endroit) est visible sur 1 à 3 coupes coronales CT (voir exemple Figure IV-26).

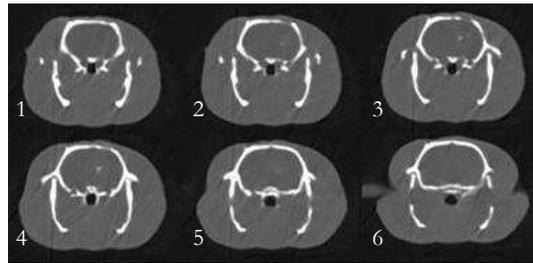


Figure IV-26 : Exemple d'images tomographiques obtenues en fin d'étude. Une petite prise de contraste est observable sur les coupes 2 à 4.

IV.2.6.3.6 Rats survivants à long terme : analyse histo-pathologique

L'analyse histo-pathologique correspondant à cette étude est présentée Figure IV-27 ; elle a été menée en collaboration avec le Professeur Barth (*Ohio State University*). Des coupes histologiques (coloration HE) ont été réalisées pour 1 ou 2 animaux par groupe, en choisissant les rats survivants à long terme pour les traitements par chimiothérapie et chimio-radiothérapie.

La coupe représentative du rat non traité (a) montre une masse tumorale importante, avec des zones péri-tumorales infiltrant le cerveau sain. Cet aspect hautement invasif est caractéristique des tumeurs F98. On l'observe également chez le rat ayant reçu une irradiation de 15 Gy (décédé à J31) après injection de dextrose par pompe osmotique (b). Les coupes réalisées chez le rat traité uniquement par radiothérapie (non montrées ici) sont tout à fait semblables (tumeur invasive et zone centrale nécrotique).

Pour chacun des rats survivants à long terme (c à h), on constate l'absence de cellules tumorales et donc la disparition du gliome. On peut cependant noter quelques observations spécifiques :

- des cellules épendymaires sont inhabituellement présentes chez le rat ayant reçu du carboplatine par pompe osmotique (c), et l'un de ceux traités par chimio-radiothérapie (f). La coupe (c) révèle un certain nombre de cellules géantes non tumorales ;
- chez le rat traité et guéri par injection CED de carboplatine, une accumulation de lymphocytes montre une inflammation chronique. La cavité (en haut à droite de l'image) est très probablement le lieu où se trouvait la masse tumorale ;
- un des rats traités par chimio-radiothérapie (e) présente très probablement une zone d'abcès ;
- les points plus sombres visibles sur la coupe (h), chez le rat ayant reçu du carboplatine par CED puis 15 Gy, sont des calcifications dystrophiques et macrophages.

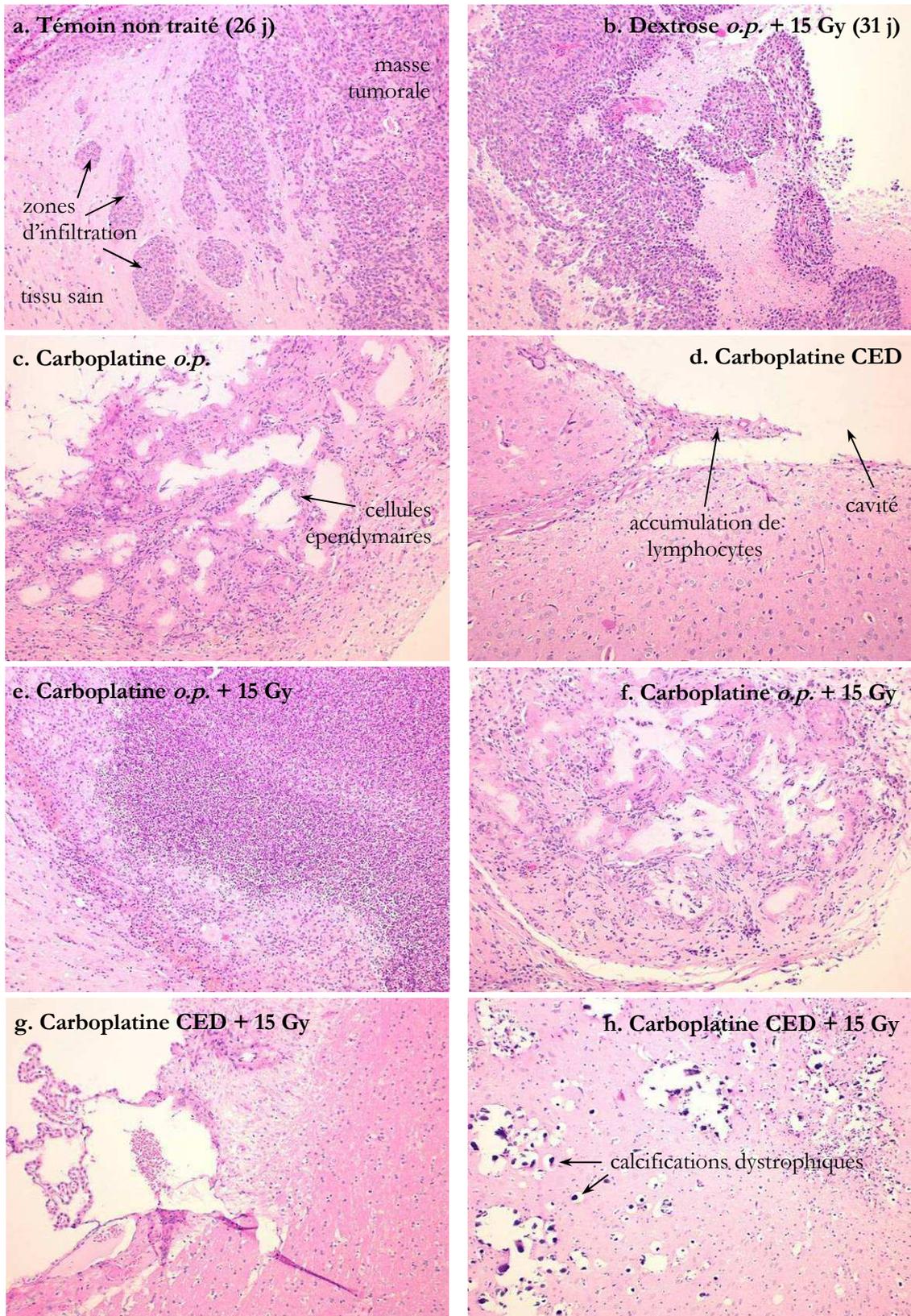


Figure IV-27 : Coupes histologiques (coloration HE; grossissement $\times 100$) de cerveaux de rats porteurs de tumeur F98, après différents traitements : témoin (a), radiothérapie (b), chimiothérapie carboplatine par pompe osmotique (c) ou CED (d), chimio-radiothérapie (e à h). Chaque photographie correspond à un animal distinct. Les animaux (c) à (h) sont des survivants à long terme euthanasiés en fin d'étude ; pour (a) et (b) le temps de survie est indiqué entre parenthèse ; *o.p.*, signifie pompe osmotique.

IV.2.6.4 Conclusion

Pour comparer les traitements évalués dans cette étude (notamment les résultats « bruts »), aux précédents décrits dans ce chapitre (ou à des résultats antérieurs), il est nécessaire de garder en mémoire les paramètres de protocole qui ont été modifiés : le nombre de cellules F98 qui diffèrent (4000 ici), la méthode d'inoculation des cellules qui théoriquement ne doit pas engendrer de reflux le long de l'aiguille, et enfin la chimiothérapie par pompe osmotique est délivrée à partir de J7 pour que le jour d'irradiation demeure inchangé (soit J14).

On peut remarquer plusieurs choses : bien que l'on ait travaillé avec 4000 cellules (la tumeur est donc plus grosse), on observe qu'un rat traité uniquement avec du carboplatine (par CED) est toujours en vie à J200 montrant l'efficacité de la chimiothérapie seule.

L'effet du traitement associant chimio et radiothérapie dépend fortement de l'efficacité de la chimiothérapie seule puisque les MeST sont très proches : 82 ou 86 jours pour les pompes osmotiques dans le cas de la chimiothérapie ou du traitement combiné, respectivement ; 40 ou 47 jours avec la CED.

Deux raisons peuvent expliquer pourquoi les pompes osmotiques se révèlent particulièrement efficaces pour délivrer le carboplatine. La première est qu'elles sont posées à J7 lorsque la tumeur est encore petite. La seconde est qu'elles délivrent la drogue pendant plusieurs jours (6 jours), prolongeant la possibilité de toucher des cellules tumorales toujours viables qui se divisent.

IV.2.7 Carboplatine ou cisplatine par CED associé à une irradiation haute énergie

IV.2.7.1 Objectif de l'étude et groupes de traitements

L'objectif était de trouver un dosage de cisplatine non toxique dans un volume relativement élevé (>5 µl) pour essayer de couvrir toute la masse tumorale. Le choix s'est porté sur un volume de 20 µl qui semblait convenir dans le cas du carboplatine ; et une masse de 6 µg de cisplatine. D'autre part nous souhaitions savoir si la réponse thérapeutique au dosage de carboplatine 20 µg/20 µl serait améliorée ou non si les cellules étaient inoculées avec de l'agarose. Nous souhaitions également comparer une irradiation haute énergie (avec ce nouveau protocole d'inoculation des cellules F98) à une irradiation en rayonnement monochromatique sur la ligne médicale ID17 (voir étude suivante). Les 71 rats ont été répartis en 5 groupes de traitements (plus un groupe non traité, n = 10) :

- chimiothérapie par CED à J13 : carboplatine (20 µg/20 µl) ou cisplatine (6 µg/20 µl) ;
- radiothérapie haute énergie (6 MV) : 15 Gy ;
- chimio-radiothérapie : carboplatine (20 µg/20 µl) à J13 + 15 Gy (6 MV) à J14
ou cisplatine (6 µg/20 µl) à J13 +15 Gy (6 MV) à J14.

IV.2.7.2 Matériels et méthodes

Les rats ont été anesthésiés suivant le protocole décrit au paragraphe IV.2.2.2.1 p.116. Les 1000 cellules gliomales F98 ont été inoculées suivant la méthode décrite précédemment (milieu agarosé), les paramètres importants sont rappelés dans le Tableau IV-31 ci-après. Les injections de drogues antinéoplasiques (cisplatine et carboplatine) ont été effectuées par CED en plaçant l'aiguille (32 gauge ; seringue Hamilton *gastight* de 50 µl : 1705 RN) aux coordonnées d'implantation de la tumeur. Le pousse seringue (KDS 310, GENEQ inc.) a été réglé sur un débit de 0,5 µl/min (Figure IV-15 p.117). La radiothérapie haute énergie (6 MV) a été effectuée au CHU de Grenoble sur un irradiateur médical conventionnel (protocole § III.3.3 p.84).

injecteur	seringue	durée d'injection	agarose	volume	nbr de cellules	profondeur
36,41 µl/min	Hamilton 702 N	16 secondes	oui	10 µl	1000	-5,0 mm

Tableau IV-31 : Paramètres d'inoculation des cellules tumorales F98 (décembre 2006).

IV.2.7.3 Résultats

Les courbes de survie sont présentées Figure IV-28, les données de survie correspondantes sont résumées dans le Tableau IV-32. Sauf précisé, les pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) sont calculés relativement à la survie médiane (MeST) ou moyenne (MST) du groupe non traité.

Après inoculation de 1000 cellules F98, la survie médiane des rats non traités est 25 jours et la survie moyenne est $25,6 \pm 2,1$ jours. Pour le groupe 15 Gy (fraction unique à J14), les MeST et MST sont de 37 et $37,0 \pm 5,7$ jours avec $p < 0,0001$ (significatif).

N ^a	Catégorie	Survie (jours après implantation)			% ILS	
		intervalle	moyenne \pm stdev	médiane	moyenne	médiane
10	Témoin	23-29	$25,6 \pm 2,1$	25,0	-	-
12	Carboplatine (20 μ g/20 μ l)	23-95	$49,7 \pm 27,0$	37,5	94,0	50,0
12	Cisplatine (6 μ g/20 μ l)	21-200 (3) [§]	$84,2 \pm 76,3^{\xi}$	37,0	228,8 ^ξ	48,0
13	15 Gy (6 MV)	28-45	$37,0 \pm 5,7$	37,0	44,5	48,0
12	Carboplatine + 15 Gy	30-200 (2) [§]	$76,3 \pm 59,9^{\xi}$	52,0	198,2 ^ξ	108,0
12	Cisplatine + 15 Gy	21-200 (2) [§]	$75,4 \pm 62,6^{\xi}$	47,5	194,6 ^ξ	90,0

Tableau IV-32 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats traités par injection intracérébrale de drogue platinée, combinée ou non à une irradiation haute énergie (6 MV). L'inoculation de 10^3 cellules F98 correspond à J0 ; la chimiothérapie (20 μ g de carboplatine ou 6 μ g de cisplatine dans 20 μ l) a été délivrée à J13 par CED (0,5 μ l/min) ; la radiothérapie a été effectuée à J14 sur un irradiateur médical. N^a donne le nombre de rats par groupe ; [§] indique la fin de l'expérience (J200) et le chiffre entre parenthèses précise le nombre de rats toujours vivants à cette date ; ^ξ signale que la moyenne est *biaisée*.

IV.2.7.3.1 Carboplatine suivi ou non de 15 Gy

Aucun rat n'est décédé précocement du fait de l'injection CED de 20 μ g de carboplatine (1 seul est décédé en même temps que le 1^{er} témoin non traité). Les survies moyenne et médiane sont respectivement de $49,7 \pm 27,0$ et 37,5 jours pour le groupe carboplatine seul, ce qui correspond à des ILS de 94,0 et 50,0 %. L'efficacité de ce traitement (par rapport au groupe non traité) est significative : $p_{LR} = 0,0007$ et $p_W = 0,0021$. Pour le groupe carboplatine+15 Gy, la MeST est 52 jours ce qui représente un ILS = 108,0 % par rapport aux non traités, et un ILS = 38,7 %, par rapport au groupe traité par carboplatine seul (Tableau IV-33). La survie moyenne est *biaisée* puisque 2 rats (soit 16,7 %) sont toujours en vie à la fin de l'étude, elle vaut $76,3 \pm 59,9$ jours, soit un ILS de 198,2 % (relatif aux non traités). On notera que la différence est significative si on compare ce traitement au groupe de radiothérapie ($p_{LR} = 0,0009$ et $p_W = 0,0045$), mais qu'elle ne l'est pas par rapport au groupe ayant reçu uniquement 20 μ g de carboplatine ($p_{LR} = 0,2205$ et $p_W = 0,1550$).

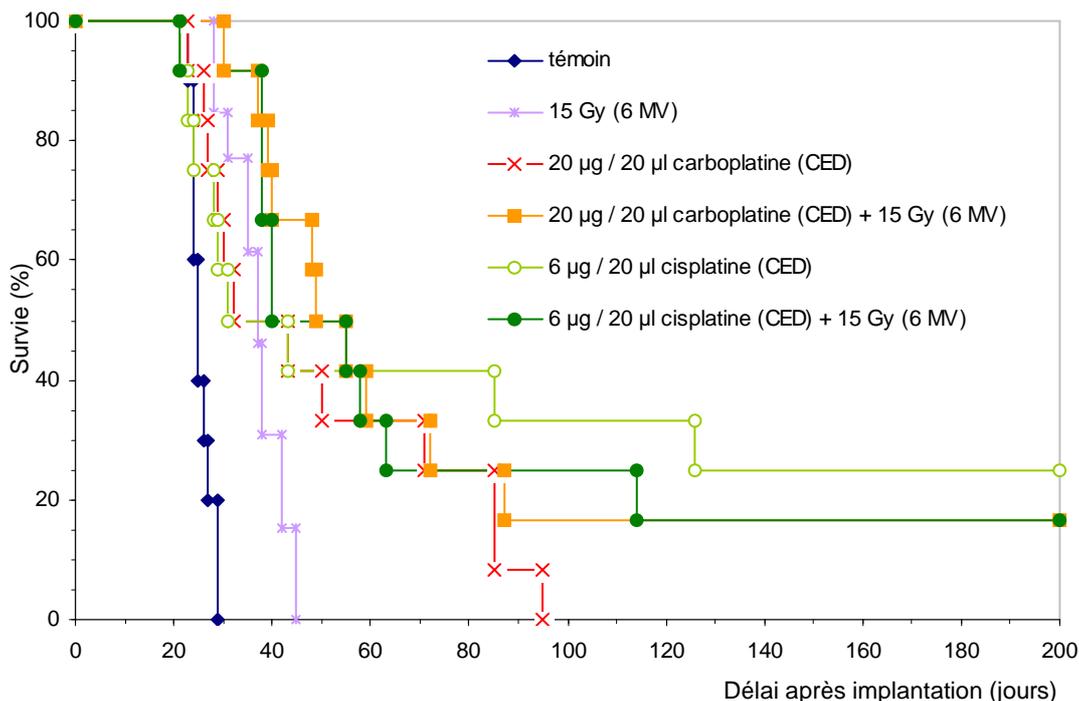


Figure IV-28 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par : une irradiation haute énergie (6 MV) de 15 Gy (-), une injection i.c. de carboplatine (×), une injection i.c. de cisplatine (○), une injection de carboplatine suivie de 15 Gy (■), ou un injection de cisplatine suivie de 15 Gy (●). Les temps de survie sont indiqués en jours après inoculation de 10^3 cellules F98 (J0). La chimiothérapie est administrée à J13 par CED, le dosage est précisé en masse de drogue/volume injecté. La radiothérapie est délivrée en fraction unique à J14, sur un irradiateur médical (6 MV).

IV.2.7.3.2 Cisplatine suivie ou non de 15 Gy

Parmi les 24 rats ayant reçu 6 µg de cisplatine, 2 sont décédés précocement à J21 (et 1 à J23). Il est important de souligner que pour ce dosage de cisplatine, on observe 3 rats (25 %) survivants à long terme et 2 rats (16,7 %) dans le cas où la chimiothérapie est suivie d'une irradiation de 15 Gy. La survie moyenne *biaisée* du groupe de chimiothérapie seule est de $84,2 \pm 76,3$ jours soit ILS = 228,8 %, celle du traitement combiné est de $75,4 \pm 62,6$ jours soit ILS = 194,6 %. La survie médiane du traitement combiné (47,5 jours soit ILS = 90 %) est plus élevée que celle de chimiothérapie seule (37 jours soit ILS = 48 %). Les intervalles de survie sont identiques [21-200 jours] et le test de Wilcoxon entre ces 2 traitements donne un $p_w = 0,6204$, non significatif.

IV.2.7.3.3 Comparaison cisplatine et carboplatine

Pour les groupes de chimiothérapie, bien que l'on observe 3 rats survivants à long terme avec le cisplatine, et aucun avec le carboplatine, le test de Wilcoxon révèle une différence non significative ($p_w = 0,7513$) car les courbes de survie sont superposées au départ (d'où une MeST équivalente). On remarquera que les traitements combinés se comportent de façon très similaire :

intervalles de survie semblables, MeST très proches et MST identiques, même nombre de rats survivants à long terme, courbes de survie superposées ; le test de Wilcoxon effectué entre ces 2 traitements donne un $p_w = 0,7515$, non significatif. Il est important de noter que pour ces deux traitements combinés (cisplatine ou carboplatine), les tests statistiques révèlent une différence non significative par rapport à la chimiothérapie correspondante (voir Tableau IV-33).

Groupe référence	(a) Traitement combiné avec cisplatine ^ξ			(b) Traitement combiné avec carboplatine ^ξ		
	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_w	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_w
Témoin non traité	194,6	90,0	∅ et 0,0002	198,2	108,0	<0,0001
15 Gy (6 MV)	103,8	28,4	∅ et 0,0196	106,3	40,5	0,0009 et 0,0035
Chimiothérapie ^ξ	-10,4	28,4	∅ et 0,6204	53,7	38,7	0,2205 et 0,1550

Tableau IV-33 : Comparaison des traitements combinés avec les groupes non-traité, radiothérapie (15 Gy fraction unique ; 6 MV) et chimiothérapie (cisplatine 6 µg/20 µl, MST *biaisée* pour *a* ou carboplatine 20 µg/20 µl pour *b*). Les pourcentages d'augmentation de survie (ILS) sont calculés par rapport aux survies moyenne et médiane du groupe de référence. Les tests du Log-rank et de Wilcoxon indiquent une différence significative si $p < 0,05$; ∅ signale que le test du Log-rank n'est pas pertinent. ^ξ précise que la MST du groupe est *biaisée*.

IV.2.7.4 Conclusion

Les essais avec du cisplatine confirment qu'un volume de 20 µl est approprié pour injecter une drogue platinée à J13 par CED. On retrouve le problème décrit au paragraphe IV.2.3.4, p.124 et rencontré également par Degen *et al.*, c'est-à-dire que certains rats traités par chimiothérapie décèdent rapidement (dans le même intervalle que les témoins) alors que d'autres survivent à long terme ou sont toujours vivants à la fin de l'étude, ce qui tendrait à prouver que la tumeur n'est pas toujours parfaitement perfusée.

Les résultats obtenus avec le carboplatine confirment que l'efficacité du traitement combiné est étroitement liée à celle de la chimiothérapie et donc à la distribution de l'agent antinéoplasique. Ceux obtenus avec le cisplatine renforcent cette hypothèse, puisque les résultats chimiothérapie et chimio-radiothérapie ne sont pas statistiquement différents, avec plus de survivants à J200 observés pour 6 µg/20 µl de cisplatine. Le nombre de survivants à long terme pour le cisplatine seul (3/12) représente 25 % des rats de ce groupe, pourcentage élevé si on le compare aux meilleurs résultats décrits jusqu'à ce jour dans la littérature, sur le modèle F98 [Barth 2000; Biston 2004a,b; Rousseau 2007b].

Une comparaison des traitements par irradiation X haute énergie (6 MV) présentés ici avec la radiothérapie synchrotron est proposé au § IV.2.8.4.2 p.160.

IV.2.8 Carboplatine, cisplatine ou IUdR associé à une irradiation de 15 Gy (*SSR*)

IV.2.8.1 Objectifs de l'étude et groupes de traitement

Le premier point important était de pouvoir comparer les résultats de cette étude en mode *SSR*, avec ceux de l'étude précédente réalisée à haute énergie (6 MV). Le second était de reproduire l'étude faite avec les pompes (carboplatine), mais cette fois-ci en inoculant 1000 cellules gliomales F98. D'autre part, nous souhaitions réaliser un essai thérapeutique pré-clinique avec de l'IUdR. Comme explicité au chapitre II.3.4.4 p.49, il est particulièrement important dans le cas de l'IUdR, de laisser les cellules tumorales en contact avec cet agent pendant plusieurs jours (pour couvrir temporellement plusieurs cycles cellulaires). Par conséquent, les injections par pompe osmotique nous ont semblées appropriées. Enfin, du fait de l'imagerie (*post* traitement) effectuée lors des études *SSR* précédentes pour vérifier la présence de la tumeur, nous avons choisi d'agrandir notre volume d'irradiation.

Les groupes de traitements sont donc les suivants :

- chimiothérapie par CED (débit 0,5 µl/min) délivrée à J13 : 6 µg de cisplatine (dans 20 µl) ; 20 µg de carboplatine (dans 20 µl) ;
- chimiothérapie carboplatine par pompe osmotique (*a.p.*) : une solution à 0,5 mg/ml (dilution dans du glucose à 5 %) est infusée avec un débit de 1 µl/heure pendant 6 jours (la pompe est implantée à J7 et retirée à J13) ;
- IUdR par pompe osmotique : une solution à 20 mg/ml (dans 50 % de DMSO) est infusée à un débit de 1 µl/heure pendant 6 jours (pompe implantée à J7 et retirée à J13) ;
- radiothérapie : 15 Gy délivrés en mode *SSR*-78,8 keV
- 4 groupes de chimio-radiothérapie : chacun correspond à une injection (parmi les 4 décrites : cisplatine par CED, carboplatine par CED ou pompe osmotique, IUdR par pompe osmotique), suivie d'une irradiation de 15 Gy (*SSR*) à J14. L'énergie est de 50 keV (groupe IUdR) ou 78,8 keV (groupes recevant une drogue platinée).

IV.2.8.2 Matériels et méthodes

IV.2.8.2.1 Implantations, injections et irradiations

Les rats sont anesthésiés par une inhalation brève d'isoflurane suivie d'une injection intrapéritonéale d'un mélange xylazine-kétamine. Les 1000 cellules gliomales F98 sont inoculées suivant la méthode décrite au paragraphe IV.2.6.2.1, p.138 (milieu agarosé), les paramètres importants sont rappelés dans le Tableau IV-34. Les injections par CED sont réalisées en plaçant

l'aiguille (32 gauge ; seringue Hamilton *gastight* de 50 μl : 1705 RN) aux coordonnées d'implantation de la tumeur. Le pousse seringue (KDS 310, GENEQ inc.) est réglé sur un débit de 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Les pompes osmotiques sont implantées à J7 et retirées à J13 comme décrit § IV.2.6.2.2, p.139. Les paramètres des irradiations réalisées à l'ESRF sur la ligne médicale (en mode tomographie) sont explicités dans le Tableau IV-35.

injecteur	seringue	durée d'injection	agarose	volume	nbr de cellules	profondeur
36,41 $\mu\text{l}/\text{min}$	Hamilton 702 N	minutes	oui	10 μl	1000	-5,0 mm

Tableau IV-34 : Paramètres d'inoculation des cellules tumorales F98 (mars 2007).

Dose [Gy]	Energie [keV]	Volume irradié			Film GafChromic
		Nombre de coupes	Hauteur du faisceau [mm]	Largeur du faisceau [mm]	
15	50 (ou 78,8)	15	1 mm	10	oui

Tableau IV-35 : Paramètres d'irradiation SSR.

IV.2.8.2.2 Préparation spécifique de l'IUdR

L'IUdR stable 5-iodo-2'désoxyuridine ($^{127}\text{IUdR}$) se présente sous forme de poudre (Sigma-Aldrich ; Fluka BioChemika, $\geq 98,0\%$). Il est tout d'abord solubilisé dans du DMSO (diméthylsulfoxyde ; Sigma-Aldrich). La concentration finale (20 mg/ml dans 50 % DMSO) est obtenue en ajoutant de l'eau stérile. Une fois remplies, les pompes sont conservées dans le noir.

IV.2.8.3 Résultats

Les données de survie de l'étude complète sont résumées dans le Tableau IV-36. Sauf précisé, les pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) sont calculés relativement à la survie médiane (MeST) ou moyenne (MST) du groupe non traité. Après inoculation de 1000 cellules F98, la survie médiane des rats non traités est 24 jours et la survie moyenne est $23,4 \pm 3,9$ jours. Pour le groupe 15 Gy (fraction unique à J14), la MeST est de 44,5 jours (ILS = 85,4 %) et la MST de $44,4 \pm 9,4$ jours (ILS = 90,0 %) ; avec $p < 0,0001$.

N ^a	Catégorie	Survie (jours après implantation)			% ILS	
		intervalle	moyenne \pm stdev	médiane	moyenne	médiane
17	Témoin	18-29	$23,4 \pm 3,9$	24,0	-	-
11	Cisplatine CED	25-43	$32,3 \pm 5,0$	32,0	38,2	33,3
11	Carboplatine CED	21-43	$29,1 \pm 7,7$	25,0	24,6	4,2
13	Carboplatine <i>o.p.</i>	18-200 (3) [§]	$70,5 \pm 74,8^{\xi}$	30,0	201,7 ^ξ	25,0
12	IUdR <i>o.p.</i>	17-54	$35,3 \pm 13,0$	32,0	50,9	33,3
8	15 Gy*	31-57	$44,4 \pm 9,4$	44,5	90,0	85,4
11	Cisplatine CED + 15 Gy*	17-200 (2) [§]	$73,8 \pm 64,5^{\xi}$	56,0	216,1 ^ξ	133,3
12	Carboplatine CED + 15 Gy*	28-86	$48,5 \pm 16,9$	48,0	107,7	100,0
11	Carboplatine <i>o.p.</i> + 15 Gy*	24-200 (6) [§]	$144,9 \pm 71,4^{\xi}$	200,0 ^ξ	520,5 ^ξ	733,3 ^ξ
10	IUdR <i>o.p.</i> + 15 Gy**	18-69	$44,5 \pm 17,6$	46,0	90,6	91,7

Tableau IV-36 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats traités par injection intracérébrale de carboplatine, cisplatine ou IUdR, combinée ou non à une irradiation SSR de 15 Gy (*78,8 keV ou **50 keV). *o.p.* signifie pompe osmotique. L'inoculation des 10^3 cellules F98 correspond à J0. La chimiothérapie est délivrée à J13 par CED (0,5 μ l/min ; cisplatine : 6 μ g/20 μ l ; carboplatine : 20 μ g/20 μ l) ou de J7 à J13 par *o.p.* (1 μ l/h ; carboplatine : 0,5 mg/ml ; IUdR : 20 mg/ml). La radiothérapie est administrée à J14. N^a donne le nombre de rats par groupe ; § indique la fin de l'expérience (J200) et le chiffre entre parenthèses précise le nombre de rats toujours en vie à cette date ; ^ξ signale une valeur *biaisée*.

IV.2.8.3.1 IUdR seul ou combiné à 15 Gy

Les courbes de survie sont présentées Figure IV-29. Parmi les 22 rats ayant reçu de l'IUdR, un seul est décédé précocement à J17 (un autre à J18). L'IUdR, perfusé par pompe osmotique pendant 6 jours, a un effet thérapeutique sur la survie des rats puisque les survies médiane (32 jours ; ILS = 33,3 %) et moyenne ($35,3 \pm 13,0$; ILS = 50,9 %) sont supérieures à celles des témoins, avec un $p_w = 0,0276$. Si on observe le groupe ayant reçu la combinaison IUdR + 15 Gy

(SSR ; 50 keV), les survies médiane et moyenne sont de 46,0 et $44,5 \pm 17,6$ jours respectivement, ce qui représente des ILS élevés (91,7 et 90,6 %) (Tableau IV-37); les tests statistiques donnent des $p_{LR} = 0,0003$ et $p_W = 0,0033$ (significatifs). Si on compare maintenant ce groupe²³ à celui ayant reçu la dose de 15 Gy (78,8 keV), on remarque que la différence n'est pas significative car $p_W = 1,000$ (Tableau IV-37); elle ne l'est pas non plus relativement au groupe IUdR seul ($p_W = 0,2136$).

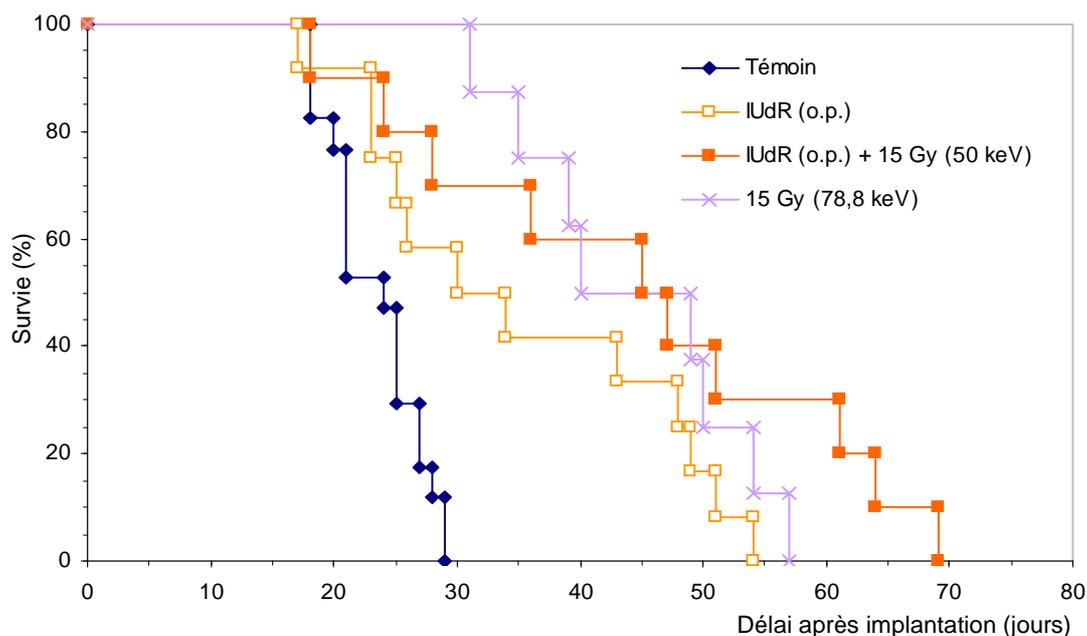


Figure IV-29 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par : irradiation de 15 Gy à 78,8 keV (x), injection d'IUdR par pompe osmotique (□), injection d'IUdR par pompe osmotique suivie de 15 Gy à 50 keV (■). Les temps de survie sont indiqués en jours après inoculation de 10^3 cellules F98 (J0). L'IUdR est délivré de J7 à J13 (20 mg/ml – 1 µl/h), la radiothérapie SSR à J14 (fraction unique).

Groupe référence	Traitement combiné IUdR et 15 Gy (50 keV)		
	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_W
Témoin non traité	90,6	91,7	0,0003 et 0,0033
SSR 15 Gy (78,8 keV)	0,3	3,4	∅ et 1,0000
IUdR (0,5 mg/ml – 1 µl/h)	26,2	43,8	∅ et 0,2136

Tableau IV-37 : Efficacité thérapeutique de la chimio-radiothérapie par rapport aux groupes non-traité, radiothérapie (15 Gy fraction unique ; SSR-78,8 keV) et chimiothérapie (IUdR par pompe osmotique : 20 mg/ml – 1 µl/h pendant 6 jours). Les pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) sont calculés par rapport aux survies moyenne et médiane du groupe référence. Les tests de Log-rank et Wilcoxon indiquent une différence significative si $p < 0,05$. ∅ signale que le test du Log-rank n'est pas pertinent.

²³ Lors des études précédentes menées au laboratoire, il a été montré qu'une dose de 15 Gy à 78,8 keV était équivalente à une dose de 15 Gy à 50 keV.

IV.2.8.3.2 Cisplatine seul ou combiné à 15 Gy

Les courbes de survie sont présentées Figure IV-30. On notera qu'un rat traité par cisplatine 6 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$, suivi de 15 Gy est décédé précocement à J17. L'effet thérapeutique du cisplatine sur la survie des rats est faible relativement au groupe non traité (MST : $32,3 \pm 5$ jours et MeST : 32 jours ; Tableau IV-36), mais toute de même significatif puisque $p < 0,0001$. Concernant le traitement par chimio-radiothérapie, la survie médiane est de 56 jours (ILS : 133,3 %). La survie moyenne est de $73,8 \pm 64,5$ jours (ILS : 216,1 %) ; cette valeur calculée est *biaisée* puisque 2 rats sur 11 (soit 18 %) étaient toujours en vie à la fin de l'étude (J200). Toujours pour le traitement combiné, les résultats de survie sont statistiquement différents relativement aux groupes non traité et chimiothérapie ($p_w = 0,0027$ et $0,0094$, respectivement), voir Tableau IV-38; ils ne le sont pas comparés au groupe radiothérapie seule ($p_w = 0,2573$).

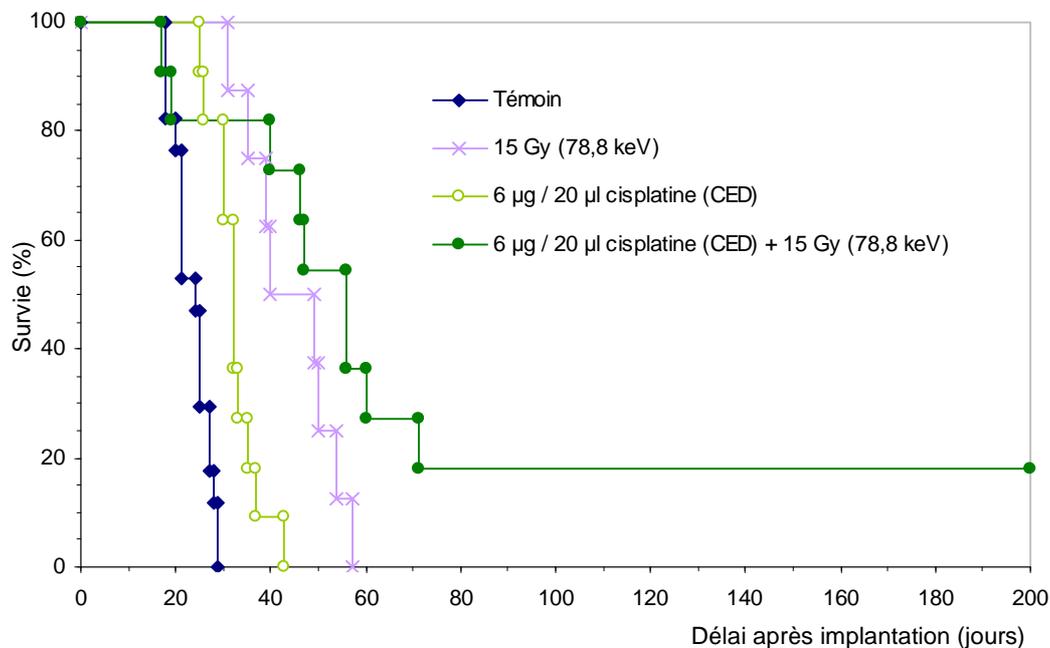


Figure IV-30 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par : irradiation de 15 Gy (x), injection i.c. de cisplatine (o), injection i.c. de cisplatine suivie de 15 Gy (●). Les temps de survie sont indiqués en jours après inoculation de 10^3 cellules F98 (J0). La chimiothérapie est administrée à J13 par CED (0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$), le dosage est précisé en masse de cisplatine/volume injecté. La radiothérapie est délivrée à J14 (mode SSR – 78,8 keV - fraction unique).

Groupe référence	Traitement combiné 6 µg/20 µl de cisplatine et 15 Gy [§]		
	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_W
Témoin non traité	216,1	133,3	∅ et 0,0027
SSR 15 Gy (78,8 keV)	66,4	25,8	∅ et 0,2573
Chimiothérapie cisplatine (6 µg/20 µl)	128,7	75,0	∅ et 0,0094

Tableau IV-38 : Efficacité thérapeutique de la chimio-radiothérapie par rapport aux groupes non-traité, radiothérapie (15 Gy fraction unique ; SSR-78,8 keV) et chimiothérapie (6 µg/20 µl de cisplatine par CED). Les pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) sont calculés par rapport aux survies moyenne et médiane du groupe référence. Le test de Wilcoxon indique une différence significative si $p < 0,05$ et ∅ signale que le Log-rank n'est pas pertinent. [§] La moyenne du groupe est *biaisée*.

IV.2.8.3.3 Carboplatine délivré par CED ou pompe osmotique, seul et combiné à 15 Gy

Les courbes de survie sont présentées Figure IV-31, les données de survies correspondantes sont décrites Tableau IV-36. La comparaison du traitement combiné (carboplatine par CED ou pompe osmotique [o.p.] suivi de 15 Gy) avec chacune des modalités (chimiothérapie ou radiothérapie) est explicitée Tableau IV-39.

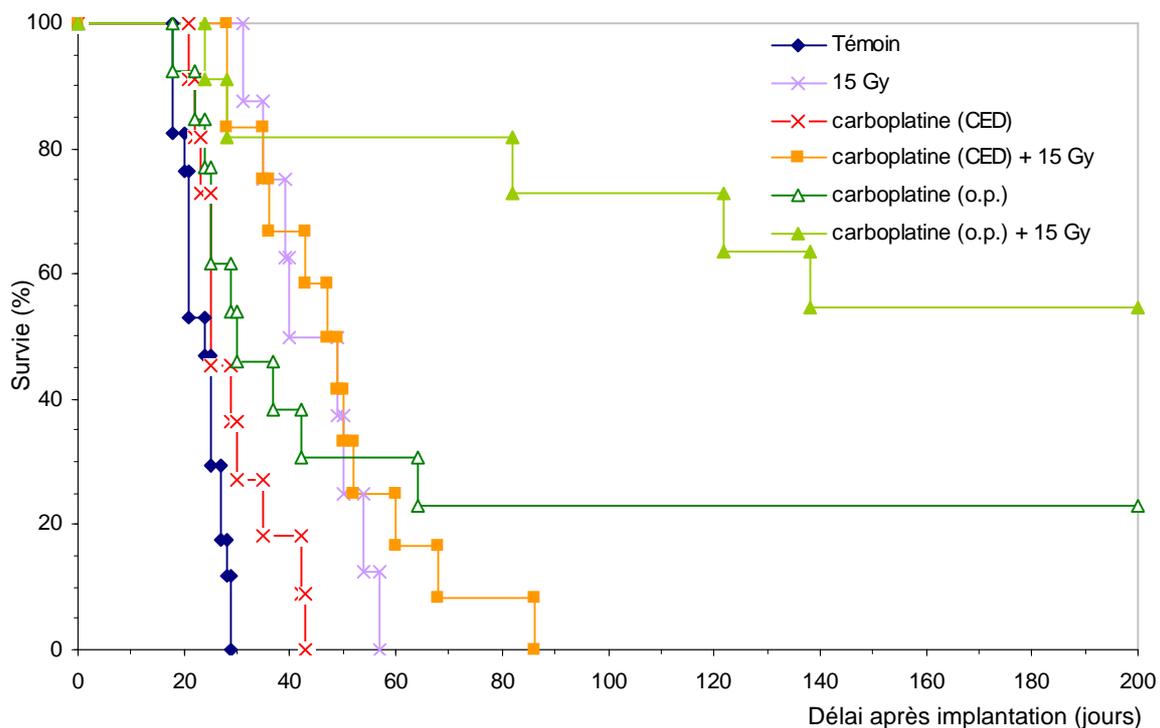


Figure IV-31 : Courbes de Kaplan Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par : irradiation de 15 Gy (×), injection i.c. de carboplatine par CED (×) ou pompe osmotique (o.p.) (Δ), injection de carboplatine par CED suivie de 15 Gy (■), injection de carboplatine par o.p. associée à 15 Gy (▲). Les temps de survie sont indiqués en jours après inoculation de 10^3 cellules F98 (J0) ; la chimiothérapie est administrée à J13 pour la CED (20 µg dans 20 µl - 0,5 µl/min) et de J7 à J13 pour les o.p. (0,5 mg/ml - 1 µl/h) ; la radiothérapie est délivrée en fraction unique à J14, en mode SSR (à 78,8 keV).

Résultats de survie obtenus par CED :

On remarquera que sur les 23 rats ayant reçu du carboplatine (20 µg/20 µl à J13) par CED, aucun n'est décédé avant le premier non traité. Le carboplatine seul a peu d'effet sur la survie des rats relativement au groupe non traité, puisque les MST et MeST sont respectivement de $29,1 \pm 7,7$ et $25,0$ jours. Les tests statistiques révèlent une différence tout de même significative ($p_{LR} = 0,0178$ et $p_W = 0,0404$). Pour le traitement combiné (carboplatine + 15 Gy), les survies médianes et moyennes sont beaucoup plus élevées : $48,0$ et $48,5 \pm 16,9$ jours. La différence est significative par rapport au groupe non traité ($p < 0,0001$) ou chimiothérapie ($p < 0,001$), mais elle ne l'est pas comparé au groupe radiothérapie ($p_W = 0,7884$), voir Tableau IV-39.

Résultats de survie après injection par pompe osmotique :

On commencera par souligner le nombre de rats toujours en vie à la fin de l'étude : 3 sur 13 (*i.e.* 23 %) pour le groupe ayant reçu uniquement du carboplatine par *o.p.* et 6 sur 11 (*i.e.* 55 %) pour ceux traités par carboplatine (*o.p.*) suivi de 15 Gy. Les survies moyennes associées à chacun de ces 2 groupes sont donc *biaisées* et très élevées : $70,5 \pm 74,8$ jours (ILS : 201,7 %) pour le carboplatine seul et $144,9 \pm 71,4$ jours (ILS : 510,5 %) s'il est combiné à 15 Gy. Le point remarquable est la survie médiane *biaisée* (200 jours, soit ILS : 733,3 %) pour la chimio-radiothérapie puisque plus de la moitié des rats du groupe (*i.e.* 6/11) sont toujours vivants à la fin de l'étude (J200). La survie des rats de ce groupe est statistiquement différentes du groupe non traité ($p < 0,0001$), de la radiothérapie seule ($p_W = 0,00116$), ainsi que de la chimiothérapie seule (p légèrement $< 0,05$).

