



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Double 164036

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - FACULTE DE MEDECINE

NANCY I

N° attribué par la bibliothèque



THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY I

Discipline : Biologie Santé et Environnement

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement

Par

Laurent Antunes

Le 12 novembre 2002

Titre :

**LA GREFFE ORTHOTOPIQUE DE BIOPSIES DE GLIOMES MALINS HUMAINS
CHEZ LA SOURIS NUDE :
UN MODELE PRE-CLINIQUE GENERAL DE RECHERCHES EN
NEURO-ONCOLOGIE**

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur A. Duprez

JURY :

Monsieur le Professeur S. Bracard

Monsieur le Professeur A. Duprez

Madame le Professeur E. Justrabo (rapporteur)

Monsieur le Professeur F. Plénat : Président

Monsieur le Professeur M. Pluot (rapporteur)





N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY I

Discipline : Biologie Santé et Environnement

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement

Par

Laurent Antunes

Le 12 novembre 2002

Titre :

**LA GREFFE ORTHOTOPIQUE DE BIOPSIES DE GLIOMES MALINS HUMAINS
CHEZ LA SOURIS NUDE :
UN MODELE PRE-CLINIQUE GENERAL DE RECHERCHES EN
NEURO-ONCOLOGIE**

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur A.Duprez

JURY :

Monsieur le Professeur S. Bracard

Monsieur le Professeur A. Duprez

Madame le Professeur E. Justrabo (rapporteur)

Monsieur le Professeur F. Plénat : Président

Monsieur le Professeur M. Pluot (rapporteur)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement :

- Monsieur le Professeur Adrien Duprez qui a toujours su être disponible, à l'écoute de l'autre et m'a guidé au cours de ces années de travail avec une clairvoyance et une franchise qui l'honorent. L'élève remercie autant le maître que l'homme.
- Monsieur le Professeur François Plénat qui a suivi ce travail et dont la vaste connaissance des méthodes d'histochimie et de biologie moléculaire ont permis des travaux histopathologiques originaux, toujours pertinents, et réalisés dans un grand souci de qualité. Je le remercie encore pour la confiance qu'il m'a accordé en me nommant dans son service.
- Madame le Docteur Karine Angioï Duprez. Au delà des sentiments d'amitié qui m'unissent à elle et à sa famille je la remercie encore pour avoir participé aux travaux de microchirurgie.
- Monsieur le Professeur Serge Bracard qui a suivi avec enthousiasme les premiers essais d'imagerie IRM et qui me permet de continuer des travaux de recherche dans d'excellentes conditions.
- Monsieur le Docteur Jean-Marie Escanyé qui, toujours avec courtoisie et patience, m'a prodigué de très nombreux et précieux conseils sans lesquels les travaux d'analyse d'image et de spectroscopie n'auraient pas pu être réalisés.
- Madame Nathalie Klein-Monhoven qui a réalisé la synthèse des oligonucléotides et m'a toujours accordé son aide amicale.
- Madame et monsieur les Professeurs Eve Justrabo et Michel Pluot qui me font l'honneur d'accepter de juger ce travail.

- Mesdames les Docteurs Jacqueline Champigneulle et Maud Ounnoughene-Piet et monsieur le Professeur Eric Labouyrie qui m'ont permis de trouver le temps nécessaire pour achever ce travail.

Tous mes remerciements vont enfin à :

- Madame Nicole Lubraniecki qui a eu la charge de l'animalerie et s'est toujours montrée disponible et amicale.
- Madame Claudine Maire qui a été un maître en matière de traitement de texte.
- Mesdames les techniciennes des Services d'Anatomie et Cytologie Pathologiques et de Microscopie Electronique de Brabois qui m'ont aidé à réaliser certaines techniques histologiques et tout particulièrement mesdames Corinne Bonnet et Sylviane Pizzagalli.
- Madame et messieurs les Docteurs Marina Rochette pour sa collaboration concernant l'imagerie, Eric Barbotte pour ses conseils statistiques et Luc Taillandier qui réalise actuellement un travail de radiothérapie expérimentale sur le modèle de la souris nude.

AVANT PROPOS

Nommé Interne des Hôpitaux en 1992, et ayant décidé de nous consacrer à l'étude de l'Anatomie et de la Cytologie Pathologique, nous avons été très tôt attiré et intéressé par l'activité de recherche développée à partir de la souris nude par le Professeur A. Duprez et par le Professeur F. Plénat. Dès 1996, un travail de modélisation de gliome nous a ainsi été confié.

La première approche expérimentale, entreprise pour notre mémoire de DEA, a consisté à utiliser comme greffon une souche gliale de référence, le gliome murin C6 simple à manipuler, mais qui s'est malheureusement avérée incapable de se développer en infiltrant le cerveau de l'hôte. Nous avons alors naturellement poursuivi ce travail en cherchant à mettre au point un modèle plus original de gliome, capable de recréer chez l'animal les caractéristiques d'une tumeur cérébrale humaine se développant spontanément. L'implantation dans le crâne de souris nude de fragments solides de gliomes provenant de différents types de tumeurs cérébrales primitives nous a permis de mettre au point un modèle capable de répondre à cette ambition. Cette approche était en effet indispensable pour que le modèle puisse être utilisé pour des recherches pré-cliniques variées mais irréalisables, pour des raisons éthiques, chez l'homme.

C'est dans la continuité de ces préoccupations que nous avons entrepris l'ensemble des travaux objets de cette thèse. Nous avons orienté notre recherche vers une étude plus spécifique des gliomes humains de haut grade. Les techniques permettant de mettre au point et de caractériser le modèle ont été notre première préoccupation puis quelques applications pré-cliniques réalisées respectivement dans le domaine diagnostique de l'investigation non invasive par la résonance magnétique nucléaire et dans celui de la thérapie antisens ont été entreprises.

Ces différents travaux ont été réalisés dans le Laboratoire de Microchirurgie et d'Histopathologie Expérimentale de la Faculté de Médecine de Nancy (Vandoeuvre), dans le Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique du CHU de Nancy - Brabois (Vandoeuvre), dans le Service de Neuroradiologie du CHU de Nancy - Hôpital Central (Nancy), dans le Laboratoire de Méthodologie RMN de la Faculté des sciences de Nancy -

UHP (Vandoeuvre), et dans le Laboratoire Commun de Biologie Moléculaire du CHU de Nancy – Brabois (Vandoeuvre).

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES	10
INTRODUCTION	12
PREMIERE PARTIE : CONCEPTION, MISE AU POINT TECHNIQUE ET CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DU MODELE DE XENO GREFFES	16
CHAPITRE 1 : LA CONCEPTION ET LA MISE AU POINT TECHNIQUE	17
1. LES PRE-REQUIS BIOLOGIQUES	18
2. MATERIEL ET METHODES	21
2.1. Le porte greffe	21
2.1.1. La découverte et les caractéristiques des souris immunotolérantes	21
2.1.2. La zootechnie	24
2.1.3. L'élevage	24
2.1.4. Les contraintes techniques et biologiques	25
2.1.4.1. Les limites techniques	25
2.1.4.2. Les limites biologiques	26
2.2. les greffons	26
2.2.1. Les tumeurs cérébrales humaines	26
2.3. les techniques microchirurgicales de greffe et d'exploration invasive	27
2.3.1. l'anesthésie	28
2.3.2. La préparation de l'animal	28
2.3.3. Les instruments	29
2.3.4. les techniques d'implantation	30
2.3.4.1. Les implantations extra-crâniennes du greffon	30
2.3.4.2. L'implantation intra-crânienne du greffon	31
2.3.5. Les interventions sur le système vasculaire de la souris	32
2.4. le contrôle de la prise du greffon par l'examen microscopique standard	33
2.4.1. La microscopie optique	33
2.4.2. La microscopie électronique à transmission	34
CHAPITRE 2 : LES RESULTATS MACROSCOPIQUES ET HISTOLOGIQUES AVEC LES TECHNIQUES DE COLORATION STANDARD	35
1. LA PRISE DES GREFFONS	36

1.1. Les greffes hétérotopiques	36
2. L'ETUDE MACROSCOPIQUE DES GREFFONS	39
2.1. Les greffons hétérotopiques	39
2.2. les greffons orthotopiques	41
3. LES ETUDES HISTOLOGIQUES ET ULTRASTRUCTURALES DES GREFFONS AVEC LES TECHNIQUES DE COLORATIONS STANDARDS	43
3.1. La microscopie optique	43
3.1.1. Les greffons hétérotopiques	43
3.1.2. Les greffons orthotopiques	44
3.2. L'étude ultrastructurale des greffons intracrâniens	46
 CHAPITRE 3 : LE CHIMERISME CELLULAIRE DU MODELE ET LE MAINTIEN DES CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DES CELLULES MALIGNES	 47
1. LE CONCEPT DE CHIMERISME CELLULAIRE	48
2. MATERIEL ET METHODES	50
2.1. Les techniques d'hybridation <i>in situ</i>	50
2.1.1. La préparation des sondes utilisées	51
2.1.1.1. Les sondes oligonucléotidiques complémentaires des séquences ALU	51
2.1.1.2. Les sondes d'ADN génomique total	52
2.1.2. Les protocoles d'hybridation	53
2.1.2.1. L'hybridation avec les sondes oligonucléotidiques	53
2.1.2.2. L'hybridation avec les sondes formées d'ADN génomique total	54
2.1.3. La révélation immunohistochimique des hybrides	54
2.2. Les techniques immunohistochimiques	55
2.2.1. Le choix des antigènes étudiés	55
2.2.2. La fixation des tissus	59
2.2.3. La détection des antigènes sur coupes de tissus inclus à la paraffine	59
2.2.4. La détection immunohistochimique de deux antigènes différents sur une même coupe en paraffine	60
2.2.5. La détection combinée, par hybridation <i>in situ</i> et immunohistochimie du génotype et du phénotype sur une même coupe en paraffine	61
2.2.6. La détection de la fibrine et des Ig G murines sur coupes à congélation	62
3. RESULTATS	63
3.1. L'étude du chimérisme cellulaire entre les greffons humains et l'hôte murin	63
3.2. L'étude de la différenciation tumorale	65
3.3. L'étude de la prolifération cellulaire	67
3.3.1. Les résultats qualitatifs	67
3.3.2. Les résultats quantitatifs	68

3.4. L'étude de la vascularisation tumorale et cérébrale	69
3.4.1. Les troubles de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique	69
3.4.2. Les membranes basales du réseau vasculaire intratumoral	70
3.5. L'étude des marqueurs tumoraux	71
3.5.1. L'expression du VEGF	71
3.5.2. Les produits d'expression des gènes <i>p53</i> et <i>bcl-2</i>	71
 CHAPITRE 4 : DISCUSSION DU MODELE	 74
 DEUXIEME PARTIE : QUELQUES APPLICATIONS DU MODELE DE XENOGREFFE	 92
 CHAPITRE 5 : ETUDES D'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	 93
1. QUELQUES RAPPELS RELATIFS A L'IMAGERIE PAR RMN	94
2. MATERIEL ET METHODES D'IMAGERIE IRM	96
2.1. L'étude de faisabilité avec un appareil à usage clinique Clinical Signa [®] à 1,5 Teslas	96
2.2. L'étude de corrélation sur appareil à haut champ	98
2.2.1. Le Spectromètre Bruker Biospec [®] BMT 100 à 2.4 Teslas	98
2.2.2. Le choix des caractéristiques microscopiques corrélées à l'imagerie	100
2.2.3. Les techniques d'analyse d'images	101
2.2.4. Les méthodes statistiques	104
3. RESULTATS DE L'IMAGERIE IRM	105
3.1. L'imagerie à 1,5 Teslas (Clinical Signa [®])	105
3.2. L'imagerie à 2.4 Teslas (Bruker Biospec [®])	106
3.2.1. L'analyse qualitative des images	106
3.2.2. Les mesures quantitatives obtenues par le traitement numérique des images	108
3.2.2.1. Les indices de surface tumorale	108
3.2.2.2. Les indices d'infiltration tumorale	109
3.3. Les études de vascularisation	111
4. DISCUSSION DES TRAVAUX D'IMAGERIE	112
 CHAPITRE 6 : ETUDE DE SPECTROSCOPIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU P31	 117
1. QUELQUES RAPPELS RELATIFS A LA SPECTROSCOPIE PAR RMN	118
2. MATERIEL ET METHODES DE SPECTROSCOPIE RMN DU ³¹ P	120
2.1. L'acquisition des spectres avec le spectromètre Bruker Biospec [®] BMT 100 à 2.4 Teslas	120
2.2. Le traitement des spectres	122
2.2.1. La quantification du signal	122

2.2.2. La détermination du pH à partir du déplacement chimique du pic du phosphate inorganique	123
3. RESULTATS DE LA SPECTROSCOPIE RMN DU ³¹ P	125
3.1. L'évolution des spectres du phosphore chez les souris témoin non greffées	125
3.2. L'évolution des spectres du phosphore chez les souris greffées avec le glioblastome D	126
3.3. La détermination du pH par la mesure du déplacement chimique du phosphate inorganique chez les souris greffées avec le glioblastome D	128
4. DISCUSSION DES TRAVAUX DE SPECTROSCOPIE RMN DU ³¹ P	130
CHAPITRE 7 : ETUDE DE LA DISTRIBUTION TISSULAIRE D'OLIGONUCLEOTIDES PHOSPHOROTHIOATE	135
1. CONSIDERATIONS GENERALES	136
2. SYNTHÈSE, MARQUAGE, ADMINISTRATION A LA SOURIS ET DETECTION TISSULAIRE DES OLIGONUCLEOTIDES PHOSPHOROTHIOATE	139
2.1. La synthèse et le marquage des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine	139
2.2. Les oligonucléotides phosphorothioate marqués au soufre 35	141
2.3. L'administration parentérale des oligonucléotides phosphorothioate	141
2.3.1. L'injection chez des souris témoins des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine	142
2.3.2. L'injection chez des souris greffées des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine	142
2.3.3. L'injection chez la souris greffée des oligonucléotides phosphorothioate marqués au soufre 35	143
2.4. Les techniques de détection des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine	143
2.4.1. Le prélèvement et la fixation des tissus	143
2.4.2. L'immunodétection de la fluorescéine en microscopie optique sur coupes à congélation	144
2.4.3. L'immunodétection de la fluorescéine en microscopie optique sur coupes déparaffinées	145
2.4.4. L'immunodétection de la fluorescéine en microscopie électronique à transmission	146
2.5. Les techniques de détection des oligonucléotides phosphorothioate marqués au soufre 35	147
2.5.1. Le conditionnement des coupes tissulaires	147
2.5.2. L'autohistoradiographie	148
3. RESULTATS	148
3.1. L'étude <i>in vitro</i> de la stabilité des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine	148
3.2. L'analyse morphologique de la distribution tissulaire des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine	149

3.2.1. Les études en microscopie optique	149
3.2.1.1. La distribution des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine chez la souris nude témoin	149
3.2.1.2. La distribution des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine dans le glioblastome D greffé chez la souris nude	154
3.2.2. La distribution intracellulaire des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine en microscopie électronique	155
3.3. La localisation tissulaire des oligonucléotides phosphorothioate marqués au soufre ³⁵ S par autohistoradiographie	156
4. DISCUSSION DE L'ETUDE DES OLIGONUCLEOTIDES PHOSPHOROTHIOATE	157
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	161
BIBLIOGRAPHIE	164
PUBLICATIONS	179

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES

Publications

Antunes L, Angioi K, Bracard S, Monhoven N, Le Faou A, Duprez A, Plénat F,
Analysis of tissue chimerism in nude mouse brain and abdominal xenograft models of human
glioblastoma multiforme: What does it tell us about the models and about glioblastoma
biology and therapy?
J Histochem Cytochem 2000, 48:847-858 **Article Original**

Plénat F, Picard E, Antunes L, Vignaud JM, Marie B, Chalabreysse P, Muhale F
L'amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique aux sites de réaction de
dérivés de la tyramine. Un gain décisif de sensibilité en immunohistochimie et en hybridation
in situ.
Ann Pathol 1997;17:17-23 **Article Original**

Publications en cours de soumission

Antunes Laurent, Angioi-Duprez Karine, Barbotte Eric, Taillandier Luc, Bracard Serge,
Plénat François, Escanyé Jean-Marie
Correlation between magnetic resonance imaging and histology in a mouse brain xenograft
model of human glioblastoma multiforme **Article Original**
soumis à Magn Reson Imaging

Communications orales (CO) et affichées (CA)

Antunes L, Angioi K, Bracard S, Monhoven N, Le Faou A, Duprez A, Plénat F,
Analyse du chimérisme tissulaire dans un modèle de xénogreffes cérébrales et abdominales de
glioblastome humain chez la souris nude.
Société Française de Neuropathologie 8 et 9 juin 2001. CIRC Lyon **CO**

Antunes L, Angioi K, Bracard S, Monhoven N, Le Faou A, Duprez A, Plénat F,
Analysis of tissue chimerism in nude mouse brain and abdominal xenograft models of human
glioblastoma multiforme: What does it tell us about the models and about glioblastoma
biology and therapy?

First euroconference on animal models of human diseases: modeling human cancer in the
mouse: from pathogenesis to human intervention, 9-12 march 2001. Sesimbra – Portugal **CO**

Antunes L, Angioï-Duprez K, Bracard S, Klein-Monhoven N, Duprez A, Plénat F
Analyse du chimérisme tissulaire dans un modèle de xénogreffes cérébrales et abdominales de
glioblastome humain chez la souris nude
Ann Pathol 2000;20:S32 **CA**

Bracard S, Antunes L, Chastagner P, Braun M, Anxionnat R, Plénat F, Duprez A
Greffes de gliome humain chez la souris nude. Intérêts de l'IRM dans le suivi. Résultats
préliminaires.

IVèmes Journées de Recherche en Imagerie Médicale, Toulouse, 3-4 février 1998

XXVIème Congrès de la Société Française de Neuroradiologie, 1ères Journées de
Neuroradiologie de Langue Française, 30-31 mars 1998. Paris **CA**

Plénat F, Antunes L, Bracard S, Duprez A

La greffe de fragments de gliomes humains dans le cerveau de la souris nude : un modèle
expérimental en neuro-oncologie.

GREEPAC Carrefour Pathologie, décembre 1997. Paris **CA**

Plénat F, Picard E, Antunes L, Marie B, Chalabreysse P, Muhale F, Vignaud JM

L'amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique aux sites de réaction de
dérivés de la tyramine : un gain décisif de sensibilité en immunohistochimie et en hybridation in
situ.

SFANP, Carrefour Pathologie décembre 1996. Paris **CO**

INTRODUCTION

La caractéristique biologique essentielle des gliomes, à l'origine de leur pronostic extrêmement défavorable (63, 79, 80), est la constante migration à grande distance de leurs cellules malignes dans le tissu cérébral normal alors que la migration dans le reste de l'organisme sous forme de métastases est exceptionnelle (36-43, 79, 120). Si les recherches récentes ne remettent pas en cause l'importance de la migration des cellules gliales malignes, elles démontrent, en revanche que cette propriété n'est pas exclusive des seules cellules néoplasiques puisque les cellules souches neurogliales même dans le cerveau adulte peuvent se déplacer sur de très grandes distances (1, 46, 66). Cette aptitude générale des cellules, neurogliales non différenciées permet de comprendre que même pour des gliomes de bas grade ou de haut grade pourtant macroscopiquement bien limités, une exérèse chirurgicale complète n'est que rarement réalisable. De plus comme ces tumeurs sont peu sensibles à la chimiothérapie et à la radiothérapie aux doses n'entraînant pas de graves lésions des tissus sains, les progrès thérapeutiques des dernières décennies n'ont pu qu'améliorer la qualité de vie des patients sans accroître pour autant leur durée de survie.

Une efficacité thérapeutique accrue ne peut donc résulter que d'une connaissance précise des limites de l'extension pour les traitements chirurgicaux et de la découverte des mécanismes de la migration cellulaire pour les traitements médicaux. Les énormes progrès de la tomодensitométrie (TDM), couplée à la biopsie en condition stéréotaxique, et de l'imagerie en Résonance Magnétique Nucléaire (IRM) ont suscité beaucoup d'espoir. Ils ont permis de très bien appréhender la masse tumorale principale, mais malheureusement la migration peritumorale échappe à ces explorations. Les limites actuelles de cette nouvelle imagerie expliquent donc que le traitement chirurgical de ces tumeurs n'a pas progressé durant les vingt dernières années. De même si des progrès ont été obtenus en chimiothérapie par l'individualisation de types histopathologiques plus chimiosensibles (oligoastrocytomes et oligodendrogliomes) ils n'ont pas transformé le pronostic général des gliomes. Enfin, si une meilleure connaissance des conditions de fractionnement et d'étalement de la dose totale d'irradiation en radiothérapie, conformationnelle a permis de définir des schémas thérapeutiques plus adaptés à la préservation des tissus sains, la durée de la survie n'est pas augmentée.

Toutes ces constatations consternantes incitent donc à penser qu'une transformation radicale du pronostic des gliomes (45) ne pourra provenir que d'études expérimentales (62) notamment de la migration cellulaire intracérébrale. Ces études pourraient, en effet, permettre d'élaborer des explorations paracliniques adaptées à la détection précise des extensions

tumorales et ensuite permettre d'imaginer des stratégies pour inhiber les déplacements cellulaires et détruire ou rendre quiescentes les cellules malignes.

Les confrontations anatomo-cliniques sur le cerveau humain entier et a fortiori après des traitements aux paramètres multiples n'étant, pour des raisons scientifiques et éthiques évidentes, pas possibles, la seule stratégie d'étude actuellement disponible réside dans l'utilisation d'un modèle expérimental animal représentatif des gliomes humains. Toutefois, compte tenu de la spécificité d'espèce de nombreux mécanismes biologiques, un modèle *in vivo* de neuro-oncologie pré-clinique doit permettre d'étudier expérimentalement des cellules humaines se comportant de plus dans le cerveau de l'hôte comme dans celui de l'homme. L'utilisation d'un animal spontanément immunodéficient T, comme la souris nude, est une méthode validée pour assurer le développement *in vivo* de xénogreffes hétérotopiques de tumeurs humaines sans immunosuppression médicamenteuse susceptible d'interagir avec la physiologie de l'animal, le greffon et, le cas échéant, l'agent thérapeutique étudié. Nous avons donc utilisé cette méthode en imaginant des modalités de greffes intra-crâniennes susceptibles d'évoluer comme des gliomes humains spontanés.

Avec un tel modèle, la coexistence dans un même organe, de cellules tumorales humaines et des cellules normales ou hyperplasiques du porte-greffe murin entraîne un chimérisme cellulaire expérimentalement très utile comme nous le démontrerons. En effet, à ce jour, il n'existe pas de techniques d'imagerie biomédicale ni de méthodes invasives capables d'apprécier, avec exactitude et de manière reproductible la diffusion à distance de la masse tumorale principale des cellules gliales malignes dans le cerveau. La possibilité de disposer d'une identification de l'espèce des cellules sur des coupes tissulaires procure un moyen très efficace pour apprécier le phénomène d'infiltration et observer comment les cellules homologues de l'hôte réagissent à l'extension de la tumeur.

Dans la première partie de cette étude, nous rapportons la démarche conceptuelle, les mises au point techniques et les caractéristiques biologiques d'un modèle de xénogreffes orthotopiques de gliomes humains de haut grade chez des souris nude. Dans la seconde partie, nous présentons, parmi beaucoup d'autres possibles, quelques applications pré-cliniques du modèle. Ces exemples n'ont pas pour objectifs d'explorer de manière exhaustive chacune des applications présentées mais de démontrer l'intérêt d'utiliser ce modèle pour des recherches diagnostiques en Résonance Magnétique Nucléaire et pour des études de la distribution

tissulaire d'oligonucléotides antisens administrés par voie vasculaire. Dans cette perspective, les expériences ont été entreprises avec un nombre limité d'animaux. La faisabilité étant, comme nous le rapporterons, prouvée par ces études des expériences complémentaires avec de grandes séries d'animaux permettront d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

PREMIERE PARTIE

CONCEPTION, MISE AU POINT TECHNIQUE ET CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DU MODELE DE XENOGREFFES



CHAPITRE 1

LA CONCEPTION ET LA MISE AU POINT TECHNIQUE

1. LES PRE-REQUIS BIOLOGIQUES

Pour que les xénogreffes humaines se développent, il faut d'abord qu'elles prennent ce qui implique que le porte greffe soit tolérant. Les cellules tumorales pourront alors soit se développer sur place, soit migrer dans un environnement cellulaire et interstitiel qui leur est totalement étranger.

Les premiers modèles de greffes humaines ont d'abord été réalisés sur des animaux immunologiquement normaux. Pour éviter le rejet de la greffe, la suppression des lymphocytes T du receveur était indispensable. Elle était obtenue par une irradiation totale de l'animal et/ou par du sérum antilymphocytaire, du cyclophosphamide, des corticoïdes ou de la cyclosporine A (83). Cette pratique modifiait nécessairement la division cellulaire des tissus de l'hôte et du greffon. De plus, l'utilisation d'une immunosuppression chimio-induite, réduisait la durée de vie des animaux et, par voie de conséquence, la durée de l'étude de la tumeur. Enfin, les tissus du greffon étaient soumis aux effets des drogues, qui transformaient la cinétique de production cellulaire, ce qui pouvait considérablement altérer la prise et le développement du greffon, retirant tout réel intérêt scientifique à de tels modèles. Pour éviter de tels effets secondaires, l'animal porte greffe doit donc nécessairement être spontanément dépourvu de possibilités de rejet des greffes pour éviter que son organisme n'ait à être soumis à un traitement susceptible de modifier gravement le développement du greffon. Seuls les animaux congénitalement sans activité lymphocytaire T satisfont à cette exigence.

Actuellement, parmi les animaux de laboratoire, il n'existe que deux espèces de mammifères dont certaines lignées sont atteintes d'une mutation entraînant une disparition de l'activité lymphocytaire T par absence ou non-différenciation de leurs lymphocytes T : les souris et les rats. Les rats athymiques congénitaux ou rats nude s'étant avérés, dans notre Laboratoire, être de médiocres porte-greffes par leurs faibles taux de prise, seules les souris mutantes dépourvues de fonctions lymphocytaires T sont utilisées. Deux variétés de mutantes sont actuellement disponibles : les souris athymiques congénitales ou souris nude et les souris SCID (Severe Combined Immuno Deficient) (8, 27, 28, 29, 55, 56, 59, 60, 64, 68, 91, 99, 100). Les souris nude sont des porte-greffes universels dont l'absence complète de poil constitue, de plus, un énorme avantage tant pour mettre en œuvre la microchirurgie de transplantation que pour la surveillance des greffons. La petite taille de l'animal a toutefois rendu indispensable la création d'une microchirurgie permettant de transformer cette souris de

moins de 25 grammes en un porte-greffe universel chez qui presque toutes les interventions chirurgicales humaines sont réalisables avec un taux de survie proche de 100%, durant un an environ.

Comme les vaisseaux des greffons à raccorder à ceux de souris lors d'une transplantation idéale ont un diamètre de l'ordre des 60 à 90 microns, aucun rétablissement de la continuité artérielle et veineuse n'est techniquement possible. Seule, donc, une nutrition aérobie directe par diffusion interstitielle, peut assurer la survie temporaire de la greffe en attendant qu'une néoangiogénèse capillaire rétablisse la continuité entre l'hôte et l'organe. Au-delà des phénomènes de rejet, maîtrisés chez la souris nude, ceci implique nécessairement une compatibilité des molécules à fonctions néoangiogénétiques régulatrices et inductrices produites par le tissu tumoral et utilisées par l'organisme de la souris pour engendrer la néoangiogénèse du greffon. Ainsi, il est nécessaire que toutes ces substances soient dépourvues de spécificité stricte d'espèce. La prise des greffes de nombreux tissus humains normaux ou cancéreux a prouvé qu'une néoangiogénèse efficace pouvait être induite par le greffon et réalisée par la souris. La capacité de survie du tissu tumoral greffé réside donc dans ses aptitudes à supporter une anoxie partielle. Pour tenter de déterminer l'importance relative de toutes ces contraintes biologiques, des expériences préliminaires s'imposaient. Ce sont les résultats de ces essais que nous voudrions brièvement rapporter maintenant pour expliquer comment le modèle a été créé.

La première condition à satisfaire est la revascularisation rapide du greffon. En attendant le fonctionnement normal, une bonne nutrition temporaire de la xénogreffe par une efficace diffusion de l'oxygène et des molécules à fonctions métaboliques à partir de l'hôte pour assurer la survie des cellules doit être assurée. Une fois constaté que les tissus greffés produisent assez de molécules à fonctions angioformatrices pour entraîner chez l'hôte une prolifération des vaisseaux nécessaires au développement de l'organe transplanté, l'évolution du greffon vers sa prise dépend exclusivement de la richesse de la vascularisation des sites receveurs de l'animal. C'est à partir de cette conception que les sites d'implantations ont été recherchés puis définitivement choisis en prenant toutefois aussi en considération leur accessibilité et les exigences fonctionnelles propres à certains organes ou les influences à démontrer entre l'hôte et le greffon.

La meilleure solution réside dans la possibilité de disposer d'un pédicule artériel et veineux aisément isolable, facilement accessible et non indispensable à la survie de l'animal pour le fixer en très étroit contact avec une des faces du greffon. Si, en plus de cette vascularisation principale, des apports capillaires et une contention très étroite avec un minimum de sutures peuvent être obtenus, les chances de développement sont presque de 100%. A partir de tous ces critères d'optimisations des conditions de prise, le pédicule épigastrique, maintenu sur le péritoine, mais isolé de la face postérieure des muscles droits de l'abdomen, a été choisi. La délicate dissection des vaisseaux permet de créer une vaste cavité dont la paroi musculaire antérieure peut être étroitement appliquée sur la face antérieure du greffon alors que la face postérieure est au contact des vaisseaux épigastriques et du péritoine, excellente surface d'échanges métaboliques. Cette technique permet, de plus, une implantation sans suture sur l'organe tout en assurant son immobilité complète par la fermeture du plan musculaire antérieur. La finesse du péritoine permet enfin une excellente extensibilité de la cavité au cours de la croissance de la tumeur, sans contrainte mécanique pouvant perturber son développement. Les vaisseaux du tube digestif constituent un autre excellent site de greffe mais l'obligation de sutures nombreuses avec du fil très fin 10(0), ainsi que l'absence de possibilité de suivi de la croissance sans laparotomies exploratrices itératives et le risque vital pour l'animal lors d'intervention sur le greffon sont des handicaps. Ce site n'est donc utilisé qu'en deuxième recours ou lorsque le siège digestif s'avère préférable comme pour certaines métastases cérébrales d'origine digestive par exemple.

La léptoméninge constitue également un bon site de greffe car c'est un territoire bien vascularisé mais, compte tenu du caractère inextensible de la boîte crânienne et de la petite taille du cerveau de la souris, il n'est pas possible de transplanter un fragment tumoral de grande taille, ce qui implique que le petit greffon soit formé de cellules malignes nombreuses et d'excellente qualité. Ceci explique l'utilisation d'une « préparation » des tumeurs par des greffes hétérotopiques initiales (cf. infra). Par ailleurs, l'usage d'un matériel de suture étant impossible, la tumeur doit être maintenue par les tissus qui la contiennent ce qui, en pratique, ne pose pas de problèmes du fait du siège intra-crânien de la greffe. Enfin, pour assurer un caractère orthotopique au glioblastome humain, la pose doit être effectuée sous la léptoméninge, après une incision de cette dernière, de manière à assurer en même temps un contact direct avec le cortex cérébral de la souris. Au total, le greffon se retrouve en position intra-crânienne mais extra-cérébrale, sans traumatisme de l'encéphale par l'acte opératoire.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Le porte greffe

2.1.1. La découverte et les caractéristiques des souris immuno-tolérantes

Parmi les souris alymphocytaires T, par athymie congénitale (souris nude), ou anomalie fonctionnelle des lymphocytes (souris SCID), toutes deux également incapables de rejeter les xénogreffes, nous avons choisi les premières parce que l'absence de poils, ainsi que nous l'avons déjà souligné, rend les interventions microchirurgicales et la surveillance clinique des greffons beaucoup plus faciles. Comme, de plus, les souris nude pangéniques sont très résistantes et peuvent subir plusieurs interventions chirurgicales majeures sans dommage et que leur taux de rejet est nul, nous n'utilisons, au laboratoire, que ces animaux pour toutes les xénogreffes de tumeurs humaines. En ce domaine, nous limiterons donc notre exposé à un rappel des principales caractéristiques de cet animal.