Groupe référence	(a) Traitement combiné Carboplatine par CED			(b) Traitement combiné Carboplatine par pompe osmotique [§]		
	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_W	%ILS (moyenne)	%ILS (médiane)	p_{LR} et p_W
Témoin non traité	107,7	100,0	$< 0,0001$	520,5	733,3	$< 0,0001$
15 Gy (78,8 keV)	9,3	7,9	Ø et 0,7884	226,6	349,4	Ø et 0,0116
Chimiothérapie	66,7	92,0	0,0004 et 0,0008	105,7	566,7	0,0472 et 0,0362

Tableau IV-39 : Comparaison des traitements combinés (pompe osmotique et CED) avec les groupes non traité, radiothérapie (fraction unique de 15 Gy ; mode SSR-78,8 keV) et chimiothérapie (CED pour *a*, pompe osmotique [*o.p.*] pour *b*). Les pourcentages d'augmentation de survie (ILS) sont calculés par rapport aux survies moyenne et médiane du groupe référence. Les tests du Log-rank et de Wilcoxon indiquent une différence significative si $p < 0,05$; Ø signale que le test du Log-rank n'est pas pertinent. [§] La MST du groupe chimiothérapie par *o.p.* ainsi que les MeST et MST du groupe combiné (b) sont *biaisées*.

IV.2.8.4 Comparaison avec les résultats précédents, discussion et conclusion

IV.2.8.4.1 IUdR

Grâce aux pompes osmotiques, les cellules tumorales sont alimentées par les molécules d'IUdR en continu pendant 6 jours. Un effet réel de chimiothérapie est observable, non seulement par l'étude de la survie des rats (ILS médian : 33,3 % ; $p < 0,03$), mais également par l'imagerie *post-traitement* puisque les tumeurs ont régressé (par rapport aux rats non traités) voire disparu (*i.e.* elles ne sont plus détectables) [Rousseau 2007c]. On remarquera que cette efficacité thérapeutique de l'IUdR n'a été observée que pour de l' $^{125}\text{IUdR}$ radioactif [Kassis 1998] et non pour de l' $^{127}\text{IUdR}$ stable [Deutsch 1989; 1990], voir paragraphe II.3.4.5 p.51. L'augmentation significative de la survie (ILS : 91,7 %) pour la combinaison $^{127}\text{IUdR}$ et irradiation X, est cohérente avec les résultats obtenus par Harrington *et al.* (source ^{137}Cs ; [Harrington 2004]) ou Deutsch *et al.* (irradiation 4 MV). Par contre, le traitement combiné n'est pas significativement différent de la radiothérapie seule ou de l'injection d'IUdR seul ce qui est beaucoup plus surprenant. Il est possible que la chimiothérapie masque l'effet Auger et que l'association IUdR - radiothérapie conduise à une forte toxicité. Il serait intéressant de poursuivre ces essais avec de l'IUdR en injection prolongée, en optimisant la dose d'IUdR et en investiguant la toxicité de ce produit lorsqu'il est injecté par voie intra-cérébrale. Une autre voie de recherche serait également de fractionner la dose d'irradiation, comme montré par Doiron *et al.* avec des polymères de BrdUrd [Doiron 1999] ou Harrington *et al.* avec des liposomes (PLIUdR) [Harrington 2004].

IV.2.8.4.2 Cisplatine et carboplatine : comparaison haute énergie et SSR

On essaiera ici de comparer les résultats de survie de cette étude avec ceux de la précédente où les irradiations ont été effectuées à haute énergie ($p_{LR} = 0,3767$ et $p_w = 0,1908$ entre les courbes de survie témoin de chaque étude). Tout d'abord, on note que comme dans le cas du traitement fractionné (3×8 Gy), l'irradiation seule (15 Gy, fraction unique) est légèrement plus efficace en mode SSR (MST et MeST = 44,5 jours) qu'à haute énergie (MST et MeST = 37 jours) ; $p_{LR} = 0,0301$ (significatif), $p_w = 0,0805$ (non significatif). Cela peut venir des géométries d'irradiation qui varient : protégeant différemment les tissus sains et concentrant plus ou moins la dose au niveau de la masse tumorale.

On constate que les traitements par cisplatine seul ne diffèrent pas statistiquement ($p_w = 0,6419$; MeST = 37 et 32 jours), bien que 3/12 rats (*i.e.* 25 %) survivent à long terme dans la première étude et aucun dans la seconde. Cette différence au niveau du nombre de survivants à long terme souligne la difficulté de répéter des résultats de survie lorsque l'on considère des petites séries

d'animaux. Concernant les traitements combinés, 17 % et 18 % des rats sont toujours en vie à la fin de l'étude pour l'irradiation à haute énergie ou en mode SSR, respectivement. (avec un nombre de décès précoces identique) et les deux courbes se superposent parfaitement ($p_w = 0,8057$) (voir Figure IV-32 à droite). Quant au carboplatine, s'il est administré seul, les résultats de survie sont statistiquement différents ($p_{LR} = 0,0135$; $p_w = 0,0227$), soulevant à nouveau le problème de la reproductibilité quand il s'agit de petites séries. S'il est suivi d'une irradiation de 15 Gy, bien que 17 % des rats soit toujours en vie à la fin de l'étude haute énergie et aucun en mode SSR, la différence entre les 2 traitements n'est pas significative ($p_{LR} = 0,1504$; $p_w = 0,2609$), voir Figure IV-32 à gauche.

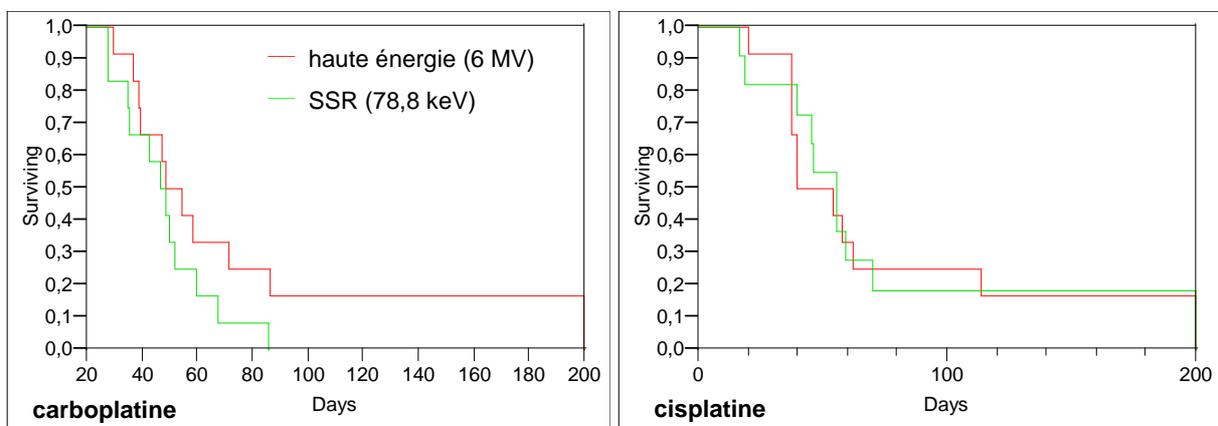


Figure IV-32 : Comparaison des traitements de chimio-radiothérapie par rayonnement haute énergie (6 MV) ou basse énergie monochromatique (mode SSR ; 78,8 keV). L'inoculation de 10^3 cellules F98 correspond à J0 ; la chimiothérapie carboplatine (20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) ou cisplatine (6 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) est administrée par CED (0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$) à J13 ; la radiothérapie est délivrée en fraction unique à J14.

IV.2.8.4.3 Pompes osmotiques

Les résultats obtenus en délivrant le carboplatine par pompe osmotique confirment les précédents obtenus après inoculation de 4000 cellules : ce moyen d'injection prolongé permet un traitement par chimiothérapie particulièrement efficace, qui sera renforcé s'il est suivi d'une irradiation. Les résultats de survie obtenus, MeST *biaisée* de 200 jours et 55 % de rats survivants à long terme sont particulièrement encourageants et parmi les meilleurs connus à ce jour sur ce modèle F98.

IV.3 Quantification

L'injection intracérébrale d'un agent pharmacologique (IUdR ou drogue platinée) suivie d'une irradiation soulève plusieurs questions : quel est le volume couvert par la drogue injectée en fonction de la méthode d'injection ; quelle est la quantité d'atomes incorporés (I ou Pt) par gramme de matière dans la tumeur par rapport aux tissus sains que l'on souhaite protéger ; où sont situés les atomes lourds à l'échelle tissulaire, intracellulaire ou intra-ADN. Pour tenter d'apporter quelques éléments de réponse, nous avons fait appel à plusieurs techniques d'analyse : HPLC-MS/MS (chromatographie haute performance couplée à un spectromètre de masse en mode tandem) pour connaître le taux d'adduits avec l'ADN, Nano-SIMS (spectrométrie de masse d'ions secondaires) pour obtenir une image élémentaire non quantitative de l'élément à l'échelle cellulaire, PIXE (fluorescence X induite par particules chargées) pour mesurer la concentration élémentaire sur une coupe, ICP-MS (spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif) pour quantifier les atomes présents dans différentes zones d'intérêt du cerveau, La-ICP-MS (ablation laser associée à de l'ICP-MS) pour imager la distribution élémentaire sur une coupe.

IV.3.1 Détection des adduits de l'ADN par HPLC-MS/MS

Cette étude préliminaire par HPLC-MS/MS a été réalisée au laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques (CEA, Grenoble) avec le Dr J.L. Ravanat. L'objectif était de déterminer le nombre d'adduits formés *in vivo* par chimiothérapie en fonction du type de traitement intra-cérébral utilisé.

IV.3.1.1 Présentation de la technique

IV.3.1.1.1 Qu'est-ce que la méthode HPLC-MS/MS ?

La chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse en mode tandem ou HPLC-MS/MS, est une méthode analytique permettant le dosage des lésions de l'ADN (*i.e.* adduits avec le platine ou l'IUdR dans notre cas). Elle nécessite une extraction puis une digestion de l'ADN des cellules. Les molécules à détecter sont tout d'abord séparées par chromatographie HPLC avant d'être ionisées par une source de type électrospray (ESI). Les molécules ionisées sont détectées en fonction de leur rapport masse sur charge (m/Z) dans un premier analyseur de type quadripôle. L'ion d'intérêt sélectionné traverse ensuite une cellule de collision induisant sa fragmentation et les fragments obtenus (appelés *ions fils*) sont analysés grâce à un deuxième quadripôle [Frelon 2000; Badouard 2005; Badouard 2006].

La colonne de chromatographie (HPLC) est couplée à la fois au spectromètre de masse (API 3000, Applied Biosystems, Toronto, Canada) en mode tandem, qui détecte les lésions de

l'ADN et à un détecteur UV (type HP 1100 series) qui permet le dosage des nucléosides normaux de l'ADN.

IV.3.1.1.2 Comment détecter les adduits de platine?

Une fois extrait des cellules puis digéré en nucléosides par hydrolyse enzymatique, l'hydrolysate est injecté dans la colonne HPLC. Les nucléosides platinés (présents à l'état de trace) sont détectés par spectrométrie de masse en mode tandem tandis que les nucléosides normaux sont dosés par spectrométrie UV. Cela permet de déterminer la quantité d'adduits présents dans l'ADN par nombre de nucléosides normaux [Jet 2005]. Les adduits recherchés et quantifiés sont, suite au traitement par cisplatine ou carboplatine, les ponts intrabrin entre 2 guanines adjacentes (GPtG) qui représentent 80 à 90 % des adduits du cisplatine [Iijima 2004]. La même approche est utilisée pour déterminer si l'IUdR est incorporé dans l'ADN des cellules traitées. La limite de détection par cette méthode HPLC-MS/MS est d'environ 0,5 lésion/million de nucléosides normaux.

IV.3.1.2 Préparation spécifique des échantillons

IV.3.1.2.1 Traitements testés

Nous souhaitons évaluer le nombre d'adduits de l'ADN formés par le platine, et l'efficacité d'incorporation de l'IUdR, en fonction du type de traitement utilisé : injection de cisplatine, carboplatine ou IUdR, par CED ou pompe osmotique. La technique d'analyse nécessitant d'avoir une quantité suffisante de matière, nous avons décidé de ne pas nous placer en conditions de traitement (*i.e.* J13 ou 14 où la tumeur ne mesure qu'environ 20 mm³ d'après l'étude histologique de Fournier *et al.*) pour pouvoir travailler sur des tumeurs plus grosses (à J21, son volume est >100 mm³ [Fournier 2003]).

10³ cellules gliomales F98 en milieu agarosé ont été inoculées dans le noyau caudé droit de 5 rats Fischer 344 (profondeur : -5.0 mm), l'implantation tumorale correspond à J0. Chacun des rats a reçu l'un des 5 traitements suivants :

- IUdR par pompe osmotique : concentration de 20 mg/ml (poudre diluée dans une solution de NaOH à 0,05 M) délivrée à un débit de 1 µl/heure ;
- IUdR par CED : dosage de 400 µg/20 µl (poudre diluée dans une solution de NaOH à 0,05 M) délivrée à un débit de 0,5µl/min ;
- cisplatine par CED : dosage de 6 µg/20 µl (dilution dans du NaCl) injecté à 0,5 µl/min ;
- carboplatine par pompe osmotique : concentration de 0,5 mg/ml (solution initiale diluée dans du dextrose 5 %) délivrée à 1 µl/heure ;
- carboplatine par CED : dosage de 20 µg/20 µl (dilution dans du dextrose 5 %), injecté à 0,5 µl/min.

Les pompes (Alzet, modèle 2001) ont été implantées à J14 et laissées en place pendant 6 jours (jusqu'à J20) ; les injections par CED ont été réalisées à J20 (injecteur Geneq, débit 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, aiguille : 32 gauge).

Les 5 rats ont été euthanasiés par inhalation d'isoflurane à J21, c'est-à-dire 24 heures après la fin du traitement. Les cerveaux ont été prélevés immédiatement et conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV.3.1.2.2 Zones cérébrales analysées

Les cerveaux ont ensuite été découpés à froid ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) à l'aide d'une matrice en acrylique (Acrylic Coronal Brain Matrix, Harvard Apparatus) qui permet de réaliser des coupes coronales de cerveau de 1 mm d'épaisseur. Nous avons ainsi isolé 3 zones distinctes en nous repérant par rapport au point d'injection (Figure IV-33) :

- la zone tumorale : coupe coronale dans l'hémisphère droit de 6 mm d'épaisseur (3 mm de part et d'autre du point d'injection)
- zone ipsilatérale (supposée saine) : reste de l'hémisphère droit.
- zone controlatérale : hémisphère gauche complet.

Chacun des échantillons a ensuite été broyé, les membranes cellulaires ont été lysées (à l'aide d'un tampon de lyse spécifique) afin d'isoler les noyaux cellulaires, dont la membrane a également été lysée de manière à extraire l'ADN. Les autres macromolécules présentes dans les noyaux cellulaires (ARN, protéines) sont éliminées par hydrolyse (RNAses et protéase) ; l'ADN est isolé par précipitation et centrifugation suivant un protocole optimisé [Ravanat 2002].

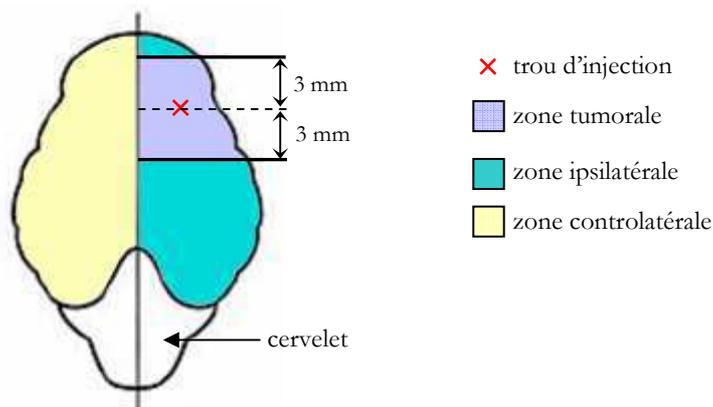


Figure IV-33 : Schéma des 3 zones cérébrales distinctes analysées par HPLC-MS/MS.

IV.3.1.3 Premiers résultats

Pour les échantillons ayant reçu l'IUdR, la présence d'un contaminant dans les échantillons d'ADN extrait n'a pas permis une détection et une analyse fiables. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence une incorporation d'IUdR dans l'ADN.

Concernant les adduits intrabrinns de platine (GPtG), ils ont pu être détectés uniquement dans les zones tumorales de deux échantillons traités : 5 adduits/ 10^6 nucléosides normaux dans le cas du cisplatine (6 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) par CED et 2 adduits/ 10^6 nucléosides normaux pour le carboplatine par pompe osmotique. Les zones ipsilatérales et controlatérales de ces échantillons contenaient donc moins de 0,5 lésions/ 10^6 nucléosides normaux. Pour l'échantillon traité par carboplatine (20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ - CED) aucune lésion n'a été détectée, pas même dans la zone tumorale. On notera que le taux d'ADN était faible ne facilitant pas l'analyse, et qu'il serait sans doute nécessaire d'optimiser le protocole d'extraction d'ADN.

Ces résultats préliminaires sont intéressants et mériteront d'être poursuivis. Une analyse de coupes plus fines au niveau de la zone tumorale serait nécessaire pour réaliser un profil de répartition des lésions par rapport au point d'injection et connaître l'étendue de cette distribution. Il serait également important d'évaluer sur des cultures cellulaires F98, la survie spécifique en fonction de l'exposition (temps et concentration) des cellules aux différentes drogues, platinées et IUdR. La quantification du nombre d'atomes intra-cellulaires par ICP-MS et intra-ADN (adduits pour le platine, substitutions pour l'IUdR) par HPLC-MS/MS devrait permettre d'établir la corrélation entre toxicité et contenu cellulaire. Pour le platine, cela nous permettrait de savoir si l'atome est capable de s'accumuler dans le noyau des cellules F98 ou s'il est présent partout de façon relativement homogène. Pour l'IUdR, ce travail pourrait permettre de savoir si un effet Auger est envisageable dans le cadre d'une irradiation.

IV.3.2 Microanalyse par spectrométrie de masse d'ions secondaires (Nano-SIMS)

Cette étude par nano-SIMS a été réalisée au Laboratoire de Microscopie Ionique (unité INSERM 759) de l'Institut Curie d'Orsay, en collaboration avec Ting-Din Wu et le Dr Jean-Luc Guerquin-Kern. L'objectif était de localiser au niveau cellulaire les atomes lourds présents (I ou Pt) après nos différents traitements par chimiothérapie.

IV.3.2.1 Présentation de la technique d'analyse par Nano-SIMS

Développée initialement à l'université d'Orsay, l'imagerie par spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) permet une analyse *in situ* destructive de l'échantillon. Elle est basée sur l'émission de particules secondaires (Figure IV-34), à partir des premières couches d'atomes de la surface (1-2 nm soit 2 à 3 couches d'atomes) d'un échantillon solide, bombardé par un faisceau d'ions primaires très énergétiques. L'impact entraîne la rupture des liaisons chimiques, libérant les atomes ou groupe d'atomes, sous forme neutre ou ionisée. Les ions extraits sont collectés et guidés vers un spectromètre de masse où ils sont triés en fonction de leur rapport masse/charge (m/Z). L'information topologique de l'échantillon étant conservée, les images obtenues sont représentatives de la distribution spatiale d'un ion spécifique au sein de la surface analysée. L'ensemble du système est maintenu sous ultra-vide.

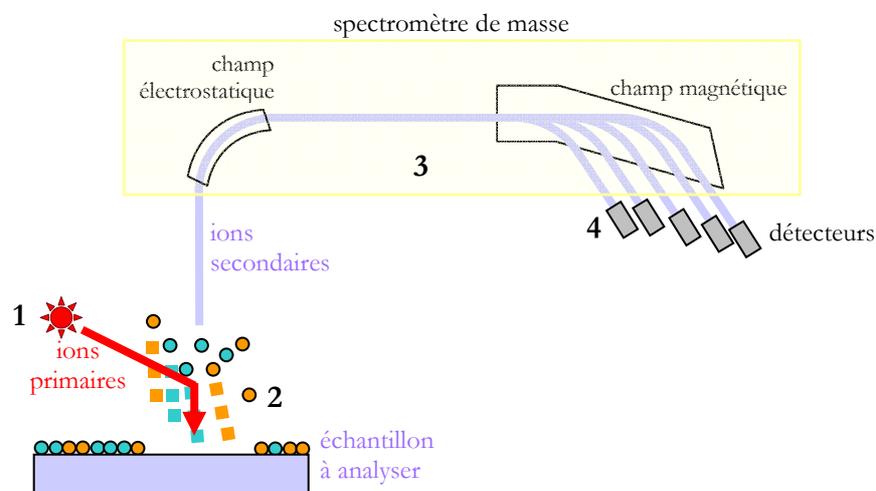


Figure IV-34 : Principe de fonctionnement de la nano sonde ionique. Les ions primaires émis par la source de bombardement ionique (1) érodent la cible (2). Les ions secondaires créés sont analysés et triés par spectrométrie de masse (3), avant d'être détectés (4).

La microsonde ionique Cameca *NanoSIMS 50* (Cameca S.A., Courbevoie, France) utilisée permet une résolution latérale de quelques dizaines de nm seulement (≤ 50 nm en ions primaires césium ; ≤ 150 nm en ions primaires oxygène), et donc une analyse ultra-structurale au niveau cellulaire. Les images sont obtenues en balayant cette sonde sur la surface à étudier. Il s'agit de l'une des

techniques d'analyse les plus sensibles, puisque la sensibilité est inférieure au ppm en mode spectrométrie et de l'ordre d'une centaine de ppm en mode imagerie (telle que celle pratiquée pour ces expériences). Grâce à un système de multidétection en parallèle, jusqu'à 5 masses différentes (types d'ions) provenant d'un même micro-volume peuvent être mesurées simultanément, assurant la détection des différents isotopes d'un seul élément et la superposition parfaite de plusieurs images. Pour une description détaillée de la microsonde et ses applications en tant que technique d'imagerie, on pourra se reporter à [Guerquin-Kern 2004; 2005].

IV.3.2.2 Préparation spécifique des échantillons

La préparation des échantillons, nécessaire notamment puisque les mesures sont effectuées sous ultra-vide, correspond en grande partie à celle effectuée pour la microscopie électronique. Cette préparation est particulière car l'aspect analytique de l'observation implique de préserver la localisation des éléments à détecter au sein de l'échantillon. L'intégrité chimique et structurale des cellules doit donc être protégée [Guerquin-Kern 2005].

IV.3.2.2.1 Traitements de chimiothérapie testés

Les cellules gliomales F98 (10^3 dans $10\ \mu\text{l}$ de milieu agarosé) ont été inoculées dans le noyau caudé de 5 rats Fischer 344 (soit J0). Les 5 traitements décrits au paragraphe IV.3.1.2.1 ont été testés : IUDR (20 mg/ml) ou carboplatine (0,5 mg/ml) administré par pompe osmotique pendant 6 jours (1 $\mu\text{l}/\text{h}$ de J14 à J20), IUDR (400 $\mu\text{g}/20\ \mu\text{l}$), carboplatine (20 $\mu\text{g}/20\ \mu\text{l}$), cisplatine (6 $\mu\text{g}/20\ \mu\text{l}$) par CED (0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$) à J20.

IV.3.2.2.2 Fixation et inclusion du tissu cérébral

Les 5 rats ont été euthanasiés à J21 par perfusion intracardiaque de solution de formaldéhyde (4 à 10 %) [Descarries 1968; Wolf 1971], avec une pompe péristaltique (Roth Cyclo II, Roth®). Cette procédure délicate, qui permet une très bonne fixation des organes (et par conséquent du cerveau), a été réalisée au laboratoire INSERM-équipe 5 (Grenoble) avec l'aide de Régine Farion. Les cerveaux ont ensuite été prélevés et conservés dans une solution de formaldéhyde (Roti® - Histofix 10 % ; Roth Sochiel).

Pour chaque échantillon, le point d'injection a été repéré et la coupe coronale (1 mm d'épaisseur) correspondant à son niveau a été isolée à l'aide de la matrice acrylique. Pour chaque coupe, 2 zones de $1\ \text{mm}^3$ du noyau caudé ont été découpées afin d'être incluses dans une résine de type époxy (utilisée en microscopie électronique), au Centre Technologique des Microstructures (Lyon 1, Villeurbanne).

IV.3.2.2.3 Coloration et repérage

A partir de ces inclusions en résine, des coupes de 300 nm d'épaisseur sont réalisées pour être analysées. Une coupe sériée est colorée au bleu de toluidine afin de repérer, par examen histologique, la structure de l'échantillon : les différents types de cellules présentes et la localisation de leur noyau. L'analyse se fait ensuite dans une zone de 20 à 40 μm . Dans notre cas, on cherchera à observer les cellules ayant un énorme noyau et un petit cytoplasme, correspondant davantage à des cellules tumorales qu'à des cellules saines.

IV.3.2.3 Résultats

Afin de repérer la distribution de l'élément cherché (Pt ou I) au sein du tissu, l'émission d'autres espèces ioniques est enregistrée simultanément, grâce au système de détection en parallèle. Elles permettent d'identifier les structures cellulaires [Guerquin-Kern 2005] :

- ions CN^- : l'azote est un atome présent en grande quantité, notamment au niveau des protéines ; son affinité électronique ne permet cependant pas la détection directe de l'ion N^- . L'analyse est effectuée au moyen du groupement CN, dont l'affinité électronique permet un rendement ionique élevé. Ainsi, les ions CN^- permettent d'obtenir des images de structures cellulaires où l'on distingue entre autres le noyau, les nucléoles et la chromatine condensée en périphérie du noyau soulignant la présence de l'enveloppe.
- ions P : cette image est représentative des macromolécules phosphorylées, correspondant principalement aux acides nucléiques. Elle représente donc plus particulièrement les noyaux.
- ions S : comme pour l'azote, cet atome se retrouve notamment par le biais d'acides aminés (cystéine, méthionine) avec des concentrations variables dans la plupart des structures intracellulaire. L'analyse de sa distribution rend bien compte de la morphologie cellulaire. Ces ions sont souvent associés à la localisation d'enzymes.

IV.3.2.3.1 Injections intracérébrales d'IUdR

L'analyse des échantillons qui correspondent aux injections i.c. d'IUdR par pompe osmotique pendant 6 jours ou par CED pendant 40 minutes est présentée respectivement Figure IV-35 et Figure IV-36. La première observation que l'on peut faire est une corrélation parfaite de la distribution d'iode avec les noyaux. On constate également une forte accumulation d'iode dans le noyau de certaines cellules uniquement : le taux d'incorporation varie et l'IUdR se fixe davantage dans le noyau des cellules qui se divisent le plus. Enfin de l'iode est présent en quantité

importante dans la chromatine condensée accolée à la membrane nucléaire, ce qui souligne les bordures internes du noyaux.

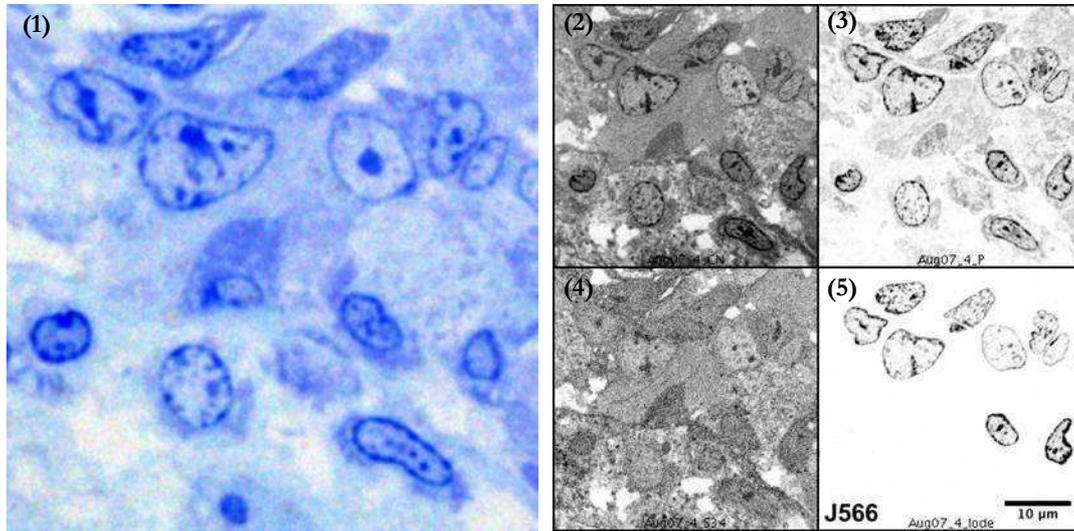


Figure IV-35 : Analyse de l'échantillon correspondant à une injection prolongée d'IudR (20 mg/ml ; 1 µl/h pendant 6 jours). (1) Coupe sériée histologique : coloration au bleu de toluidine. Les images de droite représentent la détection simultanée des ions secondaires : CN⁻ (2), P⁻ (3), S⁻ (4) et iode (5).

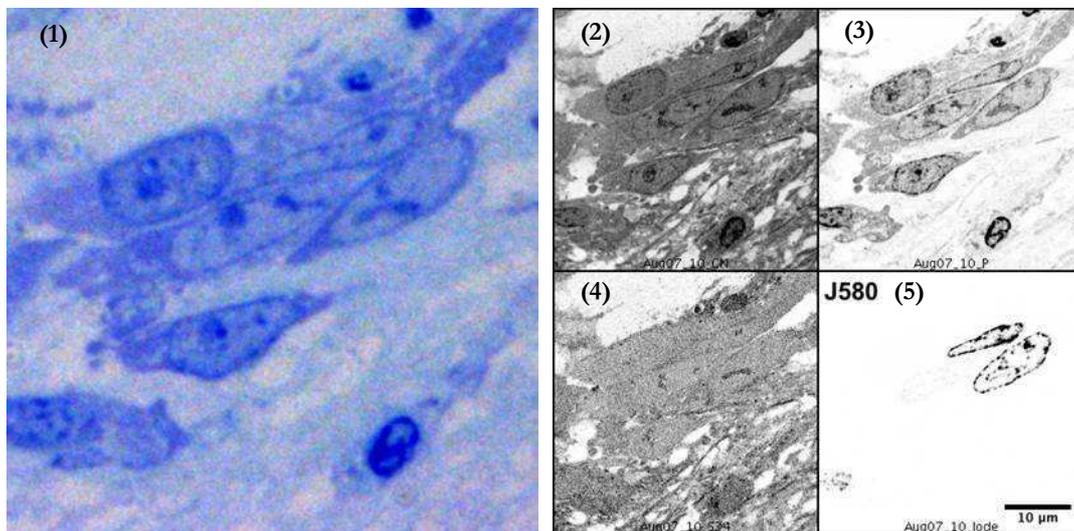


Figure IV-36 : Analyse de l'échantillon correspondant à une injection d'IudR par CED (400 µg/20 µl ; 0,5 µl/min). (1) Coupe histologique sériée : coloration au bleu de toluidine. Les images de droite représentent la détection simultanée des ions secondaires : CN⁻ (2), P⁻ (3), S⁻ (4) et iode (5).

IV.3.2.3.2 Injections intracérébrales de drogues platinées

La détection de l'élément platine s'est révélée beaucoup plus difficile que celle de l'IUdR, voire impossible sur certains prélèvements. Pour l'échantillon correspondant à une injection prolongée de carboplatine par pompe osmotique (Figure IV-37 et Figure IV-38), des points d'accumulation sont visibles, sans doute au niveau de débris cellulaires, mais le platine n'est pas concentré au niveau nucléaire.

Concernant l'injection de carboplatine (Figure IV-39) ou de cisplatine par CED, le niveau de platine est trop faible pour être imagé par la microsonde, aucune accumulation de l'élément n'est observée. Plus précisément si l'on travaille en mode spectromètre, c'est-à-dire lorsque l'information est cumulée sur toute une surface (une cellule par exemple), un pic correspondant au platine est détecté. Certes peu intense, ce pic est la signature incontestable de la présence de platine au sein de l'échantillon. En mode imagerie, le volume sondé est beaucoup plus petit. Par conséquent, si la totalité des atomes détectés en mode spectrométrie sont regroupés sur quelques pixels alors il sera possible de les localiser sur une image ; sinon, la probabilité de présence de ces atomes sur un pixel donné est extrêmement réduite et leur localisation est rendue impossible.

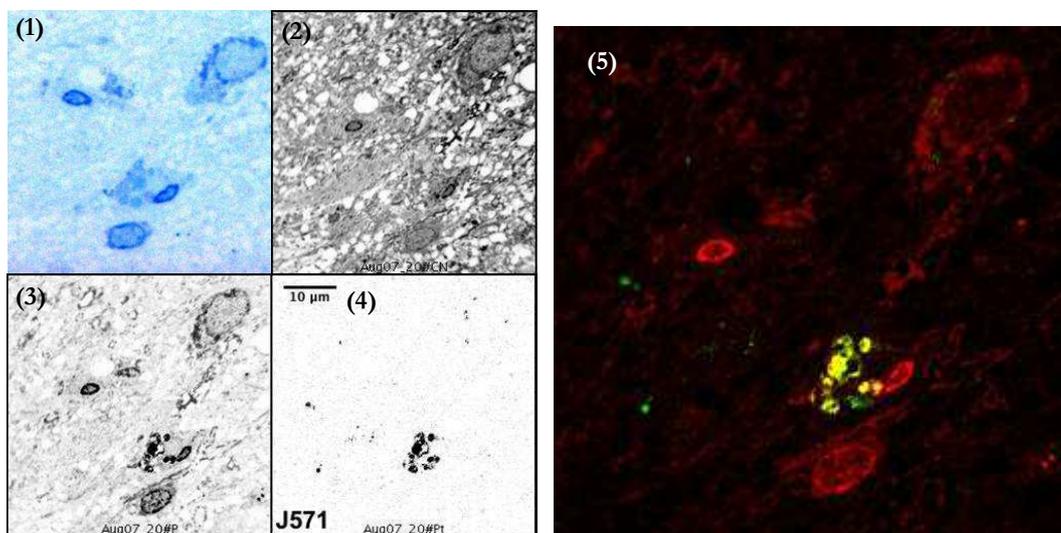


Figure IV-37 : Analyse d'une zone de l'échantillon correspondant à une injection prolongée de carboplatine (0,5 mg/ml ; 1 μl/h pendant 6 jours). (1) Coupe histologique sériée : coloration au bleu de toluidine. Images 2 à 4 : détection simultanée des ions secondaires : CN⁻ (2), P⁻ (3), et platine (4). L'image 5 est un montage : le phosphore apparaît en rouge et le platine en vert (la couleur jaune correspond à la colocalisation des deux atomes).

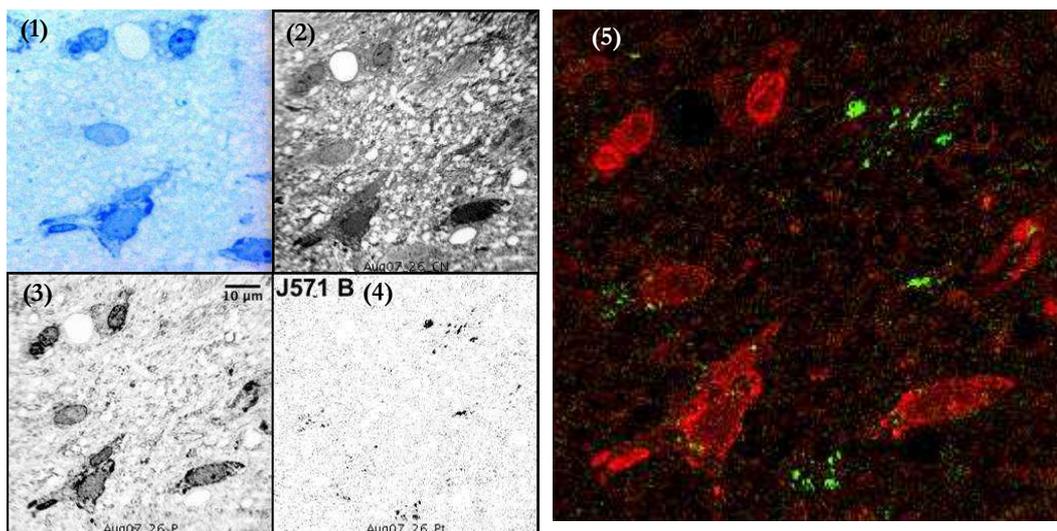


Figure IV-38 : Analyse d'une seconde zone de l'échantillon correspondant à une injection prolongée de carboplatine (0,5 mg/ml ; 1 μ l/h pendant 6 jours). (1) Coupe histologique sériée : coloration au bleu de toluidine. Images 2 à 4 : détection simultanée des ions secondaires : CN⁻ (2), P⁻ (3), et platine (4). L'image 5 est un montage : le phosphore apparaît en rouge et le platine en vert.

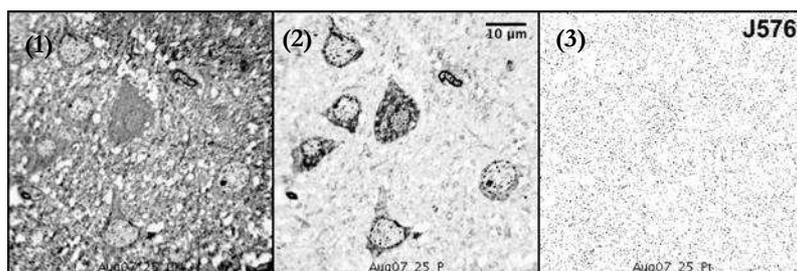


Figure IV-39 : Analyse de l'échantillon correspondant à une injection de carboplatine par CED (20 μ g/20 μ l ; 0,5 μ l/min). Chaque image représente la détection d'un ion secondaire : CN⁻ (1), P⁻ (2), et platine (3).

IV.3.2.3.3 Interprétation de l'analyse du platine

Plusieurs problèmes se posent concernant la détection du platine. Le premier est la présence de 3 isotopes à hauteur de 30 % environ (¹⁹⁴Pt : 32,9 % ; ¹⁹⁵Pt : 33,8 % ; ¹⁹⁶Pt : 25,3 %) ce qui divise d'autant le nombre d'ions détectés puisque les isotopes sont séparés par le spectromètre. D'autre part, à la différence de l'IUDR, toutes les cellules ont la même capacité à incorporer le platine sans sélectivité préférentielle des cellules tumorales en division.

On sait que le platine est présent sous forme d'adduits, et nous l'avons vérifié par HPLC-MS/MS (5 lésions /10⁶ bases dans le cas du cisplatine). La technique d'analyse par Nano-SIMS permet de sonder les premières couches atomiques de l'échantillons (*i.e.* 5 à 10 nm) alors que la taille d'un noyau est de l'ordre de 5 μ m. Par conséquent, si le platine est présent de façon homogène sur le prélèvement, il est très probable que la densité de signal ne soit pas suffisante pour être détectée.

IV.3.3 Analyse par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS)

Cette étude préliminaire par ICP-MS a été réalisée au Laboratoire Pierre Süe (unité mixte CEA-CNRS ; Saclay) grâce à l'aide du Dr Barbara Gouget. L'objectif était de déterminer la quantité de platine ou iode incorporée au niveau tissulaire dans différentes zones cérébrales, en fonction du traitement utilisé.

IV.3.3.1 Présentation de la technique

La spectrométrie de masse est une technique permettant l'analyse chimique d'un échantillon. Elle repose sur la séparation, l'identification et la quantification des éléments constitutifs de cet échantillon en fonction de leur masse mono-isotopique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/Z). Les différentes techniques de spectrométrie de masse se différencient par le type de source d'ionisation et d'analyseur. Dans le cas de l'ICP-MS (pour *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer*), il s'agit d'une torche à plasma couplée à un spectromètre de masse quadripolaire. L'ICP-MS permet le dosage multi-élémentaire des éléments en trace avec une très forte sensibilité de l'ordre du ppb (10^{-9} g/g). L'incertitude moyenne est généralement $<3\%$. Le Laboratoire Pierre Süe dispose s'un ICP-MS series X7 (Thermo Electron Corporation).

L'analyse par ICP-MS se déroule en plusieurs étapes distinctes (Figure IV-40). L'échantillon est tout d'abord mis en solution. Grâce à une pompe péristaltique et un passeur automatique d'échantillon, la solution est introduite dans une chambre de vaporisation. Elle y est nébulisée au contact avec de l'argon puis est envoyée dans une torche à plasma d'argon à très haute température (6000 à 10 000°C). L'échantillon est alors atomisé puis ionisé dans sa totalité. Un système de vide accélère les ions du plasma vers un ensemble de lentilles électrostatiques qui extrait les ions positifs et les guide vers le filtre de masse quadripolaire.

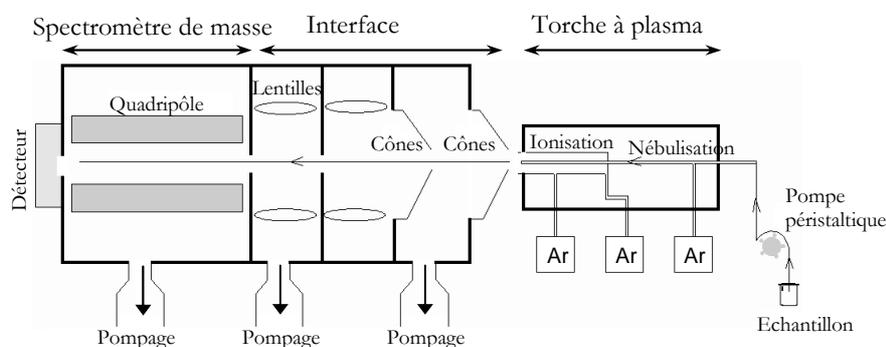


Figure IV-40 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse quadripolaire. On distingue 4 étapes : l'introduction-nébulisation, l'ionisation, la séparation en masse et la détection.

La fréquence appliquée au quadripôle permet de ne transmettre que les ions ayant un rapport (m/Z) particulier. La détection s'effectue ensuite grâce à un multiplicateur d'électrons. Les données sont enregistrées à l'aide de l'interface PlasmaLab (Thermo Electron Corporation). Pour un isotope donné (^{194}Pt , ^{195}Pt ou ^{196}Pt pour le cas du platine, par exemple), le nombre d'ions mesuré permet de calculer directement la concentration de l'élément analysé grâce à un logiciel de traitement quantitatif et qualitatif de l'enregistrement.

IV.3.3.2 Préparation spécifique des échantillons

IV.3.3.2.1 Traitements testés

Après inoculation de 10^3 cellules F98 (dans 10 μl de milieu agarosé ; n = 5 rats), chaque animal a reçu l'un des traitements décrit au paragraphe IV.3.1.2.1 p.163 : IUdR (20 mg/ml) ou carboplatine (0,5 mg/ml) administré par pompe osmotique pendant 6 jours (1 $\mu\text{l}/\text{h}$ de J14 à J20), IUdR (400 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), carboplatine (20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), cisplatine (6 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) par CED (0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$) à J20. Les 5 rats ont été euthanasiés à J21 par inhalation d'isoflurane. Les cerveaux ont été immédiatement prélevés puis stockés à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

IV.3.3.2.2 Zones cérébrales analysées

Les coupes cérébrales coronales à analyser, ont été réalisées à froid ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) à l'aide d'une matrice acrylique. Cinq zones distinctes (Figure IV-41), repérées par rapport au point d'injection ont ainsi été isolées :

- 3 coupes coronales de 2 mm d'épaisseur (correspondant à la zone tumorale), la seconde coupe étant centrée sur le point d'injection ;
- zone ipsilatérale (supposée saine) : reste de l'hémisphère droit ;
- zone controlatérale : hémisphère gauche complet.