En 1962, Grist découvre, dans une portée d'un élevage de souris non consanguines du laboratoire de Virologie de l'Hôpital Ruchill de Glasgow, quelques unes sans poil. Ce n'est qu'après les avoir croisées entre elles plusieurs fois qu'une étude anatomique sera entreprise et découvrira que ces souris atriches sont aussi dépourvues de thymus. A la naissance, ces souris ont une morphologie identique à celle des autres, avec toutefois une absence de moustaches qui permet de les reconnaître rapidement. A l'âge adulte, elles restent sans poil si ce n'est quelques îlots de poils follets répartis de façon aléatoire sur toute la surface cutanée. La peau de ces souris, un peu ridée, est froissée, comme si elle était trop grande par rapport au corps qu'elle recouvre. Même si à la naissance leur poids est identique à celui des souris normales, la croissance et la prise pondérale sont réduites par rapport aux animaux normaux de la même lignée possédant un thymus. Chez l'adulte, le poids moyen est de 30 % inférieur à celui des souris normales et varie de 20 à 30 g alors que la taille est, comme pour les autres, de 5 à 6 cm sans la queue.

Par croisement de deux animaux mutants de cette nouvelle souche, Flanagan a obtenu 100 % de souris sans poil mais 0 % lorsque le couple est composé d'une souris sans poil et

d'une normale et enfin 25 % par croisement de deux souris avec poils, issues des géniteurs précédents. Les deux sexes sont atteints en égale proportion par la mutation. Cette nouvelle souris anormale résulte donc d'une mutation autosomique récessive. L'absence de poils, qui constitue le signe extérieur le plus caractéristique de cette souris, lui a valu le nom de "nude-mouse" incomplètement traduit en français dans l'appellation désormais classique de "souris nude" alors qu'une traduction complète aurait dû conduire à la nommer "souris nue". Cette mutation, attribuée à la transformation d'un gène qualifié de "nu", est autosomique récessive et ne s'exprime donc que chez les souris homozygotes (nu/nu). Les souris (nu/+) sont normales (64).

En 1964, Flanagan remarqua que les souris homozygotes avaient une durée de vie plus courte que celle des animaux hétérozygotes de même souche et ne survivaient pas au-delà de 25 semaines, sans qu'une cause patente explique le décès (64).

En 1968, Pantelouris (99, 100) découvrit, à l'examen autopsique, que les animaux homozygotes étaient dépourvus de thymus ou possédaient un minuscule résidu thymique, sans lymphocyte à l'examen histologique. Cette athymie congénitale, non létale, implique une absence de différenciation des lymphocytes T en cellules immunocompétentes et, de ce fait, un déficit profond de l'immunité cellulaire spécifique, avec en particulier, absence de différenciation en lymphocytes *T-helper*, T-suppresseur ou T-cytotoxique. Ces anomalies impliquent à leur tour l'existence d'un déficit partiel de la réponse immunitaire humorale en raison de l'impossibilité d'obtenir une activation des lymphocytes B par des antigènes T-dépendants. A l'inverse, les cellules *natural killer* (NK) sont abondantes et leur activité n'est pas altérée. Il a également été noté que dans les plaques de Peyer, l'activité phagocytaire, appréciée par le nombre de macrophages contenant des phagosomes, était plus faible chez les souris nude que chez les souris normales (118, 119). Ceci pourrait être expliqué, au moins en partie, par la diminution de la phagocytose après opsonisation spécifique, due à une production peu importante des lymphokines et/ou des immunoglobulines. Les anomalies du système immunitaire induisent un dysfonctionnement de la défense anti-infectieuse, ce qui explique que les souris nude ont une relative fragilité vis à vis des bactéries, des virus et des parasites (124). Néanmoins, ce statut immunitaire explique également que la souris nude ne rejette pas les allogreffes, les hétérogreffes ou les xénogreffes.

L'absence de poils, constamment liée a permis d'établir une synonymie entre souris athymique congénitale et souris nude. Mais il ne faudrait toutefois pas confondre les souris nude avec les souris atriches (hairless) qui sont, elles aussi, des souris sans poil mais qui possèdent un thymus normal et rejettent donc les xénogreffes.

Cet animal a, de ce fait, acquis une très grande importance en biologie cellulaire, tissulaire et du développement ainsi qu'en pathologie humaine expérimentale, notamment en cancérologie. Il existe désormais plusieurs souches de souris nude utilisables pour l'expérimentation car le gène "nu" a été expérimentalement introduit par croisement simple dans de nombreuses souches de souris pour obtenir des souris nude consanguines ou pangéniques. Les souris des lignées consanguines ou congéniques ont toutes le même patrimoine génétique, ce qui constitue un avantage considérable pour certaines études très spécifiques notamment immunologiques mais ces animaux sont biologiquement très fragiles, donc d'utilisation délicate. A l'inverse, les souris pangéniques sont extrêmement résistantes mais ne disposent pas toutes du même patrimoine génétique, ce qui n'est toutefois pas indispensable pour la grande majorité des études.

L'introduction du gène "nu" dans d'autres lignées a permis d'obtenir des souris plurimutantes qui auraient théoriquement pu être immunologiquement encore plus tolérantes. On peut, en effet, obtenir des souris nude - lasat, c'est-à-dire athymiques et aspléniques congénitales, des souris nude aplasmocytaires, des souris triple mutantes athymiques, aplasmocytaires et «beige», c'est-à-dire sans *natural killer*. Ces derniers animaux ne possèdent plus alors que des granulocytes et des phagocytes mononucléés pour assurer leur défense qui se réduit à des processus phagocytaires sans participation immunologique. Certains chercheurs, dans le même souci de réduire une hypothétique immunité cellulaire résiduelle, soumettent leurs souris nude à une irradiation corporelle totale de 5 à 6 grays. Les taux de prises avec les techniques d'implantations que nous utilisons chez nos souris nude pangéniques sont toujours supérieurs à ceux décrits par tous les auteurs. D'ailleurs, toutes les vérifications histologiques faites sur les greffons depuis 22 ans au laboratoire (plusieurs milliers) ou les échecs de prises (quelques dizaines) n'ont jamais mis en évidence de réactions inflammatoires à lymphocytes dans les tissus humains ou murins en périphérie des greffes. C'est pourquoi, au laboratoire, nous n'utilisons, depuis de nombreuses années, plus que des souris nude pangéniques.

2.1.2. La zootechnie

Les souris nude femelles ont une fécondité et une gestation normale mais ont des portées réduites à quatre ou six souriceaux au maximum et, de plus, comme la montée laiteuse est faible, le nombre de souriceaux survivant au moment du sevrage dépasse rarement trois. Le croisement de femelles nu/+ et de mâles nu/nu donne naissance à 7 à 10 souriceaux dont 4 à 5 nude. Les souriceaux normaux sont sacrifiés à la naissance pour avantager les mutants plus faibles. Ainsi, 4 souriceaux en moyenne parviennent au sevrage. En conséquence, pour des raisons d'efficacité, la production de ces animaux est assurée par le croisement d'une femelle nu/+ avec un mâle nu/nu. Certains biologistes ont imaginé que les souriceaux nu/nu, nés de mère nu/+, auraient pu bénéficier d'une stimulation thymique maternelle durant la gestation et, qu'en conséquence, ces souris n'étaient pas strictement athymiques mais hypothyriques. Les études hématologiques d'immuno-phénotypages fines et l'expérience des xénogreffes ont totalement invalidé cette hypothèse. Cette méthode de production des souris nude est donc désormais la seule mise en œuvre dans presque tous les centres d'élevage. Les animaux utilisés au laboratoire, dès l'âge de six semaines, proviennent d'un établissement d'élevage agréé, le Centre d'Élevage Iffa-Credo à Lyon (France).

2.1.3. L'élevage

A leur arrivée au laboratoire, les souris femelles sont placées dans de grandes cages collectives en plastique, non stérilisées, avec une litière normale alors que les mâles sont immédiatement mis dans des cages individuelles car ces animaux, au cours de combats fréquents dès l'âge de la 10^{ème} semaine, en arrivent à se mutiler gravement. Tous sont nourris avec des aliments et de l'eau non stériles. Contrairement aux affirmations de certains auteurs et surtout de certains fabricants de matériel perfectionné et coûteux, l'obligation d'élever ces animaux sous flux laminaire et de leur procurer en permanence des aliments et boissons stériles sont des affirmations erronées, surtout s'il s'agit de souris pangéniques. La durée moyenne de vie de toutes les souris nude (pangéniques, consanguines bi ou triple mutantes) utilisées au laboratoire de Microchirurgie Expérimentale de la Faculté de Médecine de Nancy est de l'ordre de 400 à 450 jours pour les pangéniques et de 200 à 300 jours pour les autres. Ces longévités sont obtenues sans aucune autre précaution qu'une excellente hygiène et des

interventions stériles, en ayant toutefois bien soin de ne pas élever, dans les mêmes locaux, d'autres animaux et tout particulièrement d'autres souris susceptibles de transmettre des affections virales murines, souvent fatales chez les nude. Les infections bactériennes, notamment à pyogènes, sont faciles à juguler par un traitement antibiotique de quelques jours. L'animalerie et la salle d'opérations sont nettoyées quotidiennement et la surveillance des animaux est assurée par une personne spécialement formée.

Après les interventions, chaque animal est placé dans une cage individuelle en plastique et nourri de la même façon que précédemment. L'isolement de l'animal est toutefois indispensable après l'intervention pour éviter des agressions par les autres animaux, surtout s'il s'agit de mâles. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum significatif en évitant les expériences inutilement redondantes. La souris ne doit pas souffrir au cours des interventions qui sont réalisées sous anesthésie. Le recours à l'euthanasie de l'animal peut être nécessaire pour éviter toute agonie prolongée en fin d'expérimentation. Enfin, une traçabilité de 3 ans à partir du début de chaque expérimentation est exigée pour chaque cas étudié.

Toutes les interventions réalisées sur des animaux au Laboratoire de Microchirurgie Expérimentale de la Faculté de Médecine de Nancy que se soit à l'occasion de ce travail de thèse ou pour d'autres expérimentations satisfont scrupuleusement aux règles relatives à la protection des animaux d'expérimentation telles celles définies par une directive du Conseil Européen datée du 24 novembre 1986 (86/609/EEC). Les locaux sont soumis au contrôle du Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale qui vérifie l'application des différents points évoqués.

2.1.4. Les contraintes techniques et biologiques

2.1.4.1. Les limites techniques

Pour pallier les difficultés opératoires dues à la petite taille de la souris, d'autres animaux athymiques congénitaux ont été systématiquement étudiés. Il y a quelques années, des rats nude ont été découverts dans des élevages et ont fait naître de grands espoirs, compte-tenu des plus grandes facilités opératoires qu'ils auraient pu procurer. Une quarantaine de rats nude ont été utilisés au laboratoire pour des expérimentations entreprises en parallèle avec des souris nude. Malheureusement, le taux de prise des transplantations fut nettement plus bas que

chez la souris nude et surtout la prolifération des cancers greffés fut beaucoup plus réduite. De ce fait, les rats nude ont été rapidement abandonnés au laboratoire, malgré la plus grande facilité technique qui aurait résulté de leur utilisation. Une véritable microchirurgie a donc dû être créée pour s'adapter aux différences de taille entre greffon et porte-greffe.

Du fait de la très petite taille de l'animal et de son faible poids, toutes les interventions ne sont pas d'emblée envisageables. Il faut, pour chaque expérience projetée, imaginer une technique spécifique pour adapter l'intervention chirurgicale à l'animal en modifiant celles utilisées en chirurgie humaine. Quelle que soit l'intervention, un facteur essentiel de réussite réside dans une hémostase soigneuse. En effet, une hémorragie, supérieure ou égale à 50% de la masse sanguine, entraîne, dans 95 % des cas, la mort de l'animal par un choc irréversible, dans les deux heures qui suivent l'intervention. Après ce délai, si l'animal commence à se réveiller, la survie sera en général acquise avec une anémie résiduelle très importante. Rappelons que 50% de la masse sanguine d'une souris nude correspond environ 1 ml, c'est-à-dire à l'absorption que procurent six coton-tiges servant à éponger le champ opératoire. Ceci implique que les interventions soient réalisées sans hémorragie.

2.1.4.2. Les limites biologiques

Toutes les techniques chirurgicales humaines sont applicables à la souris nude, sauf les interventions impliquant l'ouverture de la plèvre, car, chez les souris, les cavités droites et gauches de cette séreuse sont communicantes, ce qui entraîne rapidement la mort de l'animal par insuffisance respiratoire liée à un pneumothorax bilatéral puisque aucune ventilation assistée temporaire en pression positive n'est possible. De même, toute trachéotomie entraîne, dans les heures qui suivent sa réalisation, la mort de l'animal par troubles respiratoires, même s'il s'est parfaitement réveillé après l'anesthésie. En dehors de ces cas particuliers, même des interventions microchirurgicales complexes, nécessitant de très larges ouvertures de la boîte crânienne, sont possibles.

2.2. les greffons

2.2.1. Les tumeurs cérébrales humaines

Trois glioblastomes (79) sont étudiés, provenant respectivement d'un homme de 46 ans (glioblastome C), d'un homme de 63 ans (glioblastome D) et d'un homme de 63 ans (glioblastome E).

La conception du modèle ainsi que sa caractérisation macroscopique et microscopique sont réalisés à partir de l'étude des greffons des glioblastomes C et D. Le glioblastome E, mis à disposition quelques années après le début de ce travail n'est décrit que dans le cadre des études d'applications développées dans la deuxième partie de cette thèse. Il présente une morphologie cellulaire comparable à celles du glioblastome D mais se caractérise par un mode d'infiltration spécifique (cf. deuxième partie - chapitre 5).

Les fragments tumoraux à greffer sont échantillonnés à partir de volumineuses pièces d'exérèse chirurgicale de patients informés de l'utilisation du matériel tumoral pour des travaux de recherche contre le cancer (Professeur J.C. Marchal - Service de Neurochirurgie, CHU Nancy). Un examen extemporané est réalisé sur la pièce opératoire pour s'assurer du diagnostic histopathologique de gliome de haut grade avant la greffe. Le reste de la pièce d'exérèse est pris en charge diagnostique de manière habituelle (Professeur A. Duprez Service d'Anatomie Pathologique Hôpital Central CHU Nancy).

Les fragments, d'environ 5 mm^3 chacun, sont conservés à $+ 4^\circ\text{C}$, dans du sérum glucosé isotonique, à 5%, en attente de la greffe réalisée au plus tard dans les 4 heures suivant l'intervention. Les greffons sont confectionnés au Laboratoire de Microchirurgie Expérimentale, en excluant les plages nécrotiques ou hémorragiques sous le contrôle d'un microscope opératoire. Les fragments, à vitalité macroscopique supposée certaine, ont une consistance élastique et une teinte rosée homogène et translucide. Les tissus sont ensuite découpés en petits cubes, d'environ 1 mm^3 pour les implantations orthotopiques et de 5 mm^3 pour les implantations hétérotopiques. Les fragments sont conservés dans du sérum salé isotonique, à $+ 4^\circ\text{C}$ si toutes les greffes ne peuvent pas être entreprises simultanément ou à température ambiante dans le cas contraire.

Un prélèvement tumoral témoin de chaque implantation est fixé dans du formol à 10% (v/v) dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 puis inclus en paraffine pour une étude histopathologique standard afin d'évaluer la vitalité de la greffe au moment de l'implantation.

2.3. les techniques microchirurgicales de greffe et d'exploration invasive

2.3.1. l'anesthésie

Pour répondre aux exigences éthiques, une anesthésie générale est réalisée. Elle doit être profonde tout en permettant d'obtenir un taux de réveil proche de 100%. Cette anesthésie a également pour fonction d'éviter des réactions neuroendocriniennes biologiques et comportementales à la douleur, pouvant perturber l'expérimentation, c'est pourquoi les altérations tissulaires chez l'animal sont toujours réduites au minimum lors des gestes chirurgicaux. Enfin, pour réaliser des gestes microchirurgicaux d'une grande précision, les animaux doivent être strictement immobiles pendant une longue durée pour certaines interventions complexes nécessitant beaucoup de temps.

Une anesthésie profonde, d'une durée de 40 à 50 minutes, est acquise une à deux minutes après l'injection intra-péritonéale de 0,01 mg de kétamine par gramme de poids corporel de l'animal à endormir. Cette anesthésie peut être prolongée 2 à 3 fois de 30 minutes environ, par l'injection de la moitié de la dose initiale, 5 à 10 minutes avant le début du réveil. L'injection d'une dose supérieure à celle préconisée entraîne 2 fois sur 3 une dépression cardio-respiratoire irréversible. Dès que le "réflexe de queue", qui consiste en une contraction musculaire généralisée de l'animal lorsque l'extrémité de la queue est pincée entre les ongles, disparaît, le taux de réveil est quasiment nul, c'est pourquoi les anesthésies longues ne peuvent être obtenues que par des injections itératives.

Comme lors de la phase d'endormissement, l'animal est souvent très agité au moment du réveil, avec apparition de mouvements désordonnés, soulevant la sciure servant de litière. Ainsi, avant de remettre la souris dans sa cage parfaitement fermée, il est indispensable de recouvrir la litière à l'aide d'une feuille de papier, de type essuie-mains, pour éviter que l'animal n'inhale des poussières de bois entraînant des troubles respiratoires immédiats ou différés, souvent mortels. Toutefois, lors du réveil, une phase d'agitation motrice apparaît assez fréquemment, mais son intensité et sa durée sont toujours beaucoup plus brèves que celles constatées lors de l'endormissement. Dans la demi-heure ou au plus l'heure qui suit la fin de l'intervention, l'animal se déplace, mange et boit normalement.

2.3.2. La préparation de l'animal

Une fois endormi profondément, l'animal est positionné en décubitus dorsal ou ventral, selon le type d'intervention, sur une planchette en plastic désinfectée, puis amarré par 5 morceaux de ruban adhésif de type Scotch® collés sur l'extrémité des 4 pattes et de la racine de la queue, en ayant soin de ne pas trop comprimer les membres. Une compression trop importante, maintenue plusieurs dizaines de minutes, entraîne toujours des ischémies avec amputation spontanée distale du ou des membres quelques jours après l'anesthésie. De même, une fixation en trop grande extension des membres antérieurs ou asymétrique du corps est à l'origine d'une gêne mécanique de la respiration entraînant des morts post-opératoires probablement par troubles hypoxiques cérébraux. Une fois fixé, l'animal est soigneusement désinfecté avant toute opération avec une solution d'éosine à 1 % (m/v) dans de l'alcool à 60° (v/v) (**planche 1, figure A**).

2.3.3. Les instruments

Toutes les interventions sont réalisées à l'aide d'un microscope opératoire Zeiss® (Le Pecq, France), à mise au point et à zoom commandés au pied, sur lequel est incorporé une camera Sony® CCD (Tokyo, Japon) couleur, PAL, permettant d'enregistrer toutes les phases importantes des opérations sur un magnétoscope Umatic® 3/4 de pouce, commandé à distance. Les instruments de cette microchirurgie sont ceux habituellement utilisés en microchirurgie vasculaire et nerveuse humaine et en ophtalmologie. Des miniaturisations du matériel ont toutefois dû être réalisées, notamment pour les clamps, les micro-pinces ou les pointes des ciseaux dont la taille a été artisanalement très réduite. L'hémostase, qui doit être très rigoureuse, est obtenue par des électrocoagulations bipolaires réalisées avec une micro-pince et un très faible courant. Des fils, de calibre 5 à 10(0), utilisés en chirurgie humaine, servent pour les diverses sutures.

Le matériel d'implantation intra-vasculaire est fabriqué au laboratoire en miniaturisant celui utilisé en chirurgie humaine. Les cathéters vasculaires ont une extrémité formée d'un tube de Téflon®, de 100 µm intérieur et 180 µm extérieur, embouti dans un autre de 170 µm intérieur et 400 µm extérieur introduit dans un cathéter de silastic® de 400 µm intérieur et 600 µm extérieur. L'autre extrémité est montée sur une aiguille à ponction intradermique, à embout inversé pour faire disparaître tout espace mort, source d'embolies pulmonaires

gazeuses fatales. Ces cathéters sont parfaitement utilisables tant pour l'injection de produits que pour l'aspiration de sang (**planche 1, figure B**).

2.3.4. les techniques d'implantation

2.3.4.1. Les implantations extra-crâniennes du greffon

Les greffes dans la paroi abdominale, en position prépéritonéale

Le greffon obtenu après l'échantillonnage de la pièce opératoire étant de petite taille (quelques mm³) et provenant d'une tumeur très friable, il est nécessaire, afin d'éviter sa fragmentation, de le placer dans une poche musculo-péritonéale étanche. L'animal est immobilisé en décubitus dorsal. La peau est incisée selon une ligne xipho-pubienne, puis décollée délicatement du plan musculaire. On repère aisément les pédicules épigastriques. L'aponévrose des muscles droits de l'abomen est ouverte, face au pédicule épigastrique. Les muscles sont alors disséqués délicatement à l'aide d'une microspatule pour séparer le muscle du péritoine pariétal et dégager l'artère et la veine épigastriques. Le muscle est ensuite récliné afin de constituer une cavité de 5 à 10 mm de diamètre. Le greffon est enfin déposé dans cette cavité, sur le péritoine, au contact des vaisseaux. La microcavité est refermée par un à trois points de fil 6/0, en prenant garde de ne pas perforer les vaisseaux. La peau est enfin refermée par un surjet (**planche 1, figure C**). Les greffes pariéto-abdominales, très superficielles, sont facilement accessibles à l'examen clinique de l'animal éveillé. Pour ce faire, la souris est fermement maintenue en extension forcée, en empoignant vers l'arrière la queue et la peau scapulocervicale, ce qui permet d'éviter les morsures et de tendre la région abdominale, rendant la surveillance du greffon simple par inspection et/ou palpation avec, le cas échéant, mesure de la tumeur en longueur et en largeur à l'aide d'un pied à coulisse.

Les greffes sur le bord mésentérique du caecum

La peau est incisée comme précédemment. La paroi abdominale est ouverte par une large laparotomie, le long de la ligne blanche. Les anses grêles et le caecum sont extraits délicatement de l'abdomen, à l'aide de deux coton-tiges imbibés de sérum salé, puis étalés sur la paroi abdominale externe. Le greffon est déposé sur le bord mésentérique du caecum et fixé

par plusieurs points de fil 10/0, peu profonds, pour éviter une perforation pariétale risquant d'aboutir à une infection pouvant être fatale à la souris. Les anses digestives et le caecum sont ensuite réintroduits à l'intérieur de l'abdomen. La paroi musculaire et la peau sont alors refermées en deux plans, selon la méthode habituelle (**planche 1, figure D**).

Cette dernière technique offre, par la présence d'un réseau vasculaire mésentérique très riche, un maximum de chances de reprise du greffon mais, du fait du siège intra-abdominal, elle ne permet pas d'apprécier un début de croissance de celui-ci par un simple examen clinique de l'animal et rend nécessaire une laparotomie exploratrice ou une étude par échographie.

2.3.4.2.L'implantation intra-crânienne du greffon

L'animal est fixé en décubitus ventral. La tête est parfaitement immobilisée en hyperextension par un blocage vers l'avant grâce à un fil de nylon 7/0 introduit dans la peau du museau. Une large incision en U ouvert vers l'avant, partant d'une oreille à l'autre, permet un décollement en bloc de la peau qui est réclinée vers l'avant. Un volet osseux est réalisé à droite du plan sagittal médian, en avant du Bregma. Pour ce faire, quatre trous de trépan sont d'abord effectués à l'aide d'une aiguille calibrée 26 gauge. Cette phase est particulièrement critique pour l'animal car, en plus d'une immobilisation axiale stricte qui gêne la respiration, la tête et le cou sont soumis à une brutale hyperpression lors du forage de la table osseuse ce qui, au total, occasionne une gêne respiratoire par aplatissement des voies aériennes supérieures. A l'aide de petits ciseaux, type Vanasse, la table osseuse est alors sectionnée d'un trou à l'autre, sur trois cotés (antérieur, postérieur et inférieur) en s'efforçant de ne pas léser l'encéphale sous-jacent. Le volet est levé en se servant du côté supérieur comme d'une charnière. Une microspatule est ensuite introduite par le bord postérieur de la craniotomie, à la surface du cortex fronto-pariétal afin de réaliser une poche sous-léptoméningée superficielle, laquelle va contenir le greffon, introduit secondairement à l'aide de la même microspatule, sans générer d'hypertension intra-crânienne. Le fragment déposé est nécessairement de petite taille. Sa vitalité doit donc être parfaite. Plusieurs modalités de fermeture osseuse sont étudiées :

La greffe orthotopique à volet osseux immobilisé (planche 1, figure E).

- Après la repose du volet, le défaut osseux, lié à la craniotomie, est comblé par un matériau inerte, le silicone caoutchouc (Silastic[®]). La peau est ensuite appliquée par dessus, puis suturée par des points séparés.
- Le défaut osseux est comblé par un ciment chirurgical. Le ciment chirurgical de type Sulfix[®] est préconisé pour l'obstruction d'orifices de craniotomie chez le rat. Au cours de mises au point préalables, nous avons constaté que ce type de matériel n'était mécaniquement pas adapté à la boîte crânienne de la souris car beaucoup trop épais (la masse moyenne du rat est de 250 à 300 g soit 10 fois plus que celle de la souris nude).
- La technique la plus efficace d'un point de vue physique et bien tolérée par l'organisme, consiste en l'application d'une colle chimique à base de cyanoacrylate de type Superglue[®]. Un comblement osseux hermétique et rigide est rapidement obtenu avec possibilité, pour la peau, d'être immédiatement appliquée sur le matériau. Une suture cutanée est ensuite réalisée comme précédemment.

La greffe orthotopique à volet osseux mobile (planche 1, figure F).

Le volet est remis en place, mais n'est pas scellé et conserve un certain degré de mobilité. Il est ensuite recouvert par la peau qui est suturée en réalisant toujours plusieurs points séparés.

Chacun des greffons, orthotopique ou hétérotopique, peut être identifié par une lettre correspondant à la souche de glioblastome implantée (C, D ou E) et par un chiffre correspondant à la génération de passage chez la souris nude.

2.3.5. Les interventions sur le système vasculaire de la souris

Pour pouvoir administrer par voie parentérale une quantité exacte de principe actif (colorant vital, agent de contraste, oligonucléotides en solution), il est indispensable de pouvoir disposer d'un accès vasculaire, pendant une durée suffisamment longue. Seule, la pose de cathéters à demeure permet de satisfaire de telles exigences.

Compte tenu de la fragilité des parois des veines et de la fréquence des thromboses, il est préférable de mettre en place le cathéter dans une artère et plus particulièrement dans la fémorale qui est d'un accès facile. Il faut toutefois que l'extrémité distale de la voie artérielle sorte de la peau dans la région sous occipitale afin d'être inaccessible au dents et aux pattes de l'animal qui n'aurait de cesse de s'en débarrasser.

Après avoir ouvert largement le creux inguinal et séparé précautionneusement la veine fémorale de l'artère, celle-ci est liée au tiers supérieur de la cuisse. L'artère est dilatée par l'instillation de Fonzyane[®] dans le champ opératoire. Elle est alors clampée juste sous l'arcade crurale et enfin ouverte par une minuscule artériotomie. Le microcathéter en Téflon[®] est introduit dans l'artère, poussé jusqu'au clamp qui est levé puis dans l'aorte, enfin un fil 7(0) est passé autour de l'artère et du cathéter, puis noué. Le cathéter en silicone, en continuité avec celui en Téflon[®], est amarré au muscle psoas puis remonté sur l'abdomen où il est fixé aux muscles obliques. Il passe ensuite sur la face antérieure du thorax et ressort sur la face postérieure du cou en sous occipital. Deux unités d'héparine sont injectées dans le cathéter qui est clampé. Le cathéter peut être maintenu en place durant plusieurs heures, voir jours et être utilisé tant pour des injections que pour des prélèvements sanguins. Si l'héparinothérapie est rigoureusement réalisée, l'obstruction du cathéter est très rare. Toutefois, si elle apparaît, comme le cathéter a été placé dans l'aorte, une injection d'une minime quantité de sérum hépariné sous forte pression permet de retrouver une perméabilité complète, sans risque d'embolie pulmonaire mortelle (**planche 1, figure B**).

2.4. le contrôle de la prise du greffon par l'examen microscopique standard

2.4.1. La microscopie optique

Les études histopathologiques sont réalisées sur des tissus fixés dans du formol à 10% (v/v) dissous dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4. Ces tissus sont ensuite inclus dans la paraffine et débités en coupes de 5 µm d'épaisseur, montées sur lames ordinaires à l'eau albumineuse. Après séchage à l'étuve à +37°C pendant 2 heures, les coupes sont déparaffinées dans trois bains successifs de toluène, hydratées par passage dans des bains d'alcool de concentration décroissante, puis dans de l'eau du robinet, enfin colorées à l'hématéine-éosine-safran (HES) avant le montage de la lamelle à l'Eukitt.

La persistance de prolongements axonaux au sein des tumeurs intracérébrales, témoignant d'une destruction parenchymateuse incomplète, est recherchée sur des coupes histologiques épaisses de 10 µm qui sont colorées par la méthode de Bodian (souris D1d, D4c).

2.4.2. La microscopie électronique à transmission

Une étude en microscopie électronique à transmission (tableau I-1) des greffons intracérébraux est réalisée pour compléter, à l'échelle ultrastructurale, l'étude de la différenciation des cellules tumorales (étude réalisée à partir d'un greffon C et d'un greffon D) et pour apprécier morphologiquement une éventuelle altération de la barrière hémato-encéphalique, ce qui ne peut être réalisé par la microscopie optique standard.

1) Des petits fragments de tumeur intracérébrale d'environ 1 mm de côté sont immédiatement prélevés après sacrifice (souris C 504, C 505, C 516) et fixés pendant 12 heures, à +4°C dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% (m/v) dans du tampon cacodylateHCl 0,1 M pH 7,2.
2) Les fragments tissulaires sont ensuite rincés pendant 24 heures à +4°C dans le même tampon.
3) La post-fixation des prélèvements est réalisée par une incubation pendant 1 heure 30 à la température ambiante dans une solution d'acide osmique à 1% dans du tampon cacodylateHCl 0,1 M pH 7,2.
4) La déshydratation des prélèvements est réalisée à la température ambiante par des passages dans des bains d'éthanol successifs de degrés croissants (30°, 50°, 70°, 80°, 90° et 100°), chaque bain durant 5 minutes.
5) L'imprégnation des prélèvements est réalisée par passages successifs dans une solution d'epoxy 12 propane pendant une heure puis dans une mélange epon/epoxy 12 propane (1/1) (v/v) pendant une heure.
6) Les prélèvements sont introduits durant 20 minutes à la température ambiante, dans une solution d'epon puis la polymérisation de la résine est obtenue par une incubation à +60°C pendant 72 heures.
7) Des coupes semi-fines de 2,5 µm d'épaisseur sont réalisées avec un microtome ultracut à l'aide d'un couteau de verre et sont colorées à chaud (+100°C) par une solution de bleu de toluidine à 1% dans une solution de borate de sodium à 1% (m/v). Cette étape permet une présélection des régions à analyser et précède la réalisation de coupes ultra-fines à l'ultracut à l'aide d'un couteau de diamant.
8) Les coupes ultra-fines sont recueillies sur grilles de cuivre et sont contrastées à l'acétate d'uranyle à 1% (m/v) dans l'eau distillée bouillie, durant 20 minutes à +37°C, dans l'obscurité, puis à la solution de Reynolds pendant 20 minutes, toujours dans l'obscurité, mais à température ambiante.
9) L'étude des tissus est ensuite effectuée sur un microscope électronique Philips CM 10®.

Tableau I-1

Protocole technique standard de microscopie électronique à transmission

CHAPITRE 2

LES RESULTATS MACROSCOPIQUES ET

HISTOLOGIQUES AVEC LES TECHNIQUES DE

COLORATION STANDARD

1. LA PRISE DES GREFFONS

1.1. Les greffes hétérotopiques

Toutes les greffes hétérotopiques, pariéto-abdominales, primaires (C1, D1) réalisées chez des souris nude ont pris, soit 100 % de réussite (5 animaux). Les lignées C et D continuent à se développer et sont, par passages successifs, perpétuées dans 100 % des cas chez les souris nude.

Le délai d'apparition d'une tumeur cliniquement décelable après son implantation pariéto-abdominale est variable. La mise en évidence précoce d'une prise du greffon pariéto-abdominal par un examen clinique de la paroi abdominale demeure incertaine du fait d'un développement qui peut être plus ou moins profond, enchâssé dans la masse musculaire et donc plus ou moins bien visible. La possibilité de remaniements cicatriciels palpables liés au geste opératoire peut, en phase toute initiale, fausser l'observation. Les greffons en position péri-caecale ne sont, eux, jamais palpables au début d'une prise tumorale. Pour tous les cas de masse suspecte, une laparotomie exploratrice permet, le cas échéant, de confirmer sa nature tumorale en la biopsiant.

Le délai d'apparition clinique d'une tumeur histologiquement confirmée, pour chaque souris, génération après génération, est résumé dans les **tableaux I-2 à I-5**. La taille de la tumeur au moment de sa découverte est arbitrairement fixée à 5 +/- 1 mm afin d'éviter les faux diagnostics positifs, liés à un bourrelet cicatriciel ou à une réaction à corps étranger sur un fil.

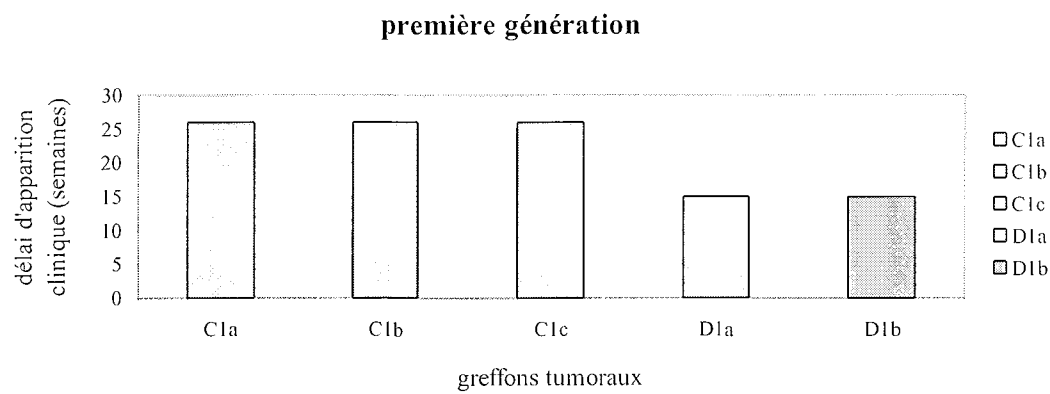


Tableau I-2
Délai d'apparition clinique des greffons abdominaux au cours du premier passage

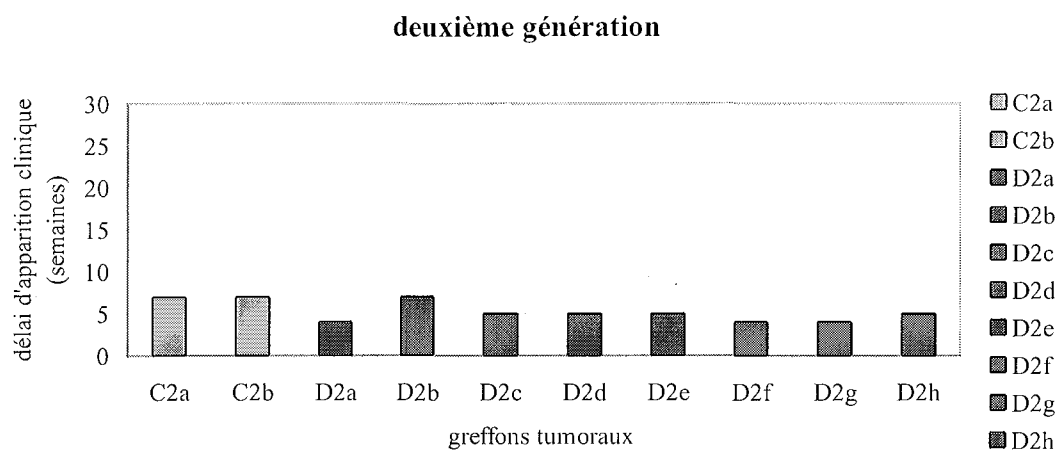


Tableau II-3
Délai d'apparition clinique des greffons abdominaux au cours du second passage

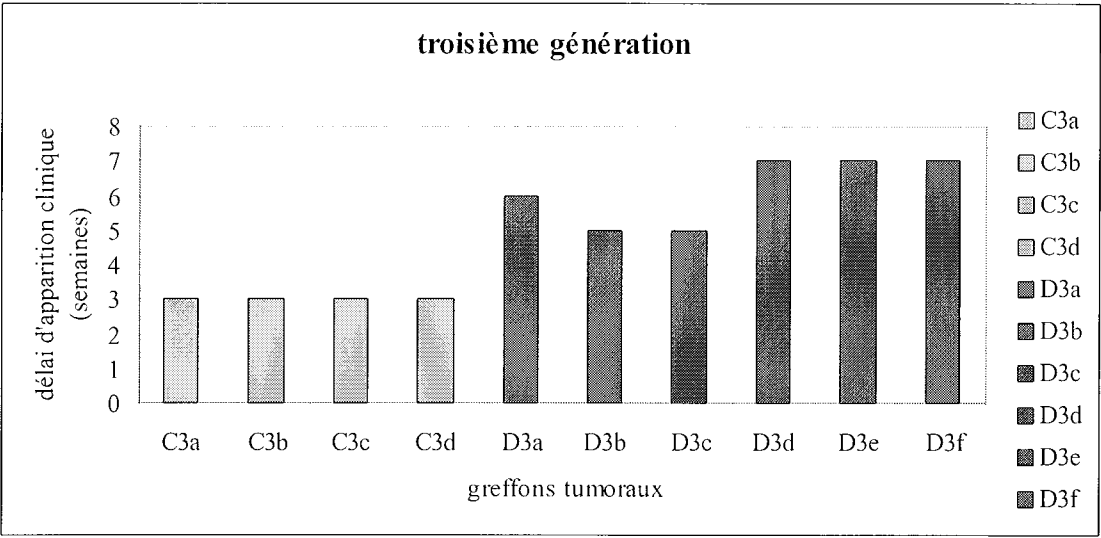


Tableau II-4

Délai d'apparition clinique des greffons abdominaux au cours du troisième passage

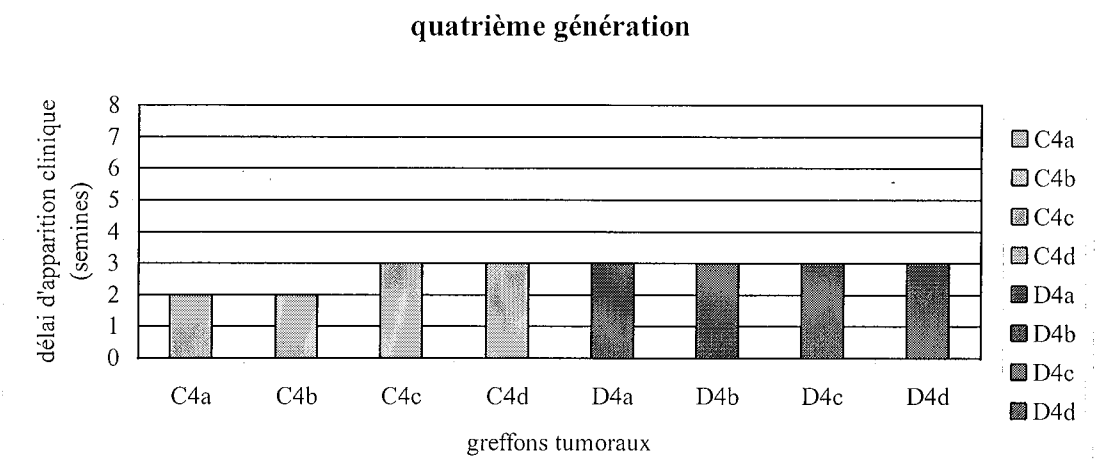


Tableau II-5

Délai d'apparition clinique des greffons abdominaux au cours du quatrième passage

Les résultats rapportés permettent de constater la prise des deux glioblastomes après un délai d'attente relativement long, supérieur à 20 semaines pour le glioblastome C et de 15 semaines pour le glioblastome D. En revanche, la durée des passages suivants est nettement plus courte, et se stabilise à 2 – 3 semaines à partir du quatrième passage et lors des passages suivants.

2. L'ETUDE MACROSCOPIQUE DES GREFFONS

L'absence d'expérience préalable dans le Laboratoire concernant le devenir des greffes de glioblastomes, a fait que quelques implantations primaires en position orthotopique ont été réalisées, en plus de la position hétérotopique (**tableau I-7**).

Aucune des greffes au niveau du cortex fronto-pariétal droit ou gauche n'entraîne de troubles neurologiques patents chez les animaux, tant en post-opératoire immédiat, qu'à moyen et long terme. Il n'existe ni déficit moteur, ni troubles de la coordination, même après le développement de volumineuses tumeurs histologiquement confirmées. Toutefois, un épisode de comitialité est rapporté chez la souris D1d lors de l'introduction du greffon. Des états d'hypervigilance et d'hyperexcitabilité sont parfois constatés chez certains animaux (souris C2b, C4a et C4b et souris D1c, D2f et D2g) (**tableaux I-6 et I-7**).

L'évolution mortelle des animaux se produit toujours dans un tableau d'importante altération de l'état général, rapidement aggravée par une déshydratation globale liée à l'arrêt de l'alimentation. Le décès survient quelques jours après la constatation d'un ralentissement général de l'activité de l'animal. Les souris sont alors le plus souvent porteuses de volumineuses tumeurs de 2 à 3 cm de grand axe au niveau abdominal. Après implantation orthotopique à volet mobile (souris D3a, D3b, D3c, D3d, D3e et D3f), on peut constater, au niveau du crâne, le développement de volumineuses tumeurs extra-crâniennes, d'environ 1 cm de grand axe, dont l'évolution macroscopique paraît synchrone de celle des témoins abdominaux, tandis que les greffes à volet fixe restent intra-crâniennes après une même durée d'évolution, donc bien limitées et de plus petit volume du fait d'un développement dans une boîte osseuse inextensible, sans pour autant qu'un syndrome clinique patent d'hypertension intra-crânienne ne soit constatable (sommolence, paralysie, troubles alimentaire ou comitialité...). Des survies prolongées, sans déficit, sont notées chez des animaux greffés à volet fixe (souris D1c D1d et D1e - **tableau I-7**) et ce malgré une infiltration parfois majeure, étendue à la grande partie de l'encéphale (souris D1d).

2.1. Les greffons hétérotopiques

Aucun des animaux greffés ne développe de tumeur à distance du niveau de l'implantation. On ne constate ni métastase macroscopique au niveau des principaux viscères, ni dissémination locorégionale dans la cavité abdominale, ni ascite. Le greffon apparaît toujours sous la forme d'un nodule bien limité, arrondi, inclus dans la paroi musculaire abdominale ou dans le mésocolon, sans ganglion métastatique décelable. Aucune adhérence aux tissus voisins n'est constatée, tant viscérale que cutanéomu-sculo-aponévrotique (**planche 2, figure A**).

Les greffons possèdent, au niveau de leur capsule, un important réseau vasculaire arborisé dont l'origine se situe en regard de l'emplacement initial de la greffe. A la coupe, ces tumeurs ont un aspect charnu, blanchâtre, plus ou moins translucide. Lorsque le grand axe tumoral dépasse approximativement 1,5 cm, on note l'apparition de foyers hémorragiques punctiformes, jamais étendus, sans cavité nécrotique (**planche 2, figure B**).

Tableaux I-6 à I-7

Chaque lot de souris greffées avec une même tumeur constitue une génération de passage pour la tumeur. Les tumeurs hétérotopiques ont été biopsiées pour s'assurer de la nature de la tumeur. La souris dont la tumeur hétérotopique a été transplantée pour assurer le développement de la génération de passage suivante est soulignée en gris dans les tableaux.
FS : volet osseux fixe silastic / FC : volet osseux fixe cyanoacrylate / M : volet osseux mobile
Prise du greffon orthotopique : +

Tumeur C	Grefe hétérotopique				Grefe orthotopique			
Génération de passage 1	C1a Biopsie + à J183 Décès J278 1,5/0,8 cm	C1b Biopsie + à J183 Décès J190 0,8/0,6 cm	C1c Biopsie + à J183 Décès J321 2/2,5 cm					
Génération de passage 2	C2a Décès J136 2,5/2 cm		C2b Décès J83 2/2 cm		C2b M +			
Génération de passage 3	C3a Décès J135 2/2,5 cm	C3b Décès J158 2,5/3 cm	C3c Décès J163 2,5/3,5 cm	C3d Décès J158 3/3 cm				
Génération de passage 4	C4a Décès J121	C4b Décès J131	C4c Décès J134	C4d Décès J58	C4a FC +	C4b FC +	C4c FC +	C4d FC +

Tableau I-6
Greffons de glioblastome C

Tumeur D	Greffe hétérotopique						Greffe orthotopique									
Génération de passage 1	D1a Biopsie + à J225 Décès J247 2,5/1,5 cm			D1b Biopsie + à J225 Décès J245 2,5/2 cm			D1c FS - Décès J211		D1d FS + Décès J213		D1e FS + Décès J184					
Génération de passage 2	D2d Décès J55 1,5/1 cm	D2e Décès J119 3,5/2 cm	D2f Décès J97 3,5/1,5 cm	D2g Décès J97 3,5/1,5 cm	D2h Décès J112 3,2/1,7 cm		D2d FS +	D2e FS ?	D2f FS +	D2g FS +	D2h FS +					
Génération de passage 3	D3a Décès J73 2/0,5 cm	D3b Décès J70 1/0,8 cm	D3c Décès J78 2/0,8 cm	D3d Décès J79 1,5/0,8 cm	D3e Décès J79 1/1 cm	D3f Décès J77 0,6/0,7 cm	D3a M +	D3b M +	D3c M +	D3d M +	D3e M +	D3f M +				
Génération de passage 4	D4a Décès J65		D4b Décès J50		D4c Décès J75		D4d Décès 78		D4a FC +		D4b FC +		D4c FC +		D4d FC +	

Tableau I-7
Greffons de glioblastome D

2.2. les greffons orthotopiques

Ayant pu observer une absence de prise d'une greffe primaire sur trois en position orthotopique (souris D1c), mais 100% de prise lors des passages successifs, il est préférable de ne pas greffer en première intention une nouvelle lignée tumorale directement dans le cerveau de l'animal, mais dans plusieurs poches pariéto-abdominales préperitonéales. Ce n'est que dans un deuxième temps, à partir du greffon qui a bien pris, que l'implantation intra-crânienne est réalisée, accompagnée d'un témoin abdominal chez chaque animal. L'utilisation de fragments solides calibrés en taille permet, par ailleurs, d'avoir un geste facilement reproductible, ce d'autant que le tissu tumoral provenant de tumeurs déjà greffées chez la souris nude est presque exclusivement constitué de cellules malignes, sans stroma ni nécrose (cf. infra – Chapitre 3).

Un facteur important concernant la greffe orthotopique est le mode de fermeture adopté. En effet, l'introduction d'un fragment tumoral sous la léptoméninge, c'est à dire directement sur la surface du cortex cérébral, sans occlusion osseuse complète, génère toujours une tumeur devenant rapidement extra-crânienne, qui mime le comportement de n'importe quel greffon

hétérotopique : la tumeur se développe principalement hors du crâne et adopte une disposition "en boutonnière" (**planche 2, figures E et F**). Le vitesse de développement est similaire à celle des témoins abdominaux. Aucune adhérence n'est constatée en regard du scalp dont la cicatrisation se fait d'ailleurs sans aucune difficulté. La vascularisation développée à la surface de la tumeur est anastomosée au réseau vasculaire extra-crânien sous-cutané (territoire carotidien externe), aussi peut-on supposer que la barrière hémato-encéphalique n'existe pas à ce niveau. En revanche, aucun clivage n'est possible entre la masse tumorale et l'encéphale sous-jacent, au niveau de l'implantation d'origine. A la coupe, l'aspect est proche de celui constaté au niveau abdominal avec, pour les plus grosses tumeurs, présence d'un piqueté hémorragique (souris D3d et D3f).

Les résultats obtenus après fixation du volet osseux par du silicone ou mieux, par du cyanoacrylate sont, au contraire, radicalement différents. L'emploi de l'un ou de l'autre ne produit pas de différence importante, toutefois le cyanoacrylate a l'avantage d'une maniabilité supérieure. Ces deux procédés, qui ne gênent pas la prise tumorale ni la cicatrisation du scalp, empêchent, par contre, tout développement tumoral extra-crânien, sauf pour de très rares animaux porteurs de tumeurs très volumineuses, en fin de vie. Par ailleurs, aucun réseau vasculaire développé n'est visible à proximité du matériel d'occlusion. A la coupe de l'encéphale, on ne retrouve pas de tumeur nettement individualisable par rapport au parenchyme cérébral de la souris mais on note, quelquefois, une petite zone hypervascularisée de quelques millimètres (**planche 2, figure C**), dont la nature tumorale peut ensuite être confirmée par l'étude histologique (**planche 2, figure D**).

L'existence d'une altération de la barrière hémato-encéphalique est bien connue dans les gliomes humains. Un trouble de la perméabilité vasculaire au niveau du greffon intracérébral est retrouvé en injectant du bleu d'Evans à un animal, 58 jours après la greffe (souris C4d). L'injection, de 200 µl de bleu d'Evans à 2 % (m/v) dissous dans du chlorure de sodium (NaCl) à 0,9 % (143) est réalisée par voie artérielle. La souris est sacrifiée une heure après l'administration du colorant et un examen nécropsique du cerveau permet la constatation d'une diffusion du colorant dans un territoire limité de l'encéphale, situé dans l'hémisphère droite, en regard du site d'implantation. L'examen histologique confirme le caractère limité de la diffusion dans le greffon, et non dans l'encéphale sain. (**planche 6, figure C**).

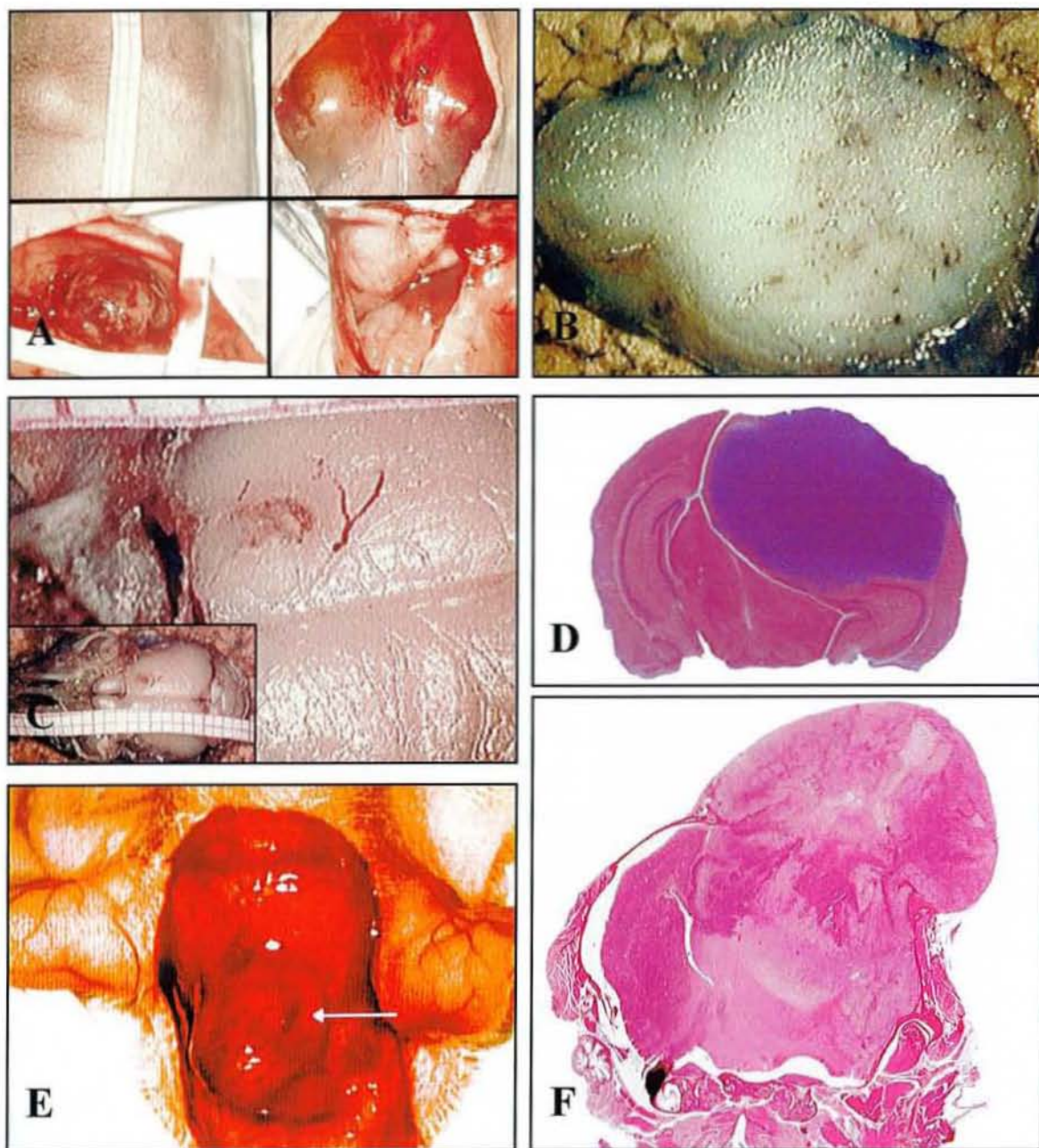


PLANCHE 2

La macroscopie

A : La prise d'une greffe hétérotopique préperitonéale. La tumeur est visible sous la peau et apparaît enchassée dans le muscle mais sans adhérence au plan profond.

B : Le greffon hétérotopique est une tumeur bien limitée, blanchâtre et focalement hémorragique à la coupe.

C : La greffe orthotopique à volet fermé - prise du greffon (un carreau = 1 mm).

D : La greffe orthotopique à volet fermé - la tumeur est exclusivement intra-crânienne et se développe dans l'encéphale (coupe montée - HES).

E : La greffe orthotopique à volet ouvert - la tumeur est exophytique et se développe vers les tissus sous cutanés.

F : La greffe orthotopique à volet ouvert - la tumeur, partiellement intra-crânienne, se développe nettement dans les tissus sous cutanés.

3. LES ETUDES HISTOLOGIQUES ET ULTRASTRUCTURALES DES GREFFONS AVEC LES TECHNIQUES DE COLORATIONS STANDARDS

3.1. La microscopie optique

3.1.1. Les greffons hétérotopiques

Les études histopathologiques ont d'abord été entreprises au plus tard 229 jours après l'implantation des greffons à partir de biopsies des tumeurs pariéto-abdominales issues des premières greffes (souris C1 et D1). Les analyses ont ensuite été pratiquées sur les greffons, prélevés en totalité, au cours des passages successifs ou lors de l'étude nécropsique de l'animal.

Greffons C1 (souris C1a, C1b et C1c) (Biopsies à J 183)

Ces tumeurs, issues du glioblastome C, sont constituées de nappes cellulaires denses, segmentées par des plages de fibrose hyaline. Les astrocytes tumoraux apparaissent le plus souvent peu différenciés et polymorphes. Un autre contingent, réduit, est formé de cellules pourvues d'un cytoplasme abondant, éosinophile, ressemblant à des astrocytes protoplasmiques. Le réseau vasculaire est peu développé et anarchique dans le greffon. Les mitoses sont nombreuses et des images d'apoptose sont présentes. En revanche, il n'existe pas de plage de nécrose de coagulation. Ces tumeurs ne sont pas encapsulées et les cellules tumorales s'insinuent entre les fibres musculaires striées adjacentes. Les tissus conjonctifs murins au contact du greffon comportent des vaisseaux congestifs mais présents en nombre normal.

Greffons D1 (souris D1a et D1b) (Biopsies à J 225)

Ces deux tumeurs, issues du glioblastome D sont constituées d'astrocytes atypiques, dont les cytoplasmes parfois abondants peuvent donner aux cellules un aspect gémistocytaire. Les prolongements cellulaires sont peu nombreux et les noyaux fréquemment irréguliers, pauvres en hétérochromatine, sont inconstamment nucléolés. Les mitoses sont nombreuses, souvent anormales, sans corps apoptotiques, ni plages de nécrose. Les réseaux vasculaires,

peu développés, sont formés de vaisseaux sans pseudostratification des cellules endothéliales. Ces deux tumeurs, qui sont pseudo-encapsulées et qui refoulent les tissus conjonctivo-adipeux au contact, sont traversées par des axes fibreux peu épais, ne comportant pas de cellules inflammatoires.

Les greffons pariéto-abdominaux issus de la lignée D après quatre passages répétés chez la souris nude, ont également le même aspect d'un animal à l'autre et sont stables, quel que soit le passage étudié. Lors du sacrifice tardif ou de la mort spontanée de l'animal, les tumeurs macroscopiquement volumineuses (**tableau I-7**) sont très cellulaires et constituées d'astrocytes atypiques indifférenciés, surtout de type protoplasmique, parfois gémistocytaire. Les noyaux sont irréguliers, encochés, hyperchromatiques, rarement nucléolés. Le cytoplasme comporte un péricaryon, plus ou moins abondant et éosinophile. Les prolongements astrocytaires sont difficiles à distinguer sur les coupes colorées à l'HES (**planche 3, figure H**). Les mitoses sont toujours très nombreuses (au moins deux mitoses visibles par champ à l'objectif 40), parfois atypiques, sans signe d'apoptose associé. Le stroma conjonctif, grêle, comporte des vaisseaux revêtus par un endothélium turgescant, mais jamais pluristratifié, ni agencé en structures pseudoglomérulaires. Lorsque l'axe principal de la tumeur atteint environ 2 cm, des plages serpigineuses de nécrose de coagulation sont visibles et sont entourées d'astrocytes disposés de manière pseudopalissadique. Les tumeurs sont segmentées par des axes conjonctifs fins, ne comportant pas de cellules inflammatoires. Autour de la tumeur, le réseau vasculaire est comparable à celui des greffons de glioblastome C, congestif mais de densité apparemment normale.

3.1.2. Les greffons orthotopiques

Les aspects observés varient considérablement en fonction du mode de fermeture de la boîte crânienne après l'implantation tumorale.

Les implantations à volet osseux mobile

Lorsque les volets de craniotomie ne sont pas immobilisés par une colle, le développement des greffons conduit à la formation de volumineuses masses exophytiques extra-crâniennes (**planche 2, figure F**). A la coupe, la tumeur a un point d'implantation profond, dans la substance blanche, proche des noyaux gris centraux. En intra-crânien, les

glioblastomes se développent latéralement au foyer d'implantation sur la face externe de la léptoméninge qu'ils recouvrent mais n'infiltrant pas. Le cortex est alors refoulé par la masse tumorale. Le volet osseux est soulevé et fragmenté par le greffon qui se développe essentiellement en extra-crânien pour former une masse nodulaire qui repousse les tissus conjonctifs sous cutanés en formant un front continu. En revanche, au contact de faisceaux de muscles striés, des foyers isolés de cellules tumorales s'insinuent entre les myocytes, sur une très courte distance (en moyenne 50 μm) et forme alors un front discontinu.

Des vaisseaux congestifs de grande taille sont retrouvés dans le cerveau, autour de la masse de cellules tumorales. Dans le tissu conjonctif extra-crânien péri-tumoral, on observe également des vaisseaux congestifs mais qui ont un caractère moins ectasiques que dans l'encéphale. La densité vasculaire péri-tumorale extra ou intra-crânienne ne paraît pas anormalement élevée. Dans la tumeur, le réseau vasculaire est constitué d'artères et de veines ectasiques morphologiquement différentes. Les calibres sont irréguliers et les trajets tortueux. Les lits capillaires ne peuvent être étudiés avec précision sur les coupes tissulaires isolées, colorées à l'HES. Il n'existe, toutefois, jamais de pluristratification endothéliale, ni d'aspect pseudoglomérulé (**planche 3, figure C**).

Les cellules des transplants ont le même aspect quels que soient le glioblastome greffé et l'animal étudié. Les tumeurs sont constituées de plages denses et homogènes d'astrocytes peu différenciés, pauvres en prolongements et dont les noyaux sont polymorphes (**planche 3, figure A**). En moyenne, deux mitoses, normales ou anormales, sont observées par champ microscopique au grossissement 40. Dans les tumeurs d'environ 1 cm de grand axe, des plages de nécrose de coagulation débutante, serpentineuses, bordées par plusieurs rangées d'astrocytes agencés en palissade, sont observées (**planche 3, figure B**). Ces plages sont irrégulièrement distribuées, localisées dans la partie exophytique, mais aussi, quoique plus rarement, en profondeur des masses tumorales.

Au niveau des foyers d'implantation dans le cerveau, les relations existant entre les greffons, d'une part, et les tissus de la souris, d'autre part, sont difficiles à préciser avec la coloration à l'HES. Tout au plus peut-on remarquer que l'infiltration du parenchyme sain par la tumeur ne paraît être, à ce niveau, que de 1 mm, pour un cerveau dont la hauteur est de 6 à 8 mm. Par ailleurs, aucun prolongement neuronal au sein même des tumeurs n'est observé avec la coloration de Bodian (**planche 3, figure F**).

Les implantations à volet osseux immobilisé

Les caractéristiques cytologiques et l'architecture des réseaux microcirculatoires ne diffèrent pas significativement, lorsque les volets de crâniotomie sont immobilisés. Il n'en va pas de même des caractéristiques de l'extension tumorale. En effet, quand les orifices osseux sont complètement obstrués donc non mobilisables, le développement du greffon est limité à l'espace intra-crânien (**planche 2, figure D**). Les tumeurs se développent en profondeur, vers l'encéphale, ne dépassent pas la léptoméninge et ne recouvrent donc pas les circonvolutions cérébrales adjacentes. En revanche, au contact du cerveau, les tumeurs infiltrant plus qu'elles ne refoulent le parenchyme sain. Si, sur les colorations de Bodian, il n'est pas retrouvé de prolongements neuronaux au centre des tumeurs, des neurites résiduels sont toujours observés à la périphérie des tumeurs, parmi les cellules tumorales (**planche 3, figures D, E**). Des astrocytes manifestement atypiques, infiltrant le parenchyme sain sur toute la périphérie tumorale, mais également très à distance, au niveau du corps calleux ou de la substance blanche du centre ovale, sont retrouvés. Il est cependant impossible, sur les coupes colorées à l'HES, d'affirmer la nature néoplasique de ces éléments. Dans un cas (D1d), la tumeur ayant longtemps évolué (213 jours), des aspects d'effraction des ventricules latéraux, avec comblement de la cavité ventriculaire, sont observés. Dans ces tumeurs, qui ne dépassent pas 0,8 cm de grand axe, on ne retrouve pas de plage de nécrose ischémique.

Au niveau du cerveau immédiatement au contact des greffons on retrouve des vaisseaux de grand calibre et dans la tumeur des vaisseaux toujours tortueux à lumière irrégulière et souvent ectasique. Il n'est à nouveau pas observé de prolifération endothéliale, ni d'aspect pseudoglomérulé (**planche 3, figure B**). L'architecture vasculaire intra-tumorale est donc la même quel que soit le mode de fermeture adopté pour le volet osseux.

3.2. L'étude ultrastructurale des greffons intra-crâniens

Cette étude porte sur la composante cellulaire dense de deux cas de tumeurs intra-crâniennes à volet fermé donc sur une tumeur exclusivement orthotopique.

Les astrocytes tumoraux sont des cellules peu différenciées, pourvues de prolongements peu nombreux et courts. Leur noyau, souvent encoché, a une chromatine modérément dense aux

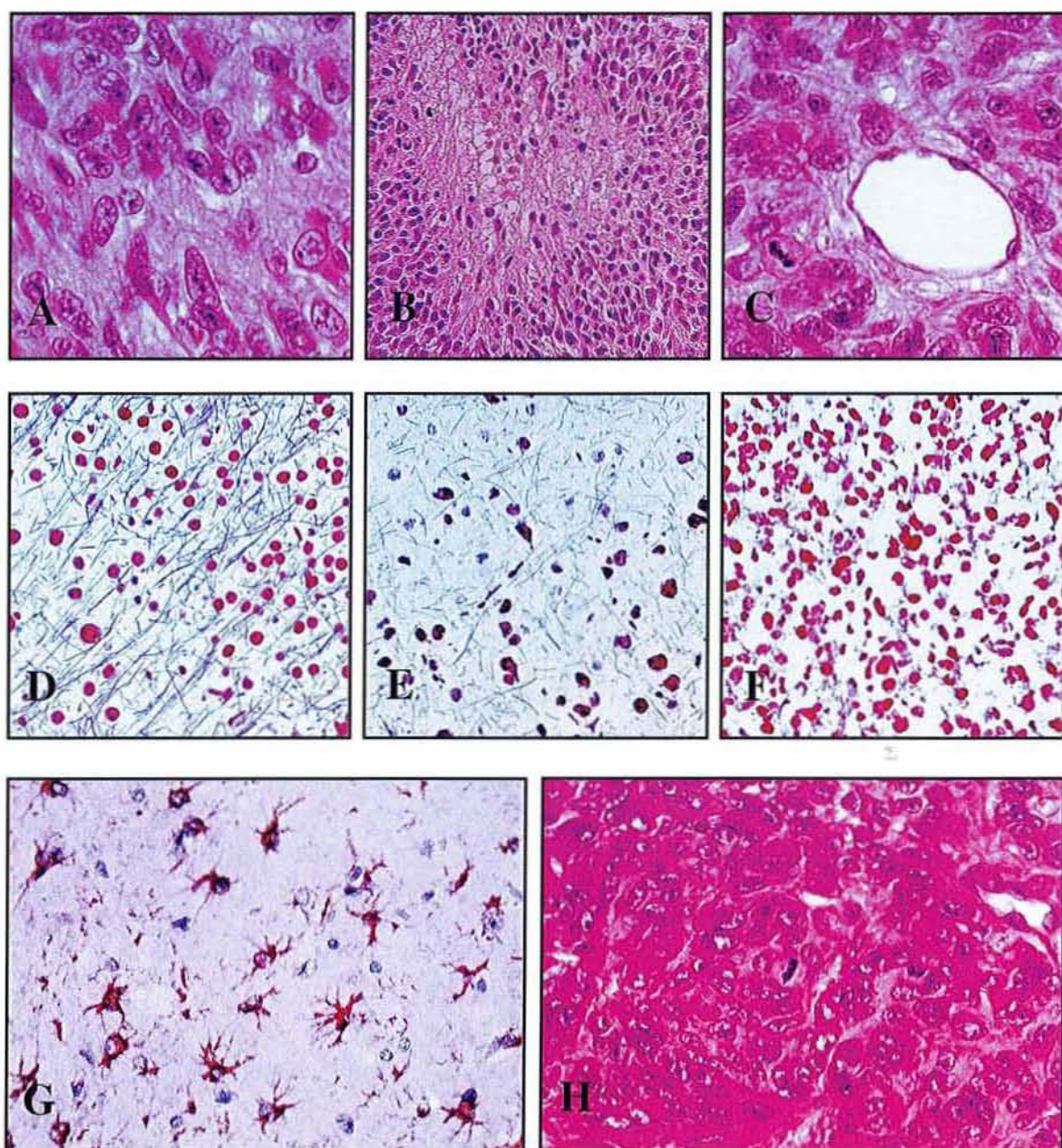


PLANCHE 3

La microscopie - l'histopathologie standard

A : Cellules tumorales isolées autour de la masse dense d'un glioblastome greffé sur le parenchyme cérébral - HES, X1000.