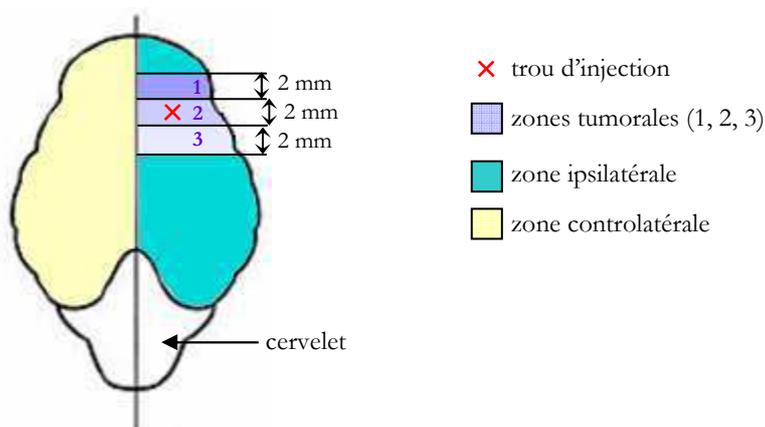


Figure IV-41 : Schéma des 5 zones cérébrales distinctes analysées par ICP-MS.

Pour qu'ils puissent être nébulisés, les échantillons à analyser doivent être en solution et parfaitement dissous. Chaque prélèvement est donc pesé, puis séché à 60°C pendant 2 jours. Une fois sa masse devenue constante, l'échantillon est digéré dans du HNO₃ ultra pur puis l'acide nitrique est évaporé sur bain à sec.

IV.3.3.3 Résultats

Les concentrations détectées sont exprimées en ppb, c'est-à-dire en ng/g de poids sec. Pour le platine, chacun des isotopes (¹⁹⁴Pt, ¹⁹⁵Pt et ¹⁹⁶Pt) est détecté mais on exprimera les résultats en masse d'élément Pt ; pour l'IUdR, on détectera l'iode 127 (stable). Les taux mesurés sont présentés dans le Tableau IV-40.

Le platine n'a été mesurable que dans l'échantillon ayant reçu du carboplatine par CED, avec un taux relativement faible (< 2 ppm). La concentration maximale est mesurée dans la zone désignée comme « ipsilatérale », il serait intéressant de réaliser des coupes à analyser de 1 mm sur tout l'hémisphère droit, afin de localiser plus finement cette concentration. En effet, il est probable que le repérage par la cicatrice du point d'injection avec la matrice ne soit pas assez fiable et précis.

Concernant l'IUdR, on restera prudent puisque ces mesures n'ont pas été reproduites et n'ont été réalisées que sur un animal par catégorie d'injection. On notera toutefois que la concentration en iode obtenue pour la pompe osmotique (6 jours) est 4 à 5 fois supérieure à celle mesurée pour la technique CED. L'imagerie par NanoSIMS nous permet de savoir que cet iode est bien incorporé et accumulé au niveau des noyaux cellulaires ; l'idéal serait maintenant de quantifier par HPLC-MS/MS l'iode situé sur l'ADN.

Traitement testé	Concentration de Pt ou d' ¹²⁷ I (ppb = ng/g de masse sèche)				
	Zone tumorale			Zone ipsilatérale	Zone controlatérale
	1	2	3		
Cisplatine (6 µg/20µl ; CED)	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld
Carboplatine (20 µg/20 µl ; CED)	774	1005	1099	1849	241
Carboplatine (pompe osmotique)	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld
IUdR (400 µg/20 µl ; CED)	2196	3824	7016	164	168
IUdR (pompe osmotique)	6036	15530	35710	2454	39

Tableau IV-40 : Dosages par ICP-MS de platine ou d'iode suivant que l'échantillon a reçu respectivement une drogue platinée ou de l'IUdR. Les concentrations ont été mesurées dans différentes zones du cerveau ; *ld* signifie limite de détection.

IV.3.4 Analyse par fluorescence X induite par un faisceau de particules chargées (PIXE)

Cet essai préliminaire par méthode d'analyse PIXE (*Particle induced X-ray emission*) a été effectué à la microsonde nucléaire du Laboratoire Pierre Süe (Saclay), avec l'aide du Dr Barbara Gouget et d'Hicham Khodja, responsable de la microsonde. L'objectif était de connaître la concentration locale sur une coupe coronale cérébrale après traitement.

IV.3.4.1 Présentation de la technique d'analyse par PIXE et de la microsonde

La méthode PIXE est une technique d'analyse basée sur l'interaction d'un faisceau d'ions légers (protons, deutons, particules alpha) avec les atomes constitutifs d'un échantillon-cible. En pénétrant dans l'échantillon, l'ion incident ionise les couches internes de l'atome-cible (K, L ou M) si la fraction de l'énergie cédée est supérieure à l'énergie de liaison de ces électrons internes. La lacune créée confère un état instable à l'atome qui va chercher à se désexciter ; le réarrangement électronique entraîne un rayonnement de fluorescence X qui va être détecté. L'énergie de ce rayonnement X est caractéristique de l'élément chimique ionisé, et des couches électroniques concernées. L'analyse des spectres permet de connaître la composition chimique élémentaire de la cible.

Cette technique fournit une information quantitative absolue en terme de masse par centimètre carré d'échantillon. Elle permet l'analyse de traces avec une très bonne sensibilité sur la majeure partie du tableau périodique ($Z > 10$). L'intensité du spectre est proportionnelle au flux incident.

Brièvement, la microsonde du laboratoire Pierre Süe est constituée d'un accélérateur électrostatique de type Van de Graaff (Figure IV-42) [Moretto 2004; Berger 2005]. Il est suivi d'un dipôle magnétique qui sélectionne les particules chargées suivant leur nature et leur énergie. Cet électro-aimant d'analyse distribue le faisceau vers l'une des deux lignes disponibles, la première étant destinée à l'étude d'échantillons radioactifs. La ligne pour l'analyse PIXE comprend un système de mise en forme et de focalisation (lentilles) du faisceau de particules, ainsi qu'une chambre d'analyse sous vide, qui renferme le porte-échantillon et les détecteurs de rayonnement X. Un microscope optique permet également de repérer et observer en temps réel la zone irradiée. Enfin, une cage de Faraday placée au fond de l'enceinte arrête les ions et mesure le nombre de particules ayant traversé un échantillon mince.

Lors de nos analyses, un faisceau de protons d'énergie 2,5 MeV (dimensions : $2 \times 2 \mu\text{m}^2$) a été utilisé pour sonder l'échantillon sur une surface de $1 \times 1 \text{mm}^2$. Le détecteur X (Germanium

Haute Pureté) était positionné avec un angle $\theta = 45^\circ$ de la direction incidente du faisceau, et à une distance de 21 mm de l'échantillon (placé lui, à 90° par rapport à l'incidence du faisceau).

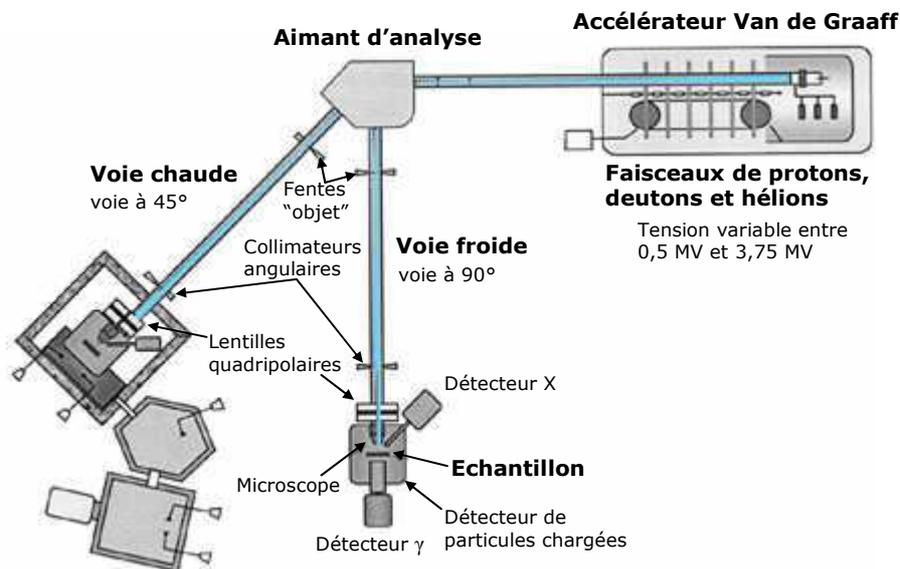


Figure IV-42 : Principe de la microsonde nucléaire du laboratoire Pierre Süe (CEA/CNRS, Saclay, France) [Berger 2005].

IV.3.4.2 Préparation spécifique des échantillons

IV.3.4.2.1 Traitements testés

Pour l'analyse du platine et de l'iode par méthode PIXE nous nous sommes placés en conditions de traitement. Par conséquent, après inoculation de 10^3 cellules F98 (dans 10 μ l de milieu agarosé ; $n = 5$ rats), les injections cérébrales testées sont les suivantes : IUdR (20 mg/ml) ou carboplatine (0,5 mg/ml) administré par pompe osmotique pendant 6 jours (1 μ l/h de J7 à J13), IUdR (400 μ g/20 μ l), carboplatine (20 μ g/20 μ l), cisplatine (6 μ g/20 μ l) par CED (0,5 μ l/min) à J13. Les 5 rats ont été euthanasiés à J14 par inhalation d'isoflurane. Les cerveaux ont été immédiatement prélevés puis stockés à -80°C .

IV.3.4.2.2 Fixation sur cible

Pour chaque cerveau, une coupe coronale (80 μ m) a été réalisée à froid (-20°C) au niveau du point d'injection. Elle a été déposée sur une cible spécifique permettant une zone analysable circulaire de 5 mm de diamètre et recouverte d'un film d'ultralene de 4 μ m d'épaisseur. Les échantillons (sur cible) ont ensuite été stockés 24 heures dans un froid sec (-20°C) puis placés dans un dessiccateur pendant une semaine afin d'être parfaitement déshydratés.

Pour chaque échantillon, une coupe sériée histologique (20 μm) et deux coupes de 80 μm d'épaisseur ont été réalisées afin de compléter cette analyse PIXE par respectivement, une coloration HE et des mesures La-ICP-MS.

IV.3.4.3 Résultats et discussion

Malgré une limite de détection élevée, de 85,3 ppm²⁴ pour la raie K de l'iode et de 4,3 ppm pour la raie L α du platine, aucun élément n'a pu être détecté de façon fiable pour aucun des échantillons.

Ces résultats sont cohérents avec les mesures par ICP-MS où des concentrations maximales de 35,7 ppm d'iode et 1,8 ppm de platine ont pu être détectées, ce qui est de toute façon inférieur à la limite de détection des mesures effectuées par PIXE. Dans les conditions de traitement que nous avons choisies, nous sommes bien loin des taux de platine décrits par Ortéga *et al.* : jusqu'à 790 \pm 24 ppm et 214 \pm 17 ppm de platine étaient observés 24 heures après injection intratumorale de 40 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ de carboplatine et 5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ de cisplatine, respectivement [Ortega 2005]. Pour des injections par pompes osmotiques (100 μg de carboplatine injectés pendant 7 jours à 1 $\mu\text{l}/\text{heure}$), Khan *et al.* ont quant à eux mesurés 5 à 6 ppm de platine au niveau du point d'injection (voir § II.3.3.4.3 p.46 et Figure II-17), concentration qui n'est plus que de 1 à 2 ppm à une distance de 3 mm du point d'injection [Khan 2005]. Il est sans doute normal que nous n'ayons rien détecté pour l'injection de carboplatine par pompe osmotique et nos mesures par La-ICP-MS (ablation laser combinée à de l'ICP-MS) devraient pouvoir nous indiquer si les taux de platine présents sont de l'ordre du ppm.

²⁴ les ppm correspondent à des $\mu\text{g}/\text{g}$.

V CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'équipe de recherche dans laquelle ce travail a été effectué, étudie la radiothérapie stéréotaxique en rayonnement synchrotron (*SSR*) pour le traitement des tumeurs cérébrales. Le terme *SSR* regroupe deux techniques développées en parallèle. La première consiste à incorporer un élément lourd au sein de la tumeur afin d'augmenter le dépôt de dose locale lors d'une irradiation X monochromatique de basse énergie en conditions stéréotaxiques. La seconde repose sur la combinaison judicieuse de chimiothérapie intracérébrale suivie de radiothérapie. Pour chacune de ces deux modalités, un des points essentiels est d'augmenter la toxicité au niveau tumoral tout en préservant les tissus sains. Les résultats précliniques obtenus jusque là sur des rats porteurs du gliome F98 sont très encourageants, et laissent entrevoir la possibilité d'une application clinique.

La barrière hémato-encéphalique est un obstacle majeur à l'efficacité de la chimiothérapie des tumeurs cérébrales par voie systémique, puisqu'elle empêche les molécules de passer à travers l'endothélium vasculaire. Les techniques d'injection d'agents pharmacologiques au niveau cérébral, qui permettent notamment de contourner la barrière hémato-encéphalique, se sont fortement développées ces dernières années. Parmi elles, la méthode de « convection-enhanced delivery » ou CED proposée dans les années 90s, semble très prometteuse. Elle exploite la pression provoquée par l'injection pour permettre de distribuer efficacement par convection le fluide contenant la drogue.

Le but de ce travail de thèse était donc d'étudier les méthodes d'injection intracérébrales envisageables, et plus particulièrement la méthode CED, en vue d'optimiser les distributions d'agents antinéoplasiques ou d'éléments lourds, dans le cadre des essais précliniques de l'équipe. Ce travail s'est donc articulé autour de 2 axes principaux : la mise en place de la CED et sa caractérisation par imagerie, puis son application à des essais précliniques de chimio-radiothérapie.

V.1 Imagerie et caractéristiques de la CED

On commencera par souligner que la CED n'exclue pas la diffusion. Pendant l'injection, elle permet de transporter la drogue principalement par convection. La diffusion dans le tissu cérébral est limitée à quelques millimètres depuis le point source où elle commence [Vogelbaum 2005]. Ainsi, lorsque la CED est terminée, le périmètre tout entier de la distribution obtenue immédiatement après l'injection, devient source de diffusion.

Au cours de l'étude d'imagerie, nous avons mis en évidence plusieurs phénomènes non soupçonnés et non pris en compte jusque là. Tout d'abord le problème de reflux important qui survient lors de l'utilisation des paramètres type « bolus », et que l'on a pu observer, particulièrement lors des injections en tissu sain. Son caractère aléatoire et non contrôlé rend la méthode « bolus » non reproductible et peu fiable. Le liquide injecté (que ce soit le liquide contenant les cellules tumorales au moment de l'inoculation ou les drogues antinéoplasiques dans le cadre du traitement par chimiothérapie) peut s'échapper en-dehors du tissu ciblé (noyau caudé dans le cas considéré) et toucher en quantité importante des structures non voulues (corps calleux par exemple), ou remonter le long du trajet de l'aiguille. Cela peut notamment induire des toxicités spécifiques dans ces structures lors d'injection de drogue antinéoplasique. En considérant ce phénomène appliqué aux essais précliniques menés dans l'équipe, des cellules tumorales peuvent donc s'échapper hors du noyau caudé où elles sont censées être déposées. La tumeur peut croître à partir de cellules remontées aléatoirement le long de l'aiguille ou d'autres présentes dans le corps calleux. Nous avons donc choisi de modifier les paramètres d'inoculation du modèle, préférant la méthode de Barth *et al.*, où l'agarose gélifié permet une distribution des cellules bien plus régulière et reproductible.

Les tumeurs F98 sont reconnues pour leur caractère infiltrant qui les rapproche des gliomes humains. Il faut noter qu'en essayant de traiter des tumeurs reproductibles, notamment au niveau de la forme, et bien délimitée, on s'éloigne des gliomes humains (variables en forme et localisation notamment). Cependant, pour déterminer si un traitement est efficace, il est important de travailler sur un modèle fiable et reproductible ; cette approche permet en outre de réduire le nombre d'animaux utilisés. On notera également que la chimiothérapie intracérébrale est administrée sans imagerie préalable de la tumeur : sa position n'est connue que par les coordonnées stéréotaxiques *théoriques*. Dans ces conditions, pour que la distribution de drogue antinéoplasique couvre efficacement le volume du gliome, il est indispensable que le modèle soit fiable.

La CED permet également d'injecter des volumes conséquents (jusqu'à 40 µl testés pour les essais thérapeutiques) sans que l'on n'observe de changement comportemental anormal de l'animal. Il ne serait pas envisageable d'administrer des volumes aussi importants avec des paramètres de type « bolus ». En effet, la pression interstitielle engendrée risquerait de léser les tissus. D'autre part, la distribution de drogue obtenue serait trop aléatoire avec encore davantage de pertes par reflux que ce que l'on a pu observer pour un volume de 5 µl.

Enfin, le caractère reproductif et contrôlé, allié à un volume de distribution qui augmente linéairement avec le volume injecté, fait de la CED une technique relativement fiable et adaptée dans le cadre d'étude de chimiothérapie intracérébrale sur notre modèle de gliome F98 implanté chez des rats. Il serait intéressant de réaliser une étude d'imagerie haute résolution plus complète ; celle-ci pourrait permettre de quantifier précisément les inhomogénéités locales de distribution qui semblent exister en tissu tumoral. Une autre piste serait de tester d'autres agents iodés de viscosités différentes puisque ce paramètre, non considéré lors des premières études expérimentales sur la CED, semble tout de même influencer sur la qualité de la distribution et l'apparition du reflux [Mardor 2005].

V.2 Essais précliniques de chimio-radiothérapie

Il faut être prudent quant à l'interprétation des résultats précliniques, notamment concernant la reproductibilité, l'efficacité ou l'intercomparaison de plusieurs traitements. En effet, on soulignera que les expériences sont réalisées sur un faible nombre de rats par groupe ($n < 15$ si on ne rassemble pas plusieurs groupes), rendant les analyses statistiques parfois discutables. Ce problème est exacerbé lorsqu'il s'agit des animaux survivants à long terme, peu nombreux et donc faiblement représentatifs d'un point de vue statistique ; on remarquera également qu'une variation de 10 % sur un nombre de rats guéris (entre 20 et 30 %, par exemple), peut correspondre à la présence d'un seul rat en plus ou en moins (pour $n = 10$). Nous avons choisi également d'arrêter les études de survie à J200 ; au-delà de cette date, les rats ne décèdent *a priori* plus de reprise tumorale. Enfin au cours des expériences, il nous est apparu indispensable pour connaître l'efficacité d'un traitement combiné, de tester en parallèle et au cours de la même expérience, chacune des modalités.

Un des problèmes majeurs de la chimiothérapie intracérébrale est la toxicité, délicate à évaluer chez l'animal et donc complexe à prendre en compte lors d'essais précliniques de thérapie. L'équilibre entre activité anti-tumorale, nécessitant une quantité suffisante de drogue antinéoplasique, et (neuro)toxicité est encore difficile à trouver. Il nous a semblé essentiel lors de ces essais, de couvrir un volume conséquent de tissu afin de cibler le maximum de cellules gliomales et atteindre certaines d'entre elles éloignées de la masse tumorale, au risque de toucher également le tissu sain. Nous avons donc préféré utiliser des volumes conséquents ($\geq 20 \mu\text{l}$) mais des concentrations relativement faibles de drogue ($6 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ pour le cisplatine et $20 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ pour le carboplatine).

Plusieurs des études présentées dans ce document, nous ont permis d'observer des rats survivants à long terme, en traitement combiné : carboplatine ou cisplatine (CED) et 15 Gy, carboplatine (CED) suivi de 3×8 Gy, carboplatine délivré par pompe osmotique associé à 15 Gy mais également en chimiothérapie seule : carboplatine ou cisplatine (CED), carboplatine par pompe osmotique. Cette dernière modalité (pompe osmotique Alzet) qui permet d'injecter l'agent antinéoplasique de façon prolongée (6 jours dans notre cas) s'est révélée particulièrement efficace puisque 23 % et 55 % des rats traités respectivement par chimiothérapie ou chimio-radiothérapie étaient toujours en vie à la fin de l'étude (après inoculation de 1000 cellules F98 ; les pourcentages sont de 11 et 42 % lorsqu'il s'agit de 4000 cellules).

Dans nos études, seuls quelques rats ont profité pleinement du traitement par injection intracérébrale et ont vu leur tumeur complètement éradiquée. Dans le cas d'un modèle aussi agressif que le gliome F98 [Barth 1998], il est peu probable que l'action antinéoplasique éradique la tumeur uniquement chez certains rats et n'ait qu'un effet marginal pour d'autres. Une des hypothèses déjà soulignée par Degen et ses collaborateurs [Degen 2003], serait que l'agent pharmacologique ne perfuse pas complètement la tumeur, sans doute à cause du phénomène de reflux (engendré par des aiguilles de tailles différentes entre l'inoculation des cellules et l'injection de la drogue). Une solution pour améliorer la convection, c'est-à-dire augmenter la qualité ainsi que l'étendue de la distribution, pourrait être d'accroître la viscosité de la solution platinée, en y ajoutant du saccharose [Mardor 2005].

L'efficacité du traitement combiné semble étroitement liée à celle de la chimiothérapie seule.

L'étude menée en fractionnant la dose (3 fractions de 8 Gy) a montré que la combinaison de carboplatine (20 µg/20 µl) administré par CED (débit 0,5 µl/min) et d'une irradiation X entraîne, quelle que soit l'énergie du rayonnement (monochromatique 78,8 keV ou haute énergie 6 MV), une hausse significative de la survie des rats, et l'éradication de la tumeur pour certains d'entre eux. Cependant, on ne peut déterminer pour le moment s'il s'agit d'un effet uniquement additif ou synergique. Des résultats de survie similaires à ceux exposés dans ce travail de recherche ont été obtenus par Barth *et al.* (non publiés) sur des rats porteurs de gliome F98, avec du cisplatine combiné ou non à une irradiation 6 MV (voir note [Rousseau 2007b]).

Ces résultats concordent avec les simulations réalisées par Bernhardt *et al.* qui montrent que la relaxation d'atomes lourds (Pt) présents dans l'ADN (après excitation au dessus de leur seuil K) engendre peu de cassures double brins de l'ADN, comparé à celles engendrées par l'irradiation elle-même [Bernhardt 2004]. Si l'idée d'activer des atomes de Pt en les irradiant au-dessus de leur

seuil K est séduisante, elle n'a qu'un effet mineur dans le cadre de notre modèle expérimental et avec les molécules utilisées. En effet, la quantité d'atomes de Pt par nombre de paires de bases, nécessaire pour qu'un tel phénomène se produise est bien supérieure à la quantité tolérable pour que la cellule soit toujours viable au moment de l'irradiation. L'action de la chimiothérapie est donc tout à fait prépondérante, ce que l'on a pu vérifier au cours de plusieurs essais précliniques (cisplatine ou carboplatine) présentés ici. Nous avons entre autres obtenu plusieurs fois des survivants à long terme après chimiothérapie seule.

V.3 Vers une application clinique

Si la CED s'est révélée très prometteuse sur modèle de rongeur aux cours de nombreuses études décrites dans la littérature, il semblerait que les avis soient plus partagés quant à son utilisation au niveau clinique. Plusieurs problèmes se posent notamment concernant les volumes importants à couvrir et les variations brutales de pression interstitielle au sein des tumeurs. De plus le gradient de pression entre tissu sain et tumoral aura tendance à guider le fluide hors des zones tumorales, où la pression interstitielle est élevée, vers les tissus sains environnants [Sampson 2007]. Par conséquent, il apparaît aujourd'hui indispensable de mettre en place et tester cette méthode CED sur des modèles plus larges, tels que les primates [Vogelbaum 2005; 2007].

Activer un élément lourd présent dans l'ADN au moyen d'un rayonnement extérieur est un concept fascinant. Pour l'envisager, il reste cependant à déterminer la molécule capable de s'accumuler en quantité suffisante tout en restant non toxique.

Les résultats présentés dans cette thèse, que ce soit en rayonnement monochromatique basse énergie (keV) ou haute énergie (6 MV) sur un irradiateur médical conventionnel, sont parmi les meilleurs connus à ce jour sur ce modèle de gliome F98 très agressif [Biston 2004b; Barth 2000; Rousseau 2007b]. Ces résultats sont donc très prometteurs et ouvrent des voies de recherche clinique, applicable à un grand nombre de patients et dans un délai raisonnable. Cette approche est d'ailleurs sérieusement étudiée par l'équipe du Pr. Barth à Columbus.

VI RÉFÉRENCES

- [Adam 2003a] **Adam JF.** Tumeurs cérébrales et rayonnement synchrotron: développements méthodologiques en imagerie quantitative de la perfusion et en radiothérapie renforcée par effet photoélectrique. Génie Biologique et Médical, Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2003.
- [Adam 2003b] **Adam JF, Elleaume H, Joubert A, Biston MC, Charvet AM, Balosso J, Le Bas JF and Esteve F.** Synchrotron radiation therapy of malignant brain glioma loaded with an iodinated contrast agent: first trial on rats bearing F98 gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:1413-1426.
- [Adam 2005] **Adam JF, Biston MC, Joubert A, Charvet AM, Le Bas JF, Esteve F and Elleaume H.** Enhanced delivery of iodine for synchrotron stereotactic radiotherapy by means of intracarotid injection and blood-brain barrier disruption: quantitative iodine biodistribution studies and associated dosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61:1173-1182.
- [Adam 2006] **Adam JF, Joubert A, Biston MC, Charvet AM, Peoc'h M, Le Bas JF, Balosso J, Esteve F and Elleaume H.** Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:603-611.
- [Badouard 2005] **Badouard C, Masuda M, Nishino H, Cadet J, Favier A and Ravanat JL.** Detection of chlorinated DNA and RNA nucleosides by HPLC coupled to tandem mass spectrometry as potential biomarkers of inflammation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;827:26-31.
- [Badouard 2006] **Daum-Badouard C.** Les lésions des acides nucléiques : détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Biotechnologie, Santé, Management ; Université Joseph Fourier, Grenoble I, 2006.
- [Bankiewicz 2000] **Bankiewicz KS, Eberling JL, Kohutnicka M, Jagust W, Pivrotto P, Bringas J, Cunningham J, Budinger TF and Harvey-White J.** Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol* 2000;164:2-14.
- [Barth 1998] **Barth RF.** Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* 1998;36:91-102.
- [Barth 2000] **Barth RF, Yang W, Rotaru JH, Moeschberger ML, Boesel CP, Soloway AH, Joel DD, Nawrocky MM, Ono K and Goodman JH.** Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival and cure following blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of sodium borocaptate and boronophenylalanine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:209-218.
- [Barth 2003] **Barth RF, Yang W and Coderre JA.** Rat brain tumor models to assess the efficacy of boron neutron capture therapy: a critical evaluation. *J Neurooncol* 2003;62:61-74.
- [Barth 2004] **Barth RF, Wu G, Yang W, Binns PJ, Riley KJ, Patel H, Coderre JA, Tjarks W, Bandyopadhyaya AK, Thirumamagal BT, Ciesielski MJ and Fenstermaker RA.** Neutron capture therapy of epidermal growth factor (+) gliomas using boronated cetuximab (IMC-C225) as a delivery agent. *Appl Radiat Isot* 2004;61:899-903.
- [Bartus 2000] **Bartus RT, Snodgrass P, Marsh J, Agostino M, Perkins A and Emerich DF.** Intravenous cereport (RMP-7) modifies topographic uptake profile of carboplatin within rat glioma and brain surrounding tumor, elevates platinum levels, and enhances survival. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:903-911.

- [Baxter 1989] **Baxter LT and Jain RK.** Transport of fluid and macromolecules in tumors. I. Role of interstitial pressure and convection. *Microvasc Res* 1989;37:77-104.
- [Behin 2003] **Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF and Delattre JY.** Primary brain tumours in adults. *Lancet* 2003;361:323-331.
- [Benabid 1986] **Benabid AL, Remy C and Chauvin C.** Experimental model of rat brain tumors by stereotactic injection of C6 glioma and HTC hepatoma cell lines. In: Walker MD and Thomas DGT, editors. *Biology of brain tumors*. Amsterdam: Martinus Nijhoff Publishers; 1986. pp. 221-226.
- [Berger 2005] **Berger P and Revel G.** Microsonde nucléaire - Principe et appareillage. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation* 2005;P2563v2:1-16.
- [Bernhardt 2004] **Bernhardt P, Friedland W and Paretzke HG.** The role of atomic inner shell relaxations for photon-induced DNA damage. *Radiat Environ Biophys* 2004;43:77-84.
- [Bernstein 2000] **Bernstein M and Berger MS,** editors. *Neuro-Oncology, The Essentials*. New York: Thieme Medical Publishers; 2000.
- [Biston 2004a] **Biston MC.** Radio-chimiothérapie par photoactivation synchrotron de drogues platinées anticancéreuses. Génie Biologique et Médical, Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2004.
- [Biston 2004b] **Biston MC, Joubert A, Adam JF, Elleaume H, Bohic S, Charvet AM, Esteve F, Foray N and Balosso J.** Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res* 2004;64:2317-2323.
- [Bland 2004] **Bland JM and Altman DG.** The logrank test. *Bmj* 2004;328:1073.
- [Bobo 1994] **Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL and Oldfield EH.** Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2076-2080.
- [Boudou 2005] **Boudou C, Balosso J, Esteve F and Elleaume H.** Monte Carlo dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy of brain tumours. *Phys Med Biol* 2005;50:4841-4851.
- [Boudou 2006] **Boudou C.** Dosimétrie pour la radiothérapie stéréotaxique en rayonnement synchrotron: calculs Monte-Carlo et gels radiosensibles. Physique pour l'instrumentation, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2006.
- [Boulikas 2003] **Boulikas T and Vougiouka M.** Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep* 2003;10:1663-1682.
- [Brabec 2005] **Brabec V and Kasparkova J.** Platinum-Based Drugs. In: Gielen M and Tiekink ERT, editors. *Metallotherapeutic Drugs & Metal-based Diagnostic Agents: the use of metals in medicine*. John Wiley & Sons Inc.; 2005. pp. 489-506.
- [Bravin 2002] **Bravin A, Fiedler S, Coan P, Labiche JC, Ponchut C, Peterzol A and Thomlinson W.** Comparison between a position sensitive germanium detector and a taper optics CCD "FRELON" camera for diffraction enhanced imaging. *NIM A* 2003;510:35-40.
- [Broaddus 1998] **Broaddus WC, Prabhu SS, Gillies GT, Neal J, Conrad WS, Chen ZJ, Fillmore H and Young HF.** Distribution and stability of antisense phosphorothioate oligonucleotides in rodent brain following direct intraparenchymal controlled-rate infusion. *J Neurosurg* 1998;88:734-742.

-
- [Bruce 2000] **Bruce JN, Falavigna A, Johnson JP, Hall JS, Birch BD, Yoon JT, Wu EX, Fine RL and Parsa AT.** Intracerebral clysis in a rat glioma model. *Neurosurgery* 2000;46:683-691.
- [Callisen 1979] **Callisen HH, Norman A and Adams FH.** Absorbed dose in the presence of contrast agents during pediatric cardiac catheterization. *Med Phys* 1979;6:504-509.
- [Calvo 1986] **Calvo W, Hopewell JW, Reinhold HS and Yeung TK.** Radiation induced damage in the choroid plexus of the rat brain: a histological evaluation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1986;12:47-61.
- [Calvo 1987] **Calvo W, Hopewell JW, Reinhold HS, van den Berg AP and Yeung TK.** Dose-dependent and time-dependent changes in the choroid plexus of the irradiated rat brain. *Br J Radiol* 1987;60:1109-1117.
- [Calvo 1988] **Calvo W, Hopewell JW, Reinhold HS and Yeung TK.** Time- and dose-related changes in the white matter of the rat brain after single doses of X rays. *Br J Radiol* 1988;61:1043-1052.
- [Carmeliet 2000] **Carmeliet P and Jain RK.** Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257.
- [Carson 2002] **Carson BS, Sr., Wu Q, Tyler B, Sukay L, Raychaudhuri R, DiMeco F, Clatterbuck RE, Olivi A and Guarnieri M.** New approach to tumor therapy for inoperable areas of the brain: chronic intraparenchymal drug delivery. *J Neurooncol* 2002;60:151-158.
- [Chen 1999] **Chen MY, Lonser RR, Morrison PF, Governale LS and Oldfield EH.** Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time. *J Neurosurg* 1999;90:315-320.
- [Chen 2002] **Chen ZJ, Broaddus WC, Viswanathan RR, Raghavan R and Gillies GT.** Intraparenchymal drug delivery via positive-pressure infusion: experimental and modeling studies of poroelasticity in brain phantom gels. *IEEE Trans Biomed Eng* 2002;49:85-96.
- [Chen 2004] **Chen ZJ, Gillies GT, Broaddus WC, Prabhu SS, Fillmore H, Mitchell RM, Corwin FD and Fatouros PP.** A realistic brain tissue phantom for intraparenchymal infusion studies. *J Neurosurg* 2004;101:314-322.
- [Chen 2005] **Chen MY, Hoffer A, Morrison PF, Hamilton JF, Hughes J, Schlageter KS, Lee J, Kelly BR and Oldfield EH.** Surface properties, more than size, limiting convective distribution of virus-sized particles and viruses in the central nervous system. *J Neurosurg* 2005;103:311-319.
- [Cherry 2007] **Cherry RN.** Les rayonnements ionisants. In: Encyclopédie de sécurité et de santé au travail - Les risques professionnels; 2007.
- [Chinot 1996] **Chinot O and Martin PM.** Biologie des tumeurs cérébrales gliales. Tome I; 1996.
- [Clendenon 1990] **Clendenon NR, Barth RF, Gordon WA, Goodman JH, Alam F, Staubus AE, Boesel CP, Yates AJ, Moeschberger ML, Fairchild RG and Kalef-Ezra JA.** Boron neutron capture therapy of a rat glioma. *Neurosurgery* 1990;26:47-55.
- [Coan 2006] **Coan P, Peterzol A, Fiedler S, Ponchut C, Labiche JC and Bravin A.** Evaluation of imaging performance of a taper optics CCD; FReLoN' camera designed for medical imaging. *J Synchrotron Radiat* 2006;13:260-270.
- [Collins 2007] **Collins VP.** Mechanisms of disease: genetic predictors of response to treatment in brain tumors. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:362-374.

- [Corde 2002a] **Corde S.** Développement méthodologique de l'application d'agents pharmacologiques renforceurs de l'effet photoélectrique pour l'utilisation du rayonnement synchrotron en radiothérapie anticancéreuse. Génie Biologique et Médical, Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2002.
- [Corde 2002b] **Corde S, Biston MC, Elleaume H, Esteve F, Charvet AM, Joubert A, Ducros V, Bohic S, Simionovici A, Brochard T, Nemoz C, Renier M, Tropres I, Fiedler S, Bravin A, Thomlinson W, Le Bas JF and Balosso J.** Lack of cell death enhancement after irradiation with monochromatic synchrotron X rays at the K-shell edge of platinum incorporated in living SQ20B human cells as cis-diamminedichloroplatinum (II). *Radiat Res* 2002;158:763-770.
- [Corde 2003] **Corde S, Balosso J, Elleaume H, Renier M, Joubert A, Biston MC, Adam JF, Charvet AM, Brochard T, Le Bas JF, Esteve F and Foray N.** Synchrotron photoactivation of cisplatin elicits an extra number of DNA breaks that stimulate RAD51-mediated repair pathways. *Cancer Res* 2003;63:3221-3227.
- [Croteau 2005] **Croteau D, Walbridge S, Morrison PF, Butman JA, Vortmeyer AO, Johnson D, Oldfield EH and Lonser RR.** Real-time in vivo imaging of the convective distribution of a low-molecular-weight tracer. *J Neurosurg* 2005;102:90-97.
- [Dale 1985] **Dale RG.** The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy. *Br J Radiol* 1985;58:515-528.
- [DeAngelis 2001] **DeAngelis LM.** Brain tumors. *N Engl J Med* 2001;344:114-123.
- [Dean 1999] **Dean RL, Emerich DF, Hasler BP and Bartus RT.** Cereport (RMP-7) increases carboplatin levels in brain tumors after pretreatment with dexamethasone. *Neuro Oncol* 1999;1:268-274.
- [Degen 2003] **Degen JW, Walbridge S, Vortmeyer AO, Oldfield EH and Lonser RR.** Safety and efficacy of convection-enhanced delivery of gemcitabine or carboplatin in a malignant glioma model in rats. *J Neurosurg* 2003;99:893-898.
- [Descarries 1968] **Descarries L and Schröder JM.** Fixation du tissu nerveux par perfusion à grand débit. *J. Microscopie* 1968;7:281-286.
- [Deutsch 1989] **Deutsch M, Rewers AB, Redgate ES, Fisher ER and Boggs SS.** 5-Iodo-2-deoxyuridine administered into the lateral cerebral ventricle as a radiosensitizer in the treatment of disseminated glioma. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1322-1325.
- [Deutsch 1990] **Deutsch M, Rewers AB, Redgate S, Fisher ER and Boggs SS.** Intra-cerebral ventricular infusion of 5-iodo-2-deoxyuridine (IUDR) as a radiosensitizer in the treatment of a rat glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;19:85-87.
- [Dilmanian 1997] **Dilmanian FA, Wu XY, Parsons EC, Ren B, Kress J, Button TM, Chapman LD, Coderre JA, Giron F, Greenberg D, Krus DJ, Liang Z, Marcovici S, Petersen MJ, Roque CT, Shleifer M, Slatkin DN, Thomlinson WC, Yamamoto K and Zhong Z.** Single- and dual-energy CT with monochromatic synchrotron x-rays. *Phys Med Biol* 1997;42:371-387.
- [Doiron 1999] **Doiron A, Yapp DT, Olivares M, Zhu JX and Lehnert S.** Tumor radiosensitization by sustained intratumoral release of bromodeoxyuridine. *Cancer Res* 1999;59:3677-3681.
- [Dupertuis 2003] **Dupertuis YM.** Modulation de l'incorporation de la 5-[¹²⁵I]-iodo-2'-désoxyuridine dans des glioblastomes. Biologie, Faculté des sciences, Université de Genève, thèse n° Sc. 3456, 2003.

- [Elleaume 1999] **Elleaume H, Charvet AM, Berkvens P, Berruyer G, Brochard T, Dabin Y, Dominguez MC, Draperi A, Fiedler S, Goujon G, Le Duc G, Mattenet M, Nemoz C, Perez M, Renier M, Schulze C, Spanne P, Suoratti P, Thomlinson W, Esteve F, Bertrand B and Le Bas JF.** Instrumentation of the ESRF medical imaging facility. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A* 1999;428:513-527.
- [Elleaume 2002] **Elleaume H, Charvet AM, Corde S, Esteve F and Le Bas JF.** Performance of computed tomography for contrast agent concentration measurements with monochromatic x-ray beams: comparison of K-edge versus temporal subtraction. *Phys Med Biol* 2002;47:3369-3385.
- [Emerich 2000] **Emerich DF, Dean RL, Marsh J, Pink M, Lafreniere D, Snodgrass P and Bartus RT.** Intravenous cereport (RMP-7) enhances delivery of hydrophilic chemotherapeutics and increases survival in rats with metastatic tumors in the brain. *Pharm Res* 2000;17:1212-1219.
- [Fairchild 1982] **Fairchild RG, Brill AB and Ettinger KV.** Radiation enhancement with iodinated deoxyuridine. *Invest Radiol* 1982;17:407-416.
- [Fournier 2003] **Fournier E, Passirani C, Montero-Menei C, Colin N, Breton P, Sagodira S, Menei P and Benoit JP.** Therapeutic effectiveness of novel 5-fluorouracil-loaded poly(methylidene malonate 2.1.2)-based microspheres on F98 glioma-bearing rats. *Cancer* 2003;97:2822-2829.
- [Frelon 2000] **Frelon S, Douki T, Ravanat JL, Pouget JP, Tornabene C and Cadet J.** High-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem Res Toxicol* 2000;13:1002-1010.
- [Goorley 2000] **Goorley T and Nikjoo H.** Electron and photon spectra for three gadolinium-based cancer therapy approaches. *Radiat Res* 2000;154:556-563.
- [Grolleau 2001] **Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, Lapied B, Pelhate M and Gamelin E.** A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol* 2001;85:2293-2297.
- [Grossi 2003] **Grossi PM, Ochiai H, Archer GE, McLendon RE, Zalutsky MR, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD and Sampson JH.** Efficacy of intracerebral microinfusion of trastuzumab in an athymic rat model of intracerebral metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:5514-5520.
- [Guerquin-Kern 2004] **Guerquin-Kern JL, Hillion F, Madelmont JC, Labarre P, Papon J and Croisy A.** Ultra-structural cell distribution of the melanoma marker iodobenzamide: improved potentiality of SIMS imaging in life sciences. *Biomed Eng Online* 2004;3:10.
- [Guerquin-Kern 2005] **Guerquin-Kern JL, Wu TD, Quintana C and Croisy A.** Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). *Biochim Biophys Acta* 2005;1724:228-238.
- [Hall 2003] **Hall WA, Rustamzadeh E and Asher AL.** Convection-enhanced delivery in clinical trials. *Neurosurg Focus* 2003;14:e2.
- [Hamilton 2001] **Hamilton JF, Morrison PF, Chen MY, Harvey-White J, Pernaute RS, Phillips H, Oldfield E and Bankiewicz KS.** Heparin coinfusion during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. *Exp Neurol* 2001;168:155-161.

- [Harrington 2004] **Harrington KJ, Syrigos KN, Uster PS, Zetter A, Lewanski CR, Gullick WJ, Vile RG and Stewart JS.** Targeted radiosensitisation by pegylated liposome-encapsulated 3', 5'-O-dipalmitoyl 5-iodo-2'-deoxyuridine in a head and neck cancer xenograft model. *Br J Cancer* 2004;91:366-373.
- [Heimberger 2000] **Heimberger AB, Archer GE, McLendon RE, Hulette C, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD and Sampson JH.** Temozolomide delivered by intracerebral microinfusion is safe and efficacious against malignant gliomas in rats. *Clin Cancer Res* 2000;6:4148-4153.
- [Heldin 2004] **Heldin CH, Rubin K, Pietras K and Ostman A.** High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:806-813.
- [Hendricks 2005] **Hendricks JS, McKinney GW, Trelue HR, Durkee JW, Roberts TL, Egdorf HW, Finch JP, Fensin ML, James MR, Pelowitz DB, Waters LS, Gallmeier FX and David JC.** MCNPX, version 2.6.a. *report LA-UR-05-8225* 2005; Los Alamos Laboratory: Los Alamos, New Mexico.
- [Herman 1989] **Herman GT, Lewitt RM, Odhner D and Rowland SW.** SNARK89: A programming system for image reconstruction from projections. Philadelphia: University of Pennsylvania: Medical Imaging Processing Group, Department of Radiology; 1989.
- [Hodges 1998] **Hodges H, Katzung N, Sowinski P, Hopewell JW, Wilkinson JH, Bywaters T and Rezvani M.** Late behavioural and neuropathological effects of local brain irradiation in the rat. *Behav Brain Res* 1998;91:99-114.
- [Hongo 1994] **Hongo A, Seki S, Akiyama K and Kudo T.** A comparison of in vitro platinum-DNA adduct formation between carboplatin and cisplatin. *Int J Biochem* 1994;26:1009-1016.
- [Huynh 2006] **Huynh GH, Deen DF and Szoka FC, Jr.** Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors. *J Control Release* 2006;110:236-259.
- [IDL 2002] IDL, Interactive Data Language 5.6. 2002, Research Systems
- [Iijima 2004] **Iijima H, Patrzyc HB, Dawidzik JB, Budzinski EE, Cheng HC, Freund HG and Box HC.** Measurement of DNA adducts in cells exposed to cisplatin. *Anal Biochem* 2004;333:65-71.
- [Jacobs 2003] **Jacobs AH, Winkeler A, Dittmar C, Vollmar S, Wienhard K, Reszka R, Voges J and Heiss WD.** Positron-emission tomography monitoring of anti-glioblastoma HSV-tk gene therapy. *Gene Therapy and Regulation* 2003;2:49-57.
- [Jain 1999] **Jain RK.** Understanding barriers to drug delivery: high resolution in vivo imaging is key. *Clin Cancer Res* 1999;5:1605-1606.
- [Jain 2007] **Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG and Batchelor TT.** Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:610-622.
- [Jet 2005] **Jet O.** Mise au point de la détection des adduits du cisplatine avec l'ADN par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem. Rapport de stage d'études ingénieur, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, 2005.
- [JMP 2002] JMP, Statistics and Graphics Guide, Version 5. Cary, NC, USA; 2002.
- [Kaiser 2000] **Kaiser MG, Parsa AT, Fine RL, Hall JS, Chakrabarti I and Bruce JN.** Tissue distribution and antitumor activity of topotecan delivered by intracerebral clysis in a rat glioma model. *Neurosurgery* 2000;47:1391-1398; discussion 1398-1399.