B : Une nécrose serpentineuse, entourée de cellules pléomorphes, est visible dans un glioblastome intra-crânien de plus de 4 mm de grand axe - HES, X200.

C : Le tissu tumoral dense du glioblastome intra-crânien comporte des vaisseaux ectasiques sans hyperplasie endothéliale - HES, X1000.

D, E et F : Les neurones sont mis en évidence par la coloration de Bodian dans l'encéphale sain (D). Ils sont partiellement détruits au contact des cellules tumorales isolées (E) et ont disparu dans la tumeur dense (F).

G : Il existe une gliose réactionnelle en périphérie d'un glioblastome intra-crânien. Les astrocytes murins sont mis en évidence par immunodétection de la GFA (péroxydase H₂O₂ / DAB), X400.

H : Le greffon hétérotopique est constitué d'un tissu tumoral dense - HES, X1000.

électrons. Des nucléoles ne sont qu'inconstamment observés. Au sein des cytoplasmes, à mitochondries nombreuses, il n'existe en revanche que de rares filaments intermédiaires. Toutes les cellules endothéliales observées sont hautes, non fenêtrées et pauvres en vésicules de pinocytoses. Elles reposent sur une lame basale souvent pluristratifiée. Les jonctions intercellulaires sont peu développées et jamais du type zonula occludens (**figure I-1**).

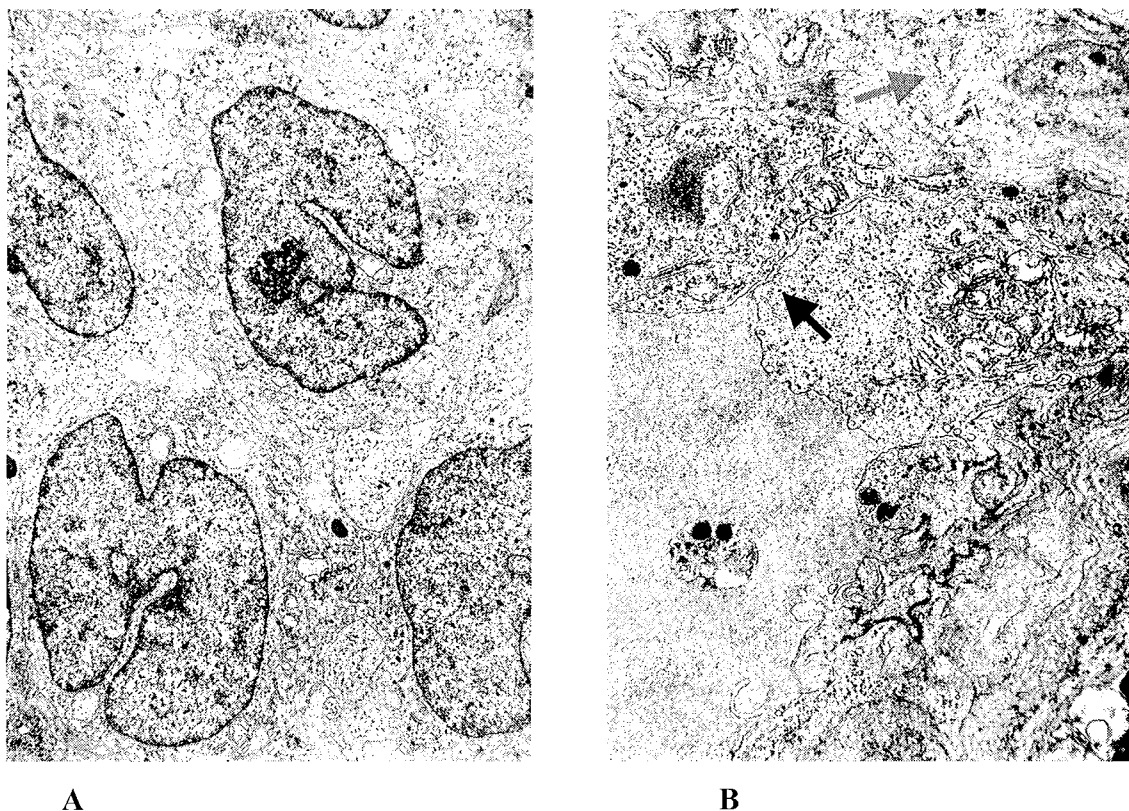


Figure I-1

A : cellules tumorales (morphologie générale) (X2950)

B : endothélium tumoral : lame basale pluristratifiée (→) jonctions intercellulaires peu développées (→) (X2100)

CHAPITRE 3

LE CHIMERISME CELLULAIRE DU MODELE ET LE MAINTIEN DES CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DES CELLULES MALIGNES

1. LE CONCEPT DE CHIMERISME CELLULAIRE

Pour posséder un réel intérêt pour des études biologiques fondamentales, diagnostiques ou thérapeutiques il est indispensable qu'avec le modèle les cellules néoplasiques puissent être identifiées microscopiquement de manière indiscutable par rapport aux cellules normales et réactionnelles du cerveau de l'hôte où s'est développé le greffon tumoral humain. De précédents travaux, réalisés dans le Laboratoire de Microchirurgie Expérimentale (107-111), ont démontré que les xénogreffes de tumeurs humaines chez la souris nude ne sont pas seulement des modèles animaux pratiques à utiliser et reproductibles mais qu'ils sont, du fait du chimérisme, des moyens d'étude qui permettent une parfaite discrimination *in situ* des cellules humaines et des cellules de l'hôte. Ainsi, l'hybridation *in situ* à l'aide de sondes non radioactives d'ADN génomique total soniqué, permet une identification sans équivoque possible, de l'espèce d'origine de chacune des cellules nucléées présentes sur les coupes histologiques. En complément, une étude immunohistochimique (57, 58) à l'aide d'anticorps reconnaissant spécifiquement des antigènes humains ou murins selon le cas peut-être couplée à l'hybridation *in situ* et permettre une étude de la cinétique respective des différentes cellules ainsi que de leur différenciation. Cette technique offre l'avantage de méthodes sensibles et spécifiques, topographiquement précises puisqu'elles sont réalisables sur des tissus fixés, inclus en paraffine, et qu'elles permettent une analyse morphologique à l'échelle de la cellule. Par ailleurs, un point essentiel de ces techniques est leur caractère non sélectif et non interférant avec la physiologie cellulaire puisqu'il n'est pas nécessaire de modifier au préalable les cellules néoplasiques humaines ou l'hôte pour permettre la mise en évidence des unes ou des autres.

Un choix judicieux des antigènes étudiés et des techniques de double marquages, par hybridation *in situ*, immunohistochimie, ou mixtes, par hybridation *in situ* et immunohistochimie a permis d'explorer plusieurs caractéristiques des gliomes humains se développant dans le cerveau des souris nude :

- La différenciation tumorale et le mode de développement spatial du gliome, en position orthotopique, et hétérotopique, sur l'abdomen.
- La gliose réactionnelle murine apparue dans la tumeur au niveau de l'interface avec le cerveau sain et à distance dans le cerveau.
- L'activité de prolifération des cellules tumorales, quelle que soit leur localisation dans l'encéphale.

- Le réseau microvasculaire présent dans la tumeur et dans l'encéphale de la souris.
- Certains marqueurs tumoraux pouvant être corrélés au pronostic en cancérologie humaine.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Les techniques d'hybridation *in situ*

La méthode d'hybridation *in situ* employée se fonde sur les différences apparues dans la séquence des deux génomes au cours de l'évolution phylogénétique. L'évolution a principalement porté sur des séquences, non exprimées en protéines, ayant la propriété d'être très répétées. Les séquences ALU en sont un exemple. Elles sont répétées plus de 500 000 fois et correspondent à 3 à 6% de l'ADN génomique total. Le chimérisme tissulaire peut donc être étudié en hybridation *in situ* à l'aide de **sondes oligonucléotidiques**, plasmidiques ou fabriquées par PCR, complémentaires des séquences ALU humaines ou murines. Les séquences exprimées en protéines, en règle uniques ou peu répétées, ont, en revanche, peu divergé au cours de l'évolution. Toutes ensemble, elles ne constituent en effet qu'une faible partie du génome. Les **ADN génomiques humain et murin totaux** peuvent donc être utilisés comme sondes pour la détection spécifique, sur coupes, des noyaux des espèces correspondantes. Dans ce travail, les deux types de sondes, oligonucléotidiques ou génomiques, ont été employées afin de comparer leurs efficacités respectives.

La petite taille des oligonucléotides permet à ces séquences d'ADN de pénétrer aisément les tissus, même fixés au formol. Les sondes oligonucléotidiques peuvent donc être utilisées sur des tissus fixés de façon habituelle, sans pré-traitement des coupes pour des techniques d'hybridation *in situ* simple. Toutefois un pré-traitement de la coupe à la chaleur humide (autoclave ou micro-onde) et par une protéase telle que la pronase ou la protéinase K permet d'obtenir un signal de bonne qualité plus rapidement.

En revanche, pour réaliser une hybridation *in situ* simple à l'aide d'ADN total ou pratiquer sur une même coupe formolée une hybridation *in situ* couplée à une étude immunohistochimique ou une double détection des génotypes humain et murin par deux hybridations successives, quelle que soit la sonde il est toujours nécessaire d'effectuer un pré-

traitement. Dans ce cas, les deux types de sondes, génomiques totales ou oligonucléotidiques, donnent de bons résultats, comparables à ceux obtenus sans pré-traitement avec des tissus fixés par un fixateur non pontant comme le liquide de Clarke.

2.1.1. La préparation des sondes utilisées

2.1.1.1. Les sondes oligonucléotidiques complémentaires des séquences ALU

Les sondes oligonucléotidiques 5'-GAGTTCCAGGACACCAGGGCTA-3' et 5'-CGACCTCGAGATCT(CT)(AG)GCTCACTGCAA-3' respectivement complémentaires des séquences ALU humaine et murine sont fabriquées (N. Klein-Monhoven Laboratoire Commun de Biologie Moléculaire, Brabois CHU Nancy) sur un synthétiseur automatique (modèle 392[®], Applied Biosystems, Roissy, France) en utilisant la technique des phosphoramidites en phase solide, conformément au protocole du fabricant.

Les oligonucléotides sont détachés de la colonne où ils ont été synthétisés par un passage dans de l'ammoniaque à 33% (v/v), pendant 16 heures à +55°C, et sont ensuite purifiés par chromatographie en phase inverse sur une colonne OPC[®] (Applied Biosystems). L'éluat est séché puis mis en solution dans environ 100 µL de tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8. La concentration des oligonucléotides est appréciée par spectrométrie UV, à 260 nm (DU 64[®] Beckman). Leur concentration est exprimée en microgramme par microlitre et en picomole par microlitre. Un contrôle de la qualité de la synthèse est enfin effectué par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 20% (m/v), dénaturant (7 M urée) avec observation des bandes par transparence UV (UV shadowing).

Les oligonucléotides sont ensuite marqués par synthèse enzymatique à l'extrémité 3' d'une courte séquence contenant des dUTP porteurs de l'haptène digoxygénine.

La composition du milieu est la suivante :

- oligonucléotides : 100 pmol
- tampon " One for all" Pharmacia : 10 µL
- dATP : 1 nM
- dUTP -11- digoxygénine : 1 nM
- terminal tranferase (Promega) : 50 unités
- eau distillée : QSP 100 µL.

La réaction de marquage est arrêtée par addition au milieu d'1 μ L d'EDTA 0,5 M. Les sondes ne sont pas purifiées.

2.1.1.2. Les sondes d'ADN génomique total

Les ADN humains et murins sont préalablement extraits des tissus par la méthode dite à l'urée/SDS. Ils sont ensuite purifiés à l'aide d'une série d'extractions par le phénol et le chloroforme, avant d'être précipités dans un mélange éthanol absolu froid/acétate de sodium 3M, pH 5,2 (2/0,1) (v/v).

Les pelets ainsi obtenus sont ensuite solubilisés dans 500 μ L de tampon Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM, pH 8 et les ADN fragmentés en séquences longues de 200 à 1 000 paires de bases par sonication à 100 watts pendant 30 minutes.

Les ADN sont marqués par la technique de multi-amorçage au hasard (multirandom priming) dans le milieu suivant :

- 400 ng d'ADN soniqué
- 22 μ L d'eau distillée
- 4 μ L d'un cocktail d'oligonucléotides hexamères à 90 unités de DO/ml dans un tampon Tris HCl 0,01 M (Pharmacia, France)

L'ensemble est dénaturé pendant 10 minutes à +100°C puis brutalement refroidi par l'immersion du tube dans de l'azote liquide.

Le marquage des sondes s'effectue ensuite pendant 16 heures à température ambiante en ajoutant à ce milieu :

- 10 μ L d'une solution de dATP, dCTP, dGTP 0,3 mM (Pharmacia, France) dans un tampon Tris HCl 0,250 M pH 8,8, MgCl₂ 0,025 M
- 3 μ L d'une solution de digoxygénine 11-dUTP 0,4 mM (Sigma, France) dans un tampon Tris HCl 0,250 M pH 8,8, MgCl₂ 0,025 M
- 10 μ L de tampon Hepes-NaOH 1 M pH 6,6
- 4 unités de fragments de Klenow de la DNA polymérase I (Pharmacia, France).

Le marquage de la sonde est arrêtée par l'addition de 2 μ L d'EDTA 0,5M. Les sondes ne sont pas purifiées.

2.1.2. Les protocoles d'hybridation

2.1.2.1.L'hybridation avec les sondes oligonucléotidiques

Ces hybridations sont réalisées sur des coupes de tissus fixés au formol ou au liquide de Clarke. Après déparaffinage et hydratation, les coupes sont déprotéinisées de façon à faciliter la diffusion des sondes dans les noyaux.

Dans une première étape, l'ADN nucléaire est démasqué par la chaleur humide, grâce à un chauffage de 10 minutes à l'autoclave, des lames, immergées dans du tampon citrate/acide citrique 10 mM, pH 6. Les coupes sont ensuite brutalement refroidies dans de l'eau stérile. Les coupes sont ensuite traitées par une solution de protéinase K (Boehringer France) à 1 mg/ml dans du tampon Tris-HCl 0,1M, pH 8, EDTA 0,05 M pendant 15 minutes, les incubations étant séparées par deux lavages de 5 minutes à l'eau distillée. Enfin les coupes sont déshydratées dans de l'éthanol à 95° avant d'être séchées à l'air.

40 μ L de milieu d'hybridation [10% (v/v) formamide désionisé, 2 x SSC (1 SSC 0,15M NaCl, 0,015 M citrate trisodique), 10% sulfate de dextrane (Pharmacia) (m/v), 100 mg/ml ADN sperme de saumon soniqué] contenant 25 ng de sonde sont déposés sur les coupes entre lame et lamelle, les lamelles étant lutées à l'aide d'un ciment de caoutchouc (Rubber cement[®]). L'ADN nucléaire est ensuite dénaturé par chauffage des coupes à +95°C pendant 10 minutes puis l'hybridation est réalisée à +30°C pendant 3 heures.

Ces deux dernières étapes sont réalisées dans un thermocycleur (Hybaid[®]). Les coupes sont ensuite lavées successivement dans une solution de formamide désionisé à 50% dans du SSC 2X pendant 10 minutes, puis dans une solution de formamide à 50% dans du 1 SSC pendant également 10 minutes enfin dans du 1 SSC pendant 10 minutes. Elles sont finalement rincées dans du TBS pendant 10 minutes.

2.1.2.2.L'hybridation avec les sondes formées d'ADN génomique total

Ces hybridations peuvent donc également être réalisées sur des coupes de tissus fixés au formol ou au liquide de Clarke.

Dans une première étape, l'ADN nucléaire est également démasqué par la chaleur humide et l'utilisation de protéase (cf. précédent paragraphe). Les coupes sont déshydratées dans de l'éthanol à 95° avant d'être séchées à l'air.

40 µl de milieu d'hybridation [50% (v/v) formamide désionisé, 2 x SSC, 10% sulfate de dextrane (Pharmacia) (m/v), 100 mg/ml ADN sperme de saumon soniqué] contenant une quantité d'ADN marqué correspondant à 20 ng d'ADN génomique matriciel avant marquage sont ensuite déposés sur la coupe entre lame et lamelle, les lamelles étant lutées à l'aide d'un ciment de caoutchouc (Rubber cement[®]). Les ADN nucléaires et la sonde marquée sont simultanément dénaturés par un chauffage de 10 minutes à +95°C puis l'hybridation est réalisée à +37°C pendant 3 heures.

Ces deux dernières étapes sont réalisées dans un thermocycleur (Hybaid[®]). Les coupes sont ensuite lavées successivement dans une solution de formamide désionisé à 50% dans du SSC 2X pendant 10 minutes, puis dans une solution de formamide à 50% dans du 1 SSC pendant également 10 minutes enfin dans du 1 SSC pendant 10 minutes. Elles sont finalement rincées dans du TBS pendant 10 minutes.

2.1.3. La révélation immunohistochimique des hybrides

Après un lavage dans du tampon TBS et une incubation de 30 minutes dans une solution de caséine (Amersham, France) à 1% (m/v) dans du TBS dont la fonction est de bloquer les accrochages protéiques non spécifiques, les lames sont incubées dans une solution d'anticorps monoclonal antidigoxigénine [fragments F(ab)₂] marqué à la phosphatase alcaline (Boehringer), diluée au 1/100 dans du tampon TBS. L'incubation est réalisée pendant 1 heure à +4°C. Après deux lavages des lames de 5 minutes dans du tampon TBS, l'activité phosphatase alcaline est révélée par la technique de Mac Gadley dite du "BCIP-NBT".

La solution d'incubation est préparée de la façon suivante : 33 mg de 5-bromo-4-chloro-indolylphosphate (Sigma) et 25 mg de nitrobleu de tétrazolium (Sigma) dissous respectivement dans 100 ml de N,N diméthylformamide pur et 100 ml de N,N diméthylformamide à 70% (m/v) dans l'eau sont mis en solution dans 9,8 ml d'un tampon Tris-HCL 0,1M, pH 7,5, MgCl₂ 0,05M. Les lames sont incubées à l'abri de la lumière et à température du laboratoire. La révélation est suivie au microscope. Elle est d'environ 45 minutes pour les deux types de sondes si au préalable un démasquage par la chaleur humide et une protéase a été réalisé.

Après deux rinçages de 5 minutes à l'eau courante, les coupes sont enfin recouvertes d'une lamelle montée à l'aide d'une solution d'alcool polyvinylique (Sigma, PM 40 000) à 13% (m/v) dans du tampon Tris-HCl 0,1M pH 8,5.

Un témoin négatif par omission de la sonde dans le milieu d'hybridation est inclus dans chaque série de lames étudiées pour démontrer que les signaux nucléaires ne sont pas dus à un accrochage non spécifique.

Lorsque deux hybridations *in situ* sont réalisées successivement sur la même coupe, l'accrochage nucléaire des premières sondes est visualisée par la technique du "BCIP-NBT". Après la révélation, la seconde hybridation est effectuée en reprenant le même protocole d'hybridation *in situ* mais avec les deuxièmes sondes. Pour mettre ensuite en évidence l'accrochage de ces deuxièmes sondes, l'activité phosphatase alcaline est révélée par une technique au Naphthol-AS-MX phosphate, le sel de diazonium, faisant office d'agent de capture du naphthol libéré étant le Fast red TR. Le milieu d'incubation est préparé de la façon suivante : 2 mg de naphthol-AS-MX phosphate dissous dans 0,2 ml de N,N diméthyl formamide est mis en solution dans 9,8 ml de Tris-HCl 0,1 M pH 8,2. A cette solution est ensuite ajouté 1 ml de lévamisole 1M puis 10 mg de Fast red TR.

2.2. Les techniques immunohistochimiques

2.2.1. Le choix des antigènes étudiés

Les études sont réalisées sur des fragments des deux glioblastomes humains C et D prélevés chez le patient et sur les greffons intra-crâniens et pariéto-abdominaux dégreffés chez au moins un animal par génération de passage sauf pour les études en immunofluorescence où seulement quelques cas d'une génération de passage sont étudiés.

Les anticorps primaires (**tableau I-8**) sont sélectionnés afin :

1) d'étudier d'éventuelles variations de la différenciation des cellules tumorales, entre, d'une part, les tumeurs d'origine et, d'autre part, leurs greffons, après un ou plusieurs passages chez la souris. Pour ce faire, des anticorps dirigés contre la protéine gliale fibrillaire, la vimentine humaine, la protéine S 100, des filaments intermédiaires tels la kératine, l'antigène épithélial membranaire (EMA) et enfin, l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) sont utilisés.

2) d'analyser la propagation des cellules tumorales dans l'encéphale de souris. Chez le patient, il est, en effet, souvent difficile de différencier à la périphérie des tumeurs, les cellules tumorales pénétrant le parenchyme sain, de celles d'une gliose réactionnelle. Dans les greffons avec les colorations ordinaires, il est malaisé de reconnaître d'éventuelles cellules gliales murines résiduelles et de suivre une éventuelle dissémination mono ou paucicellulaire des astrocytes humains tumoraux. L'hybridation *in situ* est utilisée pour assurer la détection spécifique, sur coupes, des noyaux des espèces humaine et murine. Des techniques couplées, d'hybridation *in situ* (sondes humaine ou murine) et immunohistochimique, à l'aide de l'anticorps anti-vimentine humaine qui est spécifique d'espèce, ont été réalisées afin de s'assurer que tout astrocyte coloré par cet anticorps est tumoral. Ainsi, lorsque le nombre de cas à étudier est important, l'étude immunohistochimique par la vimentine humaine peut être utilisée si une vérification par l'hybridation *in situ* est faite sur quelques lames. En revanche, des cellules gliales tumorales indifférenciées peuvent ne pas exprimer la vimentine et la reconnaissance de l'espèce d'origine de telles cellules ne peut, dans ce cas, être effectuée que par l'hybridation *in situ*.

3) de caractériser le chimérisme des membranes vasculaires par la mise en évidence, au sein de ces structures, du collagène de type IV des membranes basales vasculaires. Pour ce faire, un antisérum, anticollagène de type IV, murin spécifique d'espèce (Stocker, institut Mérieux) et un anticorps monoclonal anticollagène de type IV humain mais non spécifique d'espèce (Dako) sont chacun utilisés sur des coupes adjacentes.

4) de comparer la cinétique des tumeurs dans sa composante proliférative chez les patients et dans les greffons développés chez la souris nude. L'estimation de la prolifération cellulaire est réalisée par la mise en évidence de la protéine Ki-67 à l'aide de l'anticorps MIB-1, non spécifique d'espèce. Cette protéine, exprimée pendant les phases G1, S, et G2 du cycle, a une durée de vie courte (20 minutes). Elle est donc détruite dès la fin de la mitose. La méthode à l'IDU (51 – 54, 71). reste la méthode de référence mais les résultats obtenus avec l'anticorps MIB-1 ne sont pas différents (10), ce qui permet donc une analyse satisfaisante de la prolifération cellulaire des tumeurs, chez l'homme et chez la souris, sans avoir à injecter avant l'exérèse chirurgicale de l'IDU au patient ce qui pourrait poser un problème éthique (122, 124).

5) de confirmer les troubles de la barrière hémato-encéphalique dans les tumeurs cérébrales greffées. A l'état physiologique, la barrière hémato-encéphalique n'est pas franchie par les protéines. Le passage du bleu d'Evans, une molécule de petite taille, dans les tumeurs greffées suggère une rupture de cette barrière. Le passage de macromolécules de haut poids moléculaire est alors étudié par la recherche immunohistochimique de fibrinogène (ou de la fibrine car l'anticorps utilisé ne différencie pas ces deux molécules) et d'Ig G murines dans la matrice extracellulaire tumorale.

6) de rechercher l'expression de certains marqueurs tumoraux dont l'expression est considérée, chez l'homme, comme corrélée au pronostic :

- l'expression de l'oncogène *bcl-2*,
- l'expression du gène suppresseur de tumeur *p53* (l'anticorps utilisé reconnaît les formes mutantes et sauvages),
- le facteur de croissance endothélial vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor* : VEGF), également appelé facteur de perméabilité vasculaire (*Vascular Permeability Factor* : VPF).

Un témoin positif humain a été inclus dans chaque série d'études afin de valider la recherche de l'expression de l'oncogène *bcl-2* (lymphome malin non hodgkinien de type folliculaire) et de l'expression du gène *p53* (adénocarcinome colique). La présence du VEGF a préalablement été recherchée sur des coupes tissulaires de cerveaux sains humains et murins.

Tableau I-8

Anticorps primaires utilisés pour caractériser le chimérisme, la différenciation, la prolifération et la vascularisation des greffons humains

Anticorps primaires	Source	Référence produit	Fournisseur	Fixation	Dilution	Prétraitement
GFA	R	Réf. Z 334	Dako	F ou C	1/800	Non
			(Trappes - France)			
Vimentine humaine	M	Clône V9	Dako	F ou C	1/400	A
		Réf. M 0725	(Trappes - France)			
PS 100	R	Réf. Z 311	Dako	F ou C	1/150	Non
			(Trappes - France)			
Cytokératines	M	Clône KL 1	Immunotech (Marseille -	F ou C	1/300	Non
		Réf. 1918	France)			
ACE	M	Clône CEJ 065	Immunotech (Marseille -	F ou C	1/600	Non
		Réf. 1242	France)			
EMA	M	Réf. M 613	Dako	F ou C	1/320	Non
			(Trappes - France)			
Fibrinogène humain	G	Réf. 106	Institut Pasteur	Non	1/20	Non
			(Marne la Coquette -			
			France)			
IgG murines	G	Réf. 75031	Institut Pasteur	Non	1/20	Non
(marquage FITC)			(Marne la Coquette -			
			France)			
Collagène IV humain	M	Réf. M0785	Dako	F ou C	1/10	E
			(Trappes - France)			
Collagène IV murin	R	Réf. 20451	Institut Merieux	F ou C	1/1500	E
			(Lyon - France)			
Antigène nucléaire Ki-67	M	Clône MIB-1	Immunotech (Marseille -	F ou C	1/400	A
		Réf. 0505	France)			
Expression de p53	M	Réf. M7001	Dako	F ou C	1/3000	A
			(Trappes - France)			
Expression de bcl-2	M	Réf. M 887	Dako	F ou C	1/160	A
			(Trappes - France)			
VEGF	M	Réf. PC 37	France Biochem	F ou C	1/40	A
			(Neudon - France)			

Abréviations :

GFA : Protéine Gliale Fibrillaire

PS 100 : Protéine S 100

ACE : Antigène Carcino-Embryonnaire

EMA : Antigène Epithélial Membranaire

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

FITC : Fluorescéine IsoThioCyanate

M : Monoclonal

R: Antisérum lapin

G : Antisérum chèvre

A : Prétraitement thermique des coupes à l'autocuiseur pendant 5 minutes dans un tampon citrate 10 mM, pH 6,0

HCl : Prétraitement des coupes par hydrolyse acide des protéines nucléaires pendant 15 minutes à température ambiante dans de l'eau distillée contenant HCl 4N

E : Prétraitement des coupes par incubation pendant 15 minutes à +37°C dans du tampon CaCl₂ à 4 _pH 7,8, contenant 0,1% de trypsine

F : Formol à 10% (m/v) dans du tampon PBS

C : Clarke : acide acétique glacial/éthanol (1/3) (v/v)

2.2.2. La fixation des tissus

Les techniques immunohistochimiques (à l'exception de celles concernant le fibrinogène et les IgG murines) sont réalisées sur des coupes de 5 µm d'épaisseur de tissus fixés au formol à 10% (v/v) dans du tampon phosphate 0,1M, pH 7,4 et inclus à la paraffine. Le fibrinogène et les IgG sont recherchés sur des coupes de tissus congelés dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide et conservés à -80°C.

2.2.3. La détection des antigènes sur coupes de tissus inclus à la paraffine

Après déparaffinage et hydratation, les coupes sont immergées dans du tampon phosphate 100 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tween 20 : 0,1% (v/v) (tampon PBS-tween).

La technique de mise en évidence indirecte des anticorps primaires fait appel tout d'abord à un anticorps anti-IgG de souris ou de lapin, suivant l'espèce d'origine de l'anticorps primaire, biotiné puis à une streptavidine peroxydase (109).

Les principales étapes sont les suivantes :

- 1) Après un éventuel pré traitement des coupes destinées à démasquer l'antigène si celui-ci est sensible à la fixation (voir tableau des anticorps), chaque image est encerclée par un film de silicone, afin de limiter l'écoulement des solutions d'incubation, responsable d'un dessèchement des tissus.
- 2) L'accrochage des anticorps sur des sites non antigéniques, à l'origine d'un bruit de fond, est ensuite inhibé par une incubation des coupes à la température ambiante dans de l'albumine sérique bovine à 3% (m/v) dans du tampon PBS-Tween pendant 30 minutes.
- 3) Après élimination de l'excès de solution albumineuse, les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon PBS pH 7,6 contenant 1% (m/v) d'albumine sérique bovine, 0,1% (m/v) d'azide de sodium, 0,06% (m/v) de n-éthyl-maléïmide et 20% (v/v) de glycérol, pendant 15 heures, en chambre humide, à +4°C à l'abri de la lumière.

4) Après deux brefs rinçages réalisés à la pissette avec un tampon PBS-Tween, les coupes sont incubées dans une solution d'anticorps secondaire biotiné (chèvre anti-IgG de souris pour les monoclonaux et chèvre anti-IgG de lapin pour les polyclonaux), tous dilués au 1/200 dans du tampon PBS-Tween.

5) Après deux lavages de 5 minutes dans du tampon PBS-Tween, une inhibition de l'activité peroxydasique endogène est réalisée par l'incubation des coupes, pendant 15 minutes à la température ambiante, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 6% (v/v) dans l'eau déminéralisée.

6) Après deux brefs rinçages réalisés à la pissette avec un tampon PBS-Tween, les coupes sont incubées 30 minutes à la température ambiante, dans une solution au 1/200 de streptavidine-peroxydase (réactif P 397 Dako), dans du tampon PBS-Tween.

7) Après deux lavages de 5 minutes dans du tampon PBS-Tween, l'activité peroxydasique est enfin révélée par la technique classique au tétrahydrochlorure de di-aminobenzidine (DAB) (Aldrich 26.189-0). Le milieu de révélation est préparé en dissolvant successivement 6 mg de DAB, 200 μ L de MRX 50 et enfin 18 μ L d' H_2O_2 à 6% (v/v) dans 9,8 ml d'un tampon Tris-HCl 50 mm, pH 7,6. La révélation est contrôlée au microscope et arrêtée par immersion de la lame dans le tampon.

8) Les coupes sont ensuite contre-colorées à l'hématéine de Harris diluée au 1/2 pendant 20 secondes puis rincées à l'eau courante et bleuies dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8.

9) Après déshydratation dans l'éthanol et passage dans le toluène, les lamelles sont montées à l'Eukitt.

Un témoin négatif par omission de l'anticorps primaire est inclus dans chaque série de lames étudiées.

2.2.4. La détection immunohistochimique de deux antigènes différents sur une même coupe en paraffine

- Afin de savoir si les cellules en division sont humaines ou murines, deux immunomarquages successifs avec des anticorps dirigés respectivement contre la vimentine humaine puis la protéine Ki-67 sont réalisés sur les mêmes coupes.
- Afin d'apprécier le rapport entre les cellules tumorales humaines et les membranes basales des vaisseaux sanguins, deux immunomarquages successifs avec des anticorps dirigés respectivement contre la vimentine humaine puis le collagène IV murin sont réalisés sur les mêmes coupes.

Le système de révélation des anticorps primaires dans les deux cas est le même mais réalisé successivement sans que pour autant l'intensité de la couleur de la première révélation soit atténuée par les traitements ultérieurs. Il fait appel à un antisérum de lapin anti-immunoglobulines de souris biotiné, dilué au 1/200 dans du tampon TBS-Tween, puis à une streptavidine phosphatase alcaline diluée au 1/100 dans le même tampon. L'application du deuxième anticorps primaire est précédée par une immersion des lames dans de l'HCl 4N pendant 20 minutes, ayant pour but, d'une part d'inhiber l'activité phosphatase alcaline de la première étape. Les activités phosphatase alcaline sont, dans les deux cas, révélées par une technique au Naphthol-AS-MX phosphate, les sels de diazonium, étant respectivement le Fast red TR (un chromogène rouge) pour la vimentine et le Fast blue BB (un chromogène bleu) pour l'iododésoxyuridine. Les milieux d'incubation sont préparés de la façon suivante : 2 mg de naphthol-AS-MX phosphate dissous dans 0,2 ml de N,N diméthyl formamide sont mis en solution dans 9,8 ml de Tris-HCl 0,1 M pH 8,2. A cette solution sont ensuite ajoutés 1 ml de lévamisole 1M puis 10 mg de Fast red TR ou de Fast blue BB. Les révélations sont surveillées au microscope. La deuxième révélation est suivie d'un rinçage à l'eau courante. Les coupes, séchées à l'air, sont ensuite recouvertes d'une lamelle montée avec une solution d'alcool polyvinylique à 13% (v/v) dans du Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5.

Un témoin négatif par omission des anticorps primaires est inclus dans chaque série de lames étudiées.

2.2.5. La détection combinée, par hybridation *in situ* et immunohistochimie du génotype et du phénotype sur une même coupe en paraffine

Afin de savoir si les cellules humaines expriment toutes la vimentine humaine, il est possible d'employer successivement les deux techniques, hybridation *in situ* puis immunohistochimie, sur une même coupe. Cette double technique permet également de nombreuses autres combinaisons en utilisant également les sondes murines et l'anticorps anti-GFA.

Chacune des deux techniques est réalisée en suivant le protocole habituel. L'hybridation *in situ* est d'abord effectuée, visualisée par la technique du "BCIP-NBT". L'immunohistochimie suit et, selon le système enzymatique choisi pour la révélation, l'activité phosphatase alcaline est révélée par une technique au Naphthol-AS-MX phosphate ou l'activité peroxydasique révélée par la technique au tétrahydrochlorure de diaminobenzidine.

2.2.6. La détection de la fibrine et des Ig G murines sur coupes à congélation

Les molécules sont mise en évidence par une technique d'immunofluorescence directe à l'aide de deux anticorps de chèvre dirigés respectivement contre le fibrinogène et les Ig G murines. Les deux anticorps utilisés reconnaissent indifféremment les protéines murines et humaines.

Pour ce faire, des coupes épaisses de 5 μm , réalisées au Cryostat, sont recueillies sur lames Superfrost[®], puis séchées pendant 10 minutes à l'air et réhydratées par immersion dans du tampon PBS. Les coupes sont ensuite incubées pendant 30 minutes à la température du laboratoire, à l'abri de la lumière, avec des solutions, soit de l'anticorps de chèvre antifibrinogène marqué à la fluorescéine à la concentration de 1/20 dans du tampon PBS, soit de l'anticorps anti-IgG marqué par le même fluorochrome et à la concentration de 1/20 dans le même tampon que celui utilisé pour l'anticorps précédent.

Après deux lavages de 5 minutes dans le tampon PBS, les noyaux sont contre-colorés par passage des coupes pendant 15 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (60 μL d'une solution à 10 mg/mL (Sigma) dans 100 mL d'eau distillée).

Après deux lavages de 5 minutes dans de l'eau distillée, les coupes sont recouvertes d'une lamelle montée avec une solution d'alcool polyvinylique (Sigma PM 40 000) à 13% (m/v) dans du Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 puis étudiées au microscope en lumière UV.

3. RESULTATS

3.1. L'étude du chimérisme cellulaire entre les greffons humains et l'hôte murin

L'analyse des coupes par les techniques d'hybridation *in situ*, simples et couplées, permet une analyse des rapports qui s'établissent entre les cellules tumorales humaines et les cellules de l'hôte quelle que soit la localisation des transplants pariéto-abdominaux et intra crâniens. Tous les greffons, orthotopiques et hétérotopiques, sont composés d'une double population cellulaire. Le contingent humain est exclusivement constitué des cellules tumorales gliales. En revanche, le stroma, qui est habituellement absent dans les gliomes, est représenté par de rares cellules murines non atypiques. Il est constitué, d'une part, des cellules endothéliales et des péricytes du réseau vasculaire anarchique de la tumeur et, d'autre part, d'un nombre réduit de cellules non vasculaires, isolées parmi les cellules tumorales humaines et qui correspondent, vraisemblablement à la gliose réactionnelle murine (taux < 1% des cellules formant le greffon) (**planche 4, figures E et F**). Cette gliose murine qui ne paraît pas jouer un rôle significatif dans l'édification autonome du greffon est constituée soit de cellules qui ont été intégrées dans la tumeur soit de cellules réactionnelles ayant migré vers la masse tumorale dense.

La réalisation de techniques couplées qui associent une détection des cellules tumorales par l'hybridation *in situ* à l'aide de sondes humaines et par l'immunodétection de la vimentine humaine permet de démontrer que **toutes les cellules dont les noyaux sont humains produisent, quoiqu'en quantité variable, de la vimentine**. Les cellules murines, notamment l'endothélium des vaisseaux des réseaux microcirculatoires tumoraux ne sont en revanche, jamais révélées par l'anticorps anti-vimentine humaine qui est parfaitement spécifique d'espèce (**planche 4, figure F**).

Les greffons hétérotopiques sont constitués d'une masse bien limitée par rapport aux tissus murins sans infiltration à distance de la masse tumorale principale. On note en revanche des aspects d'insinuation des cellules tumorales humaines dans le tissu musculaire, par contiguïté mais il n'existe pas de contingent à cellules isolées. Les muscles et le conjonctif sont refoulés et atrophiques, constituant une pseudo-capsule autour du nodule tumoral (**planche 4, figure A**).

Au niveau des greffons orthotopiques, il existe en revanche un contingent de cellules tumorales isolées, s'insinuant dans le parenchyme cérébral de la souris (**planche 4, figure B**), parfois à grande distance de la masse tumorale principale. Ceci est particulièrement visible avec certains greffons orthotopiques du glioblastome D (D1d et D1e). Au centre des tumeurs, les astrocytes tumoraux ont un cytoplasme souvent abondant et des prolongements trapus, parfois multiples. Le nombre des prolongements et la taille des astrocytes infiltrant le parenchyme cérébral sont plus réduits que ceux constituant la masse tumorale principale. Ces prolongements apparaissent uniques ou multiples et des aspects de cellule bipolaire sont fréquemment découverts, notamment dans les territoires d'extension tumorale dans la substance blanche hémisphérique ou du corps calleux (**planche 4, figure D**). Dans un tiers des cas environ, ces prolongements sont absents et le cytoplasme apparaît alors limité à une fine couronne péri-nucléaire, mais pour prouver l'absence de tout prolongement, il faudrait alors entreprendre une étude sur des coupes en série.

Lorsque les volets sont fermement immobilisés, la propagation tumorale s'effectue sur toute la périphérie des tumeurs. De nombreuses cellules humaines sont alors observées, dispersées dans la substance blanche du centre ovale, du corps calleux, dans les espaces de Virchow Robin, autour du canal de l'épendyme (**planche 4, figure C**) et même dans les régions immédiatement sous piales des circonvolutions situées à distance de la masse tumorale principale. Dans une observation, des astrocytes tumoraux sont même décelés dans des axes conjonctifs des plexus choroïdes. Lorsque le volet osseux n'est pas immobilisé, l'extension des cellules gliales humaines dans le parenchyme cérébral sain est limitée à la base d'implantation de la tumeur. Cette propagation tumorale ne s'effectue que sur environ 1 mm de profondeur seulement.

La protéine gliale fibrillaire acide (GFA) des astrocytes humains et murins peut être détectée sans spécificité d'espèce par l'anticorps anti-GFA. L'analyse de coupes histologiques

adjacentes traitées l'une avec l'anticorps anti-vimentine humaine, l'autre avec l'anticorps anti-GFA permet de constater que les tumeurs sont bordées à leur périphérie par une couche pluristratifiée d'astrocytes marqués par l'anticorps anti-GFA, parfaitement différenciés, répartis de façon très régulière mais non reconnus avec l'anticorps anti-vimentine humaine. Les prolongements astrocytaires, longs et ramifiés, entrent, à leur partie distale, en contact avec ceux des cellules adjacentes. Ces cellules ne sont pas d'origine humaine et peuvent donc correspondre à une gliose réactionnelle murine (**planche 3, figure G**). En revanche, dans la mesure où les astrocytes tumoraux sont reconnus par l'anticorps anti-GFA, la présence d'une gliose réactionnelle murine au sein même des masses tumorales ne peut être appréciée par cette technique et requiert l'utilisation d'une technique d'hybridation *in situ*.

3.2. L'étude de la différenciation tumorale

Le marquage des cellules tumorales ou son absence avec les anticorps dirigés contre la vimentine, la protéine gliale fibrillaire, l'antigène épithélial membranaire, l'antigène carcino-embryonnaire, la protéine S100 et les filaments intermédiaires de kératine ainsi que l'intensité, le cas échéant, des signaux obtenus, sont consignés dans le **tableau I-9**. De l'analyse de ce tableau, il apparaît que les phénotypes immunohistochimiques, pour les antigènes étudiés, sont stables et ne sont affectés ni par les transplantations successives ni par le siège de l'implantation des greffons.

Tableau I-9
Immunoréactivité des tumeurs originelles et des greffons C et D

Lignée de passage		Vimentine		GFA		Kératine		PS 100	
C0 - B96 2144		Cell. tumorales ++ Astrocytes réactionnels +++		+++		-		Cell. tumorales - Astrocytes réactionnels ++	
D0 - B96 2015		+++		+++		-			
B1	B1a	Abdomen		Abdomen		Abdomen		Abdomen	
C1	C1a	Abdomen +		Abdomen +++		Abdomen -		Abdomen -	
	C1b	Abdomen +++		Abdomen +++		Abdomen -		Abdomen ++	
	C1c	Abdomen ++		Abdomen +++		Abdomen -		Abdomen +	
D1	D1c	Cerveau +++		Cerveau +++		Cerveau -		Cerveau +++	
	D1a	Abdomen +		Abdomen +++		Abdomen -		Abdomen +	
	D1b	Abdomen +		Abdomen +++		Abdomen -		Abdomen ininterprétable	
C2	C2a	Abdomen +++		Abdomen ++		Abdomen -		Abdomen +	
D2	D2h	Abdomen +++	Cerveau +++	Abdomen ++	Cerveau ++	Abdomen ±	Cerveau ±	Abdomen ++	Cerveau ++
C3	C3a	Abdomen +++		Abdomen +++		Abdomen -		Abdomen ++	
D3	D3a	Abdomen +++	Cerveau +++	Abdomen +	Cerveau ++	Abdomen -	Cerveau -	Abdomen ++	Cerveau +++
	D3b	Abdomen +++	Cerveau +++	Abdomen +	Cerveau ++	Abdomen -	Cerveau -	Abdomen +	Cerveau ++
C4	C4d	Abdomen +++	Cerveau +++	Abdomen +++	Cerveau +++	Abdomen non étudié	Cerveau non étudié	Abdomen ++	Cerveau ++
D4	D4b	Abdomen +++	Cerveau Pas de tumeur	Abdomen +++	Cerveau astro réac +++	Abdomen non étudié	Cerveau non étudié	Abdomen ++	Cerveau astro réac +++
	D4c	Abdomen +++	Cerveau +++	Abdomen +++	Cerveau +++	Abdomen non étudié	Cerveau non étudié	Abdomen ++	Cerveau +++

Appréciation semi-quantitative de l'immunoréactivité :
- : signal nul
+ : signal focal, limité à quelques cellules
++ : signal modéré, observé dans environ 50% des cellules
+++ : signal intense, observé dans 100% des cellules

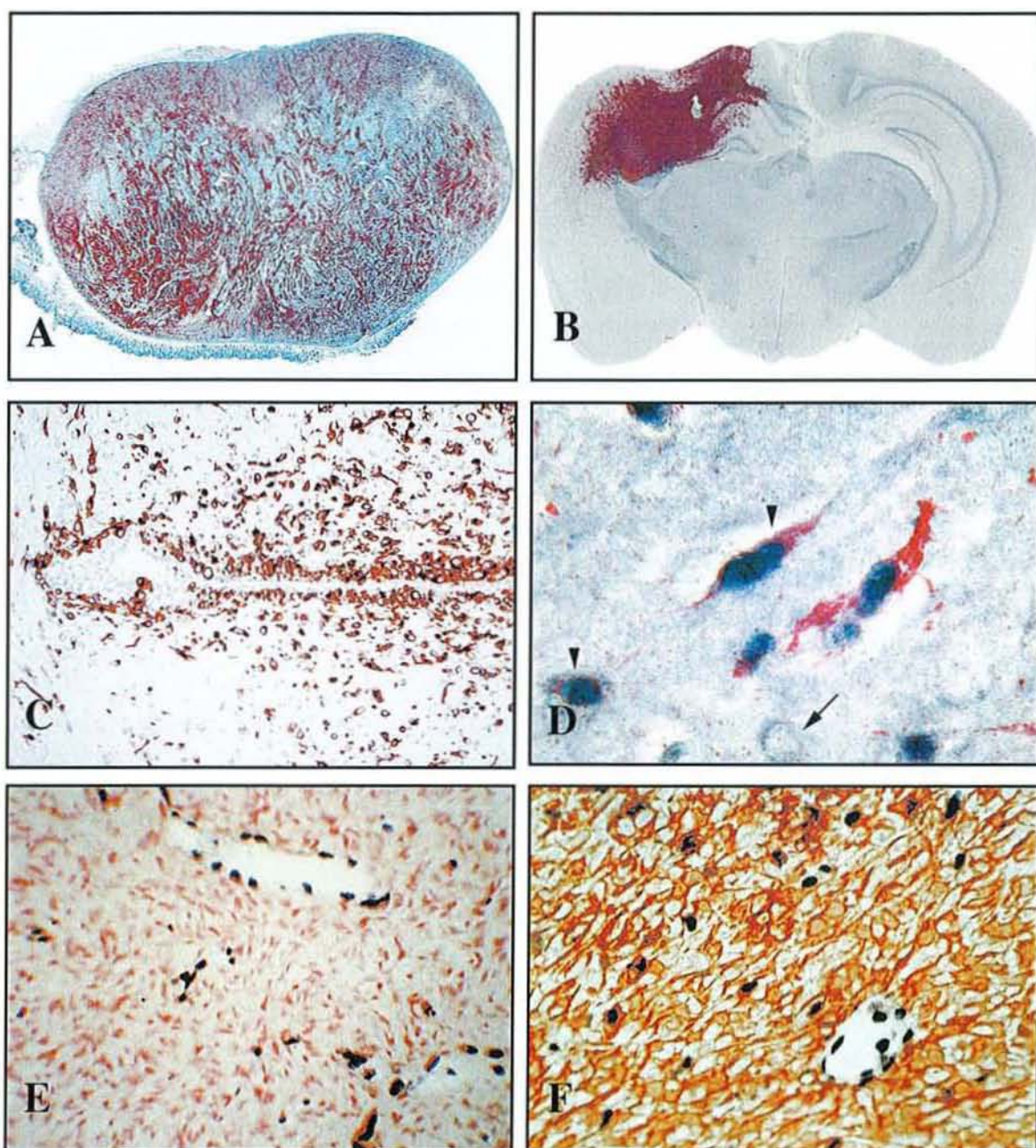


PLANCHE 4

La microscopie - le chimérisme cellulaire

A et B : La greffe hétérotopique du glioblastome E se développe et prend l'aspect d'une tumeur bien limitée, non infiltrante (coupe montée d'une tumeur de 2 cm de grand axe). La greffe orthotopique du même glioblastome se développe et prend l'aspect d'une tumeur à double composante, dense et infiltrante (coupe montée d'un cerveau de 1 cm de grand axe) - immunodétection de la vimentine humaine (péroxydase, H₂O₂ / DAB).

C : Des cellules tumorales isolées en situation péri-épendymaire - immunodétection de la vimentine humaine (péroxydase, H₂O₂ / DAB), X200.

D : Les cellules tumorales isolées (tête de flèche) expriment la vimentine humaine - immunodétection couplée de la vimentine humaine (phosphatase alcaline, fast red) et hybridation in situ humaine (phosphatase alcaline, NBT/BCIP). Les cellules murines ne sont pas reconnues (flèche), X1000.

E : La double hybridation in situ révèle les cellules tumorales humaines (phosphatase alcaline, fast red) et les cellules endothéliales murines (phosphatase alcaline, NBT/BCIP) dans le tissu tumoral dense d'un greffon orthotopique, X400.

F : Une méthode combinée d'hybridation in situ et d'immunohistochimie met en évidence les cellules tumorales qui exprime la vimentine humaine (péroxydase, H₂O₂ / DAB) et l'endothélium, reconnu par les sondes murines(phosphatase, NBT/BCIP), X400.

3.3. L'étude de la prolifération cellulaire

3.3.1. Les résultats qualitatifs

Quand la tumeur étudiée ne contient pas de plages de nécrose, les cellules en cycle apparaissent uniformément réparties. Le pourcentage des cellules marquées n'apparaît notamment pas plus élevé autour des vaisseaux qu'à la périphérie de la tumeur. Il n'en va pas de même dans les tumeurs les plus volumineuses, siège de plages de nécrose focale. Dans ce cas, en effet, et quel que soit la localisation du greffon, les cellules proliférantes sont préférentiellement situées autour des vaisseaux, loin de la nécrose.

Sur les coupes (souris D3c) où un double marquage à l'aide d'un anticorps Mib-1 puis d'un anticorps anti-vimentine humaine a été réalisé, il apparaît :

- 1) que des cellules en cycle sont présentes dans la population des cellules tumorales isolées infiltrant le parenchyme sain et dans la masse tumorale principale, et que les cellules d'aspect gémistocytaire sont rarement en cycle (**planche 5, figure A**)
- 2) que le pourcentage des cellules non tumorales de l'hôte, non reconnues par l'anticorps anti-vimentine, entrées dans le cycle cellulaire, est plus élevé que celui observé au niveau d'encéphales de souris témoins (**planche 5, figure A**).

De la comparaison des résultats des doubles marquages d'une part, et de ceux des immunomarquages réalisés avec l'anticorps anti-protéine gliale fibrillaire d'autre part, il apparaît que ces cellules murines non tumorales en cycle sont essentiellement des astrocytes réactionnels, très nombreux aux confins de la masse tumorale principale mais également présents dans la substance blanche ou le cortex, très à distance de la tumeur dans des territoires parfois indemnes d'infiltration tumorale.

En revanche, le pourcentage des cellules endothéliales murines en cycle est d'environ 1%. Cette valeur faible traduit malgré tout une prolifération anormalement élevée par rapport aux zones de tissu normal. Enfin, aucune cellule du plexus choroïde dont l'axe conjonctif est infiltré par le processus tumoral n'est révélée par l'anticorps MIB 1.

3.3.2. Les résultats quantitatifs

Les marquages obtenus à l'aide de l'anticorps MIB-1 a été quantifié afin d'apprécier le pourcentage des cellules tumorales entrées dans le cycle de division cellulaire. Les indices de marquage sont établis au niveau des masses tumorales (tumeurs abdominales ou intracérébrales). La densité cellulaire élevée des tumeurs, l'absence de stroma autre que vasculaire et l'identification facile des cellules endothéliales, qui ne sont pas prises en compte, simplifient le dénombrement des noyaux marqués. Cette numération est effectuée à l'aide d'un oculaire à intégration à l'objectif 40. Du fait de la taille variable des échantillons et de l'hétérogénéité de répartition des cellules tumorales, il n'est pas possible de compter un nombre fixe de cellules. Par convention, les comptes sont réalisés à partir de plages cellulaires denses, non nécrotiques afin d'apprécier les zones morphologiquement les moins modifiées par des phénomènes vasculaires.

Le **tableau I-10** montre que le pourcentage des cellules en cycle est plus élevé dans les greffons que dans les tumeurs chez les patients. Par ailleurs, l'indice de prolifération croît lors des passages successifs mais de manière inhomogène d'un animal à l'autre et d'un site d'implantation à l'autre.

Lignée de passage	Ki67 (anticorps MIB-1)	
Glioblastome C chez le patient	3%	
Glioblastome D chez le patient	7%	
C1b	Abdomen : 12,8%	
D1a	Abdomen : 42,3%	
D2h	Abdomen : 30%)	
C3a	Abdomen inidentifiable	
D3c	Abdomen 25,8%	Cerveau 30,5%
C4d	Abdomen 33,5%	Cerveau 25,9%
D4c	Abdomen 44,5%	Cerveau 24,3%

Tableau I-10
Prolifération cellulaire évaluée avec l'anticorps MIB-1

Afin de vérifier que les deux composantes, dense et à cellules isolées, d'un greffon ont un indice de prolifération semblable, une analyse complémentaire est réalisée pour comparer statistiquement les indices relevés au centre de la lésion et à sa périphérie, dans les territoires infiltrés. La recherche d'une différence entre les indices a été réalisée par le T-test de Student.

Cette étude de comparaison entre les indices de prolifération cellulaire est effectué sur des greffons du glioblastomes D et sur des greffons du glioblastome E (jusque là non explorés). Ce travail, développé au cours des travaux d'imagerie (cf. deuxième partie de thèse) est rapporté dans ce chapitre afin d'en simplifier la lecture.

L'analyse des résultats permet de valider statistiquement l'impression première d'une prolifération identique dans les deux territoires étudiés. Les indices mesurés varient de 22 à 55,33% pour les greffons du glioblastome D et de 22,75 à 44,5% pour les greffons du glioblastome E, soit en moyenne 39 contre 33%. Pour chacun des transplants étudiés, les indices de prolifération ne varient pas significativement selon le compartiment cellulaire, dense ou périphérique, à cellules isolées ($p=0.32$) (**tableau I-11**).

Localisation		Tissu dense (n = 13)	Marges d'infiltration (n = 13)	P*
Indice (%)	Moyen	34,3	36,5	0,32
	Médian	32,0	34,0	
	Q1-Q3	28,0-40,5	29,0-44,5	
	Range	22,0-55,3	24,0-55,3	

* paires appariées par T-test de Student ; Q1-Q3 : écart entre le premier et le troisième quantile

Tableau I-11
Les indices d'activité de prolifération des cellules tumorales selon leur localisation

3.4. L'étude de la vascularisation tumorale et cérébrale

3.4.1. Les troubles de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique

Des dépôts extra-vasculaires, denses abondants, discontinus et irrégulièrement répartis de fibrinogène (ou de fibrine) et d'Ig G murines sont observés au sein des greffons étudiés, sur celui à volet ouvert (D3b) mais aussi sur celui à volet fermé (D4c). La topographie des signaux obtenus avec les deux anticorps est strictement superposable. En revanche, au niveau du parenchyme sain, aucun trouble de perméabilité n'a été découvert (**planche 5, figure B**).

3.4.2. Les membranes basales du réseau vasculaire intra-tumoral

L'anticorps anti-collagène de type IV humain croise pour le collagène de type IV murin. La présence résiduelle du collagène humain ne peut donc être affirmée ou infirmée par cette technique. En revanche, l'utilisation d'un anticorps anti-collagène de type IV murin spécifique d'espèce confirme l'origine murine de la membrane basale vasculaire. Les études immunohistochimiques démontrent ainsi la présence d'une basale, continue, souvent épaissie et parfois dédoublée, dans la paroi des vaisseaux de la tumeur. Par ailleurs, l'organisation vasculaire est beaucoup plus aisée à apprécier sur ces préparations que sur des coupes colorées à l'HES. Sur les coupes ainsi traitées, le lit vasculaire intra-tumoral est formé d'un réseau anarchique de vaisseaux dont le calibre irrégulier est le plus souvent très supérieur à la normale, mais les vaisseaux de la taille d'un capillaire sont en nombre très réduit par rapport au parenchyme cérébral sain. Ainsi, les distances inter-vasculaires sont beaucoup plus importantes dans la tumeur (parfois supérieures à 200 μm) comparativement à celles observées dans le cerveau sain, quelle que soit la région étudiée. Un même vaisseau semble donc irriguer un volume plus important que dans les territoires non envahis et de toute évidence beaucoup plus cellulaire ce qui entraîne nécessairement une souffrance des cellules tumorales lorsque les vaisseaux sont très éloignés (**planche 5, figures C et D**). Au niveau de l'interface entre le greffon tumoral et l'hôte, dans les territoires peu infiltrés, on observe des vaisseaux sanguins congestifs, de calibre augmenté mais régulier, sans anomalies morphologiques notables au niveau des membranes basales (**planche 5, figure E**). Dans les territoires infiltrés par des cellules tumorales isolées, la technique d'immunodétection combinée de la vimentine humaine et du collagène IV permet d'observer une disposition préférentielle des astrocytes néoplasiques autour de capillaires dépourvus d'anomalies morphologiques du type de celles visibles dans la composante cellulaire dense. En revanche, on note une congestion très nette (**planche 5, figure F**). Au total, les vaisseaux sanguins

situés en périphérie de la tumeur ne paraissent pas augmenter en nombre mais sont soumis, quel que soit leur calibre, à des phénomènes de vasodilatation intense au contact des cellules tumorales. Ces caractéristiques sont comparables à celles observées au niveau de la vascularisation péri-tumorale des greffons extra-crâniens à la différence près que dans ce cas il n'existe pas de dissémination des cellules tumorales à distance mais juste une insinuation limitée au contact de cellules musculaires striées. Dans ce cas, seuls les vaisseaux situés dans le voisinage immédiat du greffon sont congestifs.

3.5. L'étude des marqueurs tumoraux

3.5.1. L'expression du VEGF

Pour les deux espèces, on constate, sur les coupes des cerveaux témoins normaux, un marquage très focal, atteignant des astrocytes isolés, au niveau de la couche moléculaire sous-piale et, en profondeur, à proximité de vaisseaux. Chez la souris, il existe en outre un marquage au niveau du tronc cérébral et du cervelet. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été publié dans la littérature (95, 129).

Les deux glioblastomes C et D prélevés chez l'homme et leurs greffons expriment le VEGF qui est détecté exclusivement dans les péricaryons et les prolongements d'environ un tiers des astrocytes tumoraux. Dans les greffons, les cellules marquées sont localisées préférentiellement, mais non exclusivement, dans les structures pseudopalissadiques périnécrotiques (**planche 5, figure G**). Le VEGF est également détecté au sein d'un petit nombre d'astrocytes, dans la substance blanche hémisphérique ou à la périphérie des circonvolutions, immédiatement sous la léptoméninge.

3.5.2. Les produits d'expression des gènes *p53* et *bcl-2*

Les marquages nucléaires des cellules tumorales révélés par les anticorps dirigés contre les produits de l'expression des gènes *p53* et *bcl-2*, sont quantifiés en utilisant la même méthode que celle des indices de prolifération cellulaire. Il a par ailleurs préalablement été

vérifié que ces deux anticorps ne produisaient aucun signal sur des coupes tissulaires de cerveaux témoin humain et murin.

L'expression de ces gènes n'apparaît pas histologiquement modifiée (**tableau I-12**).

Lignée	p53			bcl-2	
CO B96 2144	69/1067 - 6,5%			< 1%	
DO B96 2015	157/1107 - 14,2%			< 1%	
C1	C1b	Abdomen < 1%		Abdomen < 1%	
D1	D1a	Abdomen < 1%		Abdomen < 1%	
D2	D2h	Abdomen < 1%	Cerveau < 1%	Abdomen < 1%	Cerveau < 1%
C3	C3a	Abdomen < 1%		Abdomen < 1%	
D3	D3c	Abdomen < 1%	Cerveau 25/555 - 4,5%	Abdomen < 1%	Cerveau < 1%
C4	C4d	Abdomen < 1%	Cerveau < 1%	Abdomen < 1%	Cerveau < 1%
D4	D4c	Abdomen < 1%	Cerveau 23/681 - 3,10%	Abdomen < 1%	Cerveau < 1%

Tableau I-12

Indices de marquage obtenus pour les anticorps dirigés contre l'expression des gènes p53 et bcl-2.

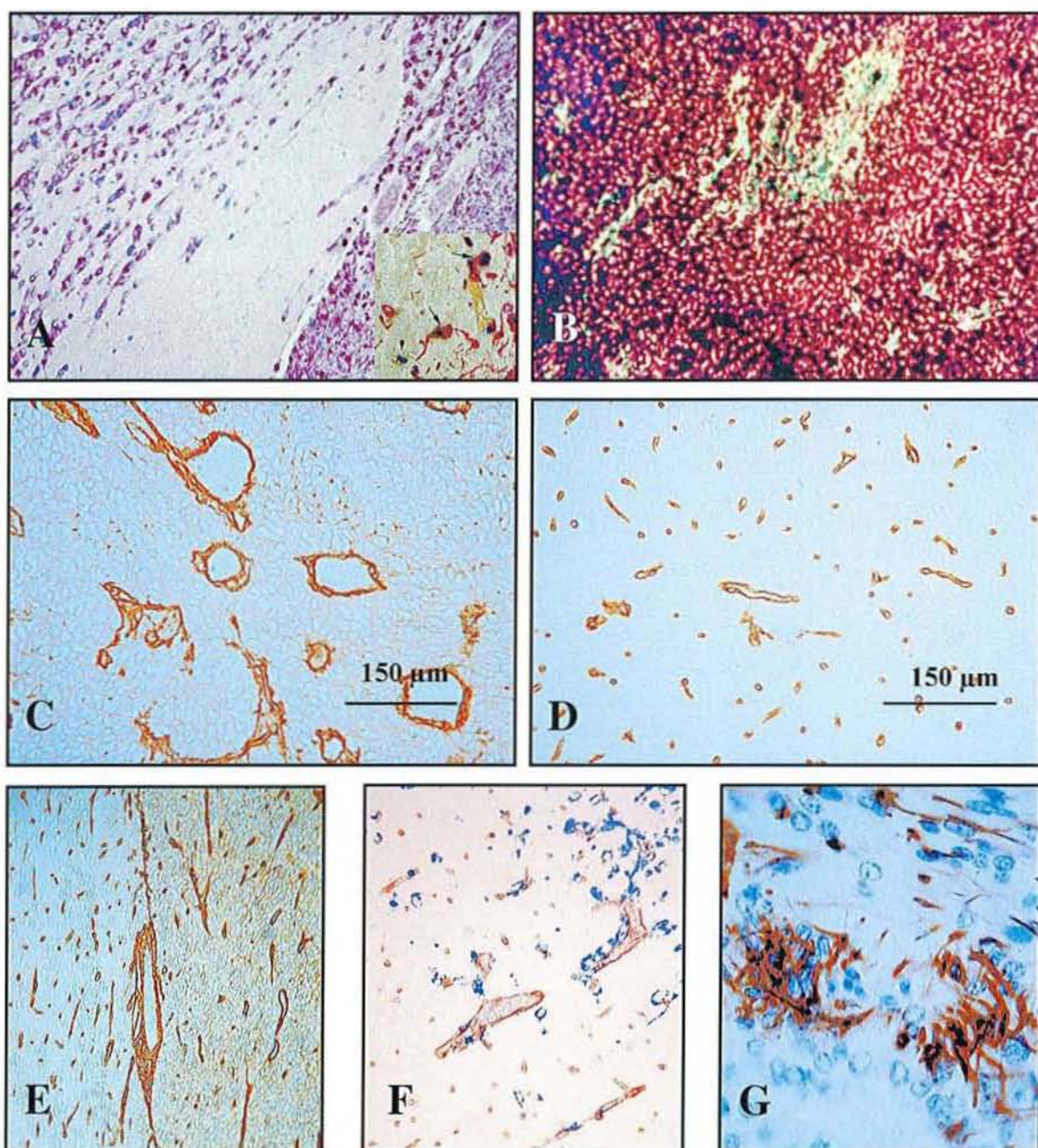


PLANCHE 5

La microscopie - la prolifération et la vascularisation

A : Les cellules tumorales isolées et celles de la tumeur principale prolifèrent avec la même intensité - double immunodétection de la vimentine humaine (phosphatase alcaline, fast red) et de l'antigène Ki-67 (phosphatase alcaline, fast blue), X100. Encart: les cellules tumorales prolifèrent ou non (flèche); des cellules réactionnelles murines prolifèrent (tête de flèche).