-
- [Kaneko 1983] **Kaneko S, Clendenon NR and Kartha M.** [Experimental study in a rat brain tumor by combined treatment with cis-DDP and irradiation]. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1983;23:917-923.
- [Kanner 2007] **Kanner AA.** Convection-Enhanced Delivery. In: Barnett GH, editor. *Current Clinical Oncology: High-Grade Gliomas: Diagnosis and Treatment*. Totowa, NJ, USA ; Humana Press Inc.; 2007. pp. 303-314.
- [Karnas 1999] **Karnas SJ, Yu E, McGarry RC and Battista JJ.** Optimal photon energies for IUdR K-edge radiosensitization with filtered x-ray and radioisotope sources. *Phys Med Biol* 1999;44:2537-2549.
- [Kassis 1998] **Kassis AI, Wen PY, Van den Abbeele AD, Baranowska-Kortylewicz J, Makrigiorgos GM, Metz KR, Matalka KZ, Cook CU, Sahu SK, Black PM and Adelstein SJ.** 5-[125I]iodo-2'-deoxyuridine in the radiotherapy of brain tumors in rats. *J Nucl Med* 1998;39:1148-1154.
- [Kawakami 2004] **Kawakami K, Kawakami M, Kioi M, Husain SR and Puri RK.** Distribution kinetics of targeted cytotoxin in glioma by bolus or convection-enhanced delivery in a murine model. *J Neurosurg* 2004;101:1004-1011.
- [Kelland 2007] **Kelland L.** The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7:573-584.
- [Khan 2005] **Khan A, Jallo GI, Liu YJ, Carson BS, Sr. and Guarnieri M.** Infusion rates and drug distribution in brain tumor models in rats. *J Neurosurg* 2005;102:53-58.
- [Kimler 1992] **Kimler BF, Liu C, Evans RG and Morantz RA.** Intracerebral chemotherapy in the 9L rat brain tumor model. *J Neurooncol* 1992;14:191-200.
- [Kimler 1993] **Kimler BF, Liu C, Evans RG and Morantz RA.** Combination of aziridinylbenzoquinone and cis-platinum with radiation therapy in the 9L rat brain tumor model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26:445-450.
- [Kimler 1994] **Kimler BF.** The 9L rat brain tumor model for pre-clinical investigation of radiation-chemotherapy interactions. *J Neurooncol* 1994;20:103-109.
- [Kinsella 1998] **Kinsella TJ, Kunugi KA, Vielhuber KA, Potter DM, Fitzsimmons ME and Collins JM.** Preclinical evaluation of 5-iodo-2-pyrimidinone-2'-deoxyribose as a prodrug for 5-iodo-2'-deoxyuridine-mediated radiosensitization in mouse and human tissues. *Clin Cancer Res* 1998;4:99-109.
- [Klein 2003] **Klein JP and Moeschberger ML,** editors. Survival analysis: techniques for censored and truncated data, Second edition. *Statistics for Biology and Health*; New York, NY, USA: Springer; 2003.
- [Ko 1980] **Ko L, Koestner A and Wechsler W.** Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones. *Acta Neuropathol (Berl)* 1980;51:23-31.
- [Kobayashi 1980] **Kobayashi N, Allen N, Clendenon NR and Ko LW.** An improved rat brain-tumor model. *J Neurosurg* 1980;53:808-815.
- [Krauze 2005a] **Krauze MT, McKnight TR, Yamashita Y, Bringas J, Noble CO, Saito R, Geletneky K, Forsayeth J, Berger MS, Jackson P, Park JW and Bankiewicz KS.** Real-time visualization and characterization of liposomal delivery into the monkey brain by magnetic resonance imaging. *Brain Res Brain Res Protoc* 2005;16:20-26.
- [Krauze 2005b] **Krauze MT, Saito R, Noble C, Tamas M, Bringas J, Park JW, Berger MS and Bankiewicz K.** Reflux-free cannula for convection-enhanced high-speed delivery of therapeutic agents. *J Neurosurg* 2005;103:923-929.

- [Kroin 1982] **Kroin JS and Penn RD.** Intracerebral chemotherapy: chronic microinfusion of cisplatin. *Neurosurgery* 1982;10:349-354.
- [Kroll 1996] **Kroll RA, Pagel MA, Muldoon LL, Roman-Goldstein S and Neuwelt EA.** Increasing volume of distribution to the brain with interstitial infusion: dose, rather than convection, might be the most important factor. *Neurosurgery* 1996;38:746-752; discussion 752-744.
- [Kunwar 2007] **Kunwar S, Prados MD, Chang SM, Berger MS, Lang FF, Piepmeier JM, Sampson JH, Ram Z, Gutin PH, Gibbons RD, Aldape KD, Croteau DJ, Sherman JW and Puri RK.** Direct intracerebral delivery of cintredekin besudotox (IL13-PE38QQR) in recurrent malignant glioma: a report by the Cintredekin Besudotox Intraparenchymal Study Group. *J Clin Oncol* 2007;25:837-844.
- [Kweekel 2005] **Kweekel DM, Gelderblom H and Guchelaar HJ.** Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy. *Cancer Treat Rev* 2005;31:90-105.
- [Labiche 1996] **Labiche JC, Segura-Puchades J, Van Brussel D and Moy JP.** FRELON camera: Fast REadout LOw Noise. *ESRF Newsletter* 1996;8:41-43.
- [Laske 1997] **Laske DW, Youle RJ and Oldfield EH.** Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. *Nat Med* 1997;3:1362-1368.
- [Lawrence 1990] **Lawrence TS, Davis MA, Maybaum J, Stetson PL and Ensminger WD.** The dependence of halogenated pyrimidine incorporation and radiosensitization on the duration of drug exposure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;18:1393-1398.
- [Le Sech 2000] **Le Sech C, Takakura K, Saint-Marc C, Frohlich H, Charlier M, Usami N and Kobayashi K.** Strand break induction by photoabsorption in DNA-bound molecules. *Radiat Res* 2000;153:454-458.
- [Le Sech 2001] **Le Sech C, Takakura K, Saint-Marc C, Frohlich H, Charlier M, Usami N and Kobayashi K.** Enhanced strand break induction of DNA by resonant metal-innershell photoabsorption. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:196-200.
- [Lesniak 2004] **Lesniak MS and Brem H.** Targeted therapy for brain tumours. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:499-508.
- [Lidar 2004] **Lidar Z, Mardor Y, Jonas T, Pfeffer R, Faibel M, Nass D, Hadani M and Ram Z.** Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase I/II clinical study. *J Neurosurg* 2004;100:472-479.
- [Lieberman 1995] **Lieberman DM, Laske DW, Morrison PF, Bankiewicz KS and Oldfield EH.** Convection-enhanced distribution of large molecules in gray matter during interstitial drug infusion. *J Neurosurg* 1995;82:1021-1029.
- [Liu 2003] **Liu L, Bassano DA, Prasad SC, Hahn SS and Chung CT.** The linear-quadratic model and fractionated stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:827-832.
- [Lo 2001] **Lo EH, Singhal AB, Torchilin VP and Abbott NJ.** Drug delivery to damaged brain. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;38:140-148.
- [Lonser 1998a] **Lonser RR, Weil RJ, Morrison PF, Governale LS and Oldfield EH.** Direct convective delivery of macromolecules to peripheral nerves. *J Neurosurg* 1998;89:610-615.

- [Lonser 1998b] **Lonser RR, Gogate N, Morrison PF, Wood JD and Oldfield EH.** Direct convective delivery of macromolecules to the spinal cord. *J Neurosurg* 1998;89:616-622.
- [Lonser 1999] **Lonser RR, Corthesy ME, Morrison PF, Gogate N and Oldfield EH.** Convection-enhanced selective excitotoxic ablation of the neurons of the globus pallidus internus for treatment of parkinsonism in nonhuman primates. *J Neurosurg* 1999;91:294-302.
- [Lonser 2002] **Lonser RR, Walbridge S, Garmestani K, Butman JA, Walters HA, Vortmeyer AO, Morrison PF, Brechbiel MW and Oldfield EH.** Successful and safe perfusion of the primate brainstem: in vivo magnetic resonance imaging of macromolecular distribution during infusion. *J Neurosurg* 2002;97:905-913.
- [Lopez 2006] **Lopez KA, Waziri AE, Canoll PD and Bruce JN.** Convection-enhanced delivery in the treatment of malignant glioma. *Neurol Res* 2006;28:542-548.
- [Lyubimova 2004] **Lyubimova N and Hopewell JW.** Experimental evidence to support the hypothesis that damage to vascular endothelium plays the primary role in the development of late radiation-induced CNS injury. *Br J Radiol* 2004;77:488-492.
- [MacKay 2005] **MacKay JA, Deen DF and Szoka FC, Jr.** Distribution in brain of liposomes after convection enhanced delivery; modulation by particle charge, particle diameter, and presence of steric coating. *Brain Res* 2005;1035:139-153.
- [Mairs 2000] **Mairs RJ, Wideman CL, Angerson WJ, Whateley TL, Reza MS, Reeves JR, Robertson LM, Neshasteh Riz A, Rampling R, Owens J, Allan D and Graham DI.** Comparison of different methods of intracerebral administration of radioiododeoxyuridine for glioma therapy using a rat model. *British Journal of Cancer* 2000;82:74-80.
- [Mardor 2005] **Mardor Y, Rahav O, Zauberman Y, Lidar Z, Ocherashvilli A, Daniels D, Roth Y, Maier SE, Orenstein A and Ram Z.** Convection-enhanced drug delivery: increased efficacy and magnetic resonance image monitoring. *Cancer Res* 2005;65:6858-6863.
- [Mamot 2004] **Mamot C, Nguyen JB, Pourdehnad M, Hadaczek P, Saito R, Bringas JR, Drummond DC, Hong K, Kirpotin DB, McKnight T, Berger MS, Park JW and Bankiewicz KS.** Extensive distribution of liposomes in rodent brains and brain tumors following convection-enhanced delivery. *J Neurooncol* 2004;68:1-9.
- [Matalka 1994] **Matalka KZ, Barth RF, Staubus AE, Moeschberger ML and Coderre JA.** Neutron capture therapy of a rat glioma using boronophenylalanine as a capture agent. *Radiat Res* 1994;137:44-51.
- [Maughan 1999] **Maughan RL, Chuba P, Porter AT, Ben-Josef E, Lucas DR and Bjarngard BE.** Mass energy-absorption coefficients and mass collision stopping powers for electrons in tumors of various histologies. *Med Phys* 1999;26:472-477.
- [McAuliffe 1991] **McAuliffe CA.** 16. Cancer Therapy using Platinum Group Metals. In: Hartley FR, editor. *Chemistry of the Platinum Group Metals - Recent Developments - Studies in Inorganic Chemistry 11*. Cranfield Institute of Technology, Central Milton Keynes, UK: Elsevier; 1991.
- [Mesa 1999] **Mesa AV, Norman A, Solberg TD, Demarco JJ and Smathers JB.** Dose distributions using kilovoltage x-rays and dose enhancement from iodine contrast agents. *Phys Med Biol* 1999;44:1955-1968.
- [Misra 2003] **Misra A, Ganesh S, Shahiwala A and Shah SP.** Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci* 2003;6:252-273.

- [Moretto 2004] **Moretto P and Beck L.** Emission X induite par particules chargées (PIXE) : applications. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation* 2004;P2558:1-17.
- [Morrison 1994] **Morrison PF, Laske DW, Bobo H, Oldfield EH and Dedrick RL.** High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. *Am J Physiol* 1994;266:R292-305.
- [Morrison 1999] **Morrison PF, Chen MY, Chadwick RS, Lonser RR and Oldfield EH.** Focal delivery during direct infusion to brain: role of flow rate, catheter diameter, and tissue mechanics. *Am J Physiol* 1999;277:R1218-1229.
- [Munter 1999] **Munter MW, Karger CP, Reith W, Schneider HM, Peschke P and Debus J.** Delayed vascular injury after single high-dose irradiation in the rat brain: histologic immunohistochemical, and angiographic studies. *Radiology* 1999;212:475-482.
- [Nias 1985] **Nias AH.** Radiation and platinum drug interaction. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1985;48:297-314.
- [Nguyen 2001] **Nguyen JB, Sanchez-Pernaute R, Cunningham J and Bankiewicz KS.** Convection-enhanced delivery of AAV-2 combined with heparin increases TK gene transfer in the rat brain. *Neuroreport* 2001;12:1961-1964.
- [Oelckers 1996] **Oelckers S and Graeff W.** In situ measurement of iron overload in liver tissue by dual-energy methods. *Phys Med Biol* 1996;41:1149-1165.
- [Olivi 1993] **Olivi A, Gilbert M, Duncan KL, Corden B, Lenartz D and Brem H.** Direct delivery of platinum-based antineoplastics to the central nervous system: a toxicity and ultrastructural study. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;31:449-454.
- [Olivi 1996] **Olivi A, Ewend MG, Utsuki T, Tyler B, Domb AJ, Brat DJ and Brem H.** Interstitial delivery of carboplatin via biodegradable polymers is effective against experimental glioma in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996;39:90-96.
- [Ortega 2005] **Ortega R, Biston MC, Devès G, Bohic S and Carmona A.** Nuclear microprobe determination of platinum quantitative distribution in rat brain tumors after cisplatin or carboplatin injection for PAT treatment of glioma. *NIM B* 2005;231:321-325.
- [Paxinos 1986] **Paxinos G and Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. Second Edition; *Academic Press Inc.*; 1986.
- [Penn 1983] **Penn RD, Kroin JS, Harris JE, Chiu KM and Braun DP.** Chronic intratumoral chemotherapy of a rat tumor with cisplatin and fluorouracil. *Appl Neurophysiol* 1983;46:240-244.
- [Pignol 2003] **Pignol JP, Rakovitch E, Beachey D and Le Sech C.** Clinical significance of atomic inner shell ionization (ISI) and Auger cascade for radiosensitization using IUdR, BUdR, platinum salts, or gadolinium porphyrin compounds. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:1082-1091.
- [Prabhu 1998] **Prabhu SS, Broaddus WC, Gillies GT, Loudon WG, Chen ZJ and Smith B.** Distribution of macromolecular dyes in brain using positive pressure infusion: a model for direct controlled delivery of therapeutic agents. *Surg Neurol* 1998;50:367-375; discussion 375.
- [Prados 1996] **Prados MD, Phillips T, Gutin P, Davis R, Greenberg HS, Sandler H, Cascino TL and Schomberg PJ.** A phase III randomized study of radiotherapy with or without BUdR plus procarbazine, CCNU, and vincristine (PCV) for the treatment of anaplastic astrocytoma. *Radiation Therapy Oncology Group of the American College of Radiology (ACR)* 1996;RTOG 94-04:36p.

- [Prise 1998] **Prise KM, Ahnstrom G, Belli M, Carlsson J, Frankenberg D, Kiefer J, Loblrich M, Michael BD, Nygren J, Simone G and Stenerlow B.** A review of dsb induction data for varying quality radiations. *Int J Radiat Biol* 1998;74:173-184.
- [Raghavan 2006] **Raghavan R, Brady ML, Rodriguez-Ponce MI, Hartlep A, Pedain C and Sampson JH.** Convection-enhanced delivery of therapeutics for brain disease, and its optimization. *Neurosurg Focus* 2006;20:E12.
- [Rainov 2006] **Rainov NG, Soling A and Heidecke V.** Novel therapies for malignant gliomas: a local affair? *Neurosurg Focus* 2006;20:E9.
- [Ram 2003] **Ram Z, Barnett G, Vogelbaum S, Constantini S, Lillehei K, Sherman J, Fleming C, Westphal M, Mehdorn M and Puri R.** Pre-operative infusion of IL13-PE38QQR cytotoxin by convection-enhanced delivery (CED) in recurrent malignant glioma: a phase I/II study. 39th ASCO Annual Meeting. Chicago; 2003 (abstr 403).
- [Rand 2000] **Rand RW, Kreitman RJ, Patronas N, Varricchio F, Pastan I and Puri RK.** Intratumoral administration of recombinant circularly permuted interleukin-4-Pseudomonas exotoxin in patients with high-grade glioma. *Clin Cancer Res* 2000;6:2157-2165.
- [Ratliff 2001] **Ratliff JK and Oldfield EH.** Convection-enhanced delivery in intact and lesioned peripheral nerve. *J Neurosurg* 2001;95:1001-1011.
- [Rautio 2004] **Rautio J and Chikhale PJ.** Drug delivery systems for brain tumor therapy. *Curr Pharm Des* 2004;10:1341-1353.
- [Ravanat 2002] **Ravanat JL, Douki T, Duez P, Gremaud E, Herbert K, Hofer T, Lasserre L, Saint-Pierre C, Favier A and Cadet J.** Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* 2002;23:1911-1918.
- [Raymond 2002] **Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J and Cvitkovic E.** Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 2002;1:227-235.
- [Redgate 1991] **Redgate ES, Deutsch M and Boggs SS.** Time of death of CNS tumor-bearing rats can be reliably predicted by body weight-loss patterns. *Lab Anim Sci* 1991;41:269-273.
- [Renier 2005] **Renier M, Fiedler S, Nemoz C, Gonzalez H, Berruyer G and Bravin A.** A mechanical chopper with continuously adjustable duty cycle for a wide X-ray beam. *NIM A* 2005;548:111-115.
- [Rodriguez 1994] **Rodriguez R, Ritter MA, Fowler JF and Kinsella TJ.** Kinetics of cell labeling and thymidine replacement after continuous infusion of halogenated pyrimidines in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:105-113.
- [Rousseau 2004] **Rousseau J.** Caractérisation de la cémra FRELON haute résolution en comparaison avec un détecteur germanium. Rapport de stage de Master 2 Physique et Ingénierie ; Physique pour l'Instrumentation ; Université Joseph Fourier, Grenoble, 2004.
- [Rousseau 2007a] **Rousseau J, Boudou C, Esteve F and Elleaume H.** Convection-enhanced delivery of an iodine tracer into rat brain for synchrotron stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:943-951.
- [Rousseau 2007b] **Rousseau J, Boudou C, Barth RF, Balosso J, Esteve F and Elleaume H.** Enhanced Survival and Cure of F98 Glioma Bearing Rats following Intracerebral Delivery of Carboplatin in Combination with Photon Irradiation. *Clin Cancer Res* 2007;13:5195-5201.

- [Rousseau 2007c] **Rousseau J, Adam JF, Deman P, Estève F and Elleaume H.** Intracerebral delivery of 5-Iodo-2'-Deoxyuridine in combination with Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy. *Int J Radiat Biol*, 2007, *submitted*.
- [Saito 2004a] **Saito R, Bringas JR, McKnight TR, Wendland MF, Mamot C, Drummond DC, Kirpotin DB, Park JW, Berger MS and Bankiewicz KS.** Distribution of liposomes into brain and rat brain tumor models by convection-enhanced delivery monitored with magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 2004;64:2572-2579.
- [Saito 2004b] **Saito R, Bringas JR, Panner A, Tamas M, Pieper RO, Berger MS and Bankiewicz KS.** Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model. *Cancer Res* 2004;64:6858-6862.
- [Saito 2005] **Saito R, Krauze MT, Bringas JR, Noble C, McKnight TR, Jackson P, Wendland MF, Mamot C, Drummond DC, Kirpotin DB, Hong K, Berger MS, Park JW and Bankiewicz KS.** Gadolinium-loaded liposomes allow for real-time magnetic resonance imaging of convection-enhanced delivery in the primate brain. *Exp Neurol* 2005;196:381-389.
- [Sampath 1998] **Sampath P and Brem H.** Implantable Slow-Release Chemotherapeutic Polymers for the Treatment of Malignant Brain Tumors. *Cancer Control* 1998;5:130-137.
- [Sampson 2003] **Sampson JH, Akabani G, Archer GE, Bigner DD, Berger MS, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE, 2nd, Kunwar S, Marcus S, McLendon RE, Paolino A, Penne K, Provenzale J, Quinn J, Reardon DA, Rich J, Stenzel T, Tourt-Uhlig S, Wikstrand C, Wong T, Williams R, Yuan F, Zalutsky MR and Pastan I.** Progress report of a Phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor (TGF)-alpha and a mutated form of the Pseudomonas exotoxin termed PE-38 (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors. *J Neurooncol* 2003;65:27-35.
- [Sampson 2007] **Sampson JH, Brady ML, Petry NA, Croteau D, Friedman AH, Friedman HS, Wong T, Bigner DD, Pastan I, Puri RK and Pedain C.** Intracerebral infusate distribution by convection-enhanced delivery in humans with malignant gliomas: descriptive effects of target anatomy and catheter positioning. *Neurosurgery* 2007;60:ONS89-98;discussion ONS98-89.
- [Sandberg 2002] **Sandberg DI, Edgar MA and Souweidane MM.** Convection-enhanced delivery into the rat brainstem. *J Neurosurg* 2002;96:885-891.
- [Santos Mello 1983] **Santos Mello R, Callisen H, Winter J, Kagan AR and Norman A.** Radiation dose enhancement in tumors with iodine. *Med Phys* 1983;10:75-78.
- [Sarntinoranont 2003] **Sarntinoranont M, Iadarola MJ, Lonser RR and Morrison PF.** Direct interstitial infusion of NK1-targeted neurotoxin into the spinal cord: a computational model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R243-254.
- [Schmidt 2004] **Schmidt NO, Ziu M, Carrabba G, Giussani C, Bello L, Sun Y, Schmidt K, Albert M, Black PM and Carroll RS.** Antiangiogenic therapy by local intracerebral microinfusion improves treatment efficiency and survival in an orthotopic human glioblastoma model. *Clin Cancer Res* 2004;10:1255-1262.
- [Sgouros 1998] **Sgouros G, O'Donoghue JA, Larson SM, Macapinlac H, Larson JJ and Kemeny N.** Mathematical model of 5-[125I]iodo-2'-deoxyuridine treatment: continuous infusion regimens for hepatic metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41:1177-1183.
- [Simkiss 2007] **Simkiss D, Ebrahim GJ and Waterston AJR,** editors. Research Methods II: Multivariate Analysis - Chapter 12: Survival Analysis; 2007 - *Online only area*.

- [Sipos 1997] **Sipos EP, Tyler B, Piantadosi S, Burger PC and Brem H.** Optimizing interstitial delivery of BCNU from controlled release polymers for the treatment of brain tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;39:383-389.
- [Solberg 1992] **Solberg TD, Iwamoto KS and Norman A.** Calculation of radiation dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain tumours. *Phys Med Biol* 1992;37:439-443.
- [Storm 2002] **Storm PB, Moriarity JL, Tyler B, Burger PC, Brem H and Weingart J.** Polymer delivery of camptothecin against 9L gliosarcoma: release, distribution, and efficacy. *J Neurooncol* 2002;56:209-217.
- [Stupp 2005] **Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E and Mirimanoff RO.** Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-996.
- [Theeuwes 1976] **Theeuwes F and Yum SI.** Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Ann Biomed Eng* 1976;4:343-353.
- [Thomlinson 2000] **Thomlinson W, Berkvens P, Berruyer G, Bertrand B, Blattmann H, Brauer-Krisch E, Brochard T, Charvet AM, Corde S, Dimichiel M, Elleaume H, Esteve F, Fiedler S, Laissue JA, Le Bas JE, Le Duc G, Lyubimova N, Nemoz C, Renier M, Slatkin DN, Spanne P and Suortti P.** Research at the European Synchrotron Radiation Facility medical beamline. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000;46:1053-1063.
- [Usami 2005] **Usami N, Furusawa Y, Kobayashi K, Frohlich H, Lacombe S and Le Sech C.** Fast He²⁺ ion irradiation of DNA loaded with platinum-containing molecules. *Int J Radiat Biol* 2005;81:515-522.
- [van Vulpen 2002] **van Vulpen M, Kal HB, Taphoorn MJ and El-Sharouni SY.** Changes in blood-brain barrier permeability induced by radiotherapy: implications for timing of chemotherapy? (Review). *Oncol Rep* 2002;9:683-688.
- [Vavra 2004] **Vavra M, Ali MJ, Kang EW, Navalitloha Y, Ebert A, Allen CV and Groothuis DR.** Comparative pharmacokinetics of ¹⁴C-sucrose in RG-2 rat gliomas after intravenous and convection-enhanced delivery. *Neuro-oncol* 2004;6:104-112.
- [Vogelbaum 2005] **Vogelbaum MA.** Convection enhanced delivery for the treatment of malignant gliomas: symposium review. *J Neurooncol* 2005;73:57-69.
- [Vogelbaum 2007] **Vogelbaum MA.** Convection enhanced delivery for treating brain tumors and selected neurological disorders: symposium review. *J Neurooncol* 2007;83:97-109.
- [Voges 2003] **Voges J, Reszka R, Gossmann A, Dittmar C, Richter R, Garlip G, Kracht L, Coenen HH, Sturm V, Wienhard K, Heiss WD and Jacobs AH.** Imaging-guided convection-enhanced delivery and gene therapy of glioblastoma. *Ann Neurol* 2003;54:479-487.
- [Vidal 2004] Vidal © 2004, Le dictionnaire, 80^{ème} Edition.
- [Walter 1995] **Walter KA, Tamargo RJ, Olivi A, Burger PC and Brem H.** Intratumoral chemotherapy. *Neurosurgery* 1995;37:1128-1145.
- [Wang 2005] **Wang D and Lippard SJ.** Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:307-320.

- [Weber 2003] **Weber F, Asher A, Bucholz R, Berger M, Prados M, Chang S, Bruce J, Hall W, Rainov NG, Westphal M, Warnick RE, Rand RW, Floeth F, Rommel F, Pan H, Hingorani VN and Puri RK.** Safety, tolerability, and tumor response of IL4-Pseudomonas exotoxin (NBI-3001) in patients with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol* 2003;64:125-137.
- [Williams 1998] **Williams JA, Yuan X, Dillehay LE, Shastri VR, Brem H and Williams JR.** Synthetic, implantable polymers for local delivery of IUdR to experimental human malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42:631-639.
- [Wolf 1971] **Wolf G.** Elementary Histology for Neuropsychologists. In: Myers RD, editor. *Methods in Psychobiology*. Vol 1. New-York: Academic Press; 1971.
- [Wong 2004] **Wong CS and Van der Kogel AJ.** Mechanisms of Radiation Injury to the Central Nervous System: Implications for Neuroprotection. *Mol Interv* 2004;4:273-284.
- [Wood 1999] **Wood JD, Lonser RR, Gogate N, Morrison PF and Oldfield EH.** Convective delivery of macromolecules into the naive and traumatized spinal cords of rats. *J Neurosurg* 1999;90:115-120.
- [Wojnarowski 2000] **Wojnarowski JM, Faivre S, Herzig MC, Arnett B, Chapman WG, Trevino AV, Raymond E, Chaney SG, Vaisman A, Varchenko M and Juniewicz PE.** Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol Pharmacol* 2000;58:920-927.
- [Yang 1996] **Yang W, Barth RF, Carpenter DE, Moeschberger ML and Goodman JH.** Enhanced delivery of boronophenylalanine for neutron capture therapy by means of intracarotid injection and blood-brain barrier disruption. *Neurosurgery* 1996;38:985-992.
- [Yang 1997] **Yang W, Barth RF, Rotaru JH, Moeschberger ML, Joel DD, Nawrocky MM and Goodman JH.** Enhanced survival of glioma bearing rats following boron neutron capture therapy with blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of boronophenylalanine. *J Neurooncol* 1997;33:59-70.
- [Yang 2002] **Yang W, Barth RF, Adams DM, Ciesielski MJ, Fenstermaker RA, Shukla S, Tjarks W and Caligiuri MA.** Convection-enhanced delivery of boronated epidermal growth factor for molecular targeting of EGF receptor-positive gliomas. *Cancer Res* 2002;62:6552-6558.
- [Yang 2005] **Yang W, Barth RF, Wu G, Ciesielski MJ, Fenstermaker RA, Moffat BA, Ross BD and Wikstrand CJ.** Development of a syngeneic rat brain tumor model expressing EGFRvIII and its use for molecular targeting studies with monoclonal antibody L8A4. *Clin Cancer Res* 2005;11:341-350.

VII TABLE DES MATIÈRES

I	INTRODUCTION	1
II	PROBLÉMATIQUE.....	5
II.1	Les gliomes	5
II.1.1	Epidémiologie	5
II.1.1.1	Désignation et classification des tumeurs cérébrales.....	5
II.1.1.2	Caractéristiques des gliomes malins (anaplasique et glioblastome).....	6
II.1.1.3	Incidence des gliomes	7
II.1.1.4	Pronostic vital.....	7
II.1.2	Développement tumoral et barrière hémato-encéphalique	7
II.1.2.1	Angiogenèse.....	7
II.1.2.2	Barrière hémato-encéphalique : structure et fonction.....	8
II.1.2.3	Altération de la BHE et effet des tumeurs	8
II.1.3	Traitements conventionnels	9
II.1.3.1	Ablation chirurgicale	9
II.1.3.2	Radiothérapie.....	10
II.1.3.3	Chimiothérapie.....	10
II.1.3.4	Témozolomide	10
II.1.4	Vers de nouvelles stratégies pour délivrer efficacement des drogues.....	11
II.1.4.1	Quels sont les obstacles à la chimiothérapie intracérébrale ?.....	11
II.1.4.2	Stratégies développées	13
II.2	Méthode de « Convection-Enhanced Delivery » (CED).....	16
II.2.1	Définitions.....	16
II.2.1.1	Terminologie.....	16
II.2.1.2	Contexte : s'affranchir de la barrière hémato-encéphalique (BHE).....	16
II.2.1.3	Diffusion	16
II.2.1.3.1	<i>Diffusion de la matière et lois de Fick.....</i>	<i>16</i>
II.2.1.3.2	<i>Diffusion d'un composé dans un tissu biologique.....</i>	<i>17</i>
II.2.1.4	Convection d'une solution	17
II.2.1.4.1	<i>Convection et transfert de matière.....</i>	<i>17</i>
II.2.1.4.2	<i>Convection d'un fluide dans les tissus biologiques.....</i>	<i>18</i>
II.2.1.5	Comparaison convection/diffusion	18
II.2.1.6	Reflux	19
II.2.2	Paramètres importants : approche empirique	20
II.2.2.1	Débit d'infusion	20
II.2.2.2	Diamètre de l'aiguille ou de la canule.....	21
II.2.2.3	Concentration du composé.....	22
II.2.2.4	Volume de distribution et rapport V_d/V_i	23
II.2.2.5	Nature de l'agent perfusé.....	24
II.2.3	Modèle mathématique du reflux donné par Morrison <i>et al.</i>.....	24
II.2.4	Distribution d'une drogue	25
II.2.4.1	Phénomènes physiologiques modifiant la distribution de drogue	25
II.2.4.2	Evolution temporelle de la concentration.....	26
II.2.5	Utilisation préclinique et clinique de la méthode CED	28
II.2.5.1	Des applications précliniques variées.....	28
II.2.5.2	Limitations du modèle animal et difficultés de l'application clinique.....	28
II.2.5.3	Développements nécessaires de l'imagerie.....	29
II.3	Agents pharmacologiques	31
II.3.1	Cisplatine.....	31

II.3.1.1	Découverte.....	31
II.3.1.2	Mécanisme d'action du cisplatine	31
II.3.1.2.1	<i>Pharmacologie cellulaire</i>	32
II.3.1.2.2	<i>Interactions du cisplatine avec l'ADN</i>	32
II.3.1.3	Utilisation clinique du cisplatine	34
II.3.2	Autres complexes platinés : carboplatine et oxaliplatine	34
II.3.2.1	Analogie structurelle avec le cisplatine.....	34
II.3.2.2	Particularités du carboplatine.....	35
II.3.2.3	Particularités de l'oxaliplatine	36
II.3.3	Injection intracérébrale de drogues platinées <i>in vivo</i> : revue de la littérature	38
II.3.3.1	Cisplatine et carboplatine : toxicité pour le système nerveux central	38
II.3.3.2	Cisplatine : toxicité et survie chez des rats porteurs de gliome	39
II.3.3.2.1	<i>Chimiothérapie sur modèle 9L (1992)</i>	39
II.3.3.2.2	<i>Chimiothérapie combinée à une irradiation au ¹³⁷Cs sur modèle 9L (1993)</i>	40
II.3.3.2.3	<i>Chimiothérapie combinée à une irradiation synchrotron sur modèle F98 (2004)</i>	41
II.3.3.3	Carboplatine : toxicité et survie chez des rats porteurs de gliome	42
II.3.3.3.1	<i>Toxicité et chimiothérapie sur modèle 9L (2003)</i>	42
II.3.3.3.2	<i>Chimio-radiothérapie (SSR ou haute énergie) sur modèle F98 (2004)</i>	43
II.3.3.4	Localisation et quantification du platine après injection intracérébrale par pompe osmotique 43	
II.3.3.4.1	<i>Cisplatine (1982)</i>	43
II.3.3.4.2	<i>Carboplatine (2002)</i>	45
II.3.3.4.3	<i>Carboplatine (2005)</i>	46
II.3.4	L'iode-désoxyuridine, analogue de la thymidine	47
II.3.4.1	Généralités	47
II.3.4.2	Problème de toxicité pour une application clinique	48
II.3.4.3	Rôle des radio-isotopes.....	48
II.3.4.4	Taux d'incorporation de l'IUdR.....	49
II.3.4.4.1	<i>Relations avec la durée du cycle cellulaire <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i></i>	49
II.3.4.4.2	<i>Conséquences cliniques</i>	50
II.3.4.5	Dosages utilisés <i>in vivo</i> et résultats de survie obtenus dans la littérature	51
II.3.4.5.1	<i>¹²⁵IUdR (pompe osmotique)</i>	51
II.3.4.5.2	<i>Combinaison IUdR (pompe osmotique) et radiothérapie</i>	51
II.3.4.5.3	<i>Combinaison IUdR et radiothérapie synchrotron (SSR)</i>	52
II.3.4.5.4	<i>Combinaison IUdR (liposomes) et radiothérapie</i>	52
II.4	Rayons X et atomes lourds présents dans l'ADN	53
II.4.1	Rapides notions sur les radiations ionisantes.....	53
II.4.2	Effet Auger et énergie d'irradiation.....	54
II.4.3	Simulations Monte-Carlo à l'échelle de l'ADN et en présence d'atomes lourds	55
II.4.4	Irradiation monochromatique d'atomes de platine présents dans l'ADN	57
II.4.4.1	Echelle cellulaire.....	57
II.4.4.2	Echelle moléculaire.....	58
II.4.4.3	Survie animale.....	59
III	TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES	61
III.1	Le rayonnement synchrotron et la ligne médicale de l'ESRF	61
III.1.1	Généralités.....	61
III.1.1.1	Principe du rayonnement synchrotron	61
III.1.1.2	Production et modes de fonctionnement.....	61
III.1.2	Organisation de la ligne expérimentale ID17.....	63
III.1.2.1	Caractéristiques du faisceau	63
III.1.2.2	Monochromateur.....	64
III.1.2.3	Ajustement du faisceau et système de positionnement.....	65
III.1.2.4	Système de détection	65
III.1.2.4.1	<i>Détecteur germanium</i>	65

III.1.2.4.2	Caméra FReLoN.....	67
III.2	Tomographie quantitative en rayonnement synchrotron (TQRS).....	69
III.2.1	Principe général de la tomographie par rayons X	69
III.2.1.1	Transmission de l'énergie et coefficients d'atténuation	69
III.2.1.2	Acquisition tomographique.....	70
III.2.1.3	Reconstruction	71
III.2.1.4	Utilisation d'agents de contraste	71
III.2.2	Qu'est ce que la tomographie quantitative par RS?	73
III.2.2.1	Avantage du rayonnement monochromatique	73
III.2.2.2	Mesure de concentration d'agent de contraste	73
III.3	Modèle expérimental de tumeur	74
III.3.1	Modèles animal et tumoral.....	74
III.3.1.1	Nécessité d'un modèle animal	74
III.3.1.2	Structures cérébrales : quelques définitions	74
III.3.1.2.1	<i>Le striatum</i>	75
III.3.1.2.2	<i>Le corps calleux</i>	75
III.3.1.2.3	<i>Interstitium</i>	75
III.3.1.3	Caractéristiques du modèle F98	75
III.3.1.4	Protocole initial d'inoculation des cellules tumorales.....	77
III.3.1.4.1	<i>Culture cellulaire</i>	77
III.3.1.4.2	<i>Anesthésie</i>	77
III.3.1.4.3	<i>Protocole initial d'implantation de la tumeur</i>	77
III.3.1.4.4	<i>Modifications apportées au protocole</i>	78
III.3.1.5	Référence commerciale des drogues antinéoplasiques platinées utilisées.....	79
III.3.2	Protocole d'irradiation synchrotron.....	80
III.3.2.1	Dosimétrie.....	80
III.3.2.1.1	<i>Chambre d'ionisation PTW</i>	80
III.3.2.1.2	<i>Détecteur HPGe</i>	80
III.3.2.2	Irradiation stéréotaxique (SSR)	81
III.3.2.3	Imagerie post-irradiation	83
III.3.3	Irradiation haute énergie	84
III.3.4	Analyse de la survie, aspects statistiques	84
III.3.4.1	Suivi post-traitement	84
III.3.4.2	Analyse histopathologique	85
III.3.4.2.1	<i>Conservation à froid</i>	85
III.3.4.2.2	<i>Fixation au paraformaldéhyde</i>	86
III.3.4.3	Pourcentage d'augmentation de survie	86
III.3.4.4	Tests statistiques	87
IV	RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	89
IV.1	Distribution obtenue par CED : imagerie	89
IV.1.1	Rappels problématique	89
III.1.1.1	SSR et distribution d'éléments dans les tumeurs.....	89
IV.1.1.1.1	<i>Radiothérapie par renforcement du dépôt de dose</i>	89
IV.1.1.1.2	<i>Chimio-radiothérapie combinée</i>	89
III.1.1.2	Comment connaître <i>in vivo</i> les distributions obtenues ?.....	90
III.1.1.3	Choix du traceur.....	90
IV.1.2	Groupes expérimentaux	91
III.1.2.1	Choix des variables testées.....	91
III.1.2.2	Modèle animal et tumoral.....	92
III.1.2.3	Dispositifs d'injection	93
IV.1.2.3.1	<i>Injection par CED</i>	93
IV.1.2.3.2	<i>Injection « bolus »</i>	94
IV.1.3	Acquisition des images CT et calcul des concentrations en iode	95

IV.1.3.1	Dispositif d'imagerie CT : rappels	95
IV.1.3.2	Mesure de concentrations en iode	96
IV.1.4	Analyse de la biodistribution de l'iode : méthode	97
IV.1.4.1	Volume de distribution V_d et rapport V_d/V_i	97
IV.1.4.2	Evolution temporelle	98
IV.1.4.3	Facteur d'augmentation de dose	100
IV.1.4.4	Dosimétrie Monte-Carlo calculée avec <i>SSRdose</i>	101
IV.1.5	Biodistribution de l'iode : résultats et discussion.....	102
IV.1.5.1	Comparaison des deux méthodes d'injection (bolus/CED).....	102
IV.1.5.1.1	<i>Forme de la distribution et problème de reflux</i>	102
IV.1.5.1.2	<i>Volumes de distribution</i>	104
IV.1.5.1.3	<i>Evolution temporelle de la concentration maximale mesurée</i>	104
IV.1.5.2	Distribution d'iode obtenue par CED	104
IV.1.5.2.1	<i>Relation linéaire entre V_d et V_i</i>	104
IV.1.5.2.2	<i>Evolution temporelle de la distribution</i>	105
IV.1.5.3	Renforcement de la dose X.....	106
IV.1.5.3.1	<i>Une distribution d'iode adaptée</i>	106
IV.1.5.3.2	<i>Distribution de dose calculée par simulation Monte-Carlo</i>	106
IV.1.5.3.3	<i>Avantage de la CED pour une irradiation SSR avec renforcement de dose</i>	107
IV.1.6	Imagerie d'une injection par CED à haute résolution : résultats préliminaires	107
IV.2	Essais précliniques de chimio-radiothérapie	109
IV.2.1	Premiers essais avec la méthode CED : cisplatine combiné à 15 Gy (SSR)	109
IV.2.1.1	Mise en place de la CED	109
IV.2.1.1.1	<i>Objectif de ces premiers essais précliniques</i>	109
IV.2.1.1.2	<i>Choix des quantités de cisplatine injectées</i>	109
IV.2.1.1.3	<i>Types d'injection utilisés</i>	110
IV.2.1.2	Matériels et méthodes	110
IV.2.1.2.1	<i>Implantation de la tumeur</i>	110
IV.2.1.2.2	<i>Dispositif pour l'injection CED</i>	111
IV.2.1.2.3	<i>Paramètres d'irradiation</i>	111
IV.2.1.3	Premiers résultats.....	111
IV.2.1.3.1	<i>Toxicité</i>	111
IV.2.1.3.2	<i>Courbes de survie, premières observations</i>	113
IV.2.1.3.3	<i>Premières interprétations</i>	113
IV.2.2	Carboplatine par CED combiné à 15 Gy SSR : premiers essais.....	115
IV.2.2.1	Injections de carboplatine par CED : choix des paramètres.....	115
IV.2.2.1.1	<i>Objectif</i>	115
IV.2.2.1.2	<i>Quantités de carboplatine injectées</i>	115
IV.2.2.2	Matériels et méthodes	116
IV.2.2.2.1	<i>Implantation de la tumeur</i>	116
IV.2.2.2.2	<i>Injection du carboplatine par CED</i>	116
IV.2.2.2.3	<i>Paramètres d'irradiation</i>	117
IV.2.2.3	Résultats.....	118
IV.2.2.3.1	<i>Chimiothérapie seule</i>	118
IV.2.2.3.2	<i>Traitements combinés</i>	119
IV.2.2.3.3	<i>Comparaison traitement combiné et chimiothérapie seule</i>	119
IV.2.2.4	Premières conclusions avec le carboplatine	120
IV.2.3	Chimiothérapie : carboplatine par CED.....	121
IV.2.3.1	Objectifs	121
IV.2.3.2	Matériels et méthodes	121
IV.2.3.2.1	<i>Implantation des cellules tumorales</i>	121
IV.2.3.2.2	<i>Paramètres d'injection CED</i>	121
IV.2.3.3	Résultats.....	122
IV.2.3.3.1	<i>Analyse de la toxicité</i>	122
IV.2.3.3.2	<i>Analyse de la survie</i>	122
IV.2.3.4	Conclusion - discussion.....	124
IV.2.4	Carboplatine et irradiation fractionnée : comparaison haute énergie - SSR.....	125
IV.2.4.1	Mise en place d'un schéma d'irradiation fractionnée.....	125