B : L'altération de la barrière hémato-encéphalique est mise en évidence par un passage interstitiel de fibrine murine dans la tumeur dense (immunofluorescence directe), X200.

C et D : Les vaisseaux sanguins sont peu nombreux, ectasiques et irrégulièrement distribués dans la tumeur (C). En revanche, dans le cerveau sain (D), ils sont nombreux, de petit calibre et équidistants - immunodétection du collagène IV murin (péroxydase, H₂O₂/DAB), X200.

E : Au niveau de l'interface tumeur / hôte, dans une zone peu infiltrante, les vaisseaux issus du parenchyme sain sont de grande taille et congestifs (péroxydase, H₂O₂/DAB), X50.

F : Une double immunodétection du collagène IV murin (péroxydase, H₂O₂/DAB) et de la vimentine humaine (phosphatase alcaline, fast blue) montre une congestion de vaisseaux normaux en contact avec des cellules tumorales isolées, X200.

G : Les cellules tumorales expriment le VEGF (péroxydase, H₂O₂/DAB), X1000.

CHAPITRE 4

DISCUSSION DU MODELE

LE MODELE PAR RAPPORT A CEUX DEJA UTILISES EN NEURO-ONCOLOGIE

Les premiers modèles expérimentaux utilisant des cellules de gliomes étaient tous murins. Ils sont encore les plus souvent utilisés et cités dans la littérature, notamment ceux de la lignée cellulaire C6 issue d'un gliome de rat établi *in vitro* après induction par de l'éthyl nitrosourée (20). Les cellules C6 ont pour principaux avantages d'avoir un comportement proche de celui des cellules des gliomes malins humains, tout en étant simples à cultiver ce qui permet de réaliser des études reproductibles facilement comparables entre elles. Ces cellules peuvent, par ailleurs, être modifiées génétiquement, notamment par une transfection à l'aide de plasmide. Cette possibilité a permis, en particulier, des études de l'expression des gènes altérés au cours du processus tumoral (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs) avec, pour objectif à moyen terme, la mise en oeuvre de stratégies de thérapie génique (15). Toutefois, l'expérimentation *in vitro* seule ne permet pas d'étudier la migration des cellules des gliomes dans l'encéphale, conséquence d'un ensemble de facteurs propres à l'environnement de l'hôte et aux cellules tumorales elles mêmes. En ce qui concerne l'étude de l'infiltration, les modèles *in vitro* sont importants pour étudier isolément le rôle de certaines molécules spécifiques, comme la laminine ou l'antigène CD44, capables d'intervenir dans les interactions entre les cellules tumorales gliales et la matrice extra cellulaire (3, 4, 12, 44, 65).

Les lignées de cellules de gliome murin ont l'avantage d'être injectables dans le cerveau de souris, de rats et même de hamsters ou de chats rendus immunodéficients, mais on observe toujours des différences morphologiques et biologiques importantes par rapport aux tumeurs cérébrales humaines développées spontanément ce qui les rend, en définitive, peu représentatives de l'évolution tumorale connue chez l'homme (32, 83). Ainsi, l'altération de la barrière hémato-encéphalique, rencontrée lors du processus tumoral cérébral, varie significativement d'un modèle animal à l'autre. La réponse à des drogues comme la Procarbazine et le Dianhydrogalactitol n'est pas la même chez les patients atteints de tumeur cérébrale et chez les divers animaux d'expériences (3). Les modalités d'infiltration sont également très différents car la plupart des lignées cellulaires animales génèrent des tumeurs à développement expansif et peu ou pas infiltrant (20).

La nécessité de pouvoir disposer de modèles de gliomes humains, est donc évidente. Plusieurs lignées cellulaires stables et à paramètres bien connus, issues de glioblastomes

humains, ont été établies et sont disponibles. Les lignées D-54 MG, U 251-MG, U 87-MG sont les plus fréquemment employées (15, 3, 32, 35, 83, 112, 127). Il convient toutefois de rester prudent et critique quant à l'homologie des études réalisées à partir de tels modèles cellulaires dissociés avec ce qui existe en clinique humaine car, après plusieurs passages *in vitro*, il a été démontré que certaines cellules subissent une modification du phénotype, dont une des traductions est la perte de l'expression antigénique de la protéine gliale fibrillaire (16 77 118).

Il faut insister sur le caractère très infiltrant des gliomes cérébraux de haut grade chez l'homme ce qui contribue en très grande partie à leur gravité. Les gliomes ont ainsi la capacité d'infiltrer par des cellules isolées se déplaçant activement dans le tissu cérébral. Cette migration est liée aux structures anatomiques et à la nature biochimique des tissus au contact des cellules tumorales. C'est ainsi que, les voies de déplacement préférentiel des astrocytes néoplasiques et les organisations spatiales tumorales qui en résultent ont été décrites chez l'homme dès 1940 par Scherer sur des coupes histopathologiques standard à partir de matériel autopsique. L'extension tumorale apparaît habituellement le long des espaces de Virchow-Robin, dans les régions sous-épendymaires, le long des faisceaux de la substance blanche comme le corps calleux, enfin à la surface du cerveau, dans les territoires corticaux situés immédiatement sous la léptoméninge (115, 121) qui elle, n'est, en revanche jamais infiltrée (102). Un mode de développement aussi systématisé d'un patient à l'autre témoigne du rôle complexe de l'environnement tissulaire cérébral sur la progression tumorale.

Notre modèle, comme nous allons le démontrer, permet de recréer les principales caractéristiques du développement spontané des tumeurs cérébrales primitives chez l'homme. Afin de conserver au maximum les caractéristiques des gliomes humains de haut grade, il fallait pouvoir greffer en position orthotopique un fragment solide de gliome, chez un hôte « inerte » qui ne rejette pas le greffon malgré l'absence d'immunosuppression. De plus, l'absence de mise en suspension du tissu tumoral humain par une digestion enzymatique et d'injection sous pression des cellules malignes dans le cerveau de l'hôte évite tout risque de dissémination cellulaire artéfactuelle (5, 47-50, 55, 56, 68).

LA MISE AU POINT DU MODELE

▪ L'EVOLUTION MACROSCOPIQUE

Les implantations dans la paroi abdominale

Un nombre restreint de travaux sur les xénogreffes hétérotopiques de gliomes humains chez des animaux congénitalement immunodéficients sont rapportés dans la littérature médicale (29, 32, 77, 118, 123). Quant aux implantations intra-crâniennes, elles sont encore plus rares et sont alors toujours réalisées par des injections intra-cérébrales (22, 44, 102) d'une suspension cellulaire provenant de lignées de cellules dérivées de gliomes humains ou de la dissociation de pièces opératoires fraîches.

La pratique de la xénogreffe hétérotopique de tumeurs malignes, chez la souris nude, n'est pas une technique nouvelle, toutefois peu de progrès méthodologiques ont été réalisés durant les deux dernières décennies et aucun des auteurs n'insiste sur la nécessité d'une maîtrise microchirurgicale du modèle, pourtant essentielle. En effet, les échecs de la prise sont liés à une mauvaise qualité des greffons (nécrose), une insuffisance de revascularisation, une surinfection ou le plus souvent à une technique de transplantation défectueuse, mais jamais à une cause immunologique (47-50), même si certains auteurs évoquent le rôle d'une immunoréactivité résiduelle (144). Ainsi, grâce à une technique originale d'implantation de biopsies de glioblastomes humains, nous avons obtenu, après un délai de latence de 15 à 30 semaines, 100 % de prise tumorale avec des tumeurs cérébrales de haute malignité, ce qui a permis de mettre au point des modalités opératoires précises pour les greffes orthotopiques.

Après l'introduction sous cutanée d'un petit fragment tumoral à l'aide d'un trocart, les taux de prise, après une greffe primaire, sont très variables (50 à 100 %), tout comme les délais de latence (2 mois à 1 an) (29, 32, 77, 112, 118, 123). En revanche, la greffe, à un autre animal, de cellules issues d'un premier greffon, procure des taux de réussite bien meilleurs (80,8 à 100%) après un temps de latence raccourci (1 à 2 mois). La prise tumorale semble corrélée au degré de malignité (29). Pour les astrocytomes, il existe, semble-t-il, un parallélisme entre l'évolution de la tumeur chez les patients et chez les animaux porte-greffes. Nos observations nous permettent également de constater un parallélisme entre l'évolution tumorale péjorative chez les patients C et D et la prise puis l'importance du développement des greffons correspondants chez les souris.

Les implantations dans la paroi abdominale des gliomes permettent d'obtenir, par une technique relativement simple, donc facilement utilisable, une prolifération cellulaire tumorale accessible à la surveillance clinique. Le greffon forme une masse relativement mobile par rapport à la peau de la souris, dont le volume peut être apprécié par le carré de la largeur (mesurée en mm), multiplié par la longueur et divisé par deux. La corrélation existant entre le volume réel et le volume estimé est très forte : $r = 0,984$ ($p < 0,0001$) (32). Ce type d'implantation permet de constituer une réserve de cellules tumorales d'excellente vitalité, très bien adaptée au passage sur un autre animal, et notamment à la greffe orthotopique.

On peut constater qu'après une première prise qui s'est développée lentement (C et D), les greffes suivantes ont toutes une croissance régulière, homogène et nettement plus rapide. Après la première transplantation, les développements des greffons sous-cutanés ou intracrâniens se sont comportés macroscopiquement de façon semblable, toutefois, les greffons intracrâniens se développent moins rapidement, probablement parce que leur volume initial est environ dix fois plus petit. Tout se passe comme si la première greffe constituait une "adaptation" des cellules tumorales à leur nouvel hôte. On peut imaginer qu'une sélection a pu apparaître au sein de la tumeur. Toutefois, lors de la première greffe, de vastes zones de nécrose sont souvent présentes dans les gliomes de grade IV, alors que les tumeurs ayant proliféré chez la souris sont essentiellement constituées de cellules tumorales, presque sans stroma et à vascularisation murine bien développée. Il n'est donc pas exclu, qu'en plus de la possible sélection clonale, le plus grand nombre de cellules viables lors du deuxième passage et la vascularisation mieux adaptée permettent des prises plus rapides, notamment grâce à des anastomoses vasculaires plus précocement perméables entre le greffon et l'hôte, d'autant que cette vascularisation possède un endothélium murin.

Les implantations intra-crâniennes

Pour étudier la migration des cellules malignes dans le parenchyme cérébral, les modifications vasculaires et la réaction des cellules de l'hôte à la dissémination intracérébrale, l'implantation intra-crânienne est indispensable.

Des modèles de xénogreffes intra-crâniennes de gliomes produits après une injection de cellules isolées sont rapportés dans la littérature, mais aucune corrélation radio-anatomo-clinique n'est décrite (44, 85). Même, si la réalisation d'une greffe intra-crânienne oblige à surmonter des difficultés techniques, le problème essentiel est de pouvoir suivre objectivement le développement de la tumeur. Dans nos séries, il est extrêmement intéressant de noter le paradoxe existant entre la découverte autopsique de volumineuses tumeurs intra-cérébrales et la discrétion des troubles neurologiques existant chez les souris durant une longue période d'évolution. Pour ne pas créer de séquelles liées à la greffe, l'implantation du greffon est réalisée dans des territoires ne relevant pas des activités motrices ou sensorielles. Aucune anomalie cliniquement détectable n'est mise en évidence après le réveil de l'animal, hormis l'épisode comitial décrit chez la souris D1d. Nous imaginions que le développement de la greffe de gliome entraînerait des signes neurologiques, soit par hypertension intra-crânienne, soit par diffusion. Il n'en fut rien. Nous ne constatons jamais de signes déficitaires neurologiques objectifs susceptibles de traduire un éventuel développement tumoral. En revanche, une adynamie intense, avec amaigrissement important, est constamment observée en phase terminale.

Il est, par ailleurs, également intéressant de constater l'existence d'une corrélation possible entre le développement extra-crânien de la tumeur et sa vascularisation partielle par des branches de la carotide externe. Une fermeture incomplète de la boîte osseuse conduit à la formation d'une tumeur intra et surtout extra-crânienne, hypervascularisée par la carotide externe. Des vaisseaux congestifs de grand calibre sont alors bien visibles en périphérie de la tumeur, en situation intra et extra-crânienne. Il est particulièrement remarquable de constater l'importance du développement externe et de la vasodilatation induite par le gliome qui détourne à son profit les branches de la carotide externe. A l'inverse, les tumeurs à volet fermé restent intra-crâniennes, donc indépendantes du réseau carotidien externe. Contrairement aux tumeurs développées à l'extérieur du crâne, seule la vascularisation issue de la carotide interne permet un apport sanguin. C'est ce modèle qui reproduit le mieux le mode de vascularisation d'un glioblastome humain mais cette différence de néoangiogénèse mérite une discussion que nous présenterons plus loin.

▪ L'EVOLUTION MICROSCOPIQUE

Avant de discuter les résultats microscopiques, une analyse critique de la méthode que nous avons utilisée par rapport à celles disponibles s'impose pour situer le modèle mais il faut surtout comparer les caractéristiques des cellules malignes dans le cerveau murin et dans le cerveau humain puisque le modèle est réputé représenter les gliomes humains spontanés. Pour satisfaire ces exigences, le modèle doit répondre à quatre séries de contraintes :

- La différenciation et la prolifération cellulaire des cellules des tumeurs humaines xénogreffées ne doivent pas être modifiées par des agents anti-rejet.
- Les origines humaines et murines des diverses cellules constituant la tumeur expérimentale doivent pouvoir être aisément identifiées, quel que soit l'état de différenciation des cellules.
- La transplantation doit permettre un développement à partir d'un foyer unique et non à partir de possibles microfoyers multiples, résultat d'une injection sous pression de cellules artificiellement dissociées par une digestion enzymatique modifiant la membrane cytoplasmique.
- La greffe doit être posée sur le cerveau sous la léptoméninge, sans effraction parenchymateuse pour éviter des disséminations iatrogènes provoquées par l'introduction des tissus dans un tissu mécaniquement facile à dissocier.

Les modèles actuellement disponibles ne satisfont pas à ces exigences et sont très éloignés de la pathologie humaine spontanée, qu'ils sont réputés représenter. En effet, l'animal le plus utilisé est le rat immunocompétent, à qui des suspensions de cellules du gliome de rat ou humains (provenant soit de lignées en culture, soit de pièces opératoires trypsinisées) sont injectées en conditions stéréotaxiques (22, 44, 85, 101). L'absence d'immunosuppression ne permet pas d'apprécier l'importance du rôle joué par d'éventuels phénomènes de rejet. A l'inverse, lorsqu'un traitement anti-rejet est utilisé, il entraîne probablement des modifications cinétiques, tout aussi difficiles à quantifier. Pour éviter ces anomalies nous avons utilisé des souris immuno-incompétentes T congénitales. Ainsi, si des modifications des cinétiques de prolifération et de différenciation étaient constatées, elles seraient indépendantes de

mécanismes liés au rejet ou à son inhibition et en relation avec une sélection clonale des cellules malignes elles mêmes.

La détermination de l'origine humaine ou murine des diverses cellules composant la tumeur transplantée est une impérieuse nécessité, pour déterminer l'importance qualitative et quantitative du chimérisme cellulaire et les relations qui s'établissent entre les cellules quel que soit leur espèce. Pour satisfaire cette exigence, la méthode ne peut être ni un marquage préalable des cellules avant leur transplantation, car l'atténuation du signal au fur et à mesure de la dilution par division successive rendrait les résultats discutables, ni une expression protéique qui pourrait disparaître par régression de la différenciation cellulaire, du fait de la transplantation (22, 85, 101). En revanche, l'utilisation de l'hybridation *in situ*, avec des sondes d'ADN génomique ou des sondes oligonucléotidiques des séquences ALU spécifiques d'espèces, permet de déterminer, avec une certitude absolue, l'origine humaine ou murine de chaque cellule, quel que soit l'état de différenciation spontanée ou modifiée par une thérapeutique (44, 111). Ainsi, des comparaisons entre les cellules constituant la tumeur, chez le patient et chez l'hôte de substitution, peuvent être réalisées avec précision et permettre de parfaitement caractériser le chimérisme.

Sauf les cas assez exceptionnels de gliomes multicentriques, la prolifération maligne prend naissance au niveau d'un foyer unique, puis les cellules se disséminent de proche en proche, selon des modalités variables. Cette aptitude à la dissémination, qui est une caractéristique essentielle des glioblastomes, constitue un des principaux facteurs de gravité pour laquelle des thérapeutiques spécifiques mériteraient d'être imaginées à partir d'études fondamentales des mécanismes de dissémination. Il est évident que tout modèle s'écartant de cette situation rend les résultats peu ou pas applicables à la pathologie humaine. Tous les modèles utilisant des cellules dissociées, avec ou sans traitement enzymatique, ne permettent donc pas d'entreprendre des extrapolations de ces phénomènes de dissémination, puisque les cellules sont détachées du stroma et que l'injection entraîne des modifications mécaniques plus ou moins importantes selon la quantité de liquide et de cellules injectée. Certes, cette technique expérimentale est beaucoup plus simple à mettre en oeuvre que celle que nous utilisons, puisqu'elle consiste en une simple injection, dans un endroit précis, mais aucune preuve scientifique concernant l'importance de la distension tissulaire initiale, avec les conséquences possibles qui en résultent pour la migration, ne peut être apportée.

Pour les études quantitatives, cette méthode d'injection de cellules dissociées paraît intéressante puisqu'elle permet de chiffrer le nombre de cellules injectées, alors que l'introduction d'une biopsie ne permet pas de connaître avec précision le nombre de cellules transplantées. En réalité, seul le nombre de cellules survivantes, *in situ*, après l'injection, constitue le paramètre biologique déterminant qui n'est jamais, nous semble-t-il, quantifié par des études préalables, ce qui retire une très grande partie de l'intérêt théorique aux méthodes n'explorant pas, avec certitude, les caractéristiques d'une diffusion spontanée. A l'inverse, si l'objet de la recherche est de découvrir les signes fondamentaux d'une destruction localisée précise, cette méthode est incontestablement d'une grande utilité puisque l'implantation stéréotaxique est d'une très grande précision spatiale. En revanche, comme un des objectifs de notre travail est l'analyse de la migration cellulaire dans l'encéphale, nous avons renoncé à utiliser ces méthodes simples.

Ainsi, pour étudier la migration, dans des conditions les plus proches possibles de celles se produisant chez le patient, la greffe d'un petit fragment non modifié s'impose donc. Ceci nécessite certes une crâniotomie précise et une implantation très délicate pour ne pas blesser l'encéphale et éviter des troubles neurologiques immédiats et surtout ne pas induire de dissémination artificielle. Avec une technique microchirurgicale précise, suivie ou non d'une occlusion complète de la crâniotomie, faite à distance du foyer d'implantation, il est possible d'étudier le déplacement des cellules malignes ainsi que le rôle de l'inextensibilité de la boîte crânienne sur le processus de migration des cellules gliales néoplasiques dans le tissu sain.

Enfin, compte-tenu du caractère massif de l'implant par rapport au volume du cerveau, cette méthode permet une surveillance clinique et radiologique de la tumeur greffée, puis l'analyse des conséquences de la dissémination.

Avant de réaliser des études pré cliniques diagnostiques et thérapeutiques avec ce modèle, il est indispensable de démontrer qu'il possède bien les principales caractéristiques de l'évolution microscopique des gliomes chez l'homme.

CARACTERES HISTOLOGIQUES DES GLIOMES GREFFES

Histologiquement, on constate, qu'après une première prise chez l'animal où les cellules les moins différenciées sont plus nombreuses qu'au niveau de la tumeur du patient, avec toutefois persistance d'astrocytes tumoraux ayant des aspects gémistiocytiques ou peu atypiques, le phénotype tumoral stabilisé persiste ensuite au cours des greffes suivantes et ceci quels que soient le lieu d'implantation et le nombre de passages successifs. Les divers immunomarquages (vimentine, GFA) sont eux aussi d'expression similaire ou identique durant les différents passages successifs. Il est donc possible qu'une sélection clonale, favorisant les cellules à divisions les plus rapides et/ou induisant mieux une néoangiogenèse locale apparait. Cette nouvelle population garderait ensuite la possibilité de se différencier après quelques divisions intercalaires rapides. L'existence de tels mécanismes mériterait confirmation sur une plus grande série que la nôtre. Si une telle hypothèse se confirmait, elle aurait l'avantage d'expliquer l'existence d'une tumeur histologiquement stable, avec la persistance définitive d'une différenciation minoritaire certes, mais indiscutable après un changement survenu au cours du premier passage. Quoiqu'il en soit, l'évolution des tumeurs après leur second passage reste indépendante du lieu d'implantation, c'est-à-dire des micro-environnements biologiques pourtant fort différents que constituent le muscle et le péritoine d'une part, l'encéphale et la léptoméninge d'autre part.

LE CHIMERISME CELLULAIRE

La détection spécifique de l'ADN nucléaire humain et murin permet de démontrer que toutes les cellules gliales malignes sont, comme on pouvait le prévoir, d'origine humaine alors que tous les vaisseaux ont un endothélium murin et qu'en périphérie des greffons orthotopiques sans limites nettes, il existe des cellules murines gliales réactionnelles en quantité plus ou moins nombreuse. Comme les cellules humaines normales provenant d'un organisme normal, pour le cas où le greffon initial en aurait contenu, ne prolifèrent pas et au mieux survivent (communication personnelle A. Duprez), les greffes en série sont donc uniquement constituées de cellules malignes humaines et d'un stroma gliovasculaire murin. A l'aide de doubles marquages par l'hybridation *in situ* et la détection immunohistochimique, on peut notamment constater que toutes les cellules gliales humaines cancéreuses produisent une quantité variable, mais souvent importante, de vimentine. Puisque les anticorps anti-vimentine humaine sont spécifiques d'espèces et ne révèlent pas la vimentine murine, il est donc possible d'étudier la migration des cellules malignes avec un anticorps anti-vimentine humaine. Cette

observation est d'un intérêt essentiel pour l'étude du chimérisme car l'immunodétection de la vimentine humaine a l'avantage d'être une technique simple, rapide et parfaitement reproductible quelle que soit le greffon étudié. Le signal cytoplasmique observé est d'une grande finesse et permet une bonne analyse du phénomène d'insinuation des cellules dans le cerveau de la souris ou des rapports qui s'établissent entre les cellules tumorales et les vaisseaux sanguins. Pour ces raisons, l'étude des modalités d'extension des greffons peut essentiellement reposer sur l'analyse des immunodétections de la vimentine humaine.

En définitive, la tumeur greffée est constituée d'une population de cellules malignes humaines induisant une néoangiogénèse d'origine murine, infiltrant, par migration à distance, un tissu murin, l'encéphale, qui réagit par une hyperplasie initiale, secondairement modifiée par l'insinuation néoplasique dont nous discuterons plus bas les caractéristiques.

LA CINETIQUE CELLULAIRE

Pour utiliser le modèle, lors d'études relatives à la chimiothérapie, à la radiothérapie ou aux thérapies géniques, diminuant ou supprimant la prolifération cellulaire, il est indispensable de connaître parfaitement l'état spontané du pouvoir prolifératif des divers contingents tumoraux, puis de s'assurer qu'il est semblable, sinon identique, à celui existant chez le patient. Comme la méthode de référence est celle fondée sur la synthèse de l'ADN, notamment appréciée par l'indice de marquage déterminé par l'incorporation de thymidine tritiée ou d'IDU (71), nous avons d'abord étudié les tumeurs gliales chez la souris par cette méthode. Toutefois, puisque l'indice de marquage par l'IDU des gliomes s'avère semblable chez l'homme et chez la souris, comme l'a démontré un travail antérieur du laboratoire (10), et que la détermination du même indice par le MIB-1 (qui n'implique pas de préparation initiale du patient) sont sensiblement identiques, nous avons, par la suite, uniquement utilisé cette technique pour montrer que les indices de marquage du gliome chez le patient et de sa greffe chez la souris ont des valeurs équivalentes pour les cellules gliales malignes. De plus, la répartition est, elle aussi, assez superposable chez les deux hôtes. Le modèle peut donc, en ce qui concerne la prolifération des cellules malignes, être utilisé pour des essais thérapeutiques précliniques de phase II avec application secondaire rapide chez le patient.

En ce qui concerne en revanche la prolifération des cellules gliales murines et plus encore des cellules endothéliales des vaisseaux, les résultats sont assez différents. On constate

des écarts de prolifération importants des cellules endothéliales murines par rapport à leurs homologues humains pour la même tumeur chez la souris et le patient. L'étude de ces variations fait l'objet du paragraphe suivant.

LA NEOANGIOGENESE DES TUMEURS ET LA PERMEABILITE VASCULAIRE

L'étude des phases précoces de la prise, réalisée il y a quelques années au laboratoire, démontre qu'une partie importante du greffon, sauf ses deux couches les plus externes, en contact des tissus de souris et notamment des parties les mieux vascularisées, se nécrose et que les cellules malignes se développent préférentiellement autour des vaisseaux qui commencent alors à bourgeonner (111). Selon le type de tumeur, la néoangiogénèse assure, quel que soit le volume de la tumeur greffée, une vascularisation anarchique. Toutefois certaines tumeurs peuvent acquérir de très grandes tailles et ne posséder aucune zone de nécrose malgré une néoangiogénèse modeste, ou à l'inverse contenir, dans leur partie centrale, des plages de nécrose partielle ou totale au niveau de tumeurs ne mesurant pourtant qu'environ 1 à 1,5 cm de diamètre (communication personnelle A. Duprez). Cette évolution est probablement liée à la rapidité de division des cellules malignes mais aussi à leur besoins métaboliques.

Dans le cas des glioblastomes, comme pour beaucoup de tumeurs xénogreffées, les tissus ne contiennent pas ou très peu de nécrose jusqu'à environ 1,5 cm de diamètre, puis des plages de nécrose centrale apparaissent, comme si l'adaptation vasculaire ne se faisait pas ou pas assez vite par rapport aux besoins de la prolifération. Quoiqu'il en soit, les cellules néoplasiques produisent des facteurs angiogènes, notamment du VEGF (21) comme nous l'avons démontré, tant au niveau des cellules de la tumeur chez le patient que de celles greffées chez la souris. Le nombre de cellules produisant ce facteur est quantitativement semblable chez les deux hôtes comme nous l'avons constaté dans tous les prélèvements que nous avons examinés. Ceci paraît démontrer que la tumeur est bien à l'origine de la néoangiogénèse murine mais que son intensité dépend de l'efficacité de la stimulation.

Puisque l'anticorps anti-VEGF reconnaît et met en évidence une grande quantité de cette protéine, cette angiogénèse est probablement moins fonctionnelle au niveau des récepteurs des cellules endothéliales murines que des cellules humaines d'où l'absence d'une hyperplasie patente, habituellement présente dans les glioblastomes. Cette hypothèse tend à être confirmée

par l'analyse des greffes d'organe d'embryons humains provenant d'IVG chez la souris nude. En effet, la prise et le développement concernent dans ce type de greffe toutes les variétés cellulaires humaines et en particulier les cellules endothéliales et musculaires des vaisseaux. Dans ce cas, il existe une hypervascularisation exubérante formant des vaisseaux humains se raccordant à des vaisseaux murins (6, 7). Des implantations de gliomes dans des organes embryonnaires greffés chez la souris nude mériteraient d'être réalisées pour mieux connaître la néoangiogénèse tumorale.

Deux caractéristiques essentielles des tumeurs, à prendre en considération pour tester l'efficacité d'une thérapie, chimique ou biologique, sont l'état de perméabilité aux macromolécules des néovaisseaux tumoraux, provenant de la carotide interne des souris, et le degrés de dissémination du gliome. Des études tant macroscopiques (passage interstitiel intra tumoral du bleu d'Evans injecté par voie parentérale) que microscopiques (mise en évidence du réseau vasculaire irrégulier par l'immunodétection du collagène IV des lames basales vasculaires et du passage interstitiel intra tumoral de protéines sériques de grand taille) il émerge un certain nombre de caractéristiques qui méritent d'être discutées.

Chez l'homme, l'hyperplasie vasculaire avec pluristratification endothéliale et formation de structures pseudoglomérulées et / ou la nécrose, sont des critères diagnostiques majeurs des glioblastomes. Cette hyperplasie s'explique par une accélération de la production des cellules participant à la constitution des parois vasculaires : les cellules endothéliales mais également, et ce point est discuté, les cellules musculaires lisses. Des mitoses sont souvent observées au niveau des structures pseudo-glomérulées. Dans un travail récent, Watanabe et al (135) a montré que le pourcentage des cellules endothéliales en cycle dans les glioblastomes, apprécié par la mise en évidence immunohistochimique de la protéine Ki67, est en moyenne de 12,5% pour les cellules constituant les structures glomérulées, alors qu'il n'est que de 2,6% dans les autres territoires vasculaires. Ce dernier chiffre est, de plus, anormalement élevé pour les endothéliums cérébraux normaux. De nombreux travaux démontrent la production de facteurs de croissance angiogéniques par les glioblastomes. C'est ainsi que les facteurs β FGF, α FGF, PDGF ont été identifiés dans ces tumeurs. Le récepteur de PDGF est exprimé par les cellules endothéliales, ce qui suggère l'intervention d'une boucle de régulation autocrine, lors de la néoangiogénèse tumorale. Plusieurs travaux suggèrent que la glycoprotéine VEGF est, en fait, le médiateur principal de l'angiogénèse tumorale (21, 104, 139). Les cellules endothéliales exprimant le récepteur du VEGF constituent les cibles de ce

facteur synthétisé par les cellules tumorales et libéré lors des ischémies. Des mutations de la protéine *p53* pourraient faciliter l'angiogénèse en inhibant la libération d'un inhibiteur. Dans toutes les expériences de greffe chez la souris nude de tissus humains embryonnaires, étudiés au laboratoire, la revascularisation des greffons se réalise tout d'abord par des anastomoses entre les lits microcirculatoires humains des greffons d'une part, et ceux murins des sites receveurs d'autre part. Après l'anastomose, les cellules endothéliales murines remplacent progressivement leurs homologues humains, puis synthétisent une néo-lame basale murine. Les résultats décrits dans notre thèse démontrent que les greffons de tumeurs gliales se développent autour des vaisseaux murins (30) puis induisent une néoangiogénèse à partir des vaisseaux de l'hôte (111, 143). Compte-tenu des volumes tumoraux et de l'architecture des lits vasculaires observée notamment sur les préparations histologiques colorées par un anticorps anticollagène de type IV murin, il est patent que le développement des gliomes greffés s'accompagne d'une importante modification du réseau vasculaire, avec prolifération des cellules endothéliales murines. Cette prolifération est toutefois lente, puisque le pourcentage des cellules en cycle dans ce travail est estimé à moins de 1%. La prolifération vasculaire est donc suffisante pour assurer une croissance tumorale, mais insuffisante pour qu'apparaissent des aspects de stratification endothéliale ou des structures glomérulées et éviter des nécroses lorsque les tumeurs augmentent de volume. Le caractère limité de l'angiogénèse tumorale a également pour conséquence un nombre insuffisant de vaisseaux permettant d'assurer une nutrition complète du greffon ce qui se traduit par une augmentation des distances intervasculaires dans la tumeur, bien visible sur les coupes d'immunodétection du collagène IV murin. Dans la mesure où, dans un gliome, la distance critique moyenne de diffusion de l'oxygène est de 100 μm , (132) une distance intervasculaire supérieure à 200 μm engendre nécessairement une nécrose ce qui est vérifiable aisément avec notre modèle.

La relative faiblesse de l'hyperplasie endothéliale ne s'explique pas par une réduction de la synthèse de VEGF, dont l'expression importante dans les tumeurs greffées est similaire à celle observée dans les glioblastomes humains étudiés chez le patient. Cette faible production de cellules endothéliales pourrait être secondaire à une rupture de la boucle de régulation autocrine normale, le facteur de croissance humain ne reconnaissant pas, avec une intensité suffisante, le récepteur protéique murin synthétisé par ces cellules endothéliales. Si cette hypothèse s'avérait exacte, il faudrait admettre que, dans notre modèle, l'angiogénèse dépend d'autres facteurs que du VEGF.

Quelle que soit la cause de ce qui est observé au niveau endothélial, il faut, en conséquence, d'emblée affirmer que le modèle ne peut, dans la mesure où le réseau vasculaire n'est pas humain, être utilisé pour des recherches sur les traitements anti-angiogènes des gliomes.

Les résultats des études fonctionnelles de la perméabilité vasculaire (diffusion du bleu d'Evans et de protéines sériques) démontrent l'existence d'un trouble qui se traduit par une accumulation des molécules extravasées dans la matrice extracellulaire tumorale. Ce trouble de perméabilité semble se confirmer morphologiquement par l'étude ultrastructurale qui permet de découvrir la présence d'une barrière hémato-encéphalique anormale, caractérisée par le faible développement des jonctions intercellulaires et l'absence complète des jonctions du type zonula occludens.

Rien n'empêche, par conséquent, d'imaginer qu'une diffusion intra-tumorale préférentielle de molécules, à visée thérapeutique, administrées par voie vasculaire, soit possible, même dans les zones d'extension de la tumeur. Cependant, nos résultats actuels ne nous permettent pas de connaître avec précision le degré d'anomalies de la barrière hémato-encéphalique dans les territoires peu infiltrés par des cellules tumorales isolées. Les anomalies de la barrière semblent être peu importantes, tout au moins au début de l'infiltration, puisqu'à cette période, les vaisseaux ne comportent pas encore les anomalies morphologiques constatées dans la tumeur principale. La réponse à cette question est d'une grande importance car outre le problème de biodistribution des drogues (chimiothérapie ou oligonucléotides antisens) dans les zones d'infiltration, la détermination par l'imagerie TDM ou IRM des limites d'une tumeur cérébrale repose en grande partie sur cette anomalie vasculaire. C'est pourquoi, dans la deuxième partie de la thèse, cette question sera reprise et développée dans un travail sur les oligonucléotides antisens et d'imagerie IRM.

Les protéines accumulées dans la matrice extracellulaire pourraient, constituer un obstacle à la diffusion intra-tumorale, comme le démontrent Dvorak *et al.* (61) dans une étude portant sur l'utilisation thérapeutique potentielle d'anticorps monoclonaux anti-tumoraux. Cet auteur montre que des traceurs macromoléculaires protéiques, administrés par voie intraveineuse à la souris porteuse de tumeurs sous-cutanées, sont surtout présents autour des vaisseaux, sans se concentrer dans les cellules tumorales. Cette possible gêne à la diffusion, présente au niveau de l'interface hôte-tumeur, pourrait donc constituer un obstacle au passage

de molécules thérapeutiques tels que des oligonucléotides antisens administrés par voie parentérale. Avant de développer une stratégie antisens complexe, il paraît judicieux de s'assurer du passage de telles molécules dans le cerveau et plus particulièrement dans les cellules tumorales. Ceci constitue une application du modèle présenté dans la deuxième partie de la thèse.

LA MIGRATION DES CELLULES TUMORALES DANS L'ENCEPHALE DE SOURIS

Le pronostic défavorable des glioblastomes est en grande partie lié à la capacité qu'ont leurs cellules malignes à infiltrer les structures cérébrales adjacentes et même à grande distance. Après une exérèse chirurgicale, cette diffusion tumorale explique la fréquence des récurrences qui se développent au niveau du site opératoire, mais également dans 20 à 25% des cas de façon multifocale dans toutes les parties du cerveau, et parfois même de la moelle épinière. Les voies de migration des astrocytes néoplasiques et les organisations spatiales tumorales qui en résultent ont été décrites de façon précise par Scherer à partir de coupes montées de gliomes prélevés lors d'autopsies. L'extension tumorale apparaît habituellement le long des espaces de Virchow-Robin, dans les régions sous-épendymaires, le long des faisceaux de la substance blanche comme le corps calleux, enfin à la surface du cerveau, dans les territoires corticaux situés immédiatement sous la léptoméninge (121) qui elle, n'est, en revanche jamais infiltrée (102).

Mais ces études sont d'interprétations délicates lorsque les cellules gliales sont bien différenciées ou au contact d'une gliose réactionnelle. Dans le cerveau de souris, en revanche, l'analyse avec un anticorps anti-vimentine humain spécifique d'espèces est d'une grande précision et d'une grande facilité. De plus, le couplage de cette révélation à une étude cinétique permet de corréler le type cellulaire, la localisation et le pouvoir prolifératif. Ce modèle permet, donc, de répondre à une très grande quantité de questions relatives aux modalités de diffusion et à la constitution des microfoyers prolifératifs.

Les voies de la propagation tumorale intracérébrale, étudiées avec notre modèle, sont, comparables à celles connues dans les gliomes malins humains (115, 121) et ne relèvent pas d'une diffusion passive artéfactuelle. Ceci confirme donc l'existence d'un mécanisme de

migration commun aux cellules malignes des astrocytomes de haut grade, et probablement également de bas grade, dans le cerveau, que cette tumeur soit primitive ou xénotransplantée. Dans les territoires d'extension corticale, les groupements d'astrocytes néoplasiques humains autour de neurones murins, correspondant au phénomène connu sous le nom de satellitose, démontre une interrelation fonctionnelle entre les neurones de souris et les cellules gliales humaines malignes. Cette organisation semble prouver que des processus de reconnaissance intercellulaire sont totalement ou au moins partiellement conservés lors des xénotransplants. D'ailleurs, un autre phénomène de reconnaissance neurogliale réciproque a été mis en évidence au laboratoire, il y a quelques années (60). En effet, lors des xénotransplants de nerfs humains en continuité avec le nerf sciatique de souris, les neurites murins sont capables de coloniser le nerf humain et de s'entourer des cellules de Schwann humaines, démontrant en ce domaine, mais en miroir, que des mécanismes non spécifiques d'espèces existent.

Dans le cadre de l'étude des phénomènes de migration, de nombreux travaux complémentaires avec le modèle mériteraient d'être entrepris pour analyser notamment le rôle des protéases (23), de la laminine, de la fibronectine, du collagène de type I et du CD 44 (12, 65, 84, 88, 92, 98, 103). De récentes découvertes concernant les cellules souches nerveuses, d'une grande importance en ce qui concerne la compréhension des mécanismes de migration des cellules neurogliales, normales ou tumorales, méritent d'être rappelées. Plusieurs travaux ont démontré que des cellules souches humaines isolées à partir de cerveaux d'embryons ont, dans l'encéphale de rats adultes rendus tolérants par immunosuppression médicamenteuse, la capacité de migrer et de se différencier en neurones et en cellules gliales (66). Les cellules souches nerveuses humaines ont un tropisme particulier pour les régions neurogéniques (hippocampe, zones sous ventriculaires et ventricules latéraux) dans le cerveau de rats adultes (46). Lorsqu'elles sont implantées en position intra-crânienne et même extra-crânienne chez des rats porteurs de glioblastomes humains orthotopiques, les cellules souches nerveuses humaines sont capables de migrer à grande distance, dans l'encéphale, spécifiquement vers les cellules tumorales (1). Notre modèle devrait permettre une étude extrêmement intéressante de la migration, de la prolifération et de la différenciation des cellules souches nerveuses humaines dans le cerveau de la souris nude avec en définitive la possibilité de mieux comprendre les mécanismes responsables de la migration des cellules de gliomes humains et même de mettre en œuvre des thérapies cellulaires spécifiques.

Une autre constatation, d'une grande importance pour l'étude des facteurs qui conditionnent la migration, semble émerger des petites séries expérimentales de ce travail, à savoir que la migration des cellules néoplasiques est différente selon que le crâne, après la greffe, a été ou non hermétiquement fermé.

Lors des greffes dans une boîte crânienne partiellement ou non refermée, la diffusion intracérébrale des cellules malignes reste relativement limitée à la périphérie immédiate de la tumeur, alors que les greffes dans une boîte crânienne fermée produisent une dissémination en profondeur importante et parfois à foyers multiples à grande distance. Dans ce cas, les cellules tumorales infiltrant de manière isolée le parenchyme cérébral sont d'une taille en moyenne inférieure à celle des cellules constituant la masse tumorale principale, mais possèdent toujours un cytoplasme bien visible et, le plus souvent (mais il faudrait confirmer cette constatation sur des coupes en série colorées par l'anticorps anti-vimentine), des prolongements fins, parfois multiples. Les cellules en migration ne sont donc pas des cellules indifférenciées, comme cela est si souvent affirmé. Il s'agit d'astrocytes relativement matures, capables, par ailleurs, de se multiplier autant que les cellules de la composante tumorale dense. Cette migration est peut-être favorisée par des flux intracérébraux normaux ou pathologiques de liquide interstitiel évoqué par Geer *et al.* comme pouvant participer à la dissémination des gliomes (67). Après l'injection stéréotaxique dans les lobes frontaux et temporaux de 20 μ L d'une solution d'albumine murine mélangée à de l'inuline tritiée et à du bleu d'Evans, suivie d'un sacrifice de l'animal six heures après, cet auteur démontre l'existence d'un flux liquidien préférentiellement dirigé le long des faisceaux de substance blanche, ainsi que l'existence d'une clairance de liquide extracellulaire, plus importante au niveau frontal (flux fronto-occipital) qu'au niveau temporal. Dans une étude radiologique, réalisée sur 50 patients adultes porteurs d'un astrocytome de haut grade supratentoriel, Wie *et al.* (141) constatent que les disséminations à distance sont plus fréquemment rencontrées lorsque la tumeur est frontale [14/19 (710%)] ou occipitale [8/11 (73%)] que lorsqu'elle est pariétale [8/11 (33%)] ou temporale [5/17 (29%)] (95).

Nos résultats suggèrent, eux aussi, l'intervention possible d'un phénomène mécanique de flux. Il est, dès lors, possible d'imaginer que le développement d'un gradient de pression entre la masse tumorale principale et le parenchyme sain intervient dans la dissémination, par l'intermédiaire d'un flux de liquide interstitiel. Lorsque le volet crânien est mobile, la tumeur se développe en grande partie dans les tissus mous. Il est, alors, possible que si un gradient de

pression entre la tumeur et le parenchyme cérébral existe, celui-ci n'est que faible. Une telle hypothèse, compte-tenu de son importance pratique, mériterait d'être étudiée sur une série beaucoup plus importante d'animaux et justifierait qu'une étude similaire avec des cellules souches nerveuses humaines soit entreprise afin de comparer les résultats.

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

A l'exception du réseau vasculaire intra-tumoral qui diffère par la cinétique de ses cellules endothéliales de celui des glioblastomes humains, les tumeurs cérébrales obtenues par une greffe microchirurgicale orthotopique sous-léptoméningée d'une biopsie de glioblastome humain chez la souris nude constituent un modèle qui ressemble énormément aux tumeurs se développant spontanément chez l'homme. On observe en effet le même mécanisme caractéristique de dissémination des cellules malignes proliférantes, à partir d'un foyer dense vers les territoires habituellement atteints chez l'homme et la gliose réactionnelle péritumorale proche et même à distance. En dépit de l'origine murine de l'endothélium des vaisseaux tumoraux, on constate une altération manifeste de la perméabilité de la barrière hémato encéphalique comparable à celle des glioblastomes chez l'homme. Les caractéristiques des tumeurs expérimentales et les possibilités d'identifier de manière indiscutable leurs composants cellulaires la constituant permettent donc d'utiliser ce modèle pour des recherches précliniques dont quelques uns font l'objet de la deuxième partie de cette thèse.

DEUXIEME PARTIE

QUELQUES APPLICATIONS DU MODELE DE XENOGREFFE

CHAPITRE 5
ETUDES D'IMAGERIE PAR RESONANCE
MAGNETIQUE NUCLEAIRE

1. QUELQUES RAPPELS RELATIFS A L'IMAGERIE PAR RMN

Le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire permet d'étudier les modifications d'aimantation des noyaux d'une molécule sous l'action conjointe de deux champs magnétique : un champ magnétique statique, fixe, élevé (B_0) et un champ électromagnétique tournant (B_1) (78). L'application morphologique de l'IRM est celle qui a connu le plus grand essor dans le domaine de l'Imagerie Biomédicale. Cette technique basée sur l'analyse du comportement du noyau d'hydrogène, formé d'un seul proton (^1H), a, en effet, complètement renouvelé les Sciences Anatomiques du fait de son caractère non invasif.

L'étude d'imagerie IRM réalisée avec le modèle a pour objectif de contrôler la prise orthotopique du greffon puis d'en évaluer le développement, de manière non invasive, c'est à dire sans avoir à sacrifier l'animal. Pour situer l'intérêt d'un tel travail, il faut d'abord rappeler la remarquable discrétion des troubles neurologiques et comportementaux (cf. première partie – chapitre 2) durant une longue période d'évolution du greffon orthotopique. Le siège intra-crânien de la greffe rend par ailleurs impossible toute surveillance, tant clinique par l'inspection ou la palpation que chirurgicale par la mise à jour du gliome, laquelle pourrait compromettre la vie de l'animal. Une incertitude demeure donc quant à la prise et au développement du greffon humain dans le cerveau de la souris. Mais surtout, ce modèle permet d'entreprendre de multiples études non invasives pour tenter de mettre en évidence la dissémination du processus tumoral actuellement impossible à détecter par les techniques d'imagerie actuelles.

Le diagnostic de tumeur cérébrale repose, chez l'homme, sur la clinique qui associe, de façon variable, des manifestations épileptiques, des signes de focalisation et des symptômes résultant du retentissement de la néoformation sur l'ensemble du cerveau, et de l'hypertension intra-crânienne. L'observation de tels signes cliniques doit faire rapidement pratiquer des examens d'imagerie, scanner et surtout IRM, afin de confirmer le diagnostic de tumeur cérébrale, d'en préciser le siège, les dimensions et les caractéristiques radiologiques.

L'IRM permet une bonne discrimination des substances blanche et grise et du cortex par une appréciation précise de leur contenu en eau et fournit ainsi une caractérisation tissulaire des tumeurs que le scanner ne peut apprécier. En outre, l'IRM a l'avantage considérable d'explorer les trois plans de l'espace, ce qui permet une meilleure appréciation du volume et des rapports tumoraux (78).

Sur le plan technique, il est nécessaire de réaliser, dans le bilan IRM initial du patient, des plans et des séquences aisément reproductibles, afin de pouvoir comparer dans de bonnes conditions les clichés successivement obtenus, pour le suivi des malades. Le plan le plus fréquemment utilisé est le plan axial bicommissural. Pour certaines tumeurs frontales ou temporales, le plan frontal est préférable. Plusieurs séquences complémentaires entre elles sont réalisées :

Une séquence courte pondérée en T1 afin d'avoir un contraste « anatomique » qui permet de bien individualiser la substance blanche (en hypersignal : blanc), la substance grise (signal intermédiaire) et le liquide céphalorachidien (en hyposignal : noir)

Une séquence longue pondérée en T2, qui donne un contraste inversé, et révèle mieux la présence d'un œdème

Une séquence pondérée en T1 après l'injection intra-veineuse d'une substance paramagnétique (agent T1) tel que le *gadolinium-diethylene-triaminepenta-acetic acid* (Gd-DTPA ou gadolinium) qui va augmenter le contraste en T1. L'existence d'une rupture de la barrière hémato-encéphalique dans une lésion (tumorale ou autre) a pour conséquence un passage et une accumulation interstitielle de gadolinium donc une augmentation du signal à ce niveau (31). Le transfert de magnétisation peut être utile pour sensibiliser la prise de contraste. L'exploration des trois plans après l'injection de gadolinium est indiquée mais elle peut être remplacée avantageusement par une acquisition tridimensionnelle suivie de reconstructions multiplanaires.

Longtemps, le développement des technologies de l'imagerie biomédicale a été exclusivement obtenu par la pratique diagnostique. L'imagerie expérimentale animale qui connaît un essor récent, était jusqu'alors limitée par l'insuffisance de la résolution spatiale et par une trop longue durée des temps d'acquisition des images, incompatible avec une immobilisation spontanément impossible des animaux (87). L'amélioration actuelle de la résolution spatiale, qui est d'environ 2 mm pour l'IRM et de 3 mm pour la tomographie par émission de positrons (PET scan) rend possible l'exploration par l'imagerie de petits animaux expérimentaux, les problèmes d'immobilité étant résolus par une anesthésie. Les modèles expérimentaux animaux usuels en imagerie IRM sont le hamster et le rat (69, 75, 138, 142). L'imagerie expérimentale animale permet la réalisation, de manière non invasive, de travaux d'Anatomie, de Physiologie, de Génétique et de Pharmacologie (87). A titre d'exemple, l'IRM permet d'évaluer précisément l'action d'un agent thérapeutique sur le développement

volumétrique d'un greffon tumoral sans qu'il ne soit nécessaire de sacrifier l'animal. Cette technique offre l'avantage d'une mesure plus précise et plus objective de l'effet thérapeutique tout en autorisant un contrôle histopathologique en fin d'étude.

Le modèle chimérique homme / souris nude offre la possibilité d'une analyse microscopique, morphologique et fonctionnelle de l'interaction entre les cellules tumorales et l'hôte. La réalisation d'images IRM pourrait, dans ce cas, bénéficier pour leur interprétation du « gold standard » que constitue la caractérisation microscopique immédiate, ce qui n'est évidemment pas possible chez l'homme.

Une étude de faisabilité d'imagerie IRM chez la souris a d'abord été entreprise sur un appareil conventionnel d'IRM, de 1,5 Teslas, afin de s'assurer que la très petite taille du cerveau de la souris nude (environ 1 cm de large) n'est pas un obstacle à la réalisation d'une telle recherche. Cette mise au point a permis d'obtenir des images intéressantes mais la résolution était insuffisante pour permettre une comparaison précise avec la microscopie. Une étude avec un appareil d'IRM à haut champ (2,4 Teslas), a alors été entreprise afin d'améliorer la résolution des images IRM pour permettre de les corrélérer aux images microscopiques. Les mesures comparées sont obtenues après une analyse morphométrique des images préalablement numérisées.

2. MATERIEL ET METHODES D'IMAGERIE IRM

2.1. L'étude de faisabilité sur appareil conventionnel Clinical Signa® à 1,5 Teslas

Le protocole d'étude est mis au point sur un appareil d'imagerie IRM à usage clinique, le Clinical Signa Version 5.5.1® à 1,5 Teslas (General Electric MS, Milwaukee, USA).

Au cours des différents essais, 17 souris qui ont reçu une greffe orthotopique du glioblastome D avec un volet fermé, sont examinées, entre 45 et 211 jours après l'implantation. Cinq animaux sont examinés à plusieurs reprises, avec un intervalle d'une ou deux semaines entre les examens. L'examen des souris est réalisé après une anesthésie générale à la Kétamine® selon un protocole identique à celui employé pour les interventions chirurgicales. Une fois endormi, l'animal est positionné en décubitus ventral, la tête en

hyperextension, sur une planchette en plastique permettant d'introduire la souris en totalité à l'intérieur de l'antenne. La souris est amarrée par du ruban adhésif sur l'extrémité des 4 pattes, sur la racine de la queue, et sur le crâne, en ayant soin de tirer vers l'avant l'excès de peau des oreilles, sans trop comprimer le cou.

Le gadolinium, qui est très toxique sous forme libre, est parfaitement toléré lorsqu'il est chélaté à un ligand, le DTPA. Cette molécule de haut poids, ne traverse pas les membranes cellulaires ni la barrière hémato-encéphalique du fait de sa charge et de sa nature hydrophile. En revanche, une fois sorti des capillaires, le gadolinium diffuse dans l'ensemble des compartiments liquidiens extra- cellulaires (31). Compte tenu de la faible toxicité du produit (chez l'homme, la dose létale de 50% est de 50 à 150 fois la dose de 0,1 mM/kg couramment utilisée), le gadolinium, sous la forme de gadopentétate de diméglumine (Magnevist® Shering, Lys les Tannoy, France) est injecté, par voie intra-artérielle, chez deux souris, à la forte dose de 0,3 mL d'une solution dosée à 0,5 mmol/mL (souris D2d et souris C2b).

La complexité de la mise en oeuvre de ce protocole s'accommode mal des contraintes techniques liées au transport des animaux jusqu'au Service de Neuroradiologie du CHU, c'est pourquoi des injections intrapéritonéales du produit de contraste sont expérimentées afin de simplifier les conditions de l'étude. Les injections intrapéritonéales (souris D4a et D4c) sont respectivement de 0,25 et de 0,5 mL de la solution de gadopentétate de diméglumine soit de 5 et de 10 mM/kg de poids corporel.

Quelles que soient les modalités d'injection du gadolinium, le contraste est obtenu. Plusieurs acquisitions d'images sont enregistrées au niveau des greffons orthotopiques et, pour quelques cas d'animaux, des greffons hétérotopiques 1,5 minutes, 3 minutes, 5 minutes, 10 minutes, 15 minutes et 20 minutes après l'administration intra-péritonéale du produit.

Après un repérage sur une coupe sagittale, quatre coupes vertico-frontales des 2 hémisphères (de type coupes de Charcot) sont réalisées, en spin écho (SE), pondérées en T1, de 3 mm d'épaisseur avec un espace entre les coupes de 0,3 mm. Les paramètres d'acquisition, choisis pour optimiser le rapport signal sur bruit et la résolution spatiale sont les suivants :

- 3 GP antenna (GEMS).
- Temps de répétition : 300 millisecondes

- Temps d'excitation : 12 millisecondes
- Champ de vue (FOV = Field of view) : 8 x 6 cm
- Matrice : 256 x 192 pixels
- 2 excitations
- durée de la séquence : 90 secondes.

2.2. L'étude de corrélation sur appareil à haut champ

Le succès de l'étude de faisabilité avec cet appareil d'IRM clinique performant mais dont la résolution est insuffisante pour exploiter pleinement les possibilités du modèle a justifié qu'une étude complémentaire faisant appel à un appareil à haut champ, à usage exclusivement expérimental, soit réalisée.

2.2.1. Le Spectromètre Bruker Biospec[®] BMT 100 à 2.4 Teslas

Dans ce travail, les mesures portent sur deux glioblastomes humains dont le mode de développement spatial dans le cerveau de la souris nude est différent l'un de l'autre. Le glioblastome D, étudié dans la première partie de cette thèse, se caractérise par le développement d'une masse tumorale dense et d'une composante infiltrante constituée de cellules isolées. Après plus de 5 passages chez la souris nude, cette caractéristique est conservée. L'autre glioblastome (E), non décrit dans la première partie car mis à disposition quelques années après le début des travaux, est utilisé après plus de cinq passages chez la souris nude. Les greffons de ce glioblastome E se caractérisent par une croissance rapide et par un développement essentiellement expansif, sans composante infiltrante à cellules isolées, en dépit de l'implantation orthotopique. Bien que cette souche soit un exemple peu représentatif du développement des gliomes chez l'homme, son caractère limité offre l'avantage d'être un bon témoin pour comparer entre eux les résultats des deux types de greffons, au développement spatial radicalement différent.

La totalité des essais de mise au point du protocole d'imagerie à haut champ n'est pas détaillée afin d'éviter des redondances. L'étude de corrélation avec la morphologie

microscopique est réalisée sur 5 souris greffées avec le glioblastome D et sur 5 souris, greffées avec le glioblastome E.

L'ensemble des examens IRM est réalisé entre le 16ème et le 76ème jour après la greffe. Les animaux dont les images IRM sont corrélées à la microscopie après un délai relativement long bénéficient de plusieurs séances d'IRM avant l'acquisition finale utilisée pour la comparaison avec la microscopie. Les séquences d'acquisition sont pondérées en T1, en T2 et en T1 après l'injection de gadolinium par la voie intra-péritonéale à la dose de 0,5 mL. Les mesures sont réalisées au minimum 10 minutes après l'injection de l'agent de contraste ce qui correspond au temps nécessaire pour positionner correctement la souris dans l'appareil. Les conditions de l'anesthésie et de l'installation des souris sont identiques à celles précédemment employées mais cette fois ci, seule la tête de la souris est introduite dans l'antenne proton compte tenu de la dimension de cette dernière.

Le paramétrage de l'appareil n'étant pas automatique, il est d'abord nécessaire de réaliser une correction de l'homogénéité du champ magnétique B0 (« shimer »). Les images sont acquises dans un plan vertico-frontal, après repérage sur une coupe sagittale, avec un mini-imageur Bruker Biospec® à 2,4 Teslas à ouverture horizontale de 40 cm. Le système des gradients est aménagé sur cet appareil, et le diamètre utile est de 15 cm. L'antenne est spécialement construite pour fonctionner en émission-réception sur un modèle en selle de cheval. La fréquence d'accord est de 100,16 MHz et le diamètre, de 2,5 cm pour une longueur de 2 cm. Le facteur de qualité en charge est supérieur à 90. La résolution des images IRM est de 256 x 256 pixels, pour un champ de 6 cm. L'épaisseur de coupe des images est de 3 mm. La séquence est un écho de spin (SE), avec un temps d'écho de 30 millisecondes et un temps de répétition de 300 millisecondes, pour un contraste en T1. Pour un contraste en T2, le temps de répétition passe à 1000 ou 2000 millisecondes. Les acquisitions sont monoscan.

Une mesure quantitative précise de T2 est faite à partir d'une acquisition multi-écho, type Carr-Purcell-Gill-Meiboom avec 6 échos espacés régulièrement entre 30 et 150 millisecondes. Les images paramétriques de T2 (cartes de T2) sont calculées point par point avec le logiciel dédié Tomikon Bruker®. La régression utilise un modèle mono-exponentiel à deux paramètres, et un seuillage pour éviter de calculer T2 sur le bruit de fond. Comme ces résultats sont assez difficiles à utiliser pour mesurer T2 sur des régions du cerveau, une méthode de regroupement des pixels connexes sur des matrices 3 x 3 à 9 x 9 avant la

régression, est utilisée pour permettre de mieux visualiser T2 avec une résolution moindre. Ce logiciel est développé sur PC après l'export des images d'IRM depuis l'ordinateur Aspect 3000® de la console Bruker, et produit des images paramétriques au format bitmap utilisables avec la plupart des logiciels. Les valeurs citées des T2 sont des moyennes sur des régions d'intérêt (ROI = Region Of Interest) tracées dans une zone tumorale ou normale, obtenues par l'utilisation du logiciel Osiris® (cf. paragraphe 2.2.3).

2.2.2. Le choix des caractéristiques microscopiques corrélées à l'imagerie

Les différents critères microscopiques morphologiques et fonctionnels susceptibles de participer à la formation de l'image IRM sont analysés sur des séries de coupes tissulaires. L'étude microscopique est réalisée pour :

- 1) mettre en évidence les cellules tumorales par l'immunodétection de la vimentine humaine
- 2) mettre en évidence la vascularisation de la tumeur et du cerveau par l'immunodétection du collagène de type IV murin, seule et couplée à l'immunodétection de la vimentine humaine. La quantification des sections vasculaires dans la tumeur, à sa périphérie et dans le cerveau sain est faite pour comparer le nombre de vaisseaux sanguins dans chacun des territoires étudiés. Cette étude est réalisée par un dénombrement des sections vasculaires dans la tumeur dense et dans le cerveau non infiltré, sur au moins 10 champs microscopiques par territoire, au fort grossissement (objectif 40) soit une surface de 0,18 mm².

Pour les études microscopiques des tumeurs, les souris sont sacrifiées immédiatement après la réalisation des images d'IRM utilisées pour la corrélation. Les cerveaux sont fixés dans du formol à 10% (v/v) dans un tampon phosphate 0,1M, pH 7,4, inclus dans la paraffine puis coupés perpendiculairement à l'axe sagittal du cerveau, dans le même plan vertico-frontal que celui déterminé manuellement lors du repérage anatomique en imagerie, en séries de 5 coupes tissulaires successives. Chaque série est séparée de la précédente par 500µm. Le cerveau est totalement débité en un total de 25 à 30 séries permettant d'en analyser l'ensemble. Une coupe par série est colorée par l'HES afin de repérer les sections qui offrent la plus grande surface de tumeur analysable choisies pour réaliser les colorations immunohistochimiques.

2.2.3. Les techniques d'analyse d'images

La numérisation des images permet de les soumettre à des traitements informatiques pour en extraire des informations supplémentaires, inaccessibles lors de l'inspection visuelle. Les images IRM des séquences pondérées en T1 après l'injection de gadolinium et les images d'immunodétection de la vimentine humaine sont numérisées afin de mesurer et de comparer les **surfaces** et le mode de **décroissance périphérique du signal tumoral** obtenus avec chacune des techniques. Les images, réalisées dans le même plan vertico-frontal, sont appariées et sont sélectionnées, pour chacune des techniques, afin d'observer la plus grande surface de signal tumoral analysable. En imagerie, le repérage sagittal visuel anatomique permet de positionner les coupes vertico-frontales en regard de la cicatrice d'ostéotomie, sur le plus grand diamètre tumoral. En microscopie, le repérage initial sur des coupes standard, colorées par l'HES et réalisées dans le même plan vertico-frontal, permet de sélectionner la coupe de plus grande surface tumorale analysable pour réaliser la technique immunohistochimique. Les mesures sont effectuées sur un ordinateur PC à l'aide du logiciel Osiris Medical Imaging® (Université Hôpital de Genève) qui est gratuitement téléchargeable à partir du site web <http://www.expasy.ch/UIN/html/projects/osiris/osiris.html> (89). Le signal immunohistochimique brun des cellules tumorales contraste suffisamment avec la contre coloration bleu pâle du cerveau pour que les images soient analysables à l'aide du logiciel Osiris, comme le sont les images d'IRM en niveaux de gris.

Le transfert physique des images d'IRM depuis le disque dur de l'ordinateur Bruker Aspect 3000® vers celui de l'ordinateur PC est réalisé à l'aide du logiciel NMR link®. Les images sont enregistrées au format PC bitmap à l'aide d'un programme développé localement. Les coupes montées des préparations immunohistochimiques de la vimentine humaine sont photographiées à la résolution de 1600 x 1200 (72 dpi) à l'aide d'un appareil photographique numérique (Nikon Coolpix 950®). Les images microscopiques sont stockées sur ordinateur PC au format JPEG.

Les mesures de surface de signal :

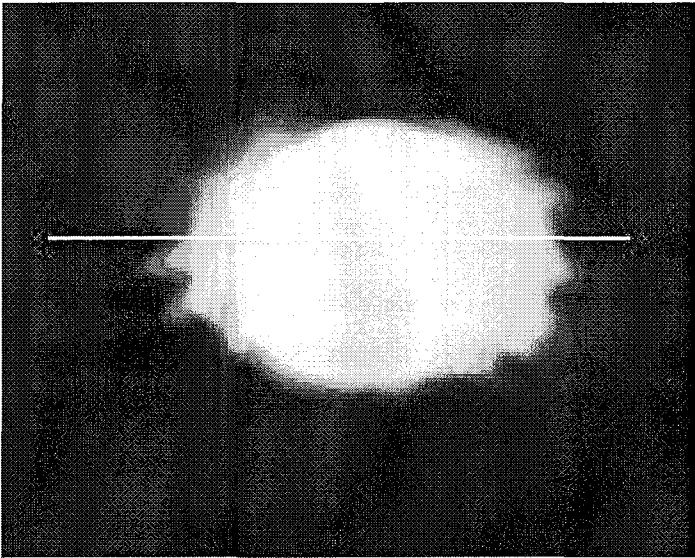
La mesure de la surface des signaux fournis par chacune des méthodes (la prise de contraste du gadolinium et la détection de la vimentine humaine) témoignant de la présence d'une tumeur est d'abord réalisée pour apprécier à partir d'une image plane le volume tumoral supposé que l'IRM permet de mettre en évidence. Ces mesures sont réalisées en traçant

manuellement des ROIs sur les signaux d'IRM et d'immunohistochimie, en incluant les marges extrêmes du signal. Deux ROIs sont tracées sur chaque image afin de mesurer, en unité pixels, les surfaces du signal tumoral et de la surface cérébrale totale, regroupant le cerveau et la tumeur.

Les mesures de transition de signal entre la tumeur et le cerveau sain :

La seconde mesure est faite dans le but d'apprécier la décroissance du signal en périphérie du rehaussement. L'objectif de cette mesure est de mettre en évidence l'existence ou non d'une concordance entre la pente de décroissance de la prise de contraste en IRM et la pente de décroissance de la densité de signal immunohistochimique témoin direct de la densité cellulaire tumorale. Autrement dit, de savoir si il est possible d'établir un lien entre la densité de cellules tumorales et le degrés du passage du gadolinium vers le milieu interstitiel, de manière à suggérer le mode d'infiltration à partir d'images d'IRM morphologique. Les deux souches de gliome étudiés, sont choisies volontairement distinctes, afin de savoir si la technique d'analyse d'images peut être ou non prédictive du degrés d'infiltration, quel que soit le type de développement spatial rencontré.

La méthode d'analyse choisie mesure la décroissance du signal à l'aide de profils (ROIs linéaires) permettant de mesurer l'intensité du signal, point par point, le long d'un segment de droite tracé sur les images (**figure II-1**).