IV.2.4.1.1	Objectif	125
IV.2.4.1.2	Définition du facteur équivalent de dose (BED)	125
IV.2.4.1.3	Chimiothérapie et irradiations fractionnées choisies	126
IV.2.4.2	Matériels et méthodes	126
IV.2.4.2.1	Implantation de la tumeur	126
IV.2.4.2.2	Paramètres d'injection CED	127
IV.2.4.2.3	Paramètres d'irradiation (6 MV et 78,8 keV)	127
IV.2.4.3	Résultats	127
IV.2.4.3.1	Analyse de la survie : irradiation haute énergie (6 MV)	128
IV.2.4.3.2	Analyse de la survie : irradiation SSR (monochromatique ; 78,8 keV)	129
IV.2.4.3.3	Comparaison des irradiations haute énergie et SSR	130
IV.2.4.4	Conclusion	131
IV.2.5	Combinaison carboplatine et 20 Gy ou oxaliplatine et 15 Gy (SSR)	132
IV.2.5.1	Objectifs et choix des paramètres de traitement	132
IV.2.5.1.1	Dose supérieure à 15 Gy	132
IV.2.5.1.2	Tester une autre drogue platinée antinéoplasique	132
IV.2.5.2	Matériels et méthodes	133
IV.2.5.2.1	Implantation des cellules tumorales	133
IV.2.5.2.2	Paramètres d'injection CED	133
IV.2.5.2.3	Paramètres d'irradiation	133
IV.2.5.3	Résultats	134
IV.2.5.3.1	Oxaliplatine - 15 Gy	134
IV.2.5.3.2	Carboplatine - 20 Gy	135
IV.2.5.4	Conclusion	136
IV.2.6	Carboplatine par pompe osmotique associé à 15 Gy (SSR) : premiers essais	137
IV.2.6.1	Choix des paramètres	137
IV.2.6.1.1	Objectifs	137
IV.2.6.1.2	Quantités de carboplatine pour les pompes osmotiques	137
IV.2.6.1.3	Groupes de traitement	138
IV.2.6.2	Matériels et méthodes	138
IV.2.6.2.1	Cellules avec de l'agarose : préparation spécifique et implantation	138
IV.2.6.2.2	Injections par pompe osmotique	139
IV.2.6.2.3	Paramètres d'injection CED	141
IV.2.6.2.4	Paramètres d'irradiation	141
IV.2.6.3	Résultats	141
IV.2.6.3.1	Toxicité-inocuité des traitements	141
IV.2.6.3.2	Chimiothérapie	142
IV.2.6.3.3	Groupe dextrose et radiothérapie	143
IV.2.6.3.4	Combinaison carboplatine i.c. (CED ou pompe osmotique) et 15 Gy	144
IV.2.6.3.5	Imagerie des rats survivants à long terme	145
IV.2.6.3.6	Rats survivants à long terme : analyse histo-pathologique	146
IV.2.6.4	Conclusion	148
IV.2.7	Carboplatine ou cisplatine par CED associé à une irradiation haute énergie	149
IV.2.7.1	Objectif de l'étude et groupes de traitements	149
IV.2.7.2	Matériels et méthodes	149
IV.2.7.3	Résultats	149
IV.2.7.3.1	Carboplatine suivi ou non de 15 Gy	150
IV.2.7.3.2	Cisplatine suivi ou non de 15 Gy	151
IV.2.7.3.3	Comparaison cisplatine et carboplatine	151
IV.2.7.4	Conclusion	152
IV.2.8	Carboplatine, cisplatine ou IUdR associé à une irradiation de 15 Gy (SSR)	153
IV.2.8.1	Objectifs de l'étude et groupes de traitement	153
IV.2.8.2	Matériels et méthodes	153
IV.2.8.2.1	Implantations, injections et irradiations	153
IV.2.8.2.2	Préparation spécifique de l'IUdR	154
IV.2.8.3	Résultats	155
IV.2.8.3.1	IUdR seul ou combiné à 15 Gy	155
IV.2.8.3.2	Cisplatine seul ou combiné à 15 Gy	157
IV.2.8.3.3	Carboplatine délivré par CED ou pompe osmotique, seul et combiné à 15 Gy	158
IV.2.8.4	Comparaison avec les résultats précédents, discussion et conclusion	160

IV.2.8.4.1	IUdR.....	160
IV.2.8.4.2	Cisplatine et carboplatine : comparaison haute énergie et SSR.....	160
IV.2.8.4.3	Pompes osmotiques.....	161
IV.3	Quantification.....	162
IV.3.1	Détection des adduits de l'ADN par HPLC-MS/MS.....	162
IV.3.1.1	Présentation de la technique.....	162
IV.3.1.1.1	<i>Qu'est-ce que la méthode HPLC-MS/MS ?</i>	162
IV.3.1.1.2	<i>Comment détecter les adduits de platine?</i>	163
IV.3.1.2	Préparation spécifique des échantillons.....	163
IV.3.1.2.1	<i>Traitements testés</i>	163
IV.3.1.2.2	<i>Zones cérébrales analysées</i>	164
IV.3.1.3	Premiers résultats.....	165
IV.3.2	Microanalyse par spectrométrie de masse d'ions secondaires (Nano-SIMS)	166
IV.3.2.1	Présentation de la technique d'analyse par Nano-SIMS	166
IV.3.2.2	Préparation spécifique des échantillons.....	167
IV.3.2.2.1	<i>Traitements de chimiothérapie testés</i>	167
IV.3.2.2.2	<i>Fixation et inclusion du tissu cérébral</i>	167
IV.3.2.2.3	<i>Coloration et repérage</i>	168
IV.3.2.3	Résultats.....	168
IV.3.2.3.1	<i>Injections intracérébrales d'IUdR</i>	168
IV.3.2.3.2	<i>Injections intracérébrales de drogues platinées</i>	170
IV.3.2.3.3	<i>Interprétation de l'analyse du platine</i>	171
IV.3.3	Analyse par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS).....	172
IV.3.3.1	Présentation de la technique.....	172
IV.3.3.2	Préparation spécifique des échantillons.....	173
IV.3.3.2.1	<i>Traitements testés</i>	173
IV.3.3.2.2	<i>Zones cérébrales analysées</i>	173
IV.3.3.3	Résultats.....	174
IV.3.4	Analyse par fluorescence X induite par un faisceau de particules chargées (PIXE)....	175
IV.3.4.1	Présentation de la technique d'analyse par PIXE et de la microsonde.....	175
IV.3.4.2	Préparation spécifique des échantillons.....	176
IV.3.4.2.1	<i>Traitements testés</i>	176
IV.3.4.2.2	<i>Fixation sur cible</i>	176
IV.3.4.3	Résultats et discussion.....	177
V	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	179
V.1	Imagerie et caractéristiques de la CED	179
V.2	Essais précliniques de chimio-radiothérapie	181
V.3	Vers une application clinique	183
VI	RÉFÉRENCES	185
VII	TABLE DES MATIÈRES	199
VIII	ANNEXE : Publications	

PHYSICS CONTRIBUTION

CONVECTION-ENHANCED DELIVERY OF AN IODINE TRACER INTO RAT BRAIN FOR SYNCHROTRON STEREOTACTIC RADIOTHERAPY

JULIA ROUSSEAU,*^{†‡} CAROLINE BOUDOU, PH.D.,*^{†‡} FRANÇOIS ESTÈVE, M.D., PH.D.,*^{†‡§} AND
HÉLÈNE ELLEAUME, PH.D.*^{†‡§}

*INSERM U647, Grenoble, France; [†]Université Joseph Fourier, Grenoble, France; [‡]European Synchrotron Radiation Facility, Medical Beamline ID17, Grenoble, France; and [§]Centre Hospitalier Universitaire, Hôpital Michallon, Grenoble, France

Purpose: To evaluate direct intracerebral and intratumoral iodine delivery as means to improve iodine distribution for synchrotron stereotactic radiotherapy (SSR) and to evaluate the corresponding X-ray dose distribution.

Methods and Materials: Healthy rats and F98 glioma-bearing rats received an iodinated contrast agent (iopamidol) intracerebrally either by bolus injection (5 μL over approximately 1 min) or by convection-enhanced delivery (infusion volumes of 5, 10, and 20 μL at a rate of 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$). We used synchrotron computed tomography (CT) to determine the iodine distribution after completion of infusion and a Monte Carlo code to compute the resulting radiation dose in SSR.

Results: Post-infusion CT imaging revealed high iodine concentrations in the perfused area with both injection methods. The iodine concentration remained elevated, with an exponential decay time constant of approximately 50 min, well suited for SSR treatment. Convection-enhanced delivery was shown to provide more uniform and controlled volumes of distribution than bolus injection and was chosen to evaluate the corresponding X-ray dose distribution. Sharp dose gradients around the target and excellent sparing of the contralateral brain were achievable with low iodine concentrations in the surrounding healthy brain tissues and blood vessels.

Conclusions: Convection-enhanced delivery is an effective method to deliver high iodine concentrations and could improve the outcome of iodine-enhanced SSR. © 2007 Elsevier Inc.

Convection-enhanced delivery, Iodine, Malignant glioma, Synchrotron, Radiotherapy, Tomography, Monte Carlo dosimetry.

INTRODUCTION

Malignant brain tumors are still associated with a poor prognosis despite advances in neurosurgery, radiotherapy, and chemotherapy. Heavy atom enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy (SSR) is a therapeutic method that involves selective accumulation of high atomic elements (such as iodine, $Z = 53$) in tumors, followed by stereotactic irradiation with monochromatic X-rays from a synchrotron source (1–4). There must be a sufficient amount of iodine in the tumor (>5 mg/g) to increase the dose in the target; conversely, low levels are required in the blood and normal brain so that they will receive only small radiation doses. Moreover, the tumor iodine level should remain elevated for the overall duration of the X-ray treatment (approximately 15 min). It has been shown both experimentally (5–8) and theoretically by Monte Carlo simulations (9–11) that the

dose enhancement depends on the photon beam energy and on the iodine concentration. We have previously reported that intracarotid infusion of iodine, together with a blood–brain barrier opener (mannitol), significantly improved the tumor iodine content and the survival of rats bearing F98 glioma at X-ray doses ≤ 15 Gy (3). However, with this infusion protocol the iodine concentration in the blood vessels was approximately 3 times the tumor iodine concentration, leading to very high radiation doses delivered to the vessels. To overcome this problem, we envisaged by-passing the blood–brain barrier by introducing the heavy element directly into the extravascular space. Drugs can be delivered intracerebrally with controlled delivery systems, such as subcutaneous pumps or biodegradable polymers. However, these approaches rely on diffusion, which is concentration dependent and inversely related to the size of the

Reprint requests to: Hélène Elleaume, Ph.D., Unité INSERM 647, ESRF, Medical Beamline, BP 220, 38043 Grenoble Cedex 9, France. Tel: (+33) 4-7688-2343; Fax: (+33) 4-7688-2885; E-mail: h.elleaume@esrf.fr

Acknowledgments—The authors thank the European Synchrotron Radiation Facility medical beamline for providing the necessary beam time and technical assistance in all the steps of the experi-

mental studies; Thierry Brochard and Christian Nemoz for instrumentation and software support; and Dominique Dallery for animal care.

Conflict of interest: none.

Received Dec 4, 2006, and in revised form Jan 30, 2007.
Accepted for publication Jan 31, 2007.

agent. These limitations often result in the nonhomogeneous distribution of the drug within very short distances from the injection site. Convection-enhanced delivery (CED) is a direct intracerebral drug delivery technique that uses convection (bulk flow mechanism) to distribute molecules to clinically significant volumes of tissue (12–17). Previous studies have demonstrated that CED can be safely used to distribute small or large molecular weight compounds in a homogeneous and targeted manner (12, 15, 16, 18–23). The advantages of this method over diffusion-dependent methods include greater distribution volumes (V_d), more uniform drug concentrations within the treatment volume, and relative independence from molecule size.

To determine whether CED could provide an improved iodine distribution for SSR treatment, we first compared the V_d obtained after CED or bolus injection of 5 μL of an iodinated tracer (iopamidol) in normal and F98 glioma-bearing rats. We then studied the iodine distribution, with increasing volumes infused by CED in healthy and brain tumor-bearing animals. We used three-dimensional synchrotron radiation computed tomography (SRCT) to monitor *in vivo* the time-course distribution of iopamidol after completion of infusion. Monte Carlo calculations were finally performed, based on the iodine biodistribution CT images, to evaluate the resulting X-ray dose distributions.

METHODS AND MATERIALS

Animal preparation

Twenty-eight male Fischer 344 rats, 7 to 8 weeks old, weighing between 230 and 260 g, were used in this study (Charles River Laboratories France, L'Abresles, Rhône, France). Anesthesia was induced by isoflurane inhalation followed by an intraperitoneal injection of ketamine (64.5 mg/kg) mixed with xylazine (5.4 mg/kg). Supplemental injections of ketamine and xylazine were administered as needed to maintain an appropriate level of anesthesia throughout the procedures. All operative procedures and animal care were in conformity with the French Government Guidelines (decree 87-848 of October 19, 1987, license 7593 and A38071). The protocol used in this study was approved by the institutional animal care and use committee of the European Synchrotron Radiation Facility.

Tumor implantation

The F98 glioma cells (American Type Culture Collection; ATCC-LGC Promochem, Molsheim, France) (24) were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin, and streptomycin. The F98 cells were inoculated using the method described by Benabid *et al.* (25). Briefly, on the day of tumor injection, the rats were placed in a small animal stereotactic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). The animals' eyes were lubricated with an ocular lubricant. A midline incision was made in the scalp, and the skull target (3.5 mm right of the bregma) was identified. A hand-held drill was used to create a small burr hole at this location. The Hamilton infusion syringe (model 701 N) was secured in the clamping device of the stereotactic frame. The associated 26s-gauge needle was first inserted to a depth of 6.0 mm from the skull

and then withdrawn to its target depth in the brain (5.5 mm from the skull surface). One thousand F98 cells diluted in 5 μL of serum-free Dulbecco's modified Eagle medium were then injected over approximately 1 min. The needle was maintained in place for 1 min after the infusion and withdrawn slowly. The skull hole was sealed with bone wax, and the scalp was sutured. Under these conditions, the procedure results in 100% tumor uptake and a median survival time of 26 days. The tumoral volume was approximately $20 \pm 10 \text{ mm}^3$ at Day 14 (4).

Tracer used for SRCT scanning

Iopamidol (MW 777 D, concentration 408.3 mg/mL; Iopamiron 200; Schering, Berlin, Germany) containing 200 mg/mL organically bound iodine was the imaging tracer used in this study. It was diluted in NaCl isotonic solution to obtain a final iodine concentration of 100 mg/mL. Croteau *et al.* (26) have previously reported the successful and safe use of this iodine-based surrogate tracer for monitoring CED in the central nervous system of rats and primates. In the present study, none of the 13 healthy rats that received iopamidol, either by CED or bolus injection, had evidence of toxicity during the 6-month period of observation.

CED and bolus infusion of iopamidol

For tumor-bearing rats, iopamidol infusion was performed on Day 13 after tumor implantation. After anesthesia, the animals were placed in the stereotactic frame, and the same procedure was followed as described for tumor implantation. To deliver iopamidol into the brain by CED we used a noncompliant, gas-tight infusion system consisting of a syringe pump (model PHD22/2000; Harvard Apparatus, Holliston, MA) that produces a constant pressure gradient, which is transmitted through a hydraulic drive connected to the plunger of the 25- μL infusate syringe (gas-tight, model 1702 RN, Hamilton, Bonaduz, Switzerland) filled with the diluted iopamidol solution (19, 27–29). The hydraulic system was composed of a water-filled polyetheretherketone tube attached at both ends by a flangeless low-pressure union to a 250- μL gas-tight Hamilton syringe (model 1725 TLLX). One TLLX syringe was placed in the syringe pump, whereas the plunger of the second one transmitted the fluid pressure to the plunger of the infusate-filled syringe. The tip of the needle was positioned into the right caudate nucleus of non-tumor-bearing rats or into the tumor bed of glioma-bearing rats (location 3.5 mm right of the bregma and 5.5 mm below the skull surface). All CED infusions were performed at a rate of 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ with a 32-gauge needle (attached to the 25- μL infusate-filled syringe). The bolus infusions (5 μL of iopamidol) were performed with a 26s-gauge Hamilton syringe (model 701 N) over 1 min.

Experimental groups

The 28 animals were divided into 8 experimental groups of 3 to 4 rats each. Non-tumor-bearing rats (*i.e.*, normal rats) were divided into 4 groups as follows: Group 1 received an intracerebral (*i.c.*) bolus injection of 5 μL iopamidol (100 mg/mL) for 1 min; Groups 2, 3, and 4 received iopamidol (100 mg/mL) by CED with injection volumes of 5, 10, and 20 μL , respectively, at a rate of 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Similarly, tumor-bearing rats were divided into 4 groups as follows: Group 5 received an intratumoral bolus injection of 5 μL iopamidol (100 mg/mL); Groups 6, 7, and 8 received iopamidol (100 mg/mL) by CED with injection volumes of 5, 10, and 20 μL , respectively, at a rate of 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. The experimental groups,

Table 1. V_d of iopamidol and V_d/V_i ratios after bolus injection or CED into normal rat brain or F98-bearing brain

Group	Category	Infusion			V_d (μL) (mean \pm SD)	V_d/V_i (mean \pm SD)
		Route	Time (min)	Volume (μL)		
1	Normal	Bolus i.c.	1	5	26.91 \pm 2.32	5.38 \pm 0.46
2	Normal	CED	10	5	19.23 \pm 1.39	3.85 \pm 0.28
3	Normal	CED	20	10	33.32 \pm 10.91	3.33 \pm 1.09
4	Normal	CED	40	20	72.73 \pm 13.31	3.64 \pm 0.67
5	Tumor	Bolus i.c.	1	5	21.38 \pm 1.49	4.28 \pm 0.30
6	Tumor	CED	10	5	15.35 \pm 4.90	3.07 \pm 0.98
7	Tumor	CED	20	10	32.67 \pm 11.28	3.27 \pm 1.13
8	Tumor	CED	40	20	72.93 \pm 6.98	3.65 \pm 0.35

Abbreviations: V_d = distribution volume; V_i = infusion volume; CED = convection-enhanced delivery; SD = standard deviation; i.c. = intracerebral.

The V_d were determined from the CT images, applying a threshold of 5% of the injected concentration. Means and SDs were calculated in groups of 3 to 4 animals each.

infusion rates, and injection volumes in the brains of normal rats or F98 tumor-bearing rats are summarized in Table 1.

Quantitative CT analysis of iodine distribution

With monochromatic X-rays it is possible to compute the absolute iodine concentration in any area of the brain directly from the CT images (30–32). In this study, we used the SRCT imaging system of the European Synchrotron Radiation Facility medical beamline (33, 34). The X-ray beam was tuned at 35 keV (150-eV energy bandwidth), above the iodine K-edge (33.17 keV). Real-time coronal CT scans (1-mm slice thickness, 1-mm spacing) were acquired starting 5–10 min after completion of i.c. iodine infusion. The detector used in this study is a high-purity germanium detector segmented in 432 elements with 0.35-mm pixel size (Eurisy Mesures, Lingolsheim, France). Image reconstruction was performed using the SNARK89 filtered back projection algorithm (35). The images were analyzed using Interactive Data Language processing software (Research Systems, Boulder, CO).

The iodine concentrations in all voxels of the rat's brain were estimated using:

$$c = \frac{(\mu - \mu_0)}{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{E,I}} \quad (1)$$

where c ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) is the iodine concentration, μ (cm^{-1}) is the linear attenuation coefficient measured in the SRCT images after iodine infusion, and μ_0 (cm^{-1}) is the linear attenuation coefficient of brain tissue without iodine. μ_0 was measured in several regions of interest (ROIs): $\mu_0 = 0.3149 \pm 0.0001 \text{ cm}^{-1}$ at 35 keV.

$(\mu/\rho)_{E,I}$ is the iodine mass attenuation coefficient at energy E ; in this study $(\mu/\rho)_{35\text{keV},I} = 31.23 \text{ (cm}^2\text{g}^{-1}\text{)}$.

Determination of volume of distribution

To establish the relationship between the infusion volume (V_i) and the V_d in normal or F98 glioma-bearing brains, 5, 10, or 20 μL of iodine were infused to the rats. Volume of distribution was calculated from the CT images immediately after infusion. Volume of distribution was defined as the tissue volume in which the local concentration of iodine exceeded 5 mg/mL (*i.e.*, 5% of the iodine concentration infused [100 mg/mL]). This volume was delineated by growing an ROI from voxels having a value exceeding this

threshold. The ROIs were visually inspected before being included in the calculation of V_d . The value of V_d was then calculated by adding the number of voxels included in the ROI multiplied by the volume of a single voxel (*i.e.*, 0.1225 μL).

Iodine concentration time-course study

Clearance of the contrast in the CT images generated by iodine was analyzed in healthy and glioma-bearing rats. For each animal, the maximum iodine concentration ($[I]_{\text{max}}$) was evaluated several times and up to 6 hours after the start of infusion. The time course of the iodine concentration measured at the injection site was fitted with an exponential function:

$$[I]_{\text{max}}(t) = y_0 + A_1 \exp(-t/T) [\text{mg}/\text{ml}] \quad (2)$$

where t (min) is the time after injection, y_0 (mg/mL) is the iodine concentration measured at the end of the study, A_1 (mg/mL) is the maximum iodine concentration at $t_0 = 0$, minus y_0 , and T (min) is the decay time constant.

For each group of rats, average values of A_1 , y_0 , and T were calculated.

Statistical test

Analyses of variance (Excel 2000; Microsoft, Redmond, WA) were used to determine the significance of differences in the volume of distribution of iodine between infusion modes. Data were considered significantly different at $p < 0.05$.

Dose-enhancement factor

From the iodine biodistribution study in F98 glioma-bearing rats, we derived the iodine dose-enhancement factors (DEFs) in various ROIs for irradiation at 50 keV. The iodine DEF (10) is defined as the ratio between the dose delivered to a volume of interest (voxel) containing iodine and the dose delivered to the same voxel without iodine. In a general way, the dose can be calculated with the following formula:

$$D = 1000 \cdot \Phi \cdot E \cdot (\mu/\rho)_{\text{en},E} \quad (3)$$

where D is the dose (Gy), Φ is the incident photon flux (cm^{-2}), E is the X-ray beam energy (J), and $(\mu/\rho)_{\text{en},E}$ is the energy absorption coefficient ($\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$) of the voxel at the energy E . The energy

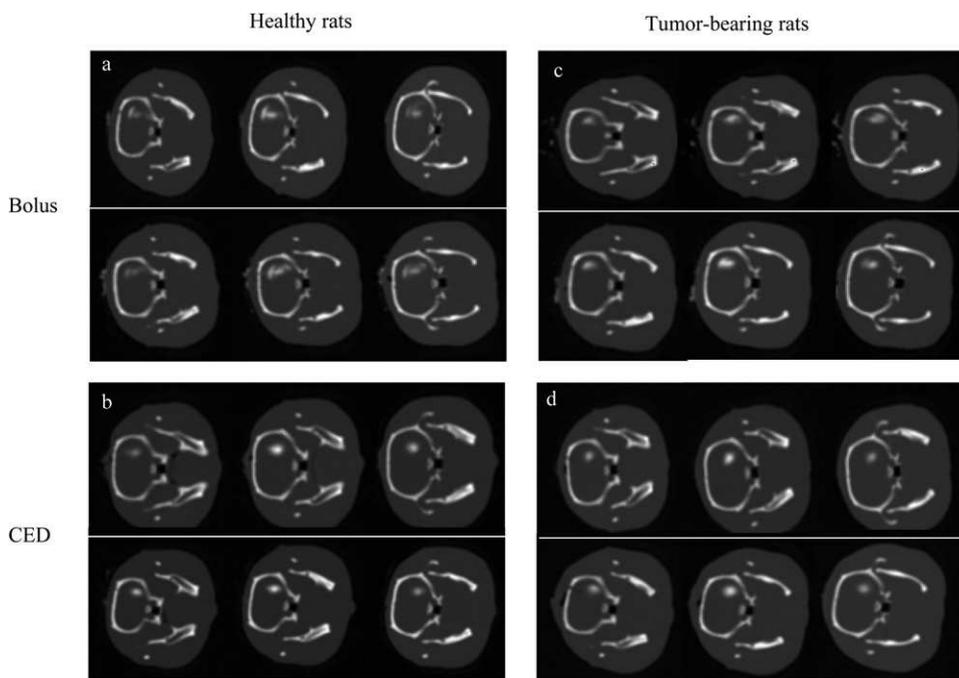


Fig. 1. Head axial computed tomography (CT) images obtained immediately after 5- μ L iopamidol injection (iodine concentration: 100 mg/mL). Iopamidol was administered into healthy brains by bolus injection (a) and convection-enhanced delivery (CED) (b); and into F98-bearing brains by bolus injection (c) and convection-enhanced delivery (CED) (d). Three adjacent slices are shown in 2 representative rats per group (*i.e.*, each row corresponds to a different animal).

absorption coefficient of a voxel composed of tissue (t) and iodine (I) can be calculated from the elemental data by weighting the coefficient for element j with its fraction by weight w_j (Bragg's additivity law) (36).

$$(\mu/\rho)_{\text{en}, E} = \sum_j w_j \cdot (\mu/\rho)_{\text{en}, E, j} \quad (4)$$

The iodine DEF can thus be calculated with:

$$\text{DEF} = \frac{w_I \cdot (\mu/\rho)_{\text{en}, E, I} + w_t \cdot (\mu/\rho)_{\text{en}, E, t}}{(\mu/\rho)_{\text{en}, E, t}} \quad (5)$$

Monte Carlo dosimetry

Conventional dosimetry systems cannot be used for accurately computing dose distributions in the SSR configuration because they do not take into account the combination of low-energy X-rays and presence of high-Z elements in the tumor. A three-dimensional Monte Carlo dosimetry tool called SSRdose was, therefore, developed in our laboratory (11). The Monte Carlo code we used (MCNPX version β 2.6.a), along with the EPDL 97 library for photon interactions, were provided by Los Alamos National Laboratory (Los Alamos, NM) (37).

During SSR irradiation, the beam is restricted to the tumor dimensions and the tumor is located at the center of the irradiation system (2, 3). The cumulative doses were computed in each voxel according to the iodine biodistribution measured *in vivo* by monochromatic CT and given as input for the calculation. The SSR was modeled with a 6-mm wide monochromatic X-ray beam of 50 keV, covering six 1-mm CT slices. Photons were launched uniformly over 360°, with the center of rotation located at the target

center. Approximately 11 hours of computation time (SUN V20Z machine; Sun Microsystems, Vélizy, France) were necessary to reach a statistical uncertainty of 5% or lower in the target region. The X-ray dose distribution was normalized to the maximum dose in the target. Average doses (ROI size = $1.75 \times 1.75 \text{ mm}^2$) were computed in different locations: tumor, ipsilateral brain (*i.e.*, normal brain from the tumor-bearing cerebral hemisphere), contralateral brain (*i.e.*, non-tumor-bearing hemisphere), and muscle.

RESULTS

Volume of distribution, comparison between bolus infusion and CED

Computed tomographic images obtained at the end of 5 μ L iopamidol infusion (bolus injection or CED) are shown in Fig. 1 for healthy and tumor-bearing rats. Three adjacent axial CT images are shown, for two representative rats per group.

Healthy rats. In all rats receiving bolus injections (Fig. 1a), infusate leak-back along the needle track and into the corpus callosum was noticeable, whereas with CED the infusate was contained within the striatum (Fig. 1b). The V_d values after bolus infusion of 5 μ L of iopamidol (Table 1) were found to be significantly higher than with CED ($26.91 \pm 2.32 \mu\text{L}$ and $19.23 \pm 1.39 \mu\text{L}$, respectively; $p = 0.026$).

Tumor-bearing rats. In rats bearing F98 gliomas, the V_d values for 5 μ L of iopamidol after bolus and CED infusion were $21.38 \pm 1.49 \mu\text{L}$ and $15.35 \pm 4.90 \mu\text{L}$, respectively ($p = 0.063$). The V_d values after bolus infusion (Fig. 1c)

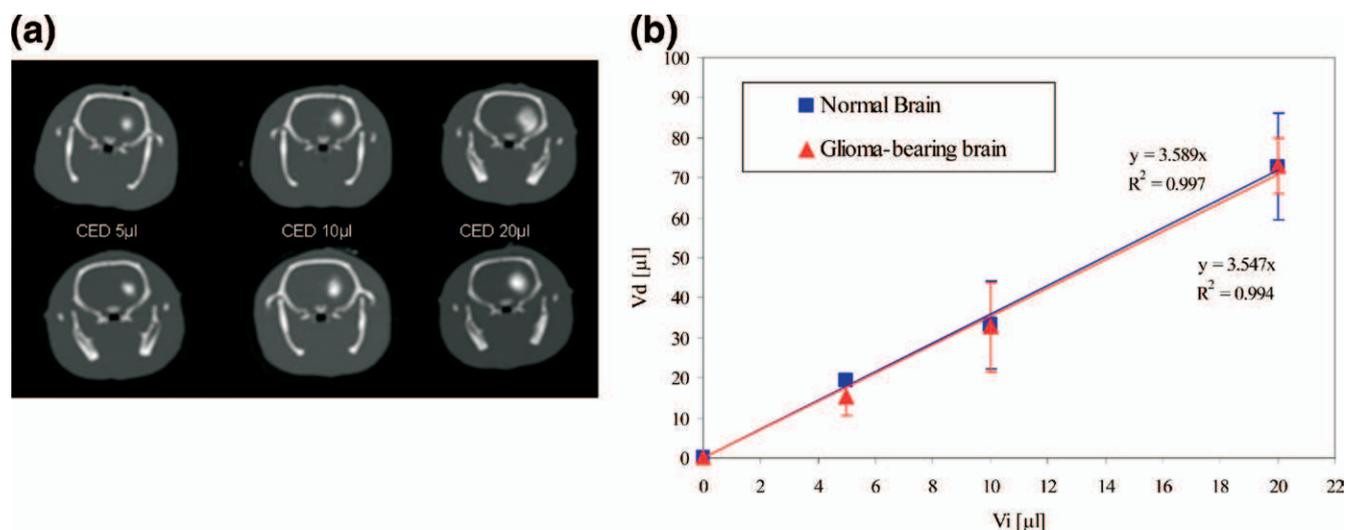


Fig. 2. (a) Head axial computed tomography (CT) scans obtained immediately after convection-enhanced delivery (CED) of iopamidol (iodine concentration: 100 mg/mL). Iopamidol was administered by CED at an infusion rate of 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ for volumes of 5, 10, and 20 μL . Upper scans correspond to 3 healthy rats, bottom scans to 3 F98 glioma-bearing rats. The absence of iodine in the contralateral brain is noticeable. (b) Relationship between distribution volume (V_d) and infusion volume (V_i) in normal and glioma-bearing brains. The V_d containing >5% of the infusate was plotted against V_i immediately after infusion of iopamidol. The error bars represent the standard deviations (2–3 animals).

were variable in shape and less regular than with CED (Fig. 1d). In two rats out of three, iodine was measured outside the targeted region in a portion of the corpus callosum. However, the differences observed between the two infusion methods were less marked in the tumor-bearing group than in the healthy group.

Volume of distribution after CED

Increasing volumes of iopamidol were administered by CED into healthy or tumor-bearing brains (V_i : 5, 10, and 20 μL , at a rate of 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$). The extent of convection was reflected by CT images obtained immediately after completion of infusion (Fig. 2). The brain region infused with iopamidol was always clearly discernible from the surrounding tissue. The V_d increased linearly with the increasing V_i both in tumor-bearing ($R^2 = 0.994$) and non-tumor-bearing rats ($R^2 = 0.997$) (Table 1 and Fig. 2). The V_d/V_i ratios after CED injection in tumor-bearing and non-tumor-bearing rat brains are reported in Table 1. The distribution volumes were not found to be significantly different in the presence or not of tumor: $p = 0.374$, $p = 0.953$, and $p = 0.983$ for $V_i = 5$, 10, and 20 μL , respectively. According to these findings, a V_d approximately 4 times higher than V_i can be expected, with V_i ranging from 5 to 20 μL , both in normal and tumor-bearing animals.

Evolution with time

To assess the retention time of iodine in rat brains, CT images were recorded several times after completion of infusion, up to 6 hours after the start of infusion. Iodine concentration profiles from the CT images were drawn at different time points (Fig. 3). The maximum iodine concen-

tration measured at the injection site followed an exponential decay with time in all groups ($R^2 > 0.99$, for all rats). The time constant decay (T), remaining concentration after 6 hours (y_0), and iodine concentration constant (A_1) resulting from the exponential adjustments (Eq. 2), are reported in Table 2. The iodine concentration measured 6 hours after infusion (y_0) was approximately 2 mg/mL (*i.e.*, approximately 5% of the concentration measured immediately after completion of infusion) both in tumor-bearing brains and healthy rats, for 5 μL bolus infusion and CED infusion volumes of 5 and 10 μL . Approximately 11% of the initial iodine concentration (*i.e.*, 5.3 mg/mL) remains 6 h after infusion, for 20- μL infusion volumes.

X-ray dose distribution

The iodine DEFs were computed at 50 keV in various regions of interest after CED infusion of iopamidol (5 μL , iodine concentration: 100 mg/mL); they are summarized in Table 3. The DEF amounts were 4.07 in the tumor region loaded with iodine (average iodine concentration: 20.20 mg/mL) and nearly 1 for all the other regions of interest where the iodine content is very low (<0.25 mg/mL) (ipsilateral brain, contralateral brain, and muscle). With this method of injection, the blood vessels contain no iodine at all during the irradiation time, also resulting in a DEF of 1.

The dose distribution resulting from a typical synchrotron stereotactic treatment at 50 keV was evaluated with Monte Carlo calculation in a tumor-bearing rat (Fig. 4). After CED of iopamidol ($V_i = 5 \mu\text{L}$, rate = 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$), the high concentrations of iodine (>5 mg/mL), within a well-delineated region (Fig. 4a), led to steep dose gradients around the target, efficiently sparing the contralateral brain and the

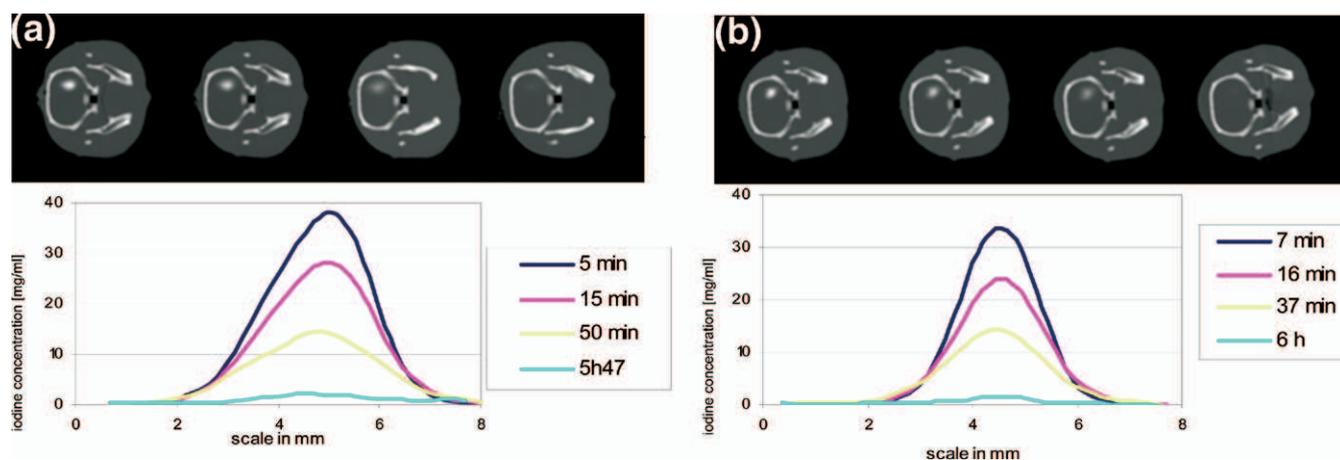


Fig. 3. Typical time evolution of iodine concentration profiles obtained in 1 tumor-bearing rat (a) and 1 healthy rat (b) after iopamidol convection-enhanced delivery infusion of $5 \mu\text{L}$. Line profiles were derived from head axial computed tomography scans and were measured in the direction of injection. The iodine concentration profiles follow a Gaussian distribution with good accuracy ($R^2 > 0.99$ for the three first post-infusion times and $R^2 > 0.91$ for the 6-h post-infusion time).

healthy tissue around the target (Fig. 4b). X-ray doses received by the skull and the jaws are due to irradiation geometry along with the small size of a rat head.

DISCUSSION

We have previously reported that an intracarotid injection of iodine together with mannitol can lead to large iodine concentrations in the tumor area (1) and may improve the survival of rats compared with intravenous (i.v.) injection or irradiation alone (3). In that study, mean survival times (\pm SD) and percentage of increased life spans (ILS [%]) of F98 glioma-bearing rats were 25.6 ± 2.4 days, 48.9 ± 13.1 days (ILS = 91%), 55.2 ± 13.4 days (ILS = 116%), and 68.8 ± 16.4 days (ILS = 169%) for untreated controls, rats irradiated without iodine, and rats irradiated after infusion of iodine and mannitol i.v. and i.c., respectively (15 Gy at the tumor). However, the iodine concentrations in the blood and in the healthy ipsilateral brain were also greatly enhanced with this infusion protocol (1). The concentration in the

blood was a major concern because it was found to be 3 times superior to the achievable concentration in the tumor, leading to very high doses delivered to the vessels (blood DEF = 9.9). Convection-enhanced delivery is an attractive way to overcome these limitations because the high-Z elements could be selectively delivered to the tumor volume, thereby sparing the surrounding healthy tissues and the blood vessels. The purpose of the present study was to evaluate CED as a means of improving the i.c. uptake of iodine for SSR. We used monochromatic CT for imaging the distribution of an iodinated contrast agent (iopamidol) within the brain parenchyma. We first evaluated the efficacy of iodine distribution by CED, in comparison with bolus injection of iodine in normal rats and in rats bearing F98 glioma (volume of infusion: $5 \mu\text{L}$). In healthy rats, iodine was measured outside the right caudate nuclei after bolus injection, falsely increasing the volume of distribution. Similarly, Chen *et al.* (19) found a leak-back greater than 20% with similar bolus injection parameters ($0.5 \mu\text{L}/\text{min}$ and 26s-gauge needle). It is worth noting that in preclinical studies

Table 2. Summary of average constants (and standard deviations) describing $[I]_{\text{max}}$ time evolution for all groups of rats

Category	Injection parameters	y_0 (mg/mL)	A_1 (mg/mL)	T (min)
Healthy rats	Bolus $5 \mu\text{L}$	1.93 ± 0.38	28.62 ± 6.78	49.19 ± 7.97
	CED $5 \mu\text{L}$	2.21 ± 1.01	36.89 ± 5.92	39.20 ± 6.56
	CED $10 \mu\text{L}$	2.42 ± 1.03	36.78 ± 5.38	39.25 ± 3.85
	CED $20 \mu\text{L}$	6.56 ± 2.10	36.88 ± 6.94	55.57 ± 10.70
Tumor-bearing rats	Bolus $5 \mu\text{L}$	1.85 ± 0.48	30.51 ± 5.06	38.72 ± 15.30
	CED $5 \mu\text{L}$	1.71 ± 0.45	33.02 ± 7.05	30.95 ± 7.24
	CED $10 \mu\text{L}$	2.11 ± 0.56	42.67 ± 1.38	40.00 ± 7.63
	CED $20 \mu\text{L}$	4.08 ± 0.33	46.06 ± 3.95	56.68 ± 2.73

Abbreviations: $[I]_{\text{max}}$ = maximum iodine concentration; y_0 = remaining concentration after 6 h; A_1 = iodine concentration constant; T = time constant decay.

For all rats, $[I]_{\text{max}}$ was measured in CT scans, plotted against time and fitted with an exponential function: $[I]_{\text{max}}(t) = y_0 + A_1 \exp(-t/T)$. The three constants A_1 , T, and y_0 were averaged to obtain constants representative of each group of rats (tumor-bearing, healthy brains, and injection modes).

Table 3. Iodine concentrations in F98 glioma-bearing rats, 10 min after 5- μ L convection-enhanced delivery of iopamidol in various regions of interest and associated dose-enhancement factors

	No. of rats	Tumor	Brain contralateral	Brain ipsilateral	Muscle
Iodine concentration (mg/mL) \pm SD	3	20.20 \pm 5.20	0.02 \pm 0.06	0.23 \pm 0.19	0.01 \pm 0.07
Mean dose-enhancement factor	3	4.07	1.00	1.04	1.00
Monte Carlo dose (%)	1	81.30	4.78	16.00	2.96

Abbreviation: SD = standard deviation.

The iodine concentrations were determined from the computed tomography (CT) images (measurement in the CT slice where the tumor has the maximal size). Each point represents the arithmetic mean \pm SD of 3 rats. Ipsilateral brain = normal brain from the tumor-bearing cerebral hemisphere; contralateral brain = non-tumor-bearing hemisphere. The doses calculated with Monte Carlo simulations were normalized to the maximum dose.

tumor cells are often administrated to the brain of animals by the means of i.c. bolus injections, with injection rate and cannula size similar to the ones used in this study. The leak-back effect that we observed with i.c injection might spread tumoral cells along the needle track in a nonreproducible way. Convection-enhanced delivery could also be used for infusing the tumoral cells into rats' brains to improve the tumors' homogeneities in a group of animals.

In the tumor-bearing animal study, the leakage of iodine out of the perfused region was noticeable after bolus injection but less important than in normal brains (Fig. 1a,c). Convection-enhanced delivery improved the iodine distribution, which was well delineated from non-

distributed brain tissue, both in healthy and tumor-bearing animals (Fig. 1b,d). Analysis of the iodine concentration in the CT images revealed a Gaussian profile after CED, compared with an irregular pattern after bolus infusion (data not shown). The homogeneity and reproducibility of iodine delivery were also found to be superior with CED compared with bolus injection.

The data obtained with increasing volumes of iodine infused by CED show that the distribution volumes into the F98 brain tumor model were almost the same as those achieved in normal brain tissue. In a similar way, Saito *et al.* (13) reported that the volume of liposomal distribution, assessed with MRI after CED infusion in two different tumor models (C6 and 9L-2 glioma), was comparable to the V_d into normal brains. However, they demonstrated that the homogeneity of the infusate distribution depends on the structure of the tumor. The liposomes were distributed in an irregular shape and leaked into the encapsulated tumor margin when infused into a heterogeneous tumor with multiple necrosis sites, such as the C6 model. In the relatively homogeneous 9L-2 tumor almost all the tumor volume was covered by the liposome distribution (13). The relatively homogeneous distribution we observed in the F98 glioma model is comparable to that obtained by Saito *et al.* using the 9L-2 model.

In our study, the iodine concentration was shown to remain elevated for an extended period, with an exponential time constant decay of approximately 50 min (Table 2), well suited for SSR treatment time, which will last approximately 15 min. Six hours after completion of infusion, CT scans still revealed the presence of iodine in the infused hemisphere.

Altogether, these findings are consistent with other studies in which CED was used for the delivery of a variety of molecules, such as C14 albumin, iopamidol, or liposomes (13, 19, 26, 38).

Finally, we have demonstrated with Monte Carlo calculations that an adequate dose distribution could be obtained in SSR after CED of iodine. Sharp dose gradients around the target and an excellent sparing of the contralateral brain are achievable with very low iodine concentrations (<0.25 mg/mL) in the surrounding healthy brain tissues and in the blood vessels. After

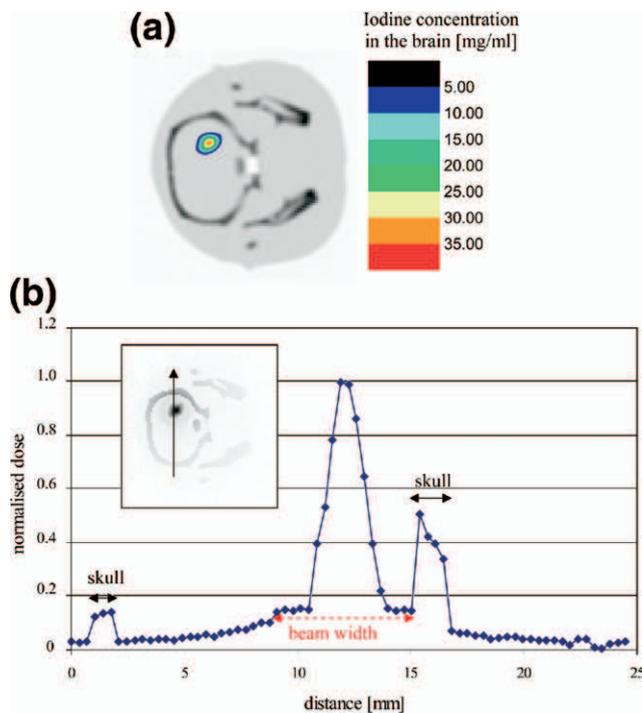


Fig. 4. Dose distribution simulating synchrotron stereotactic radiotherapy (SSR) after 5- μ L convection-enhanced delivery of iopamidol in a F98 glioma-bearing rat. (a) Segmented iodine distribution superimposed on the corresponding axial computed tomography image. (b) Dose distribution obtained with Monte Carlo simulations for SSR at 50 keV with a 6×6 -mm² beam and associated dose profile.

intracarotid injection of iodine with mannitol, Adam *et al.* (1) obtained iodine DEFs of 4.11, 9.9, and 1.92 in the target area, blood vessels, and ipsilateral brain, respectively. In comparison, with CED we have obtained iodine DEFs of 4.07, 1.0, and 1.04, respectively. With a comparable iodine DEF in the target area, CED provides much lower dose enhancements in the vessels and ipsilateral brain. With CED, it could be possible to define the iodine distribution volume for matching the tumor volume; in addition, the iodine concentration could be adjusted for achieving the desired iodine dose enhancement.

To date, the most prolonged survival result with the F98 tumor model was obtained with the combination of *cis-*

diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) and SSR (4). The rats treated with 3 μg CDDP (5 μL , bolus intratumoral injection) and irradiated with 78 keV monochromatic synchrotron X-ray beam (15 Gy) had a median survival time of 206 days (ILS = 704%) and a 34% long-term survival rate was obtained. In this treatment the chemotherapeutic drugs could also be delivered with CED for improving their biodistribution. Studies are underway in our laboratory to investigate these issues.

Altogether, these results demonstrate that CED can provide a homogeneous, targeted, reproducible, and safe distribution of iodinated compounds in F98 glioma-bearing rats, in a way suitable for SSR treatment. This delivery method might improve the treatment of brain tumors using SSR and warrants further investigations.

REFERENCES

- Adam JF, Biston MC, Joubert A, *et al.* Enhanced delivery of iodine for synchrotron stereotactic radiotherapy by means of intracarotid injection and blood-brain barrier disruption: Quantitative iodine biodistribution studies and associated dosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61:1173–1182.
- Adam JF, Elleaume H, Joubert A, *et al.* Synchrotron radiation therapy of malignant brain glioma loaded with an iodinated contrast agent: First trial on rats bearing F98 gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:1413–1426.
- Adam JF, Joubert A, Biston MC, *et al.* Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:603–611.
- Biston MC, Joubert A, Adam JF, *et al.* Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with *cis*-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res* 2004;64:2317–2323.
- Estève F, Corde S, Elleaume H, *et al.* Enhanced radio sensitivity with iodinated contrast agents using monochromatic synchrotron X-rays on human cancerous cells. *Acad Radiol* 2002;9(Suppl. 2):S540–S543.
- Corde S, Joubert A, Adam JF, *et al.* Synchrotron radiation-based experimental determination of the optimal energy for cell radiotoxicity enhancement following photoelectric effect on stable iodinated compounds. *Br J Cancer* 2004;91:544–551.
- Matsubara S, Katoh T, Kubota N, *et al.* The effects of X-ray energy and an iodine-based contrast agent on chromosome aberrations. *Radiat Res* 1994;137:231–237.
- Matsubara S, Kong ZS, Omura M, *et al.* The effect of iodine-based contrast agents on the levels of radiation-induced chromosomal aberrations. *Radiat Res* 1997;147:263–268.
- Mesa AV, Norman A, Solberg TD, *et al.* Dose distributions using kilovoltage x-rays and dose enhancement from iodine contrast agents. *Phys Med Biol* 1999;44:1955–1968.
- Solberg TD, Iwamoto KS, Norman A. Calculation of radiation dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain tumours. *Phys Med Biol* 1992;37:439–443.
- Boudou C, Balosso J, Estève F, *et al.* Monte Carlo dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy of brain tumours. *Phys Med Biol* 2005;50:4841–4851.
- Lonser RR, Walbridge S, Garmestani K, *et al.* Successful and safe perfusion of the primate brainstem: In vivo magnetic resonance imaging of macromolecular distribution during infusion. *J Neurosurg* 2002;97:905–913.
- Saito R, Bringas JR, McKnight TR, *et al.* Distribution of liposomes into brain and rat brain tumor models by convection-enhanced delivery monitored with magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 2004;64:2572–2579.
- Saito R, Bringas JR, Panner A, *et al.* Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model. *Cancer Res* 2004;64:6858–6862.
- Morrison PF, Laske DW, Bobo H, *et al.* High-flow microinfusion: Tissue penetration and pharmacodynamics. *Am J Physiol* 1994;266:R292–R305.
- Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, *et al.* Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2076–2080.
- Mardor Y, Rahav O, Zauberman Y, *et al.* Convection-enhanced drug delivery: Increased efficacy and magnetic resonance image monitoring. *Cancer Res* 2005;65:6858–6863.
- Laske DW, Morrison PF, Lieberman DM, *et al.* Chronic interstitial infusion of protein to primate brain: Determination of drug distribution and clearance with single-photon emission computerized tomography imaging. *J Neurosurg* 1997;87:586–594.
- Chen MY, Lonser RR, Morrison PF, *et al.* Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: A systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time. *J Neurosurg* 1999;90:315–320.
- Lonser RR, Cortes ME, Morrison PF, *et al.* Convection-enhanced selective excitotoxic ablation of the neurons of the globus pallidus internus for treatment of Parkinsonism in nonhuman primates. *J Neurosurg* 1999;91:294–302.
- Lieberman DM, Laske DW, Morrison PF, *et al.* Convection-enhanced distribution of large molecules in gray matter during interstitial drug infusion. *J Neurosurg* 1995;82:1021–1029.
- Morrison PF, Chen MY, Chadwick RS, *et al.* Focal delivery during direct infusion to brain: Role of flow rate, catheter diameter, and tissue mechanics. *Am J Physiol* 1999;277:R1218–R1229.
- Kaiser MG, Parsa AT, Fine RL, *et al.* Tissue distribution and antitumor activity of topotecan delivered by intracerebral clysis in a rat glioma model. *Neurosurgery* 2000;47:1391–1398; discussion 1398–1399.
- Barth RF. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* 1998;36:91–102.
- Benabid AL, Rémy C, Chauvin C. Experimental model of rat brain tumors by stereotactic injection of C6 glioma and HTC hepatoma cell lines. In: Walker MD, Thomas DGT, editors.

- Biology of brain tumors. Amsterdam: Martinus Nijhoff Publishers; 1986. p. 221–226.
26. Croteau D, Walbridge S, Morrison PF, *et al.* Real-time in vivo imaging of the convective distribution of a low-molecular-weight tracer. *J Neurosurg* 2005;102:90–97.
 27. Lonser RR, Gogate N, Morrison PF, *et al.* Direct convective delivery of macromolecules to the spinal cord. *J Neurosurg* 1998;89:616–622.
 28. Hamilton JF, Morrison PF, Chen MY, *et al.* Heparin coinjection during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. *Exp Neurol* 2001;168:155–161.
 29. Yang W, Barth RF, Adams DM, *et al.* Convection-enhanced delivery of boronated epidermal growth factor for molecular targeting of EGF receptor-positive gliomas. *Cancer Res* 2002;62:6552–6558.
 30. Elleaume H, Charvet AM, Corde S, *et al.* Performance of computed tomography for contrast agent concentration measurements with monochromatic x-ray beams: Comparison of K-edge versus temporal subtraction. *Phys Med Biol* 2002;47:3369–3385.
 31. Oelckers S, Graeff W. In situ measurement of iron overload in liver tissue by dual-energy methods. *Phys Med Biol* 1996;41:1149–1165.
 32. Dilmanian FA, Wu XY, Parsons EC, *et al.* Single- and dual-energy CT with monochromatic synchrotron x-rays. *Phys Med Biol* 1997;42:371–387.
 33. Thomlinson W, Berkvens P, Berruyer G, *et al.* Research at the European Synchrotron Radiation Facility medical beamline. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000;46:1053–1063.
 34. Elleaume H, Charvet AM, Berkvens P, *et al.* Instrumentation of the ESRF medical imaging facility. *Nucl Instruments Methods Phys Res A* 1999;428:513–527.
 35. Herman GT, Lewitt RM, Odhner D, *et al.* SNARK89: A programming system for image reconstruction from projections. Philadelphia: University of Pennsylvania Medical Imaging Processing Group, Department of Radiology; 1989.
 36. Maughan RL, Chuba P, Porter AT, *et al.* Mass energy-absorption coefficients and mass collision stopping powers for electrons in tumors of various histologies. *Med Phys* 1999;26:472–477.
 37. Hendricks JS, McKinney GW, Trelue HR, *et al.* MCNPX, version 2.6. a. Report LA-UR-05–8225. Los Alamos, New Mexico: Los Alamos Laboratory; 2005.
 38. Krauze MT, McKnight TR, Yamashita Y, *et al.* Real-time visualization and characterization of liposomal delivery into the monkey brain by magnetic resonance imaging. *Brain Res Brain Res Protoc* 2005;16:20–26.

Enhanced Survival and Cure of F98 Glioma – Bearing Rats following Intracerebral Delivery of Carboplatin in Combination with Photon Irradiation

Julia Rousseau,^{1,2,3} Caroline Boudou,^{1,2,3} Rolf F. Barth,⁵ Jacques Balosso,^{1,2,3,4} François Estève,^{1,2,3,4} and Hélène Elleaume^{1,2,3,4}

Abstract Purpose: The goal of the present study was to evaluate the efficacy of intracerebral (i.c.) administration of carboplatin by means of convection-enhanced delivery (CED) in combination with fractionated, external beam photon irradiation for the treatment of F98 glioma – bearing rats. **Experimental Design:** Carboplatin (20 µg/20 µL) was administered i.c. by CED to F98 glioma – bearing rats, 13 days after stereotactic implantation of 10³ tumor cells. One day following initiation of CED, a 24-Gy X-ray dose was administered in three daily fractions of 8 Gy each. Photon irradiation was carried out using either a conventional (6 MV) linear accelerator or a monochromatic synchrotron source (80 keV) at the European Synchrotron Radiation Facility. The primary end point of this study was overall survival. **Results:** The median survival times were 79 and 60 days and the corresponding percent increase in life spans were 182% and 114%, respectively, for the combination of carboplatin chemotherapy and irradiation with either 6-MV or 80-keV photons. A subset of long-term survivors (>200 days) were observed in both chemoradiotherapy groups: 16.6% and 8.3% for 6 MV and 80 keV, respectively. In contrast, the median survival times for 6-MV or 80-keV irradiated controls, chemotherapy alone, and untreated controls were 42, 51, 45, and 28 days, respectively. **Conclusions:** Our results convincingly show the therapeutic efficacy of i.c. administration of carboplatin by means of CED in combination with either 6-MV or 80-keV photons. Further studies are warranted to optimize this combination of chemoradiotherapy for malignant gliomas.

Up until recently, the overall median survival of patients with high-grade gliomas usually has been less than 1 year after diagnosis (1, 2). Standard treatment consists of surgical resection of the tumor followed by radiation and chemotherapy. Although such treatment has generally increased life span by several months, the tumor inevitably recurs (3, 4) and long-term survivors are extremely rare. Recently, however, Stupp et al. (5) have reported that the combination of temozolomide and radiotherapy, followed by repetitive cycles of temozolomide alone, significantly prolonged the overall median life span of glioblastoma patients by 2.5 months. Although small, this was highly significant ($P < 0.001$) and the percent patients surviving at 30 months was ~25%, compared with 5% for

patients who had not received temozolomide (5). This major advance has set a new standard for the treatment of patients with glioblastoma multiforme, against which other therapeutic approaches will now be measured. Among all chemotherapeutic agents available, platinum-derived drugs have played an important role in the treatment of solid tumors (6, 7), but their systemic administration has been limited by their toxicity. Carboplatin is a cisplatin analogue, which produces fewer side effects than cisplatin, but has a similar range of clinical activity (8). Hongo et al. have shown that carboplatin induces the same platinum-DNA adducts as cisplatin, although *in vitro*, it requires a 10-fold higher drug concentration and a 7.5-fold longer incubation time to produce an equivalent effect (8, 9).

The clinical effectiveness of carboplatin for the treatment of brain tumors is limited by the blood-brain barrier, which effectively reduces its uptake following systemic administration (10). Although the blood-brain barrier may be partially disrupted in some regions of the brain tumor, it is largely intact in more distant areas, thereby reducing the chemotherapeutic effectiveness in the surrounding normal brain in which there are infiltrating tumor cells. Strategies have been developed to improve drug delivery, such as the disruption of the blood-brain barrier or local administration of drug within the central nervous system by means of implantable pumps, biodegradable polymers, and convection-enhanced delivery (CED). CED has been used to enhance the distribution of drugs to brain tumors in a homogeneous and targeted manner (10–23). Its advantages over diffusion-dependent methods include greater volumes

Authors' Affiliations: ¹Equipe 6, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U836; ²Université Joseph Fourier; ³Medical Beamline ID17, European Synchrotron Radiation Facility, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 836; ⁴Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France; and ⁵Department of Pathology, The Ohio State University, Columbus, Ohio

Received 4/27/07; revised 6/19/07; accepted 6/26/07.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Hélène Elleaume, Medical Beamline, European Synchrotron Radiation Facility, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 836, BP 220, 38043 Grenoble Cedex 9, France. Phone: 33-4-7688-2343; Fax: 33-4-7688-2885; E-mail: h.elleaume@esrf.fr.

© 2007 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1002

of distribution, more uniform drug concentrations within the treatment volume, and relative independence from molecular weight. It has been used experimentally by one of us (R.F.B.) to enhance the delivery of boronated anti-epidermal growth factor monoclonal antibodies for boron neutron capture therapy (24, 25).

Recently, we reported on the efficacy of synchrotron stereotactic radiotherapy (SSR) in combination with direct intratumoral (i.t.) injection of cisplatin [3 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ of *cis*-diammine-dichloroplatinum (CDDP)] for the treatment of F98 glioma-bearing rats. This combined modality treatment resulted in survival times greater than 1 year in Fischer rats bearing F98 gliomas (26). Our initial hypothesis was that therapeutic efficacy was related to the production of Auger electrons and photoelectrons following irradiation of platinum atoms with beams of monochromatic X-rays tuned just above the Pt K-edge energy (Pt K-edge, 78.4 keV). Above this energy, extraction of electrons from the K-shell by the photoelectric effect results in the creation of K-shell vacancies. After removal of inner-shell electrons, the resulting vacancies are successively filled up by radiative and nonradiative transitions from outer-shell electrons whereby several low-energy photons and Auger electrons are released. The Auger electrons have short path lengths in tissue, producing high local energy deposition within a range of a few nanometers (27). The number of platinum atoms incorporated and their intranuclear position, therefore, determine the magnitude of cell killing (28).

The photoelectric cross section of Pt is $4.8\times$ greater at 78.8 keV compared with 78.0 keV (2,860 and 593 barns/atom, respectively). Therefore, if the efficacy of treatment were related to emission of Auger electron, a greater therapeutic gain should be obtained following irradiation above rather than below the Pt K-edge. This enhancement has been observed by us *in vitro* at the molecular level. A larger number of double-strand breaks occurred when tumor cells were pretreated with cisplatin (CDDP) and subsequently irradiated above the Pt K-edge, compared with irradiation below the K-edge. Three times more double-strand breaks were measured with human SQ20B carcinoma cells pretreated with 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CDDP for 6 h (3×10^8 atoms of platinum per cell; ref. 29) and $1.5\times$ more double-strand breaks using F98 glioma cells (26). However, such an enhancement was not obtained *in vitro*, when the cells were pretreated with 3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CDDP for 6 h, a treatment compatible with cell survival (cells survival rate, 25%; 4×10^6 atoms of Pt per cell; refs. 29, 30). *In vivo*, the combined i.t. administration of CDDP (3 μg in 5 μL), followed 24 h later by 15-Gy irradiation, resulted in enhanced survival of F98 glioma-bearing rats, irrespective of whether the irradiation was done below or above the Pt K-edge (33% cure rate in both groups; ref. 26).

Taken together, these findings suggested that therapeutic efficacy was *not* related to the emission of Auger electrons from the Pt atoms, when it was incorporated into tumor cells at therapeutic levels. This led us to postulate that the Pt-based chemoradiotherapy also could be carried out using high-energy X-rays from a linear accelerator. We hypothesized that local administration of carboplatin by CED in combination with photon irradiation would improve the survival of F98 glioma-bearing rats. In the present study, we first evaluated the toxicity and efficiency of intracerebral (i.c.) delivery of carboplatin by CED in syngeneic Fischer rats bearing F98 gliomas at varying

carboplatin concentrations and dosing schedules. Based on these data, we then evaluated the efficacy of carboplatin, administered by CED, followed by fractionated radiation therapy using either 6-MV photons, produced by a linear accelerator or SSR with monochromatic 80-keV X-rays. Our data show the efficacy of this chemoradiotherapeutic approach using either radiation modality, and considerably broaden its clinical applicability because linear accelerators are widely available in radiation therapy departments throughout the world.

Materials and Methods

F98 glioma model. Following i.c. implantation into syngeneic Fischer rats, the F98 glioma forms a progressively growing, infiltrative tumor with characteristics similar to those of human high-grade gliomas, including a lack of response to a variety of therapeutic modalities (31, 32). Up until recently, the best survival data with this tumor model have been obtained using either boron neutron capture therapy (33) or, more recently, SSR in combination with direct i.t. injection of CDDP (26).

Tumor implantation. All operative procedures and animal care were carried out in conformity with the guidelines of the French Government (decree 87-848, 19th October 1987; license nos. 7593 and A38071) and in accordance with the Laboratory Animal Care and Use Committee of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF). F98 glioma cells were routinely cultured as monolayers in DMEM (Life Technologies-Invitrogen-France) supplemented with 10% FCS, penicillin, and streptomycin. Male Fischer 344 rats (Charles River Laboratories), weighing 230 to 260 g, were anesthetized with an isoflurane inhalational technique followed by an i.p. injection of a mixture of ketamine (64.5 mg/kg of body weight) and xylazine (5.4 mg/kg of body weight). Additional i.p. injections of ketamine and xylazine were administered as needed to maintain anesthesia throughout the surgical procedures. The animals' eyes were lubricated with an ocular lubricant. For therapy experiments, 10^3 F98 cells in 5 μL of serum-free DMEM were implanted i.c. into the right caudate nucleus (3.5 mm right to the bregma and 5.5 mm in depth). The syringe pump (model KDS 310, GENEQ, Inc.; infusion rate, 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$) was directly mounted on the stereotactic frame (David Kopf Instruments) and the syringe (model 701 N, Hamilton) was attached to the pump. Before infusion using the same stereotactic coordinates, a 26s-gauge needle was inserted to a depth of 6 mm and then withdrawn to a target depth of 5.5 mm from the skull surface. On completion of the infusion, the needle was left in place for 2 min and withdrawn slowly. The hole in the calvarium then was filled with bone wax and the operative field was cleaned with betadine before closure of the scalp incision.

Chemotherapeutic drug delivery by CED. Carboplatin was kindly supplied by the Grenoble University Hospital Pharmacy (MW, 371.25; Carboplatine Faulding 10 mg/mL, Pharmaceuticals S.A.). The carboplatin solution was diluted in isotonic NaCl solution to obtain the required concentrations for i.c. infusion. Thirteen days following tumor implantation, the rats were anesthetized as previously described. Carboplatin was administered by means of CED with the use of a syringe pump (model KDS 310, GENEQ) at a rate of 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (17). A 32-gauge needle, attached to a 50- μL syringe (model 1700, gas-tight, Hamilton), was placed in the tumor bed by using the same coordinates as those used for tumor implantation.

Chemotherapy study. The toxicity and/or efficacy of i.c. delivery of carboplatin by CED was evaluated in F98 glioma-bearing rats. Different infusion volumes (V_i), concentrations (c), and schedules of infusion relative to the time of tumor implantation were used. Animals were stratified as follows: group 1: controls (these animals received no treatment at all; $n = 7$); group 2: $c = 1 \text{ mg}/\text{mL}$, $V_i = 20 \mu\text{L}$, 13 days ($n = 10$); group 3: $c = 1 \text{ mg}/\text{mL}$, $V_i = 40 \mu\text{L}$, 13 days ($n = 7$); group 4:

$c = 5$ mg/mL, $V_i = 20$ μ L, 13 days ($n = 6$); group 5: $c = 1$ mg/mL, $V_i = 40$ μ L, 8 days ($n = 8$). Animals were weighed and monitored clinically. The side effects of carboplatin infusion were evaluated by determining loss of body weight and clinical status. Mean survival time (MST) and median survival time (MeST) were the end points of this study.

Fractionated irradiations. SSR at 80 keV was carried out at the ESRF Medical Beamline and 6-MV irradiation was done at the Grenoble University Hospital. The X-ray dose was delivered over 3 days, with the first fraction given on day 14 after tumor implantation. In our previous studies (26, 34), the X-ray dose was delivered on day 14 in a single-fraction of 15 Gy at the tumor. The biologically equivalent dose-fraction (BED) in a three-fraction regimen was calculated using the classic linear quadratic equation (35, 36):

$$\text{BED} = nd [1 + d(\alpha/\beta)^{-1}] \quad (\text{A})$$

where n is the number of fractions, d is the dose per fraction in Gy, and α and β are two variables that indicate the sensitivity of tumor or normal tissue to changes in dose fractionation. The α/β ratio is usually taken to be 10 for tumor and early-reacting tissues and 3 for late-reacting tissues like brain. The biologically effective dose (BED) for 15 Gy, delivered in a single fraction, using the α/β ratios indicated above, was 37.5 Gy in acute and tumor effects and 90 Gy in late effects (37). To obtain the same BED for tumor and early-reacting tissues, in a three-fraction regimen, the fraction size was determined by solving Eq. A using $\text{BED} = 37.5$ Gy and $\alpha/\beta = 10$, which gave $d = 7.3$ Gy. Using the same equation for normal brain and late-responding tissues ($\text{BED} = 90$ Gy and $\alpha/\beta = 3$), the fraction size d was 8.1 Gy, given in three fractions. Based on these evaluations, we chose to deliver the radiation dose in three fractions with 8 Gy per fraction to be biologically comparable to a single 15-Gy fraction previously used in our preclinical studies (26, 34).

Stereotactic synchrotron radiation. Anesthetized animals were irradiated as previously described (26, 34). Briefly, the irradiations were done with monochromatic radiation from the ESRF ID17 beamline (38), which was tuned at 80 keV (80-eV energy bandwidth). The right hemisphere was centered on the rotation axis of the irradiation system and the beam was shaped by tungsten slits to 10 mm in width and 1 mm in height. The dose was delivered while the rat was being rotated, and translating upwards between each of the 13 adjacent 360-degree arcs so that the irradiated target volume encompassed a 10 mm in diameter and 13 mm in height cylinder. A GafChromic film (MD-55, International Specialty Products) was exposed during the rats' irradiation for checking homogeneity of the irradiation. The X-ray dose rate was determined using an ion chamber (PTW Unidos, PTW) and a high-purity germanium detector (Eurysis). The dose rate at the tumor was 0.27 Gy/s. The dose distributions were determined using Monte Carlo simulations (39) with rat head CT images, X-ray dose rate, and beam geometry as input variables.

Linear accelerator irradiation. Irradiations were done using a 6-MV medical irradiator (SLI, Elekta). Rats were irradiated, two at a time, in a

polystyrene box. The head of each animal was aligned in the middle of an 8×4 cm² aperture, defined by the beam collimator. Only the right cerebral hemisphere was irradiated. A wax block was positioned between the rats' heads and a 0.5-cm tissue equivalent bolus was placed on top to ensure electronic equilibrium. The dose of 8 Gy was prescribed at a 1.5-cm depth at a dose rate of 200 cGy/min (dosimetry treatment planning system: Dosigray, DosiSoft). After treatment was completed, the animals were transferred to the Animal Care Facility at the ESRF.

Chemoradiotherapy experimental groups. Chemotherapy was initiated 13 days following stereotactic implantation of 10^3 F98 glioma cells and X-ray irradiations were started 24 h later. The animals received a dose of carboplatin (concentration, 1 mg/mL; $V_i = 20$ μ L), which was moderately toxic when administered alone. The animals were randomized into six experimental groups of 6 to 12 animals each. For those experiments carried out at the University Hospital (6-MV linear accelerator irradiation), the groups were stratified as follows: group 6, untreated controls ($n = 9$); group 2, chemotherapy controls, which received carboplatin (20 μ g in 20 μ L by CED; $n = 10$); group 7, irradiated controls at 6 MV ($n = 11$); and group 8, carboplatin (20 μ g in 20 μ L administered by CED), followed by three 8-Gy fractions (6 MV) administered over 3 days ($n = 12$). For those experiments carried out at the ESRF (80 keV), the groups were stratified as follows: group 9, untreated controls ($n = 6$); group 10, irradiated controls at 80 keV ($n = 11$); and group 11, carboplatin (20 μ g in 20 μ L administered by CED), followed by three 8-Gy fractions at 80 keV over 3 days ($n = 12$).

Monitoring of clinical status and neuropathologic evaluation. After therapy, the animals were weighed thrice a week and their clinical status was monitored. The combination of sustained weight loss, ataxia, and periorbital hemorrhage has been shown to be indicative of progressively growing tumors (40). In such cases, the animals were euthanized by an intracardiac injection of Dolethal (150 mg/kg; Vetoquinol) and survival times were determined by adding 1 day to the time between tumor implantation and euthanasia. The long-term survivors were defined as rats living >200 days and the surviving animals were euthanized at this time point. Following euthanasia, the brains of selected animals in the therapy studies were removed, fixed in 10% buffered formalin, and then cut coronally at the level of the optic chiasm and 2 mm anterior and posterior to it. Coronal slices were embedded in paraffin, cut at 4 μ m, stained with H&E, and then examined microscopically to assess histopathologic changes.

Statistical evaluation of survival data. Kaplan-Meier survival curves were plotted for each group. Differences between various treatment groups were assessed for statistical significance by means of the log-rank test (JMP, SAS Institute, Inc.). Those rats still alive at 200 days after tumor cell implantation were euthanized. Minimal statistical significance was defined at $P < 0.05$. The MST, SE, and MeST were calculated with a value of 200 days for the rats still alive at the end of the study. When the last observations in each group are the only ones censored, then the estimate of the mean is approximately the arithmetic mean of the survival times with the last censoring observations included in the

Table 1. Rat weight loss percentage 7 d after chemotherapy treatment of F98 glioma

Group	Infusion volume (μ L)	Carboplatin concentration (mg/mL)	Delivery time (d)	N*	No. death	<5%	6-10%	11-30%
2	20	1	13	10	0	7	3	0
3	40	1	13	7	1	3	0	3
4	20	5	13	6	1	3	1	1
5	40	1	8	8	0	7	0	1

NOTE: The table indicates the number of animal that died within 7 d after chemotherapy treatment, and the number of animals that lost weight, comparatively to their initial weight. The weight lost was classified in various ranges (<5%, 6-10%, and 11-30%).

*N is the number of animals per group.

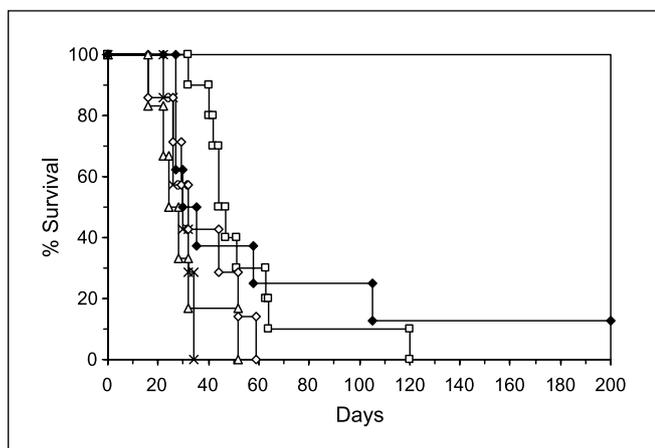


Fig. 1. Kaplan-Meier survival plots for F98 glioma – bearing rats after carboplatin chemotherapy. Survival times in days after tumor implantation have been plotted for untreated animals (x), CED of carboplatin 40 µg/40 µL delivered on day 13 after tumor implantation (◇) or on day 8 after tumor implantation (◆), CED of carboplatin 20 µg/20 µL delivered on day 13 after tumor implantation (□), and CED of carboplatin 100 µg/20 µL delivered on day 13 after tumor implantation (△). One animal that received carboplatin at a dose of 40 µg/40 µL, on day 8 after tumor implantation, was still alive at day 200.

mean (41). Percentage of increased life span (%ILS) was determined relative to MST or MeST of untreated controls as follows:

$$\% \text{ ILS} = \frac{\text{MST} - \text{MST}_{\text{Control}}}{\text{MST}_{\text{Control}}} \times 100$$

Results

Chemotherapy study in rats bearing glioma. All animals that received i.t. carboplatin by CED lost weight within 7 days after treatment. Three of seven rats that received 40 µg/40 µL carboplatin by CED at day 13 lost >10% of their body weight (Table 1), and one rat in that group died early on day 16 (Fig. 1; Table 2). One early death (day 16) also was observed in chemotherapy group 4 that received 100 µg/20 µL of carboplatin at day 13. Conversely, the weight lost was mild (<10% of body weight) in group 2, which received 20 µg/20 µL on day 13. The survival of rats in this group was significantly different from that of the untreated control group (*P* < 0.0001). The log-rank

test was not used for the other groups because the survival plots crossed each other due to early deaths. In such instances, the log-rank test is unlikely to detect differences between groups (41). In group 5 that received chemotherapy 8 days after tumor implantation, the rats had a small loss in weight (<5%), and no early death was observed. It is noteworthy that one rat was still alive at the end of the study (200 days).

Therapeutic response following chemoradiotherapy. For the chemoradiotherapy study, 20 µg/20 µL carboplatin was administered by CED at a rate of 0.5 µL/min, 13 days after implantation of 10³ F98 glioma cells, and radiotherapy was initiated 24 h later. Survival data are summarized in Table 3 and Kaplan-Meier survival plots are shown in Fig. 2. The untreated rats had a MeST of 28 days and a MST of 28 ± 1 days (range, 26-32 days) compared with a MeST of 51 days and a MST of 52 ± 2 days (range, 42-65 days) for the irradiated controls at 80 keV (*P* < 0.0001). Similarly, the 6-MV, photon-irradiated controls had a modest increase in MeST to 42 days and a MST of 43 ± 2 days (range, 35-56 days) compared with a MeST of 28 days and a MST of 29 ± 1 days for the untreated rats (*P* < 0.0001). Animals bearing F98 gliomas, which had received carboplatin (dose = 20 µg/20 µL) by CED, had a MeST of 45 days and a MST of 55 ± 8 days with one rat surviving 120 days, which was significantly different from the untreated control group (*P* < 0.0001). The corresponding %ILS relative to the median were 63%, 82%, and 50% for chemotherapy alone and irradiation alone at 80 keV or 6 MV, respectively. The combination of carboplatin and irradiation resulted in the greatest prolongation in survival time. Animals that received chemotherapy followed by SSR at 80 keV had a MeST of 60 days and a MST of 81 ± 16 days (censored; range, 47-200⁺ days). Animals that received chemotherapy, followed by irradiation with 6-MV photons, had a MeST of 79 days and a MST of 97 ± 15 days (censored; range, 50-200⁺ days). Most significantly, there was a cure rate of 16.6% for animals that received carboplatin followed by fractionated, 6-MV photon irradiation, with a 182% ILS of the MeST compared with that of untreated controls. There were also long-term survivors and/or cured animals in the chemoradiotherapy group irradiated at 80 keV. One rat was still alive at 200 days and another died at day 198. Survival of the animals that received chemoradiotherapy was significantly different from those of the irradiated controls that received either 6-MV (*P* < 0.0001) or 80-keV photons (*P* = 0.041). Although the MST and MeST

Table 2. Survival of F98 glioma – bearing rats after carboplatin chemotherapy

Group	N*	Carboplatin CED treatment (dose/volume)	Survival time (d)			% Increased life span	
			Range	Mean ± SE	Median	Mean	Median
1	7	Untreated	22-34	29 ± 2	30	—	—
2	10	20 µg/20 µL	32-120	55 ± 8	45	90	63
3	7	40 µg/40 µL	16-59	37 ± 6	32	26	7
4	6	100 µg/20 µL	16-52	29 ± 5	26	0	-13
5	8	40 µg/40 µL (at day 8)	27-200 [†]	64 ± 22 (biased)	33	120 (biased)	10

NOTE: Carboplatin was delivered by CED on day 13 after tumor implantation for groups 2, 3, and 4, and on day 8 for group 5. A survival time of 200 d was considered as the end point of the study. Rats still alive at 200 d after inoculation of 10³ F98 glioma cells were euthanized.

*N is the number of animals per group.

[†] One rat was still alive at day 200.

Table 3. Survival times of F98 glioma-bearing rats following CED of carboplatin (20 µg/20 µL) and three fractions of 8 Gy delivered on days 14, 15, and 16 after tumor inoculation

Irradiation energy	Treatment	N*	Survival time (d)			% Increased life span	
			Range	Mean ± SE	Median	Mean	Median
6 MV	Untreated controls	9	25-36	29 ± 1	28	—	—
	Chemotherapy controls	10	32-120	55 ± 8	45	90	63
	Irradiated controls	11	35-56	43 ± 2	42	50	50
	Chemoradiotherapy	12	50-200 [†]	97 ± 15 (2) [‡]	79	234 (biased)	182
80 keV	Untreated	6	26-32	28 ± 1	28	—	—
	Irradiated controls	11	42-65	52 ± 2	51	85	82
	Chemoradiotherapy	12	47-200 [†]	81 ± 16 (1) [‡]	60	184 (biased)	114

NOTE: Carboplatin (20 µg/20 µL) was injected by CED on day 13 after tumor implantation and was followed by radiotherapy (three fractions of 8 Gy), delivered on days 14, 15, and 16 after inoculation of 10³ F98 glioma cells. A survival time of 200 d was considered as the end point of the study. Rats still alive at 200 d were euthanized.

*N is the number of animals per group.

[†]Rats still alive after 200 d were euthanized at this date.

[‡]The number in parentheses indicates the number of rats surviving >200 d.

of the chemoradiotherapy groups were greater than those of the chemotherapy alone group, the differences were statistically significant only for chemoradiotherapy group irradiated with 6-MV photons ($P = 0.004$) and not with 80-keV X-rays ($P = 0.176$). Most importantly, the survival times of the two chemoradiotherapy groups (6-MV and 80-keV X-rays) were not significantly different from each other ($P = 0.173$).

Histopathologic studies. Microscopic examination of the brains of three rats, which had received carboplatin and 6-MV (2 rats) or 80 keV (1 rat) photons and were euthanized on day 200, revealed no evidence of tumor. One animal that had received 80-keV X-rays and died at day 198 also had no evidence of residual tumor. The brains of two animals that received carboplatin alone also were examined. One, which received 100 µg/20 µL on day 13 after tumor implantation and died on day 16, showed a small focus of necrotic tumor cells, rarefaction of white matter, and microfoci of hemorrhage. These findings suggest that this was a therapy-related death. The other one, which received 40 µg/40 µL on day 8 after tumor implantation, was still alive at termination of the study (day 200) and showed no evidence of tumor.

Discussion

The major finding in the present study was that carboplatin, administered by CED in combination with external beam X-irradiation, resulted in a significant enhancement in MST, and the cure of a subset of F98 glioma-bearing rats was independent of the X-ray beam energy. Rats that received chemotherapy, followed by 6-MV X-irradiation, had a MeST of 79 days, a corresponding 182% ILS (MeST), and a cure rate of 16.6% at 200 days. The chemoradiotherapy group irradiated at 80 keV had a MeST of 60 days (114% ILS) with one long-term survivor (one rat died at day 198) and one cured animal (8.3%). Using the same experimental tumor model, one of us (R.F.B.) has obtained a 25% cure rate following boron neutron capture therapy (33). In a previous study (26), we reported a 33% cure rate of F98 glioma-bearing rats after i.t. injection of cisplatin (3 µg/5 µL) in combination with 15 Gy of synchrotron

radiation. In that study, animals that received chemoradiotherapy had a MeST of 214 and 194 days at 78.0 and 78.8 keV, respectively, in the first experiment, and 131 and 91 days in the second, which was carried out 4 months later under the same conditions. The survival of the animals irradiated with an X-ray beam tuned above the Pt K-edge was not statistically different compared with irradiation below the K-edge. In both cases, 33% of the treated rats were still alive 1 year later. In the same way, using nontoxic cisplatin concentrations, we have not observed any significant *in vitro* difference in the survival of SQ20B cells when irradiated either above or below the Pt K-edge (30).

The results obtained in the present study confirm our initial findings, but suggest an alternative explanation relating to the role of DNA damage induced by atomic inner-shell relaxation, following a photoelectric event. If the efficacy of chemoradiotherapy was primarily related to inner-shell ionizations of

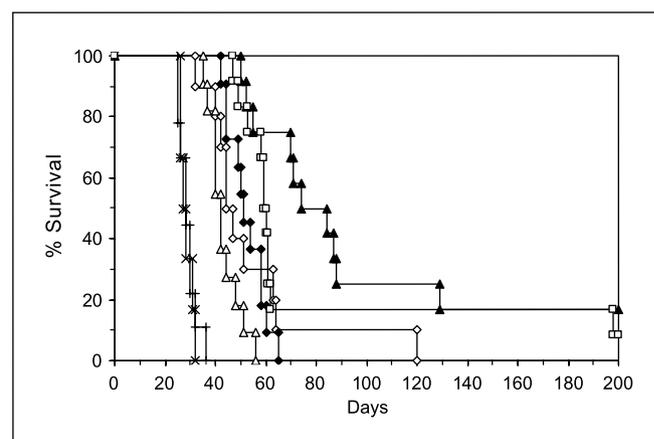


Fig. 2. Kaplan-Meier survival curves for F98 glioma-bearing rats after chemoradiotherapy. Survival times in days after tumor implantation have been plotted for untreated animals (+ and ×), CED of carboplatin 20 µg/20 µL alone (◇), irradiation at 6 MV alone (three fractions of 8 Gy; △) or in combination with CED of carboplatin 20 µg/20 µL (▲), and irradiation at 80 keV alone (three fractions of 8 Gy; ◆) or in combination with CED of carboplatin 20 µg/20 µL (□). Carboplatin was administered on day 13 and X-ray dose fractions were delivered on days 14, 15, and 16 after tumor implantation.

Pt atoms and subsequent Auger electrons cascades, synchrotron radiation, tuned above the Pt K-edge, should have been much more effective than the same treatment with 6-MV photons from a linear accelerator. Bernhardt et al. (27) have studied the role of atomic inner-shell ionization and subsequent relaxation of platinum, and the resulting DNA damage. It was observed that the amount of energy deposited in a local area surrounding the site of absorption was quite small, even when as many as 10^9 Pt atoms were intercalated with DNA. Although the photoelectric cross section for inner-shell ionizations of Pt atoms is relatively large (2.91×10^3 barns/atom at 78.39 keV), K-shell ionization events occur quite rarely because only a small number of Pt atoms per base pair can be tolerated *in vivo*. Our results suggest that the therapeutic gain obtained with i.t. injection of either cisplatin or carboplatin followed by X-irradiation was *not* predominantly due to Auger electrons emitted from the Pt atoms, but rather involved other mechanisms (27). However, these findings do not refute the premise on which SSR is based: the irradiation of high Z number atoms with energies the same as those of K-shell electrons.

Carboplatin, by itself, is an active cytoreductive chemotherapeutic agent (42). In the present study, animals that received carboplatin at a dose of 20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ had a MeST of 45 days (median %ILS, 63%), and there was one long-term survivor (120 days) with no early deaths. The highest doses of carboplatin tested (40 $\mu\text{g}/40 \mu\text{L}$ and 100 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$) were toxic, as evidenced by significant weight loss of F98 glioma-bearing rats within the first week after drug administration, which strongly suggests that this was drug related. However, it is noteworthy that one rat that received 40 $\mu\text{g}/40 \mu\text{L}$ of carboplatin 8 days after tumor implantation was still alive at the end of the study (200 days). Intracerebral administration of carboplatin has been evaluated for the treatment of glioma-bearing rats in several other studies (10, 43–45). Degen et al. (10) have shown that carboplatin delivered by CED was effective in the treatment of 9L gliosarcoma-bearing rats. In their study, among the rats that received carboplatin (40 $\mu\text{g}/40 \mu\text{L}$) on day 7, three of four animals survived to 120 days, at which time the study was terminated. There was one early death at day 19. In the same study, the toxicity of carboplatin, delivered by CED, into the striatum of non-tumor-bearing rats was evaluated. Rats treated with the lowest doses of carboplatin (1 or 10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) did not exhibit any clinical signs or histologic evidence of toxicity over a 3-day observation period. In contrast, four rats infused with the highest dose (100 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$)

died within the 3 days of infusion. Carboplatin has been shown to be less neurotoxic than other platinum-based compounds (42), even when delivered directly into the central nervous system. Strege et al. (46) have investigated the neurotoxicity of carboplatin after chronic i.c. infusion into the monkey brainstem. Neurotoxicity was the most important side effect of i.c. infusion of carboplatin and doses exceeding 400 μg were neurotoxic in monkeys. Strege et al. concluded that the pharmacokinetics of local and systemic delivery were different for carboplatin. Based on our own data, we have concluded that further studies are required to evaluate the most effective platinum compound, to optimize its i.c. delivery with variable dosing schedules, and to carefully balance its tumoricidal activity and drug-related neurotoxicity.

In conclusion, our data show the therapeutic efficacy of i.c. administration of carboplatin by means of CED in combination with fractionated radiotherapy in F98 glioma-bearing rats.⁶ Chemotherapy by itself improved the survival of F98 glioma-bearing rats, but this was enhanced by the addition of external beam photon irradiation. It remains to be determined if this effect was additive or synergistic. Our data show that high-energy X-ray irradiation (6 MV) was as effective as synchrotron X-ray irradiation for treatment of the F98 glioma. This significantly broadens the applicability of this chemotherapeutic approach for the treatment of patients with high-grade malignant brain tumors because it could be more easily translated into a clinical trial using 6-MV photons instead of synchrotron-derived X-rays.

Acknowledgments

We thank the European Synchrotron Radiation Facility medical beamline for providing the necessary beam time and technical assistance in all the steps of the experimental studies; Dr. Melvin Moeschberger and Kevin Tordoff for assistance with statistical evaluation of the data; Dr. Stéphanie Corde, Géraldine Michel-Amadry, Catherine Massart, Thierry Brochard, and Dr. Christian Nemoz for their help during the experiments; Dominique Dallery for animal care; and Dr. Dominique Charlety (Grenoble University Hospital Pharmacy, Grenoble, France) for providing carboplatin.

⁶ Similar survival data recently have been obtained by Drs. Rolf Barth and Weilian Yang that are confirmatory of those reported in this article. F98 glioma-bearing rats treated with either cisplatin alone, administered by convection enhanced delivery, or in combination with LINAC irradiation with 6-MV photons, had mean and median survival times of 73 and 71 days, respectively, compared with 21 days for untreated and 28 days for irradiated control animals.

References

- Curran WJ, Jr., Scott CB, Horton J, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:704–10.
- Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001;95:190–8.
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. *Lancet* 2003;361:323–31.
- Bredel M. Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 35:161–204.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987–96.
- Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4: 307–20.
- Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol* 1999;17:409–22.
- Knox RJ, Friedlos F, Lydall DA, Roberts JJ. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that *cis*-diamminedichloroplatinum(II) and *cis*-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res* 1986;46:1972–9.
- Hongo A, Seki S, Akiyama K, Kudo T. A comparison of *in vitro* platinum-DNA adduct formation between carboplatin and cisplatin. *Int J Biochem* 1994;26: 1009–16.
- Degen JW, Walbridge S, Vortmeyer AO, Oldfield EH, Lonser RR. Safety and efficacy of convection-enhanced delivery of gemcitabine or carboplatin in a malignant glioma model in rats. *J Neurosurg* 2003; 99:893–8.
- Saito R, Bringas JR, McKnight TR, et al. Distribution of liposomes into brain and rat brain tumor models by convection-enhanced delivery monitored with magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 2004;64: 2572–9.
- Saito R, Bringas JR, Panner A, et al. Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model. *Cancer Res* 2004; 64:6858–62.
- Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH. Convection-enhanced

- delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2076–80.
14. Mardor Y, Rahav O, Zauberman Y, et al. Convection-enhanced drug delivery: increased efficacy and magnetic resonance image monitoring. *Cancer Res* 2005;65:6858–63.
 15. Morrison PF, Chen MY, Chadwick RS, Lonser RR, Oldfield EH. Focal delivery during direct infusion to brain: role of flow rate, catheter diameter, and tissue mechanics. *Am J Physiol* 1999;277:R1218–29.
 16. Morrison PF, Laske DW, Bobo H, Oldfield EH, Dedrick RL. High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. *Am J Physiol* 1994;266:R292–305.
 17. Chen MY, Lonser RR, Morrison PF, Governale LS, Oldfield EH. Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time. *J Neurosurg* 1999;90:315–20.
 18. Laske DW, Morrison PF, Lieberman DM, et al. Chronic interstitial infusion of protein to primate brain: determination of drug distribution and clearance with single-photon emission computerized tomography imaging. *J Neurosurg* 1997;87:586–94.
 19. Lieberman DM, Laske DW, Morrison PF, Bankiewicz KS, Oldfield EH. Convection-enhanced distribution of large molecules in gray matter during interstitial drug infusion. *J Neurosurg* 1995;82:1021–9.
 20. Lonser RR, Corthesy ME, Morrison PF, Gogate N, Oldfield EH. Convection-enhanced selective excitotoxic ablation of the neurons of the globus pallidus internus for treatment of parkinsonism in nonhuman primates. *J Neurosurg* 1999;91:294–302.
 21. Lonser RR, Walbridge S, Garmestani K, et al. Successful and safe perfusion of the primate brainstem: *in vivo* magnetic resonance imaging of macromolecular distribution during infusion. *J Neurosurg* 2002;97:905–13.
 22. Kaiser MG, Parsa AT, Fine RL, Hall JS, Chakrabarti I, Bruce JN. Tissue distribution and antitumor activity of topotecan delivered by intracerebral clysis in a rat glioma model. *Neurosurgery* 2000;47:1391–8; discussion 8–9.
 23. Rousseau J, Boudou C, Esteve F, Elleaume H. Convection-enhanced delivery of an iodine tracer into rat brain for synchrotron stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:943–51.
 24. Wu G, Yang W, Barth RF, et al. Molecular targeting and treatment of an epidermal growth factor receptor-positive glioma using boronated cetuximab. *Clin Cancer Res* 2007;13:1260–8.
 25. Yang W, Barth RF, Wu G, et al. Molecular targeting and treatment of EGFRvIII-positive gliomas using boronated monoclonal antibody L8A4. *Clin Cancer Res* 2006;12:3792–802.
 26. Biston MC, Joubert A, Adam JF, et al. Cure of Fischer rats bearing radioresistant F98 glioma treated with *cis*-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res* 2004;64:2317–23.
 27. Bernhardt P, Friedland W, Paretzke HG. The role of atomic inner shell relaxations for photon-induced DNA damage. *Radiat Environ Biophys* 2004;43:77–84.
 28. Kassis AI. The amazing world of auger electrons. *Int J Radiat Biol* 2004;80:789–803.
 29. Corde S, Balosso J, Elleaume H, et al. Synchrotron photoactivation of cisplatin elicits an extra number of DNA breaks that stimulate RAD51-mediated repair pathways. *Cancer Res* 2003;63:3221–7.
 30. Corde S, Biston MC, Elleaume H, et al. 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* 2002;158:763–70.
 31. Barth RF. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* 1998;36:91–102.
 32. Koestner A, Swenberg JA, Wechsler W. Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley rats. *Am J Pathol* 1971;63:37–56.
 33. Barth RF, Yang W, Rotaru JH, et al. Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival and cure following blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of sodium borocaptate and boronophenylalanine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:209–18.
 34. Adam JF, Joubert A, Biston MC, et al. Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:603–11.
 35. Dale RG. The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy. *Br J Radiol* 1985;58:515–28.
 36. Douglas BG, Fowler JF. Letter: Fractionation schedules and a quadratic dose-effect relationship. *Br J Radiol* 1975;48:502–4.
 37. Liu L, Bassano DA, Prasad SC, Hahn SS, Chung CT. The linear-quadratic model and fractionated stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:827–32.
 38. Elleaume H, Charvet AM, Berkvens P, et al. Instrumentation of the ESRF medical imaging facility. *Nucl Instrum Methods Phys Res A* 1999;428:513–27.
 39. Boudou C, Balosso J, Esteve F, Elleaume H. Monte Carlo dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy of brain tumours. *Phys Med Biol* 2005;50:4841–51.
 40. Redgate ES, Deutsch M, Boggs SS. Time of death of CNS tumor-bearing rats can be reliably predicted by body weight-loss patterns. *Lab Anim Sci* 1991;41:269–73.
 41. Klein JP, Moeschberger ML. Survival analysis techniques for censored and truncated data. 2nd ed. New York: Springer; 2003.
 42. Olivi A, Gilbert M, Duncan KL, Corden B, Lenartz D, Brem H. Direct delivery of platinum-based antineoplastics to the central nervous system: a toxicity and ultrastructural study. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;31:449–54.
 43. Carson BS, Sr., Wu Q, Tyler B, et al. New approach to tumor therapy for inoperable areas of the brain: chronic intraparenchymal drug delivery. *J Neurooncol* 2002;60:151–8.
 44. Olivi A, Ewend MG, Utsuki T, et al. Interstitial delivery of carboplatin via biodegradable polymers is effective against experimental glioma in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996;39:90–6.
 45. Emerich DF, Winn SR, Snodgrass P, et al. Injectable chemotherapeutic microspheres and glioma II: enhanced survival following implantation into deep inoperable tumors. *Pharm Res* 2000;17:776–81.
 46. Strega RJ, Liu YJ, Kiely A, et al. Toxicity and cerebrospinal fluid levels of carboplatin chronically infused into the brainstem of a primate. *J Neurooncol* 2004;67:327–34.

Intracerebral delivery of 5-Iodo-2'-Deoxyuridine in combination with Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy.

Julia Rousseau^{1,2,3}, Jean-François Adam^{1,2,3}, Pierre Deman^{1,3,4}, François Estève^{1,2,3,5} and
Hélène Elleaume^{1,2,3,5,*}

¹ INSERM U836, Equipe 6, Grenoble, France;

² Université Joseph Fourier, Grenoble, France;

³ European Synchrotron Radiation Facility, Medical Beamline ID17, Grenoble, France;

⁴ Institut National Polytechnique de Grenoble, France ;

⁵ Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France;

* Corresponding Author:

Hélène Elleaume, Ph.D., INSERM Unité 836, ESRF Medical Beamline, BP 220, 38043

Grenoble Cedex 9, France. Tel: (+33) 4-7688-2343; Fax: (+33) 4-7688-2885;

E-mail: h.elleaume@esrf.fr

Running title: IUdR combined with synchrotron radiotherapy

Keywords: Glioma, IUdR, Intracerebral delivery, Osmotic pump, Synchrotron, Radiation therapy.

ABSTRACT

Purpose: Iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy takes advantage of the radiation dose-enhancement produced by high Z elements when irradiated with kV x-rays. We investigated in this study whether the treatment efficacy could be improved using a thymidine analogue: 5-[¹²⁷I] iodo-2'-deoxyuridine, as a radiosensitizing agent.

Materials and Methods: ¹²⁷IUdR was administered intracerebrally during 6 days to F98 glioma-bearing rats using osmotic pumps, starting 7 days after tumor implantation. On day 14th, a single 15 Gy fraction x-ray dose was delivered with 50 keV monochromatic x-rays from a synchrotron source. The primary endpoint of this study was overall survival.

Results: The median survival time was 46 days for the combination of ¹²⁷IUdR chemotherapy and irradiation. The median survival times for chemotherapy alone, irradiation alone and untreated controls were 32, 44 and 24 days, respectively.

Conclusions: The chemotherapeutic effect of the prolonged infusion of ¹²⁷IUdR was seen to be significant, but the addition of a single fraction of X-ray dose did not improve significantly the treatment outcome. Further studies are required to understand the absence of irradiation benefit and to optimize this combination of chemo-radiotherapy against glioma.

Acknowledgments. We are indebted to the European Synchrotron Radiation Facility medical beamline for providing the necessary beam time and technical assistance in all the steps of the experimental studies. Special thanks to Mrs. Catherine Massart, Mr. Thierry Brochard, Dr. Christian Nemoz, Mrs. Géraldine Michel-Amadry, Dr. Manuel Fernandez and Mrs. Elodie Kerboul for their help during the experiments and to Mr. Dominique Dallery for animal care.

Conflicts of interest notification. There are no conflicts of interest.

INTRODUCTION

Primary brain tumors are a serious healthcare issue since no curative treatment is available despite aggressive multimodality treatments (Behin et al., 2003, Croteau and Mikkelsen, 2001). Efforts to improve their prognosis using innovative radiation therapy techniques have included, among others : stereotactic radiosurgery (Phillips et al., 1994), intensity modulated radiation therapy (Cardinale et al., 1998), boron neutron capture therapy (Barth et al., 2005), Auger electrons emitter therapy (Kassis, 2003) or synchrotron stereotactic radiotherapy (SSR) (Adam et al., 2003, Adam et al., 2006, Biston et al., 2004, Rousseau et al., 2007a). In iodine enhanced-SSR, the tumor is selectively loaded with an iodinated compound and irradiated in stereotactic arc therapy conditions, with monochromatic 50 keV x-ray beam, restricted to the tumor size. The irradiation geometry produces a sharp dose distribution around the tumor. In addition, the fluorescent x-rays, photo-electrons, and Auger electrons generated by photo-electric effect on the high-Z element produce a localized dose enhancement (Boudou et al., 2005, Boudou et al., 2004, Boudou et al., 2007). The use of x-rays energies in the tens of keV range is essential for the success of this approach, due to the prevalence of the photo-electric effect at these energies. X-rays, produced by medical accelerators (5-25 MV), would provide less than 10% dose enhancement from photo-electric effect (Robar et al., 2002). The tunable and intense monochromatic x-ray beams, generated with synchrotron sources, are therefore optimal for the evaluation of the therapeutic efficacy of this treatment. For irradiation of small animals such as rodents, the iodine-dose-enhancement is maximum for x-ray energies of about 50 keV and can reach 250% in presence of 10 mg/ml of iodine (Adam et al., 2003, Corde et al., 2004, Esteve et al., 2002). We have recently shown that suitable iodine bio-distributions could be obtained on the F98 rat glioma model, by carotid or venous infusion of an iodinated contrast agent (Iomeron[®])

with mannitol, a transient blood brain barrier (BBB) opener (Adam et al., 2005, Adam et al., 2006). A significant rats survival improvement was obtained when the animals were irradiated in presence of iodine (doses ≤ 15 Gy, intracarotid injections) compared with irradiation alone (Adam et al., 2006). However no long-term survivors were observed in that study. The failure of iodine-enhanced SSR to cure these rats may be due to the inability of the treatment to produce enough DNA lethal damages. Indeed iodinated contrast agents remain in the extra-cellular space (Lorusso et al., 1994) and photoelectrons emitted from the iodine atoms have a range in water of about 10 microns (50 keV photons generate mainly 17 keV photoelectrons), thereby producing a limited number of damages. To improve therapeutic effectiveness of this treatment, we have investigated the possible use of cold iodine incorporated in the DNA of tumor cells via 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUdR) in combination with kV x-ray irradiation to generate Auger electron cascades, as originally proposed by Fairchild *et al.* (Fairchild et al., 1982). Auger electron cascades can be produced by using either radioactive IUdR labeled with appropriate Auger emitters (e.g. ^{123}I , ^{125}I) (Bodei et al., 2003) or using stable (^{127}I IUdR) and external x-rays irradiation with energies above the iodine K-edge (Berry and Kinsella, 2001). It has been shown that 95 % of Auger electrons have energies below 3 keV with high linear energy transfer (LET). These particles would therefore be responsible for greater biological effectiveness, comparable to the one obtained with α particles (Karnas et al., 1999). Monte Carlo simulations have shown that these high-LET particles could be responsible for more than one double strand break (DSB) in DNA per decay, and therefore should be highly toxic for the cells that have incorporated IUdR (Terrissol et al., 2004). Prolonged and locoregional administration of ^{125}I IUdR was successfully evaluated in preclinical trials on the 9L rat glioma model, leading to 10-20% cure (Kassis et al., 1998). Several clinical trials are underway to evaluate the therapeutic efficiency of this treatment

(Bodei et al., 2003). Alternatively to the use of radioactive IUdR, Auger cascades can also be induced by photo-activation of cold iodine with an external x-ray beam tuned at the appropriate energy (above the iodine K-edge 33.17 keV) (Fairchild et al., 1982, Karnas et al., 2001, Karnas et al., 1999). The main advantage of this approach is that photo-activation is selectively performed at the tumor location, where both iodine and x-rays are present, avoiding damages in non-targeted area. Using Monte-Carlo simulations, Karnas and Moiseenko have shown that the Auger electron spectra emitted from incorporated stable iodine range from less than 0.1 keV to about 33 keV, with 90% of the electrons having energy less than 1 keV and an average energy of 780 eV (Karnas et al., 2001, Moiseenko et al., 2002). The number of emitted electrons fluctuates greatly from none (for a purely fluorescent event) up to about 40 electrons (for a strong K-shell Auger burst). The average shower size was determined to be 9 electrons. It is comparable to ^{123}I which undergoes a single electron capture event and thus a similar vacancy filling (Charlton, 1986). Due to the very short range of Auger electrons, iodine atoms have to be incorporated into the DNA of tumor cells in order to generate DNA damages. IUdR is a good compound as it is transported through the cell membrane and incorporated into DNA in competition with thymidine during the S phase of the cell cycle.

Useful radio-sensitization with thymidine analogs has been shown to depend both on having a sufficient uptake of the analog into DNA on a per cell basis and on maximizing the proportion of cells with thymidine replacement (Doiron et al., 1999, Kassis et al., 1998, Kinsella et al., 1987). Intracerebral and prolonged infusions of IUdR were performed using mini osmotic pumps to optimize the DNA analog uptake and minimize systemic toxicity. Mairs *et al.* (Mairs et al., 2000) have shown in an animal brain tumor model (C6 tumors in rats) that single injection of 0.37 MBq

^{125}I -IUdR in 10 μl labeled only 6% of tumor cells whereas similar amounts of ^{125}I -IUdR released from polymer or infused continuously via an osmotic pump labeled 22% and 34% of tumor cells, respectively. In a head and neck cancer xenograft model, Harrington *et al.* obtained their best results with pegylated liposome-encapsulated IUdR and an optimal administration schedule over 7 days (Harrington *et al.*, 2004).

In vitro preliminary studies have shown that cells pre-treated with non-radioactive IUdR had a higher sensitization factor than cells irradiated alone and that the optimal energy was 50 keV (Corde *et al.*, 2004). Encouraged by these findings, we have examined in the present study the feasibility and therapeutic potential of SSR combined with locoregional injection of stable ^{127}I UdR.

METHODS AND MATERIALS

Animals and tumor inoculation

The experiments were performed on 47 male Fischer rats bearing F98 gliomas (7-8 weeks old, 240-280 g Charles River laboratory, L'Abresles, France). All operative procedures and animal care were in conformity with the Guidelines of the French Government (Décret 87-848, 19th of October 1987, licences # 7593 and # A38185-10002) and were approved by the European Synchrotron Radiation Facility ethical committee. The F98 rat glioma model has been described in details by R.F. Barth (Barth, 1998). Cells were routinely cultured as monolayers with DMEM (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% FCS, penicillin, and streptomycin. The rats were anesthetized with an isoflurane inhalation followed by an intraperitoneal injection of ketamine 64.5 mg/kg of body weight (b.w.) mixed with xylazine 5.4 mg/kg of b.w. Supplemental intraperitoneal injections of ketamine and xylazine were

administrated as needed to maintain anesthesia throughout the surgical procedures. The animals' eyes were lubricated with an ocular lubricant. For these experiments, 10^3 F98 cells in $10\ \mu\text{l}$ of serum-free Dulbecco's medium (containing 1% agarose with a gelling temperature $<30^\circ\text{C}$) were stereotactically implanted into the right caudate nucleus (3.5 mm right to the bregma and 5.0 mm in depth) of the rats. A syringe pump (model KDS 310, GENEQ inc., Montréal, Québec, Canada) was directly mounted on the stereotactic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, California, USA) and the syringe (model 702 N, Hamilton) was secured in the pump. The associated 22s-gauge needle was first inserted, 3.5 mm to the right of the bregma to a depth of 5.5 mm from the skull and then withdrawn to its target depth in the brain (5.0 mm from the skull surface). The F98 cells were injected over 16 seconds. On completion of the infusion, the needle was left in place for 2 minutes and withdrawn slowly. The skull perforation was then filled with wax and the operative field was cleaned with betadine before closure of the scalp incision.

Chemotherapeutic agents

Stable dry 5-iodo-2'-deoxyuridine ($^{127}\text{IUdR}$) was obtained from Sigma-Aldrich (Fluka BioChemika). The IUdR powder was first solubilized in pure Di-Methyl Sulfoxide (Sigma-Aldrich) (DMSO), sterile water was then added to obtain a final solution of 20 mg/mL IUdR and 50% DMSO.

Alzet osmotic pumps

Alzet osmotic pumps (model 2001) and Alzet brain infusion kits (model 2) were purchased from Charles River Laboratories France (L'Abresles, Rhône, France). The osmotic pumps were filled with IUdR solution and stored in the dark in sterile saline (9%) solution at 37°C during 24 hours

before being implanted. Seven days after tumor implantation, the rats were anesthetized as described before. The body of the osmotic pump was inserted subcutaneously on the back of the anesthetized rodent, in a pocket created with a hemostat into a mid-spacular incision. The pocket was made large enough to allow some movement of the pump. The pump was inserted with sufficient amount of catheter tubing to permit free motion of the animal's head and neck. The anterior end of the catheter was connected to the brain infusion kit. The brain infusion cannula (28 gauge) was inserted through the skull to the stereotactic correct depth (penetration depth 5 mm from skull surface), and the kit was fixed with surgical glue. The osmotic pump was left in place from day 7th to day 13th after tumor implantation. The animals thus received an infusion of IUdR (20 mg/mL), delivered at a rate of 1 μ l/h, during 6-days.

Irradiation protocol

Irradiations were performed in a single 15 Gy fraction, with monochromatic x-rays from the ESRF ID17 beamline, according to the procedure described elsewhere (Adam et al., 2006, Biston et al., 2004). Briefly, the right hemisphere was centered on the rotation axis and the beam dimensions were adjusted to 10 mm x 1 mm. The complete irradiation was performed, under a continuous rotation of the rat, in 15 adjacent 360° arcs, so that the planning target volume (PTV) encompassed a cylinder of 10 mm in diameter and 15 mm in height. The prescribed dose (*i.e.* 15 Gy) at the tumor was determined with Monte-Carlo simulations (Boudou et al., 2005, Boudou et al., 2004). The rats that received IUdR were irradiated with monochromatic x-rays of 50 keV, corresponding to the maximum dose-enhancement observed *in vitro* (Corde et al., 2004). The “irradiation alone” group was irradiated at 78.8 keV¹. 3D synchrotron radiation quantitative

¹ The irradiation control group was used in two different sets of experiments. In absence of high Z element the irradiation energy between 40 keV and 80 keV provide similar survivals (Adam et al. 2006, Biston et al. 2004).

computed tomography (SRCT) of the rat head was performed before radiation therapy (skin entrance x-ray dose: 0.15 - 0.20 Gy), without injection of contrast agent. The images were used for tumor centering and dosimetry.

Experimental groups

The rats were randomly divided into 4 groups as follow:

- 1) Untreated controls (n = 17);
- 2) $^{127}\text{IUdR}$ injection alone (n = 12);
- 3) Irradiation alone (15 Gy) on day fourteen after implantation (n = 8);
- 4) $^{127}\text{IUdR}$ plus irradiation (15 Gy), 24 h after completion of the infusion (n = 10).

Tumor growth evaluation with CT

The tumor growth was assessed by synchrotron computed tomography (SRCT) (Rousseau et al., 2007b) in a subset of animals, 15 days to 18 days after tumor inoculation. CT images were acquired with 35 keV monochromatic x-rays after intravenous injection (i.v.) of 1 mL of iodinated contrast agent, previously warmed at 37°C by the tail vein (Iomeron[®]; iodine concentration: 350 mg/mL) followed by 1 mL of NaCl. 3D axial SRCT images (1 mm slice thickness, 1 mm spacing) were acquired starting 5 to 10 minutes after completion of i.v. iodine infusion. The detector used in this study is a high-purity germanium detector segmented in 432 elements with 0.35 mm pixel size (Eurisy Mesures[®], Lingolsheim, France). Image reconstruction was performed using the SNARK89 filtered back projection algorithm (Herman et al., 1989). The images were analyzed using IDL processing software (Interactive Data Language[®], Research Systems Inc., Boulder, Colorado, U.S.A.).

The iodine concentrations in all voxels of the rat's brain were estimated using:

$$c = \frac{(\mu - \mu_0)}{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{E,I}}$$

where:

- c [g/ml] is the iodine concentration,
- μ [cm^{-1}] is the linear attenuation coefficient measured in the SRCT images after iodine infusion,
- μ_0 [cm^{-1}] is the linear attenuation coefficient of rat brain tissue without iodine,
 μ_0 was measured in several region of interest: $\mu_0 = 0.3149 \pm 0.0001 \text{ cm}^{-1}$ at 35 keV.

$(\mu/\rho)_{E,I}$ is the iodine mass attenuation coefficient at energy E ; in this study

$$(\mu/\rho)_{35\text{keV},I} = 31.23 \text{ [cm}^2\text{g}^{-1}\text{]}.$$

The images were acquired about 5 min after the bolus injection. The tumor size index was computed by a semi-automatic technique. A region of interest (ROI) was grown starting from a seed of voxels that have a value exceeding a given threshold. The threshold was defined as the contralateral brain attenuation coefficient plus three times the noise amplitude. The skull bone ($\mu = 0.68 \text{ cm}^{-1}$) was automatically removed from the ROI by applying an upper threshold of 0.46 cm^{-1} , a value empirically found to be never reached in the tumour (corresponding to an iodine concentration superior to 11.5 mg/mL). The ROIs were visually inspected before being included in the calculation of tumor volume.

Survival analysis

Rats were monitored after treatment by daily controlling their weight, as well as their feeding ability, external appearance and locomotion. Imminence of death is suggested by the combination

of sustained weight loss, ataxia, and per orbital haemorrhage (Redgate et al., 1991); at this stage, the rats were euthanized by intra-cardiac Dolethal[®] injection (1 ml.kg⁻¹) (Vetoquinol, Lure, France). In these cases, the survival time was calculated from the day of tumor implantation to the day of euthanasia plus one day. Kaplan-Meier survival curves were plotted and pairwise comparisons were made using the Mantel-Cox logrank test (JMP, SAS institute Inc., Cary, NC, USA). In addition, the percent increase life spans (%ILS) relative to the mean and median survival times of the ‘untreated control’ group were computed.

RESULTS

The inoculation of 10³ F98 glioma cells resulted in 100 % tumor uptake. The survival data are reported in **Table I**. The corresponding Kaplan-Meier graph is represented on **Figure 1**. The proportional hazard assumption was checked by comparing the 4 groups overall (a single log-rank test for the 4 curves, $p < 0.001$). The statistical tests results are summarized in **Table II**. Survivals of untreated rats and rats that received ¹²⁷IUdR alone were significantly different ($p = 0.002$, median 24 and 32 days, respectively). Median survival time of rats that received ¹²⁷IUdR in combination with irradiation (Median = 46 days) was however not statistically different compared to rats treated with ¹²⁷IUdR alone (Median = 32 days $p = 0.104$). The Log-Rank test was not used to test the difference between IUdR in combination with irradiation and irradiation alone (Median = 44 days), since the survival plots crossed each other. In such cases the Log-Rank test is unlikely to detect differences between groups (Klein and Moeschberger, 2003).

Computed Tomography Imaging

CT images of two representative animals are shown in **Figure 2** (slice thickness: 1 mm, rats imaged 17 or 18 days after tumor implantation). The tumor is clearly visible on 6 CT scans of an

untreated animal (Figure 2 A) with a tumor size of about 180 mm³. Interestingly, the tumor was on the other hand not detectable when the rats received IUdR alone treatment over 6 days (Figure 2B). The tumor volumes were calculated in a subset number of animals in each group. All the treatments: Chemotherapy alone, irradiation alone or their combination lead to a decrease of the tumor growth as shown in **Figure 3**.

DISCUSSION

The use of protracted intracerebral administration of ¹²⁷IUdR as a radiosensitizer for iodine-enhanced SSR was investigated in this preclinical trial. The biological endpoint was the survival time of rats bearing F98 glioma after treatment. Interestingly, IUdR alone led to a significant improved survival (Median = 32 days) in comparison with the untreated animals (Median = 24 days, $p = 0.002$). In addition, the CT images acquired on day 18th after tumor implantation showed almost a complete tumor disappearance after IUdR administration. However, the combination of IUdR with radiation (92% ILS), did not improved significantly the survival time of the animals in comparison with irradiation alone (83% ILS) or in comparison with IUdR alone (33% ILS $p = 0.014$). 20% of the animals that received IUdR and irradiation survived longer than the irradiated group, but the increase life span was only few days. It is noticeable that few rats in the group IUdR + radiation died before the first animals in the “irradiation alone” group, suggesting an enhanced toxicity of this combined treatment.

The results of the present study can be compared with other experimental studies using either radioactive IUdR or the photo-activation of cold IUdR with an external beam.

Kassis *et al.* evaluated the therapeutic potential of Auger electron therapy using radioactive ¹²⁵IUdR in rats bearing intracerebral 9L gliosarcoma. In their study, IUdR labelled with ¹²⁵I was

infused intracerebrally, using an Alzet osmotic pump, over a 6-day period into animals with 9-day-old 9L tumors (100 μ l/week, 238 μ Ci in 86 μ l) (Kassis et al., 1998). The median survival of animals treated with 125 IUdR (28.5 days) was slightly but not significantly longer ($p = 0.07$) than that of control animals (24 days). However, even with a modest increase in the life span (%ILS = 22%), 10% of the animals survived longer than 65 days. There are few studies dealing with intracerebral tumor treated with cold IUdR in combination with irradiation (Deutsch et al., 1989, Harrington et al., 2004, Kinsella et al., 1987, Kinsella et al., 1998, Williams et al., 1997, Mairs et al., 2000, Deutsch et al., 1990). Deutsch *et al.* reported the efficacy of IUdR as a radiosensitizer when administrated into the cerebral spinal fluid of the lateral cerebral ventricle in the 9L glioma rat brain model. In their study, radiotherapy was delivered over the entire brain in 3 fractions of 8 Gy delivered on days 4, 6 and 7 after 5×10^4 9L tumor cells implantation into the left caudate nucleus. IUdR (8.4 mg) was administrated with an osmotic pump over 7 days, starting on day of tumor implantation. The single modality treatments produced a slight but statistically non significant increase in survival, compared to the control group (median 16.9, 21.5, 19.5 for control group, IUdR alone and radiotherapy alone, respectively). The combination of radiation and infusion of IUdR produced a marked survival advantage (median 30.5 days) and was statistically different compared to all the other groups (Deutsch et al., 1990). Harrington *et al.* have examined the effect of radiation therapy with 137 Cs sources combined with various schedules of administration of un-encapsulated IUdR or pegylated liposomal IUdR (PLIUdR) for the treatment of KB xenograft tumors in nude mice (Harrington et al., 2004). They showed that when PLIUdR was delivered by a protracted administration schedule over 7 days (48 mg/kg), the effect of single fraction radiotherapy was significantly improved for 4.5 Gy, but not for 9 Gy. They obtained significant survival enhancement for *fractionated* PLIUdR-enhanced 137 Cs

radiotherapy, when compared to radiotherapy alone. Similarly, Doiron *et al.* used BrdUrd, another thymidine analog. They reported that radiosensitization was not seen for an acute dose of 16.5 Gy in the mouse tumor model RIF-1 after intratumoral BrdUrd polymer implantation, whereas a significant radiosensitization was observed for fractionated treatments when polymer/BrdUrd was implanted 3 days before the first radiation dose (Doiron *et al.*, 1999).

We recently reported, using the same tumor model and extra-cellular iodine as radio-enhancer (Adam *et al.*, 2006), survival results comparable to those obtained in the present study. The rats that received injection of iodine and mannitol in combination with a single fraction of radiation dose (50 keV, 15 Gy) survived longer than the rats irradiated without iodine (MeST = 26, 46, 54 and 71 days, for untreated animals, irradiation alone, or in combination with intra-venous (i.v) and intra-carotid injections, respectively). In comparison with the 15 Gy irradiation alone group, the survivals were significantly different only for intracarotid infusion ($p = 0.2$ and $p = 0.004$ for intravenous and intracarotid injections, respectively). The use of cold IUdR rather than radioactive IUdR could be advantageous for protecting surrounding healthy tissues. Radioactive IUdR therapy leads to irradiations circumvent to the cell level, but damages also tissues that uptake the radioactive element, wherever their location in the body. The use of cold IUdR with an external beam would lead to larger irradiation fields, but would be limited to the organs present in these fields. The photo-activation of IUdR generates theoretically additional double strand breaks in DNA (Terrissol *et al.*, 2004). However, it is difficult to differentiate *in vivo* between the chemotherapeutic effect of IUdR and the interaction of x-rays on the iodine atoms. The chemotherapeutic effect of IUdR observed in this study is important (Table 1) and might mask the Auger effect. The cause of the early deaths observed in the group of rats that have received the combination of IudR and radiotherapy has to be investigated.

Conclusion: The chemotherapeutic effect of the prolonged infusion of $^{127}\text{IUdR}$ was seen to be significant, but the addition of a single fraction of X-ray dose did not improve significantly the treatment outcome. Further studies are warranted with an optimized IUdR injection modality and x-ray dose fractionation.

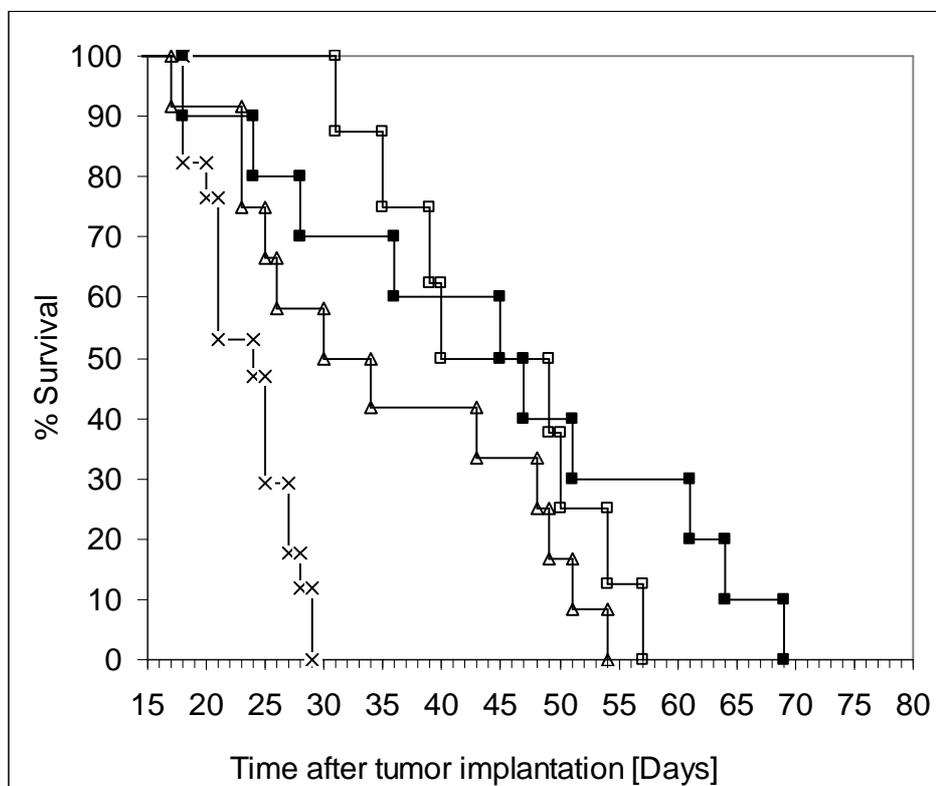


Figure 1: Kaplan Meier survival curves for F98 glioma-bearing rats after chemo-radiotherapy. Survival times in days after tumor implantation have been plotted for untreated animals (×), infusion of ^{127}I UdR with osmotic pump 20 mg/ml alone (Δ), irradiation alone (single fraction of 15 Gy) (\square), or in combination with ^{127}I UdR delivered by osmotic pump 20 mg/ml (\blacksquare). IUdR was administered for 6 days starting 7 days after tumor implantation. X-ray dose was delivered in a single fraction on day 14 after tumor implantation. Note: In the IUdR group, 2 rats died at the anesthesia and were not included in the analysis.

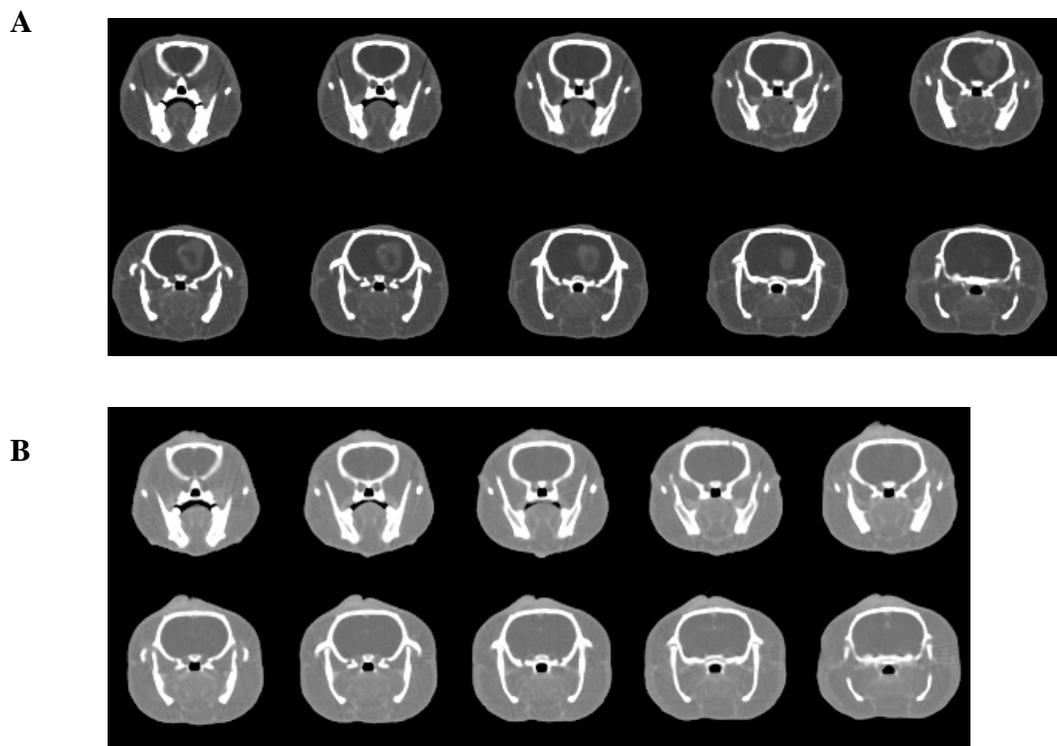


Figure 2: *Synchrotron Computed Tomography.*

10 consecutive CT images (slice thickness: 1mm) of the rat head of two representative animals: A) Untreated animal, imaged 18 days after tumor implantation, survival time: 21 days; the tumor is clearly visible on 6 slices with a tumor size index of about 180 mm^3 . B) Group “IUdR alone”; imaged on day 17th after tumor implantation; survival time: 51 days. The tumor was no longer detectable after IUdR infusion over 6 days (B), even with an optimized gray level windowing.

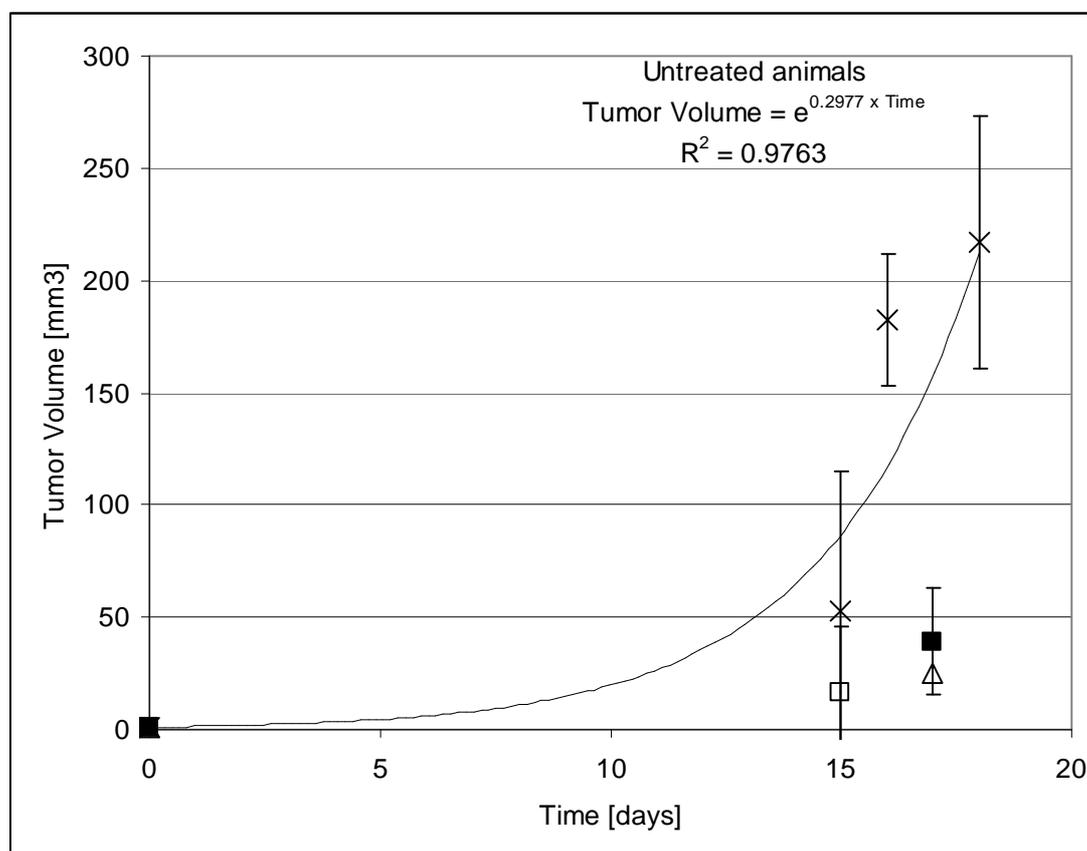


Figure 3: Tumor growth versus time for the different treatments.

Tumor volumes measured using the CT images for a subset of rats in each group:

Untreated animals (x) n = 11, infusion of ¹²⁷IUdR with osmotic pump 20 mg/ml alone (Δ) n = 6, irradiation alone (single fraction of 15 Gy) (□) n = 5, or in combination with ¹²⁷IUdR with osmotic pump 20 mg/ml (■) n = 5. IUdR was administered for 6 days starting 7 days after tumor implantation. The line corresponds to an exponential fit of the “untreated group” survival data.

Tables

Group	Survival time (days)			%ILS	
	Survival Range	Mean \pm SE	Median	Mean	Median
Untreated (n=17)	18-29	23 \pm 1	24	-	-
¹²⁷ IUdR (n=12)	17-54	35 \pm 4	32	52 %	33 %
Irradiation 15 Gy (n=8)	31-57	44 \pm 3	44	91%	83 %
¹²⁷ IUdR + Irradiation 15 Gy (n=10)	18-69	44 \pm 6	46	91 %	92 %

Table I: *Survival times of F98 glioma-bearing rats after chemo-radiotherapy.*

¹²⁷IUdR (20 mg/ml) was injected by the means of osmotic pumps starting on day 7 after tumor implantation. The infusion lasted for 6 days, at a rate of 1 μ l/h. Radiotherapy (single fractions of 15 Gy), was delivered on day 14 after inoculation of 10^3 F98 glioma cells.

Groups comparison	Statistical test	
	Log Rank	Wilcoxon
IUdR / Untreated	0.002	0.013
X / Untreated	<0.001	<0.001
IUdR + X / Untreated	<0.001	0.003
IUdR + X / IUdR	0.104	0.213
IUdR + X / X	N.A. #	N.A. #

Table II: Log-rank and Wilcoxon statistical tests results.

N.A.: Not applicable. The tests were not performed since the survival plots cross each other. In that case they are unlikely to detect differences between groups.

Figures Legend

Figure 1: *Kaplan Meier survival curves for F98 glioma-bearing rats after chemo-radiotherapy.*

Survival times in days after tumor implantation have been plotted for untreated animals (\times), infusion of $^{127}\text{IUdR}$ with osmotic pump 20 mg/ml alone (\triangle), irradiation alone (single fraction of 15 Gy) (\square), or in combination with $^{127}\text{IUdR}$ with osmotic pump 20 mg/ml (\blacksquare). IUdR was administered for 6 days starting 7 days after tumor implantation. X-ray dose was delivered in a single fraction on day 14 after tumor implantation. Note: In the IUdR group, 2 rats died at the anesthesia, they were not included in the analysis.

Figure 2: *Synchrotron Computed Tomography.*

10 consecutive CT images (slice thickness: 1mm) of the rat head of two representative animals: A) Untreated animal, imaged 18 days after tumor implantation, survival time: 21 days; the tumor is clearly visible on 6 slices with a tumor size index of about 180 mm^3 . B) Group “IUdR alone”; imaged on day 17th after tumor implantation; survival time: 51 days. The tumor was no longer detectable after IUdR infusion over 6 days (B), even with an optimized gray level windowing.

Figure 3: *Tumor growth versus time for the different treatments.*

Tumor volumes measured using the CT images for a subset of rats in each group: Untreated animals (\times) $n = 11$, infusion of $^{127}\text{IUdR}$ with osmotic pump 20 mg/ml alone (\triangle) $n = 6$, irradiation alone (single fraction of 15 Gy) (\square) $n = 5$, or in combination with $^{127}\text{IUdR}$ with osmotic pump 20 mg/ml (\blacksquare) $n = 5$. IUdR was administered for 6 days starting 7 days after tumor implantation. The line corresponds to an exponential fit of the “untreated group” survival data.

Tables Legend

Table I: *Survival times of F98 glioma-bearing rats after chemo-radiotherapy.*

¹²⁷IUdR (20 mg/ml) was injected by the means of osmotic pumps starting on day 7 after tumor implantation. The infusion lasted for 6 days, at a rate of 1 µl/h. Radiotherapy (single fraction of 15 Gy), was delivered on day 14 after inoculation of 10³ F98 glioma cells.

Table II: Log-Rank and Wilcoxon statistical tests results.

N.A.: Not applicable. The tests were not performed since the survival plots cross each other. In that case they are unlikely to detect differences between groups.

REFERENCES

- Adam, J. F., Biston, M. C., Joubert, A., Charvet, A. M., Le Bas, J. F., Esteve, F. and Elleaume, H. (2005) *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **61**, 1173-82.
- Adam, J. F., Elleaume, H., Joubert, A., Biston, M. C., Charvet, A. M., Balosso, J., Le Bas, J. F. and Esteve, F. (2003) *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **57**, 1413-26.
- Adam, J. F., Joubert, A., Biston, M. C., Charvet, A. M., Peoc'h, M., Le Bas, J. F., Balosso, J., Esteve, F. and Elleaume, H. (2006) *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **64**, 603-11.
- Barth, R. F. (1998) *J Neurooncol*, **36**, 91-102.
- Barth, R. F., Coderre, J. A., Vicente, M. G. and Blue, T. E. (2005) *Clin Cancer Res*, **11**, 3987-4002.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F. and Delattre, J. Y. (2003) *Lancet*, **361**, 323-31.
- Berry, S. E. and Kinsella, T. J. (2001) *Semin Radiat Oncol*, **11**, 300-15.
- Biston, M. C., Joubert, A., Adam, J. F., Elleaume, H., Bohic, S., Charvet, A. M., Esteve, F., Foray, N. and Balosso, J. (2004) *Cancer Res*, **64**, 2317-23.
- Bodei, L., Kassis, A. I., Adelstein, S. J. and Mariani, G. (2003) *Cancer Biother Radiopharm*, **18**, 861-77.
- Boudou, C., Balosso, J., Esteve, F. and Elleaume, H. (2005) *Phys Med Biol*, **50**, 4841-51.
- Boudou, C., Biston, M. C., Corde, S., Adam, J. F., Ferrero, C., Esteve, F. and Elleaume, H. (2004) *Phys Med Biol*, **49**, 5135-44.
- Boudou, C., Tropres, I., Rousseau, J., Lamalle, L., Adam, J. F., Esteve, F. and Elleaume, H. (2007) *Phys Med Biol*, **52**, 4881-4892.
- Cardinale, R. M., Benedict, S. H., Wu, Q., Zwicker, R. D., Gaballa, H. E. and Mohan, R. (1998) *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **42**, 431-6.
- Charlton, D. E. (1986) *Radiat Res*, **107**, 163-71.
- Corde, S., Joubert, A., Adam, J. F., Charvet, A. M., Le Bas, J. F., Esteve, F., Elleaume, H. and Balosso, J. (2004) *Br J Cancer*, **91**, 544-51.
- Croteau, D. and Mikkelsen, T. (2001) *Curr Treat Options Oncol*, **2**, 507-15.
- Deutsch, M., Rewers, A. B., Redgate, E. S., Fisher, E. R. and Boggs, S. S. (1989) *J Natl Cancer Inst*, **81**, 1322-5.
- Deutsch, M., Rewers, A. B., Redgate, S., Fisher, E. R. and Boggs, S. S. (1990) *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **19**, 85-7.
- Doiron, A., Yapp, D. T., Olivares, M., Zhu, J. X. and Lehnert, S. (1999) *Cancer Res*, **59**, 3677-81.
- Esteve, F., Corde, S., Elleaume, H., Adam, J. F., Joubert, A., Charvet, A. M., Biston, M. C., Balosso, J. and Le Bas, J. F. (2002) *Acad Radiol*, **9 Suppl 2**, S540-3.
- Fairchild, R. G., Brill, A. B. and Ettinger, K. V. (1982) *Invest Radiol*, **17**, 407-16.
- Harrington, K. J., Syrigos, K. N., Uster, P. S., Zetter, A., Lewanski, C. R., Gullick, W. J., Vile, R. G. and Stewart, J. S. (2004) *Br J Cancer*, **91**, 366-73.
- Herman, G. T., Lewitt, R. M., Odhner, D. and Rowland, S. W. (1989) Medical Imaging Processing Group, Department of Radiology, Philadelphia: University of Pennsylvania.
- Karnas, S. J., Moiseenko, V. V., Yu, E., Truong, P. and Battista, J. J. (2001) *Radiat Environ Biophys*, **40**, 199-206.
- Karnas, S. J., Yu, E., McGarry, R. C. and Battista, J. J. (1999) *Phys Med Biol*, **44**, 2537-49.

- Kassis, A. I. (2003) *J Nucl Med*, **44**, 1479-81.
- Kassis, A. I., Wen, P. Y., Van den Abbeele, A. D., Baranowska-Kortylewicz, J., Makrigiorgos, G. M., Metz, K. R., Matalka, K. Z., Cook, C. U., Sahu, S. K., Black, P. M. and Adelstein, S. J. (1998) *J Nucl Med*, **39**, 1148-54.
- Kinsella, T. J., Dobson, P. P., Mitchell, J. B. and Fornace, A. J., Jr. (1987) *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **13**, 733-9.
- Kinsella, T. J., Kunugi, K. A., Vielhuber, K. A., Potter, D. M., Fitzsimmons, M. E. and Collins, J. M. (1998) *Clin Cancer Res*, **4**, 99-109.
- Klein, J. P. and Moeschberger, M. L. (2003) *Survival analysis techniques for censored and truncated data*, Springer, New York.
- Lorusso, V., Luzzani, F., Bertani, F., Tirone, P. and de Haen, C. (1994) *Eur J Radiol*, **18 Suppl 1**, S13-20.
- Mairs, R. J., Wideman, C. L., Angerson, W. J., Whateley, T. L., Reza, M. S., Reeves, J. R., Robertson, L. M., Neshasteh_Riz, A., Rampling, R., Owens, J., Allan, D. and Graham, D. I. (2000) *British Journal of Cancer*, **82**, 74-80.
- Moiseenko, V. V., Karnas, S. J., Yu, E. and Battista, J. J. (2002) *Radiat Prot Dosimetry*, **99**, 113-6.
- Phillips, M. H., Stelzer, K. J., Griffin, T. W., Mayberg, M. R. and Winn, H. R. (1994) *J Clin Oncol*, **12**, 1085-99.
- Redgate, E. S., Deutsch, M. and Boggs, S. S. (1991) *Lab Anim Sci*, **41**, 269-73.
- Robar, J. L., Riccio, S. A. and Martin, M. A. (2002) *Phys Med Biol*, **47**, 2433-49.
- Rousseau, J., Boudou, C., Barth, R. F., Balosso, J., Esteve, F. and Elleaume, H. (2007a) *Clin Cancer Res*, **13**, xx-xx.
- Rousseau, J., Boudou, C., Esteve, F. and Elleaume, H. (2007b) *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **68**, 943-51.
- Terrissol, M., Edel, S. and Pomplun, E. (2004) *Int J Radiat Biol*, **80**, 905-8.
- Williams, J. A., Dillehay, L. E., Tabassi, K., Sipos, E., Fahlman, C. and Brem, H. (1997) *J Neurooncol*, **32**, 181-92.

Polymer gel dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy and iodine dose-enhancement measurements

C Boudou^{1,2,3}, I Tropès^{2,4}, J Rousseau^{1,2,3}, L Lamalle^{2,4}, J F Adam^{1,2,3},
F Estève^{1,2,3,4} and H Elleaume^{1,2,3,4}

¹ INSERM U-836 Equipe 6 'Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale',
Institut des Neurosciences de Grenoble, France

² Université Joseph Fourier, Grenoble, France

³ European Synchrotron Radiation Facility, Medical Beamline ID17, Grenoble, France

⁴ CHU Grenoble, Hôpital Michallon, Unité IRM, Grenoble, France

E-mail: helene.elleaume@esrf.fr

Received 26 January 2007, in final form 21 June 2007

Published 30 July 2007

Online at stacks.iop.org/PMB/52/4881

Abstract

Synchrotron stereotactic radiotherapy (SSR) is a radiotherapy technique that makes use of the interactions of monochromatic low energy x-rays with high atomic number (Z) elements. An important dose-enhancement can be obtained if the target volume has been loaded with a sufficient amount of a high- Z element, such as iodine. In this study, we compare experimental dose measurements, obtained with normoxic polymer gel (nPAG), with Monte Carlo computations. Gels were irradiated within an anthropomorphic head phantom and were read out by magnetic resonance imaging. The dose-enhancement due to the presence of iodine in the gel (iodine concentration: 5 and 10 mg ml⁻¹) was measured at two radiation energies (35 and 80 keV) and was compared to the calculated factors. nPAG dosimetry was shown to be efficient for measuring the sharp dose gradients produced by SSR. The agreement between 3D gel dosimetry and calculated dose distributions was found to be within 4% of the dose difference criterion and a distance to agreement of 2.1 mm for 80% of the voxels. Polymer gel doped with iodine exhibited higher sensitivity, in good agreement with the calculated iodine-dose enhancement. We demonstrate in this preliminary study that iodine-doped nPAG could be used for measuring *in situ* dose distributions for iodine-enhanced SSR treatment.

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

1. Introduction

At the medical beamline of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), a new therapeutic modality against brain tumours is under development. The so-called ‘synchrotron stereotactic radiotherapy’ (SSR) consists in loading a tumour with elements of a high atomic number, such as iodine, prior to irradiation by low energy monochromatic x-rays (50–80 keV) from a synchrotron source (Adam *et al* 2003, 2006). The tumour is first placed at the centre of rotation of a tomography system and then irradiated continuously over 360° by a monochromatic beam restricted to the tumour dimensions. At these energies, the high photoelectric cross section of iodine results in substantial photoelectric interactions, which generate fluorescent x-rays, photoelectrons and Auger electrons producing a localized dose enhancement. When iodinated contrast agents are used, an iodine dose-enhancement ratio (DER) is defined as the ratio between the dose delivered to a given volume containing iodine, and the dose delivered to the same volume without iodine.

The specificities of SSR irradiation, in particular the presence of high-Z elements and the irradiation energy, have required the design of a dedicated dose calculation tool. Tissue densities play an important role in the energy range 50–80 keV and commercial planning systems, designed for high-energy beam treatments, are therefore not adequate for SSR treatment. We developed a dose calculation tool *SSRdose* (Boudou *et al* 2005) based on the MCNPX Monte Carlo code (Hendricks *et al* 2005). Monte Carlo (MC) calculations provide energy deposition in complicated geometries made of user-defined materials, using track histories of each incident photon and subsequent scattered photons and electrons.

In parallel with the development of a specific treatment planning system, there is a need for measuring the three-dimensional (3D) absorbed dose distribution within anthropomorphic phantoms. Gel dosimetry is the unique technique that can provide a full 3D estimate of the dose distribution. In 1984, a Fricke gel dosimeter was introduced by Gore *et al* (1984) and was seen to be a promising solution for measuring 3D dose distributions with high resolutions in a tissue equivalent medium. The technique was based on the radiation-induced conversion of ferrous ions to ferric ions, which could be measured with magnetic resonance imaging (MRI). The suitability of Fricke gel has been investigated for SSR therapy in a previous study (Boudou *et al* 2004). The major disadvantage of the Fricke gel was the diffusion of ferric ions through the gel after irradiation, which led to the loss of dose gradients. More recently, polymer gels have been introduced as dosimeters (Maryanski *et al* 1993). The principle is based on polyacrylamide formed by radiation-induced co-polymerization and cross-linking of acrylamide and bis-acrylamide monomers in a gel matrix. The polymer formation following irradiation increases the relaxation rate of protons, which can be measured using an MRI technique. The change in the relaxation rate can be directly related to the absorbed dose. In recent years, a new generation of polymer gel dosimeters, which can be manufactured in a normal atmosphere, has been developed (Fong *et al* 2001, De Deene *et al* 2002). An important advantage of normoxic polyacrylamide gel (nPAG) over Fricke gel is that the radiation-induced polymer is stable and does not diffuse through the gel.

The experimental verification of the dose-enhancement induced by the presence of high-Z elements in a medium is inherently difficult. Few attempts have been made for doping radiosensitive gels: the Fricke solution was found to be appropriate for the measurement of dose enhancement due to the presence of gold particles (Herold *et al* 2000). Nevertheless, Corde *et al* (2005) have shown that the Fricke gel dosimeter could not reveal an iodine dose enhancement. A normoxic polyacrylamide gel has also been used in the framework of boron neutron capture therapy (BNCT) (Farajollahi *et al* 2000). This latter work indicates the potential feasibility of dose-enhancement measurements for neutrons due to boron.



Figure 1. An anthropomorphic head phantom. Overview on the left side and opened phantom on the right. A cassette and three spacers are visible.

The purpose of this study was twofold: first to evaluate the performances of normoxic polyacrylamide gel for SSR dose measurement; second to investigate the feasibility of doping nPAG with iodine to quantify the DER. The resulting dose distributions were compared with Monte Carlo calculations (in-plane isodoses comparison and γ -index evaluation (Low *et al* 1998)). The sensitivity of iodine doped polyacrylamide gels, called further nPAGI, was correlated with the Monte Carlo calculation of DERs.

2. Materials and methods

2.1. Phantom description

A human head phantom (Computerized Imaging Reference Systems, Norfolk, VA, USA) was used in this study (figure 1). It mimics the tissues from 50 keV to 25 MeV x-rays. Gel cassettes of different sizes can be inserted into the cavity together with brain-equivalent spacers. Several boxes, made of polymethylmethacrylate (PMMA, 4 mm thick), were manufactured (UsiPlast, Gières, France). One of them is the size of the entire cavity ($63.68 \times 63.68 \times 103.68 \text{ mm}^3$) and the other three have a cubic shape (sides of 63.68 mm).

2.2. Gel preparation

A standard gel formulation for nPAG was utilized, whose properties were recently reported by De Deene *et al* (2006). The same formulation was employed for both the 3D dosimetry study and measurement of the iodine DER.

Acrylamide (3 (w/w)%) and *N-N'*-methylene-bis-acrylamide (3 (w/w)%) were dissolved in half the amount of the total water volume (89 (w/w)%). This solution was heated up to 45 °C and stirred until the solution became clear. Gelatin from porcine skin (300 bloom, 5 (w/w)%) was dissolved separately in the other half of the water and heated to about 45 °C. Both solutions were mixed after they had cooled down to 40 °C. Finally, an antioxidant (tetrakis hydroxymethyl phosphonium chloride THPC, 5 mmol l⁻¹) was added to the solution which was then stirred for 1 min.

2.2.1. *3D dosimetry.* After filling, the PMMA vials were immediately closed and placed in a fridge for complete gelation. Gels were removed from the fridge and stored at room temperature for about 4 h before irradiation.

2.2.2. *Measurement of the iodine DER.* Right after the antioxidant has been added, the nPAG solution was separated into three batches. In two of them, a quantity of NaI powder was dissolved in order to reach final iodine concentrations of 5 and 10 mg ml⁻¹. The third batch remained unchanged. Glass tubes (1 cm in diameter, 1 mm wall thickness) were rapidly filled and closed. Thirty minutes in the fridge allowed the gel to fix. The tubes were then stored at room temperature until irradiation (about 2 h). We checked during the gel preparation that the addition of NaI did not modify the pH of the gels. Moreover, it was established in the framework of another experiment that the addition of NaI does not modify the gel sensitivity when megavoltage radiation is used (data not shown).

The concentrations of iodine in the gels were chosen as being accessible concentrations in brain tumours via standard injection modes (Mesa *et al* 1999). Iodine concentrations of up to 5 mg ml⁻¹ have been reported in brain tumours by intravenous administration (Santos Mello *et al* 1983, Norman *et al* 1997). These concentrations were obtained using conventional administration procedures for brain tumour imaging, without the specific aim of maximizing the iodine concentration. It is most likely possible to increase the iodine tumour uptake in patients. Moreover, regarding the electron density, the tissue equivalence of the doped gel is well preserved. Indeed, the electron density for a 10 mg ml⁻¹ doped nPAG is $3.47 \times 10^{29} \text{ m}^{-3}$, representing an increase of 0.7% relative to a standard nPAG ($3.41 \times 10^{29} \text{ m}^{-3}$) whereas the electron density of the brain (grey and white matter) is $3.46 \times 10^{29} \text{ m}^{-3}$.

2.3. Irradiations

Anthropomorphic dosimetry was performed at 80 keV, in the energy range that could be used for the treatment of patients. Monte Carlo calculations were performed in a previous study to find an optimal irradiation energy range for the treatment of patients bearing glioma (Boudou *et al* 2005). The optimal irradiation energy is a compromise between the production of free electrons (and subsequent absorption of their kinetic energies) and x-ray absorption of the healthy surrounding tissues. The dose distribution is dependent on the tumour dimension, its location within the brain, the irradiation energy and on the tumour iodine concentration. The dose–response of iodine-doped gels (nPAGI) was evaluated at 35 keV as well, just above the iodine K-edge, where the photoelectric effect is dominant for a mixture of water and iodine.

2.3.1. *3D dosimetry.* The calibration procedure proposed by Oldham *et al* (1998) was used in this study. This method is based on the depth dose attenuation measurement within a large recipient (here a box of 10 cm in length, see figure 2(a)). The main advantage of this technique is to provide a large number of calibration points in a single measurement. In addition, the volume of the calibration container is about the same as the experimental vials. Temperature variations are therefore similar in the various vials.

The target region within the anthropomorphic phantom was positioned on the rotation axis and the irradiation was performed in a tomography mode with a parallel beam of 80 keV (figure 2 and table 1). Two treatments were simulated.

- (1) *Case A.* The planned target volume (PTV) was defined as a single cylinder: 1.5 cm in height and 1.5 cm in diameter, located at the centre of the phantom.

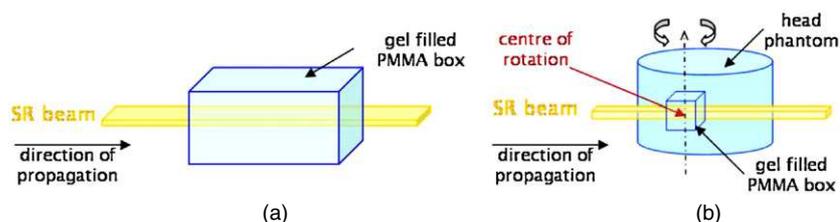


Figure 2. Configurations for the calibration procedure (a) and for the SSR irradiation (b) with the synchrotron radiation (SR).

Table 1. PTV definition and irradiation parameters.

	PTV dimensions (cm)	Beam width (cm)	Beam height (cm)	Height irradiated (cm)	Nominal x-ray dose (Gy)
Phantom case A	1.5 × 1.5	1.5	0.1	1.5	11
Phantom case B	0.7 × 1.5 then 0.8 × 2.0	1.5 then 2.0	0.1	0.7 then 0.8	11
Calibration box (depth)	–	2	0.1	0.8	15 (entrance dose)

- (2) *Case B.* The PTV consisted in two contiguous cylinders: (1) 0.7 cm in height and 1.5 cm in diameter and (2) 0.8 cm in height and 2 cm in diameter, located at the centre of the phantom.

Irradiations were carried out at the ESRF medical beamline, described in Elleaume *et al* (1999), with monochromatic low energy x-rays. One of the characteristics of synchrotron radiation is its low divergence in the transverse plane to the electron orbit plane. For that reason, the typical height of the beam at the ESRF medical beamline is only 1 mm whereas its width can reach 15 mm. Several contiguous irradiations were thus performed to cover the overall target height. Before each experiment, the maximal dose (100%) at the centre of rotation was calculated and the beam width was chosen to cover the PTV with the 90% isodose. The x-ray dose rate was evaluated independently with an ionization chamber (PTW 31 002, Freiburg, Germany) and a high purity germanium detector HPGe (Eurisy Mesures, Lingolsheim, France). The dose rate in water at the sample level was $0.42 \text{ Gy} \cdot \text{s}^{-1}$ with a ring current of 180 mA.

2.3.2. Measure of the iodine DER. The iodine DER is defined as the ratio between the dose delivered to a tube of nPAG gel containing iodine, and the dose delivered to the gel without iodine:

$$\text{DER} = \frac{\text{DOSE}_{\text{nPAG-I}}}{\text{DOSE}_{\text{nPAG}}}$$

The dose–response of iodine-doped gels (nPAGI) was evaluated at 35 keV and 80 keV. At 35 keV, just above the iodine K-edge, the photoelectric effect is dominant for a mixture of water with 10 mg ml^{-1} iodine. The 80 keV beam corresponds to an optimum in energy for a particular treatment case (Boudou *et al* 2005).

Tubes were irradiated in SSR mode by a 30 mm wide and 1 mm high beam, over 15 mm, vertically. Doses for the standard nPAG were 1, 5, 10 and 20 Gy for both energies and one of the tubes was left unirradiated. Doses prescribed to the iodinated samples were computed

taking into account the DER derived from Monte Carlo simulation in such a manner that doses delivered to the doped gels roughly correspond to the doses given to the normal gel.

2.4. Monte Carlo calculations

A Monte Carlo (MC) based dose calculation tool (*SSRdose*) was developed around the multiple particle transport code MCNPX (Hendricks *et al* 2005, Pelowitz 2005). It includes the transfer and segmentation of computed tomography (CT) data into a voxelized geometry of user defined materials and the read out of MCNPX output files (Boudou *et al* 2005). CT images of the anthropomorphic phantom, calibration vial and glass tubes were obtained at the medical beamline (spatial resolution 350 μm , slice thickness 1 mm). To obtain sufficient counting statistics within a reasonable time, the image spatial resolution was degraded to 1.05 mm (except for glass tubes). Energy deposition was recorded in each voxel included within the slices of interest, and converted to a dose. Material compositions were obtained from ICRU when available (ICRU 1992) or calculated. The synchrotron beam was represented as a parallel 35 or 80 keV monochromatic beam. For the SSR irradiation (tomography mode), the starting position of each photon was sampled according to the position of the centre of rotation and the beam characteristics (width, height, energy). For the depth dose calibration, a parallel beam (20 mm wide and 8 mm high) was modelled perpendicular to the short side of the calibration box (cf figure 2(a)).

2.5. Magnetic resonance imaging

Following the irradiations, the samples were imaged using a 3 T magnetic resonance imaging (MRI) scanner (Bruker BioSpin[®], Germany) with a standard head coil at the proton resonance frequency (125.466 MHz). The MRI of the gels was performed 3 days and 1.5 days after irradiation for the 3D and nPAGI experiments, respectively. The vials were imaged at room temperature. In order to calculate the spin–spin relaxation rates, multiple spin echo sequences were programmed. The transverse relaxation rate (R_2) of each pixel was derived by fitting a monoexponential decay to the T_2 decay curve using the Levenberg–Marquardt algorithm (Origin[®]6.0, Microcal Software, USA). The first echo was not considered in the fitting.

2.5.1. 3D dosimetry. The parameters for the multiple spin echo sequence used for imaging the three vials at once were echo time = 28 ms, number of echoes = 50, repetition time = 5000 ms. The field of view was 160 \times 140 mm, for a matrix size of 160 \times 140, resulting in a spatial resolution of 1 mm in the image plane. The volume of the cassettes was scanned with a slice thickness of 2 mm (24 slices).

When comparing calculated and measured dose maps, both spatial and dose deviations are important. Various types of dose distribution comparison tools exist and were detailed in a recent paper by Jiang *et al* (2006). These authors proposed to perform the dose distribution comparison only in the dose domain, considering both predetermined dose and spatial thresholds. This particular algorithm was used with an acceptance region derived from Low's γ -index (Low *et al* 1998) for the evaluation of gel dosimetry (test distribution) versus Monte Carlo calculations (reference distribution).

2.5.2. Measurement of the iodine DER. The parameters for the multiple spin echo sequence were echo time = 28 ms, number of echoes = 56, repetition time = 5000 ms. The field of view was 192 \times 152 mm, for a matrix size of 192 \times 152, resulting in a spatial resolution of 1 mm

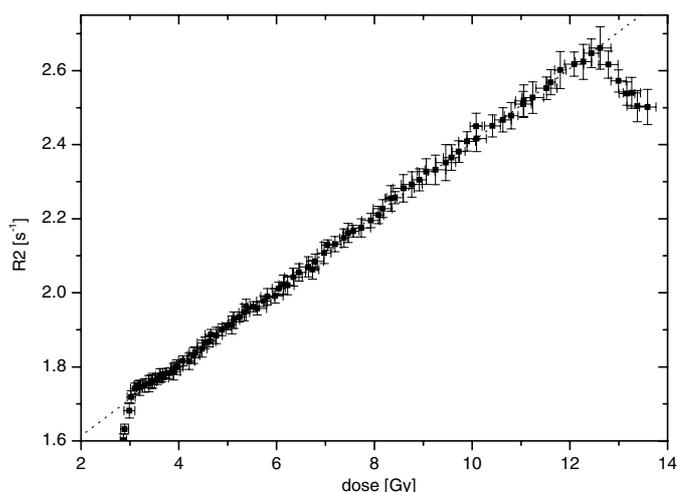


Figure 3. Response curve of the nPAG. Relaxation rates are reported against the MCNPX dose calculations. Error bars are one standard deviation of 13 voxels averaged for both MRI measurements (26 mm^3) and calculations (71.7 mm^3).

in the image plane. One image was acquired longitudinally across the tubes with a slice thickness of 3 mm.

3. Results and discussions

3.1. Gel calibration

From previous experiments, we found an acceptable range of linearity from 0 to 22 Gy for this type of nPAG gel, read by MRI (data not shown). A visual inspection of the boxes revealed that a gel region close to the walls was insensitive. A sharp drop of relaxation rates was indeed observed within a region of 6 mm (figure 3). This phenomenon was also observed in a previous experiment (data not shown). Oxygen or impurity contamination from the wall could probably be the reason for this loss in sensitivity. Hepworth and co-workers have demonstrated a decrease in spin–spin relaxation rates with an increase in the oxygen concentration in the polyacrylamide gel (Hepworth *et al* 1999). The data fitting was therefore performed excluding 6 mm on each side of the depth dose measurement. In this experiment, a linear response was obtained with a sensitivity of $(9.923 \pm 0.046) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Gy}^{-1}$ (figure 3), in the dose range 2.9–12.5 Gy.

3.2. Volume measurements

The phantom R2 images obtained from MRI were converted into dose maps through the calibration equation from the depth dose measurement. A dead volume (6 mm region near the vial walls) was removed from the data of interest. Dose distributions obtained by Monte Carlo calculations and experimental measurements are superimposed in figure 4, for a nominal dose of 11 Gy delivered to the PTV. High dose gradients around the target were accurately reproduced by the gel. It is also noticeable that the dose maps agree well in terms of the absolute dose values.

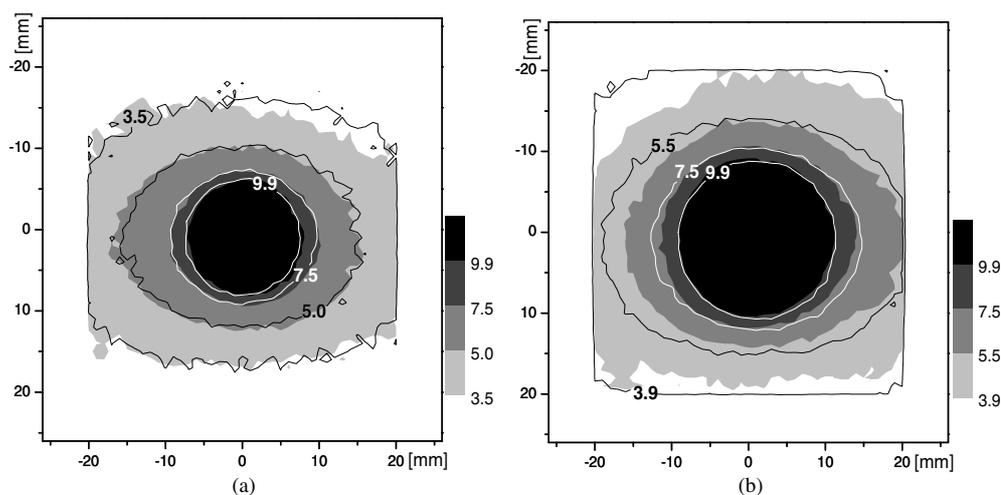


Figure 4. Dose distributions of two SSR treatments calculated by MCNPX (lines) and measured by polymer gel dosimetry (grey areas): for (a) case A and (b) case B (one slice of the volume of interest). Indicated isodoses are in grey. A dead volume (6 mm from the vial walls) was removed from the images.

Quantitative dose distribution comparison was performed using a gamma acceptance region derived from Low's γ -index (Jiang *et al* 2006). For the pass–fail test, dose and spatial criteria were, respectively, 4% and 2.1 mm (figure 5). The usual criteria used in standard dose distribution comparison for clinical treatments vary from 3 to 5% in dose and 2.5 to 5 mm in distance, depending on the type of target. Usual standards used in dose distribution comparison for clinical treatments vary from 3 to 5% in dose and 2.5 to 5 mm in distance, depending on the type of target. For the treatment of brain tumours, smaller spatial tolerance is required. Since the spatial resolution of the MRI images (1 mm \times 1 mm \times 2 mm, in this study) cannot be easily decreased due to constraints on the scanning time and gel heating, other imaging techniques (such as optical tomography) could be investigated to improve this limitation.

According to the selected criteria, 82% and 79% of the voxels pass the test for the irradiation case A and case B, respectively. The lower score obtained in case B is mostly due to a lack of gel sensitivity in one of the corners, presumably because of oxygen contamination. Undesirable effects on the edges have also been reported in the literature related to 3D dosimetry (Low *et al* 1999, Cosgrove *et al* 2000). The problem of polymerization inhibition could be reduced by shortening the time span between fabrication and irradiation. The cleaning of vials should also be carefully performed. In order to maximize the measurement volume, a less permeable plastic material, such as Barex[®], could be utilized. This material has been successfully used previously for gel dosimetry (Haraldsson *et al* 2000, Duthoy *et al* 2003, 2004, Vergote *et al* 2004).

3.3. Measurement of the iodine DER

Dose–responses for the three batches are displayed in figure 6 for both energies. It is noticeable that iodine does not modify in a large extent the intercept (R2 value at 0 Gy). A good linear relationship was found between the dose and R2, whatever the iodine content and the beam

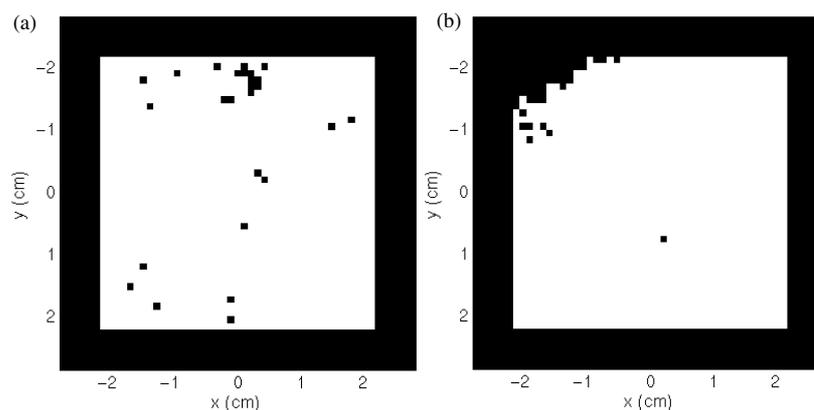


Figure 5. Pass/fail maps of the gel dose distribution versus the computed dose distribution (a) case A and (b) case B (one slice of the volume of interest) with 4% dose tolerance and 2.1 mm distance to the agreement criteria. White pixels represent the passed areas, while black pixels represent the failed areas.

Table 2. Sensitivities of the various gels at 35 and 80 keV from which $DER_{s_{exp}}$ are derived. Measured $DER_{s_{exp}}$ are compared to Monte Carlo calculated dose-enhancement ratio DER. It should be noted that the standard deviations of sensitivities apply to the uncertainties in the linear fit, not to the measurement uncertainty.

	DER_{exp} (SD) ($s^{-1} Gy^{-1}$)	Correlation coefficient	DER_{exp}	DER_{calc} Monte Carlo (SD)	Relative error ^a
@ 35 keV					
nPAG	0.0776 (0.0018)	0.9978	—	—	—
nPAGI 5 mg ml ⁻¹	0.1171 (0.0049)	0.9989	1.509 (0.072)	1.641 (0.082)	-8.05
nPAGI 10 mg ml ⁻¹	0.1524 (0.0037)	0.9968	1.963 (0.066)	2.084 (0.104)	-5.80
@ 80 keV					
nPAG	0.0719 (0.0020)	0.9991	—	—	—
nPAGI 5 mg ml ⁻¹	0.1100 (0.0047)	0.9992	1.530 (0.077)	1.506 (0.075)	1.60
nPAGI 10 mg ml ⁻¹	0.1418 (0.0030)	0.9927	1.971 (0.068)	1.967 (0.098)	0.21

^a Relative error = $(DER_{exp} - DER_{calc})/DER_{calc} \times 100$.

energy are (figure 6 and table 2). It is nevertheless perceptible that for the nPAGI containing 10 mg ml⁻¹ of iodine, the linearity tends to vanish for the last point. The 1 Gy equivalent point for the nPAGI containing 5 mg ml⁻¹ was not measurable. This lack of sensitivity is presumably due to oxygen contamination, as this batch was the latest prepared and sealed. It is known that such gels exhibit a threshold in dose whereas their sensitivities remain unchanged (De Deene *et al* 2006).

The experimental dose-enhancement ratios ($DER_{s_{exp}}$) are reported in table 2 and figure 7. They were derived from the gel dose–response curves and were calculated as the ratio of the doped gel sensitivity and the standard gel sensitivity: $DER_{exp} = sens_{nPAGI}/sens_{nPAG}$ (Corde *et al* 2005).

Sensitivities of the normal gel irradiated at 35 and 80 keV are not significantly different (95% confidence) which corroborates the relative invariance of nPAG response with photon beam energy (De Deene *et al* 2006). DER_{exp} and DER_{calc} are quite comparable at 80 keV. At

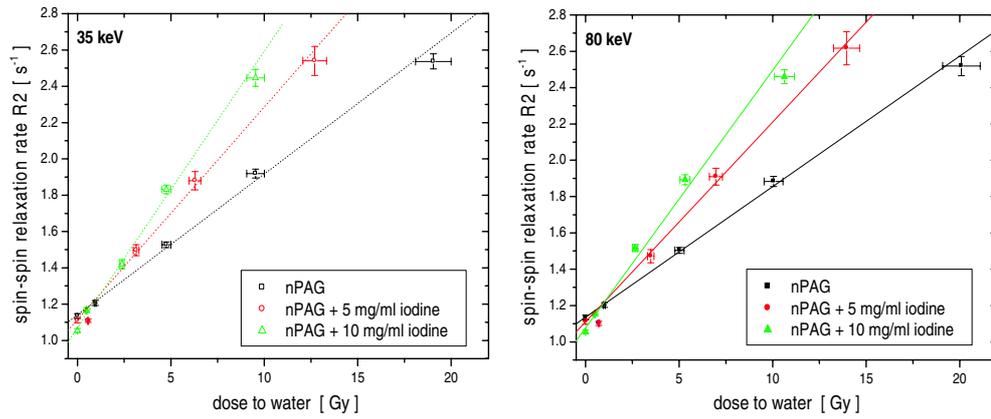


Figure 6. Dose–responses for three gel batches at 35 keV (left) and 80 keV (right). The standard nPAG data are represented by squares, the doped nPAG with 5 mg ml⁻¹ iodine by circles and the doped nPAG with 10 mg ml⁻¹ iodine by triangles. Vertical error bars represent the standard deviation of the measure (mean of a region of interest of 9×9 voxels = 243 mm³) and horizontal error bars represent the uncertainty on the given dose (5%). Lines are linear fits of data.

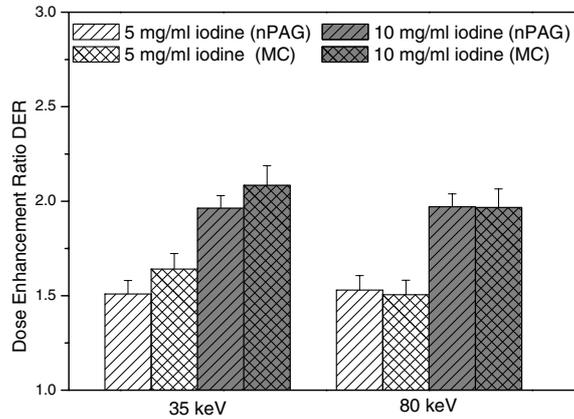


Figure 7. Display of the DER (MC calculations) and DER_{exp} values for doped gels with 5 mg ml⁻¹ of iodine (white dashed areas) and 10 mg ml⁻¹ of iodine (grey dashed areas) at 35 and 80 keV.

35 keV however, relative differences are much higher between the measured and calculated values but they remain statistically acceptable (one standard deviation). It is nevertheless possible to distinguish the dose-enhancement due to a 5 mg ml⁻¹ or a 10 mg ml⁻¹ doped gel.

It was exposed in different studies that polymer gel dosimeters are dependent on the linear energy transfer (LET) of the incident particles (Ramm *et al* 2000, Heufelder *et al* 2003, Gustavsson *et al* 2004). Gustavsson *et al* have shown that the gel sensitivity decreases when the LET of protons is above 4.9 keV μm^{-1} , at the end of the proton range, i.e. at the Bragg peak. In our configuration, the iodine atoms play the role of secondary low energy electron emitters, which have in some cases high LET, especially with 35 keV incident photons. The LET dependence of the polymer gel dosimeters might explain the difference found between the calculated and measured DERs at 35 keV. Further experimental studies are however necessary to confirm this hypothesis.

4. Conclusion

We demonstrated in this study that normoxic polyacrylamide gel nPAG, read out by MRI, is an adequate 3D dosimeter for SSR. Experimental dosimetry with the nPAG seems promising in terms of spatial resolution and absolute dosimetry for the particular SSR irradiation scheme (small target and high dose gradient). The technique could be further improved using dosimeter containers made with less permeable plastic materials, such as Barex[®], to avoid or reduce the inhibition of polymerization, which was observed close to the vial walls in our study. A good agreement was obtained between the experimental results and Monte Carlo dose calculations. In addition, the results obtained by a gel doped with iodine assess the feasibility of measuring the DER induced by the iodine atoms in a 3D dosimeter.

Acknowledgments

C Boudou wishes to thank K Vergote for explaining how to prepare nPAG gels and S B Jiang for providing the MADD calculation code. We also express gratitude to T Brochard (ESRF) for the design of the boxes and help provided during the experiments, as well as C Nemoz (ESRF) and H Requardt (ESRF). C Ferrero (ESRF) and R Wilcke (ESRF) are thanked for active support regarding the installation of MCNPX. M Lepage (Sherbrooke University) is thanked for constructive discussions on doped gels. C Boudou is grateful to J-F Le Bas (Grenoble University Hospital) for financial support obtained from 'région Rhône-Alpes'.

References

- Adam J F, Elleaume H, Joubert A, Biston M C, Charvet A M, Balosso J, Le Bas J F and Esteve 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. Biol. Phys.* **57** 1413–26
- Adam J F, Joubert A, Biston M C, Charvet A M, Peoc'h M, Le Bas J F, Balosso J, Esteve F and Elleaume H 2006 Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **64** 603–11
- Boudou C, Balosso J, Estève F and Elleaume H 2005 Monte Carlo dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy of brain tumours *Phys. Med. Biol.* **50** 4841–51
- Boudou C, Biston M C, Corde S, Adam J F, Ferrero C, Esteve F and Elleaume H 2004 Synchrotron stereotactic radiotherapy: dosimetry by Fricke gel and Monte Carlo simulations *Phys. Med. Biol.* **49** 5135–44
- Corde S, Adam J F, Biston M C, Joubert A, Charvet A M, Esteve F, Le Bas J F, Elleaume H and Balosso J 2005 Sensitivity variation of doped Fricke gel irradiated with monochromatic synchrotron x rays between 33.5 and 80 keV *Radiat. Prot. Dosim.* **117** 425–31
- Cosgrove V P, Murphy P S, McJury M, Adams E J, Warrington A P, Leach M O and Webb S 2000 The reproducibility of polyacrylamide gel dosimetry applied to stereotactic conformal radiotherapy *Phys. Med. Biol.* **45** 1195–210
- De Deene Y, Hurley C, Venning A, Vergote K, Mather M, Healy B J and Baldock C 2002 A basic study of some normoxic polymer gel dosimeters *Phys. Med. Biol.* **47** 3441–63
- De Deene Y, Vergote K, Claeys C and De Wagter C 2006 The fundamental radiation properties of normoxic polymer gel dosimeters: a comparison between a methacrylic acid based gel and acrylamide based gels *Phys. Med. Biol.* **51** 653–73
- Duthoy W, De Gersem W, Vergote K, Boterberg T, Derie C, Smeets P, De Wagter C and De Neve W 2004 Clinical implementation of intensity-modulated arc therapy (IMAT) for rectal cancer *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **60** 794–806
- Duthoy W, De Gersem W, Vergote K, Coghe M, Boterberg T, De Deene Y, De Wagter C, Van Belle S and De Neve W 2003 Whole abdominopelvic radiotherapy (WAPRT) using intensity-modulated arc therapy (IMAT): first clinical experience *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **57** 1019–32
- Elleaume H *et al* 1999 Instrumentation of the ESRF medical imaging facility *Nucl. Instrum. Methods A* **428** 513–27

- Farajollahi A R, Bonnett D E, Tattam D and Green S 2000 The potential use of polymer gel dosimetry in boron neutron capture therapy *Phys. Med. Biol.* **45** N9–14
- Fong P M, Keil D C, Does M D and Gore J C 2001 Polymer gels for magnetic resonance imaging of radiation dose distributions at normal room atmosphere *Phys. Med. Biol.* **46** 3105–13
- Gore J C, Kang Y S and Schulz R J 1984 Measurement of radiation dose distributions by nuclear magnetic resonance (NMR) imaging *Phys. Med. Biol.* **29** 1189–97
- Gustavsson H, Back S A, Medin J, Grusell E and Olsson L E 2004 Linear energy transfer dependence of a normoxic polymer gel dosimeter investigated using proton beam absorbed dose measurements *Phys. Med. Biol.* **49** 3847–55
- Haraldsson P, Back S A, Magnusson P and Olsson L E 2000 Dose response characteristics and basic dose distribution data for a polymerization-based dosimeter gel evaluated using MR *Br. J. Radiol.* **73** 58–65
- Hendricks J S *et al* 2005 *MCNPX Version 2.6.a*. (Los Alamos, NM: Los Alamos Laboratory)
- Hepworth S J, Leach M O and Doran S J 1999 Dynamics of polymerization in polyacrylamide gel (PAG) dosimeters: (II) modeling oxygen diffusion *Phys. Med. Biol.* **44** 1875–84
- Herold D M, Das I J, Stobbe C C, Iyer R V and Chapman J D 2000 Gold microspheres: a selective technique for producing biologically effective dose enhancement *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **76** 1357–64
- Heufelder J, Stiefel S, Pfaender M, Ludemann L, Grebe G and Heese J 2003 Use of BANG polymer gel for dose measurements in a 68 MeV proton beam *Med. Phys.* **30** 1235–40
- ICRU 1992 Photon, Electron, Proton and Neutron Interaction Data for Body Tissues *ICRU Report* (Bethesda, MD: ICRU)
- Jiang S B, Sharp G C, Neicu T, Berbeco R I, Flampouri S and Bortfeld T 2006 On dose distribution comparison *Phys. Med. Biol.* **51** 759
- Low D A, Dempsey J F, Venkatesan R, Mutic S, Markman J, Markaacke H E and Purdy J A 1999 Evaluation of polymer gels and MRI as a 3-D dosimeter for intensity-modulated radiation therapy *Med. Phys.* **26** 1542–51
- Low D A, Harms W B, Mutic S and Purdy J A 1998 A technique for the quantitative evaluation of dose distributions *Med. Phys.* **25** 656–61
- Maryanski M J, Gore J C, Kennan R P and Schulz R J 1993 NMR relaxation enhancement in gels polymerized and cross-linked by ionizing radiation: a new approach to 3D dosimetry by MRI *Magn. Reson. Imaging* **11** 253–8
- Mesa A V, Norman A, Solberg T D, Demarco J J and Smathers J B 1999 Dose distributions using kilovoltage x-rays and dose enhancement from iodine contrast agents *Phys. Med. Biol.* **44** 1955–68
- Norman A, Ingram M, Skillen R G, Freshwater D B, Iwamoto K S and Solberg T 1997 x-ray phototherapy for canine brain masses *Radiat. Oncol. Investigations* **5** 8–14
- Oldham M, McJury M, Baustert I B, Webb S and Leach M O 1998 Improving calibration accuracy in gel dosimetry *Phys. Med. Biol.* **43** 2709–20
- Pelowitz D B 2005 *MCNPX™ User's Manual Version 2.5.0*. (Los Alamos, NM: Los Alamos Laboratory)
- Ramm U, Weber U, Bock M, Krämer M, Bankamp A, Damrau M, Thilman C, Böttcher H D, Schad L R and Kraft G 2000 Three-dimensional BANG gel dosimetry in conformal carbon ion radiotherapy *Phys. Med. Biol.* **45** N95
- Santos Mello R, Callisen H, Winter J, Kagan A R and Norman A 1983 Radiation dose enhancement in tumors with iodine *Med. Phys.* **10** 75–8
- Vergote K, De Deene Y, Duthoy W, De Gerssem W, De Neve W, Achten E and De Wagter C 2004 Validation and application of polymer gel dosimetry for the dose verification of an intensity-modulated arc therapy (IMAT) treatment *Phys. Med. Biol.* **49** 287–305