Mesure de la densité des pixels par profil

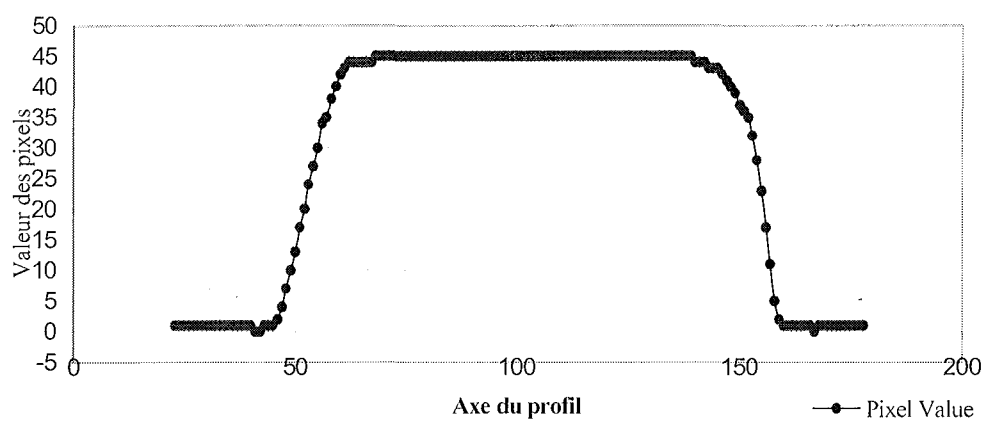


Figure II-1

Principe de l'analyse par profil ou ROI linéaire qui mesure l'intensité de chaque pixel traversé par le profil

Plusieurs profils sont réalisés par image, en différents points de la périphérie tumorale afin d'étudier individuellement des territoires susceptibles ou non d'être infiltrés (cf. première partie discussion).

Afin de définir une fourchette des valeurs de signal (du blanc au noir et du brun au bleu ciel) permettant de séparer arbitrairement, selon l'intensité des pixels, le cerveau sain, le cerveau infiltré et la tumeur dense, les densités moyennes, minimales et maximales observées respectivement dans le cerveau sain et dans la tumeur dense sont mesurées par ROI, sur

chaque image avant de tracer des profils (environ 500 pixels par ROI pour les images d'IRM et 2000 pixels pour les images immunohistochimiques).

Les profils sont tracés de manière à assurer des mesures reproductibles et comparables. Quatre zones de transition sont étudiées sur chaque image d'IRM et d'immunohistochimie, grâce à deux axes, tracés sur le signal tumoral, perpendiculaires l'un par rapport à l'autre. Un axe vertical passe par la région de l'hypophyse en bas et le sommet de la tumeur en haut, à égale distance des deux bords latéraux de la tumeur, et le second axe, perpendiculaire au précédent, passe par la mi-hauteur de la tumeur. Ces repères, simples à déterminer quelle que soit l'image, d'IRM ou d'immunohistochimie, définissent quatre zones de transition par image analysée (**planche 7, figures F et G**).

Compte tenu des différences importantes de résolution des images comparées (faible pour l'IRM, élevée pour l'immunohistochimie) il n'est pas possible d'apparier des valeurs absolues. Les données sont donc recueillies sous la forme de valeurs relatives ou d'indices, avec, pour l'étude des surfaces, le rapport de la surface du signal tumoral sur la surface cérébrale totale et pour l'infiltration, le rapport du nombre de pixels de valeurs intermédiaires de la région de transition sur le nombre total des pixels du signal tumoral sur l'axe.

La totalité des valeurs numériques est stockée sur un ordinateur PC dans des fichiers Microsoft Excel[®] soit 20 valeurs appariées d'indices de surface tumorale et 80 valeurs appariées d'indices d'infiltration tumorale.

2.2.4. Les méthodes statistiques

Les différents tests statistiques sont choisis en tenant compte des petits effectifs comparés.

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel SAS[®].

Les indices de surface tumorale sont comparés par le test Wilcoxon pour valeurs appariées.

Les indices d'infiltration tumorale sont comparés par le coefficient de corrélation intraclasse (13) et par la méthode graphique de Bland et Altman (24, 25).

La recherche d'une différence entre les indices d'infiltration tumorale est réalisée par le T-test de Student. La recherche d'une différence entre les temps de relaxation T2 du cerveau sain et de la tumeur est réalisé par le T-test de Student et par une analyse de variance (Anova test).

3. RESULTATS DE L'IMAGERIE IRM

3.1. L'imagerie à 1,5 Teslas (Clinical Signa[®])

Le signal T1, sans injection de gadolinium, des greffons varie en fonction du siège hétérotopique ou orthotopique de la tumeur.

Les greffons hétérotopiques apparaissent spontanément en hyposignal sur les séquences pondérées en T1. Après l'injection de gadolinium, les images pondérées en T1 des mêmes greffons révèlent le caractère bien limité de la tumeur, circonscrite par une pseudo-capsule prenant le contraste (**planche 6, figures A et B**).

L'infiltration des tissus sains résultant de la croissance du greffon orthotopique conduit à un déplacement de la ligne médiane et, pour les plus grosses tumeurs, à une effraction de la boîte crânienne ainsi qu'à une expansion vers les tissus mous sous cutanés. Toutefois, aucun signal permettant de discriminer la tumeur des tissus normaux n'est visible sur les images pondérées en T1 et en T2 en l'absence de l'injection de gadolinium.

L'utilisation préalable de la voie vasculaire a permis de constater l'apparition d'un rehaussement tumoral en T1 après une injection de gadolinium. Cependant, l'impossibilité d'utiliser en série la voie artérielle et l'efficacité de la voie intra-péritonéale conduit à n'utiliser que cette dernière. Avec cette modalité, un signal est parfaitement observé (**tableau II-1**) confirmant donc le passage du gadolinium à travers cette séreuse, bien que l'agent utilisé soit une très grosse molécule. Une dose importante est toutefois nécessaire pour obtenir un signal dans des temps assez brefs. Ce volume est empiriquement fixé à 0,5 mL de gadolinium par animal puisqu'en deçà, nous n'avons pas obtenu de signal, même 15 minutes après l'injection. Le délai idéal séparant l'injection de la mesure est de 10 minutes. Au delà de 20 minutes, le signal tumoral est saturé par l'accumulation de produit de contraste, en deçà, la prise de contraste n'est pas suffisante.

Souris	Volume injecté	1 min. 30	3 min.	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.
D4a	0,25 mL	0	0	0	0	0	0
D4c	0,5 mL	0	0	+	++	++	Signal saturé

0 absence de prise de contraste
+ discrète prise de contraste
++ importante prise de contraste

Tableau II-1
Délai d'apparition d'un rehaussement en IRM après l'injection intra-péritonéale de gadolinium

Le délai minimum de croissance tumorale pour observer un signal est de 45 jours après la greffe orthotopique. Le signal révèle une tumeur d'environ 0,3 cm de diamètre qui n'a pas été contrôlée histologiquement car la souris a été conservée en vie afin de réaliser d'autres mesures IRM. Au cours de la mise au point des modalités d'exploration du modèle, l'évolution du gliome intracrânien de la souris D4c peut être contrôlée par trois IRM successives. Il nous est ainsi possible de poser un diagnostic positif de tumeur à J 51 après la greffe puis de surveiller la croissance tumorale sur un deuxième cliché à J 65 et sur un troisième à J 72 (**planche 6, figures D, E et F**). L'examen clinique de l'animal est parfaitement normal durant cette période, la tolérance de la souris à l'injection de gadolinium est excellente.

Quelques essais de coupes pondérées en T2 sont réalisés mais les dimensions de la souris et la nécessité d'une immobilité parfaite ne permet pas d'obtenir de clichés exploitables.

3.2. L'imagerie à 2.4 Teslas (Bruker Biospec®)

3.2.1. L'analyse qualitative des images

De manière analogue à ce qui est observé avec le Clinical Signa®, la séquence pondérée en T1 sans injection de gadolinium ne révèle aucune différence de signal entre la tumeur et le parenchyme cérébral. Un rehaussement au niveau de la tumeur est visible après l'injection intra-péritonéale de gadolinium, avec un délai minimum de croissance tumorale nettement plus court puisqu'un signal est visible 16 jours après une greffe avec le glioblastome E (**planche 7, figure A**). Dans ce cas, le rehaussement correspond à une tumeur

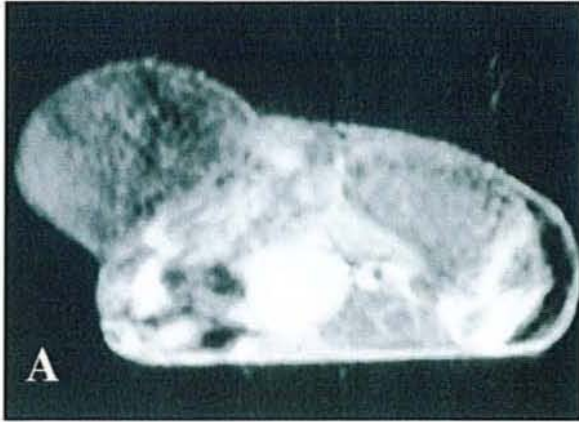


PLANCHE 6 **L'imagerie IRM à 1,5Teslas**

A : L'aspect du greffon hétérotopique du glioblastome D sur une image pondérée en T1 sans l'injection de gadolinium.

B : L'aspect du même greffon sur une image pondérée en T1 après l'injection intra-péritonéale de 0,5 mL de gadolinium.

C : Une altération de la barrière hémato-encéphalique est visible macroscopiquement dans la tumeur cérébrale 1 heure après l'injection intra-artérielle de 200 μ L de bleu d'Evans à 2%.

D, E et F : La croissance d'un greffon orthotopique du glioblastome E, cliniquement indétectable, est suivie sur des séquences pondérées en T1 après l'injection intra-péritonéale de 0,5 mL de gadolinium - D: J51, E: J65 et F: J72.

d'environ 1,5 mm de diamètre sur la coupe immunohistochimique correspondante. La réalisation d'acquisitions tardives (à 20 et à 30 min.) au cours d'une même expérimentation révèle une accumulation de gadolinium dans la tumeur en l'absence de diffusion significative de l'agent de contraste de la tumeur vers le cerveau sain (**planche 7, figure B**).

Les images obtenues à 2,4 Teslas ont une définition légèrement meilleure que celles obtenues à 1,5 Teslas ceci pouvant s'expliquer par une taille de matrice plus élevée et par un champ plus petit. Toutes les séquences pondérées en T1 après l'injection de gadolinium montrent un intense rehaussement, quel que soit le type de glioblastome et le volume du greffon lorsque la tumeur est de taille supérieure ou égale à 1,5 mm (**planche 7, figures C, D et E**).

L'ensemble des greffons du glioblastome D et les greffons du glioblastome E dont le diamètre est évalué à moins de 4 mm sur les coupes immunohistochimiques, se caractérisent par un rehaussement de signal homogène. En revanche, les greffons du glioblastome E de taille supérieure à 4 mm montrent un rehaussement hétérogène. Le signal prédomine tantôt en périphérie, tantôt au centre de la silhouette tumorale. Sur les coupes tissulaires, les tumeurs correspondantes ne montrent pas de foyers extensifs de nécrose ischémique mais des foyers microscopiques focaux. Dans ce cas, l'étude comparée, région par région, des images ne montre pas de correspondance topographique entre les signaux hypodenses en IRM et les foyers de nécrose tumorale en histopathologie (**planche 7, figure F**).

En ce qui concerne la taille, la silhouette et le dégradé des contours, les images pondérées en T1 après l'injection de gadolinium des greffons du glioblastome D diffèrent nettement de celles du glioblastome E. Les images des greffons du glioblastome E révèlent des lésions arrondies à contours nets se démarquant de façon précise du parenchyme cérébral. En revanche, les images des greffons du glioblastome D montrent des tumeurs souvent plus petites, de forme triangulaire, sans contours nets, se signalant au contraire par une décroissance progressive de l'intensité de pixels (**planche 7, figure G**).

L'utilisation d'un temps d'acquisition relativement long, de l'ordre de 15 minutes permet une amélioration du rapport signal sur bruit des images pondérées en T2, faible mais suffisante pour distinguer la masse tumorale sans injecter du gadolinium. Toutefois, l'appréciation des marges de la tumeur est difficile, quel que soit le type de glioblastome étudié.

Un calcul des valeurs des temps de relaxation transverse de T2 est réalisé pour 4 greffons du glioblastome E. Une différence statistiquement significative entre les valeurs de la tumeur et du cerveau sain est trouvée après les analyses bivariée et multivariée ($p<10^{-4}$) (tableaux II-2a et b).

	Nombre de pixels	Intensité moyenne des pixels	Intervalle de confiance (95%) de l'intensité moyenne	<i>p</i>
Total	918	110.6	108.9-112.2	<10 ^{-4**}
Souris				
† J 28	355	116.0	112.1-119.8	
† J 34	145	102.7	97.8-107.6	
† J 42	180	138.0	133.5-142.5	
† J 56	238	100.3	97.6-103.0	
Tissus				<10 ^{-4*}
tumeur	467	125.1	122.8-127.4	
cerveau	451	104.2	102.1-106.3	
* Student's T test ** ANOVA. † Jx: étude de corrélation x jours après la greffe.				

Tableau II-2a : Analyse bivariée

Comparaisons des valeurs quantitatives de T2 dans la tumeur et dans le cerveau sain

	Intensité moyenne des pixels ajustée	Intervalle de confiance (95%) de l'intensité moyenne ajustée	<i>p</i>
Souris			<10 ⁻⁴
J 28	122.3	118.8-125.8	
J 34	111.9	107.3-116.4	
J 42	142.1	138.1-146.0	
J 56	102.7	100.3-105.1	
Tissus			<10 ⁻⁴
tumeur	131.3	128.1-134.5	
cerveau	108.1	106.1-110.1	

Tableau II-2b Analyse multivariée (ANOVA)

Comparaisons des valeurs quantitatives de T2 dans la tumeur et dans le cerveau sain

3.2.2. Les mesures quantitatives obtenues par le traitement numérique des images

3.2.2.1.Les indices de surface tumorale

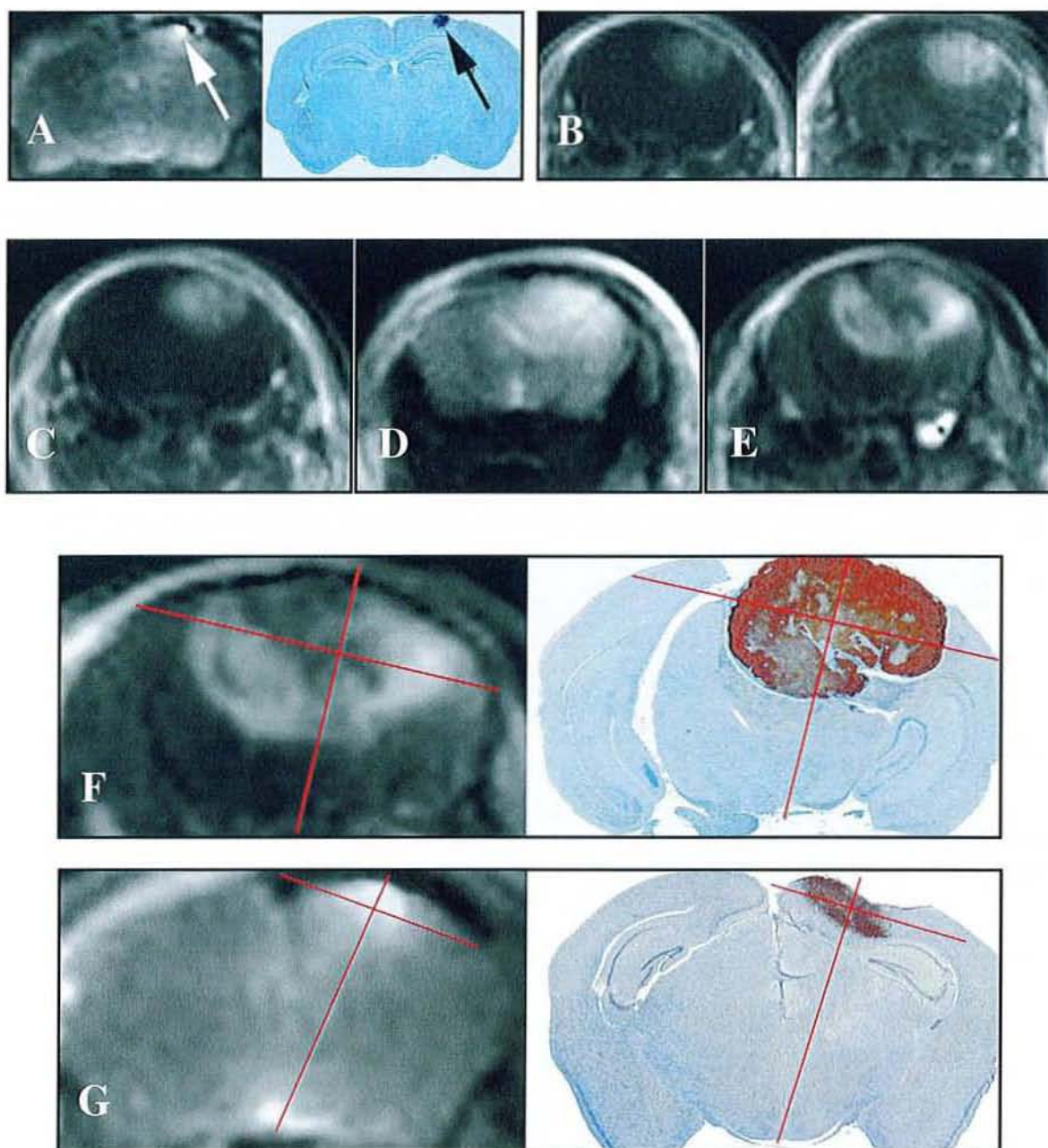


PLANCHE 7

L'imagerie IRM à 2,4Teslas

A : Un greffon orthotopique du glioblastome E est visible 16 jours après la greffe avec une séquence pondérée en T1, 10 min. après l'injection intra-péritonéale de 0,5 mL de gadolinium. La tumeur a un diamètre de 1,5 mm sur la coupe histologique correspondante - vimentine humaine (péroxydase, H2O2/DAB).

B : La répétition de séquences pondérées en T1 après l'injection intra-péritonéale de 0,5 mL de gadolinium montre l'absence de diffusion du produit de contraste dans l'encéphale sain.

C, D et E : La croissance du greffon orthotopique du glioblastome E est suivie par des séquences pondérées en T1, après l'injection intra-péritonéale de 0,5 mL de gadolinium à J28 (**C**), à J34 (**D**) et à J42 (**E**). La résolution est légèrement supérieure à celle de l'imagerie à 1,5T.

F et G : Les profils pour les mesures avec le logiciel Osiris sont reproductibles d'une tumeur à l'autre pour chacune des techniques, en imagerie et en immunohistochimie.

Aucune différence significative n'est notée entre les indices moyens de surface tumorale mesurés par l'imagerie IRM (moyenne: 24,9%; médiane: 17,9%; intervalle entre les quantiles: 39,9) et ceux mesurés par l'immunodétection de la vimentine humaine sur coupes tissulaires (moyenne: 24,8%; médiane: 17,3%; intervalle entre les quantiles: 39,9) $p=0.62$. Le coefficient de corrélation intra-classe est de 0,95 (95% d'intervalle de confiance ($_{95}IC$):[0,83; 0,99]). De la même manière, la méthode graphique de Bland et Altman montre que la différence des indices moyens est très proche de 0. La concordance entre les mesures est élevée pour les tumeurs de petite taille tandis qu'elle est moins bonne pour les tumeurs plus volumineuses, lorsque la valeur de l'indice moyen est supérieure à 30% (**figure II-2**).

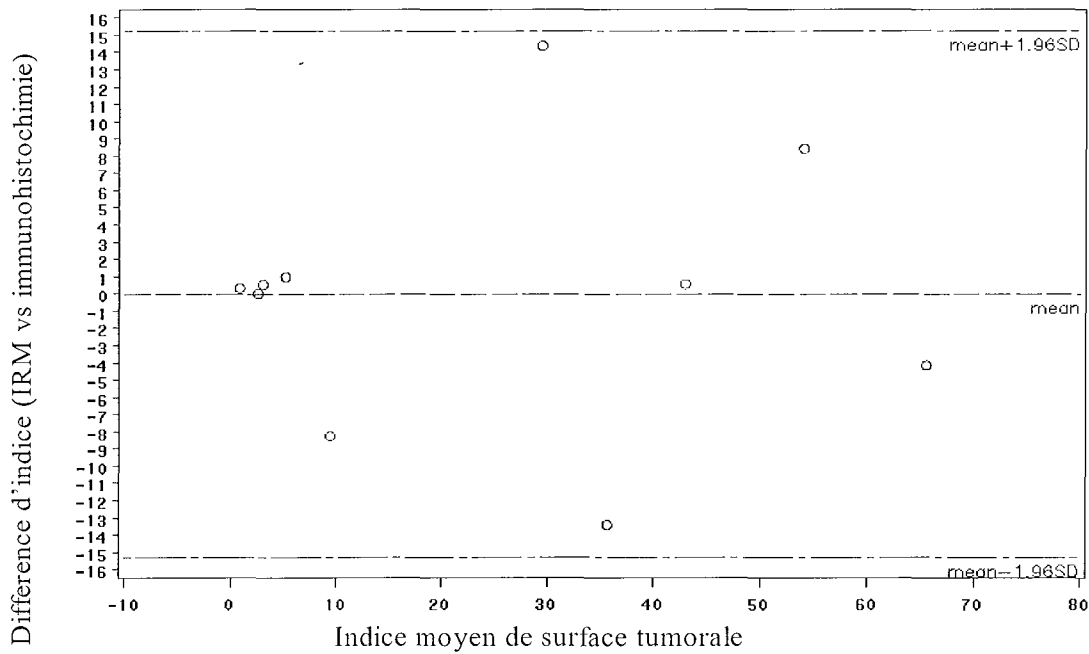


Figure II-2

Graphique de Bland et Altman : les différences entre les indices moyens de surface tumorale mesurés sont faibles pour les petites tumeurs et plus importantes lorsque la tumeur augmente en taille

3.2.2.2.Les indices d’infiltration tumorale

L'indice moyen d'infiltration tumorale est de 7,9% et la médiane correspondante de 5,5%. Il n'est pas trouvé de différence significative entre les indices moyens d'infiltration mesurés selon chacune des méthodes ($p=0.06$) (**tableau II-3**).

Méthode utilisée		Immunohistochimie	IRM	<i>p</i> *
		(n = 40)	(n = 40)	
Indice	Moyen	6,8	8,9	0,06
	Median	3,8	6,7	
	Q1-Q3	2,1-10,2	3,9-12,6	
	Range	0,6-32,4	0,6-35,7	

* appariement par T-test de Student.

Tableau II-3

Indices d'infiltration tumorale selon chacune des méthodes (Q1 : premier quantile ; Q3 : troisième quantile)

Le coefficient de corrélation intra classe est de 0,52 (95% d'intervalle de confiance [0,25; 0,71]). Le graphique de Bland et Altman montre une faible différence moyenne entre les résultats obtenus avec les 2 méthodes (2,1%) mais avec un intervalle de confiance de 95% très important, allant de -15% à +11%. Au total, ceci signifiait qu'il y a environ 50% de chance que la concordance entre les mesures soit due au hasard. Les valeurs mesurées en IRM ne sont donc pas significativement corrélées aux résultats du contrôle immunohistochimique (**figure II-3**).

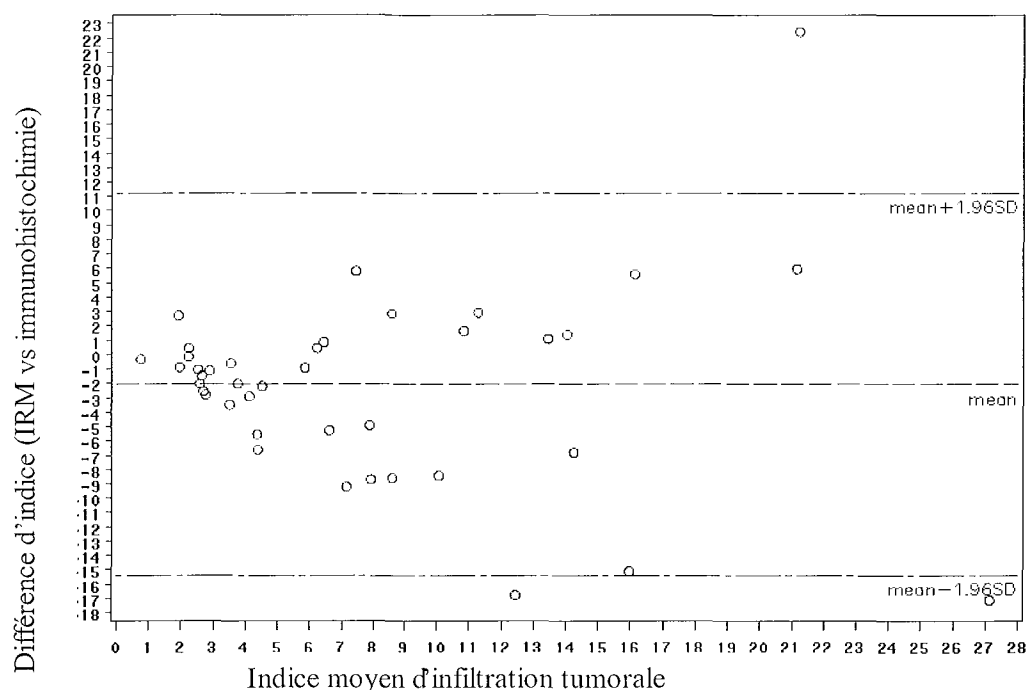


Figure II-3

Graphique de Bland et Altman : les différences entre les indices moyens d'infiltration tumorale sont éloignées de 0 ce qui traduit une faible concordance entre les valeurs mesurées par les deux méthodes

3.3. Les études de vascularisation

L'analyse morphologique complète des greffons est identique à celle développée en première partie. Quelques précisions concernant la morphologie des greffons du glioblastome E sont toutefois nécessaires. Cette tumeur a un aspect histopathologique comparable à celui du glioblastome D au niveau de sa composante tumorale dense, caractérisée par :

1) une densité cellulaire importante ; 2) des cellules peu différenciées, souvent en mitose ; 3) un réseau vasculaire irrégulier, tortueux, sans pluristratification endothéliale, ni aspect pseudoglomérulé ; 4) des foyers serpigneux de nécrose de coagulation avec agencement pseudo palissadique des cellules tumorales, visibles sur les greffons dont le plus grand diamètre est supérieur à 4 mm, c'est à dire lorsque les tumeurs sont prélevées après le 42^{ème} jour de greffe.

L'étude de l'infiltration tumorale par l'immunodétection de la vimentine humaine confirme une infiltration minime ou absente par le glioblastome E. Le tissu cérébral murin est, en revanche, refoulé.

La vascularisation des deux glioblastomes est semblable à celle développée dans la première partie (cf. chapitre chimérisme). L'étude quantitative montre que la densité vasculaire est, sans exception, beaucoup plus basse dans la masse tumorale principale (allant de 11 à 49; moyenne: 29; médiane: 28; déviation standard: 11,2) que dans l'hémisphère normale (allant de 73 à 124; moyenne: 102; médiane: 100; déviation standard: 15,2).

4. DISCUSSION DES TRAVAUX D'IMAGERIE

Les rapides progrès techniques de l'imagerie IRM ont rendu cette exploration indispensable au diagnostic des tumeurs cérébrales (76, 113, 136) et ont permis l'émergence d'une séméiologie radiologique validée en clinique et qui, pour les neuropathologistes, constitue l'équivalent d'un examen macroscopique. Les tumeurs astrocytaires, qu'elles soient cytologiquement bénignes (astrocytome pilocytique) ou malignes (astrocytome anaplasique et glioblastome) sont hautement angiogéniques lorsque elles sont très cellulaires. Ceci se traduit de manière générale en imagerie (TDM ou IRM) par un rehaussement après une injection de produit de contraste. Ces tumeurs comportent toujours une composante de tissu tumoral dense, très cellulaire et en conséquence, prennent, au moins de façon partielle, le contraste. Les oligodendrogliomes, en revanche, sont peu angiogéniques, sauf lorsque la tumeur est de haut grade. Cette caractéristique est très spécifique et constitue un critère important pour attribuer un grade à la tumeur (36).

Le rôle de l'IRM morphologique est donc essentiel en ce qui concerne le diagnostic positif d'un processus expansif intra-cérébral. Toutefois, il n'existe pas, actuellement, de séquences IRM satisfaisantes pour évaluer avec certitude la composante tumorale à cellules isolées infiltrant le cerveau autour de la masse principale. L'étude histopathologique courante des pièces d'exérèse chirurgicale des gliomes et les travaux de corrélation anatomo-clinique qui ont été publiés montrent que l'infiltration tumorale va généralement bien au delà de ce que suggère les images d'IRM pondérées en T2, qui sont pourtant réputées mettre en évidence la composante à cellules isolées par l'intermédiaire de l'œdème vasogénique qui leur est généralement associé (96). Cette infiltration s'effectue sur un mode monocellulaire qui est, par ailleurs, particulièrement difficile à apprécier sur des biopsies stéréotaxiques.

Actuellement, le refus de l'autopsie scientifique rend difficile les études de corrélation anatomo-clinique sur des cerveaux humains complets, ce qui limite les possibilités d'évaluer les nombreuses séquences d'acquisition IRM en les comparant à un standard que constitue l'examen histopathologique des tissus étudiés.

En dépit de la petite taille de la souris nude, les travaux rapportés dans cette thèse ont démontré que ce modèle permet la réalisation d'images d'IRM morphologiquement significatives et dont les caractéristiques sont superposables à celles observées chez l'homme. La petite taille du porte-greffe simplifie l'étude histopathologique puisque l'ensemble de la tumeur et de l'encéphale est analysable sur une même coupe. Enfin, le chimérisme cellulaire qui permet d'étudier individuellement l'infiltration tumorale et la vascularisation du parenchyme sain et de la tumeur isole sélectivement des paramètres essentiels pour comprendre la formation de l'image IRM.

La réalisation de séquences pondérées en T1 sur un appareil à haut champ, après une injection de gadolinium, a un grand intérêt puisque cette technique permet de confirmer dès le 16^{ème} jour de greffe l'existence d'une tumeur ne mesurant pas plus de 1,5 mm de diamètre. Le diagnostic de certitude de prise du gliome orthotopique est donc possible du vivant de l'animal, de même que le suivi itératif du développement tumoral, spontané ou soumis à l'effet de diverses thérapeutiques. L'emploi d'un appareil destiné à un usage clinique, à champ moins élevé, ne permet toutefois pas de mettre en évidence aussi précocement une tumeur. Cependant, cet appareil permet une surveillance à des stades plus tardifs de la croissance tumorale.

L'administration intravasculaire du gadolinium, par analogie à ce qui est pratiqué chez l'homme, nécessite une technique complexe. Elle est difficile à mettre en oeuvre de façon extensive puisqu'elle implique la pose d'un microcathéter vasculaire. La voie intrapéritonéale constitue au contraire une méthode d'administration simple, reproductible puisqu'elle ne nécessite aucune technique microchirurgicale. La constatation d'un passage transpéritonéal du gadolinium a un intérêt considérable, dans la mesure où elle rend possible le suivi itératif de grandes séries d'animaux greffés. De ce point de vue, le modèle pourrait être utilisé pour des études de la biodistribution d'agents de contraste nouvellement employés en IRM.

Les images obtenues en T1 après l'injection de gadolinium ont des caractéristiques tout à fait comparables à celles habituellement observées en pathologie humaine. La possibilité, avec ce modèle, de disposer de greffons de plusieurs glioblastomes dont le comportement est différent permet de mieux aborder le problème de l'infiltration tumorale en IRM. Nous avons donc utilisé un glioblastome peu infiltrant et un autre qui s'est développé sur un mode expansif et infiltrant de manière analogue à ce qui observé chez l'homme. L'analyse par morphométrie des images IRM et des témoins histopathologiques n'a pas permis de trouver de concordance entre le mode de décroissance du signal IRM en périphérie de la masse principale et le degré d'infiltration cellulaire tumorale.

Une autre solution aurait été de ne comparer que la surface de pixels de densité intermédiaire mais cette méthode n'aurait pas permis d'apprécier la pente de décroissance du signal. La différence importante de résolution entre les images et l'existence d'artéfacts liés à chacune des techniques (déformation en IRM et rétraction due à la fixation formolée en immunohistochimie) aurait rendu aléatoire une comparaison de surfaces beaucoup trop petites pour un risque d'erreur trop grand.

En revanche, il existe une forte corrélation entre le rehaussement tumoral après l'injection de gadolinium et la composante tumorale dense caractérisée par une altération de la barrière hémato-encéphalique. Cette anomalie est précoce pour les deux cas de glioblastomes étudiés puisque même des tumeurs de petite taille sont détectables. Le degré d'extravasation du gadolinium n'est pas lié de manière linéaire au nombre de cellules tumorales qui infiltrent le parenchyme cérébral ce qui suggère que l'altération de la barrière hémato encéphalique n'est pas un phénomène uniquement lié à la densité cellulaire tumorale. Ceci permet de comprendre la bonne corrélation qui s'établit pour des tumeurs de taille réduite (à ce stade, peu infiltrantes) entre les indices de surface tumorale. La concordance entre les deux techniques diminue avec l'augmentation de taille du greffon qui se traduit en microscopie par une composante infiltrante plus importante. Cette observation laisse à penser que plus la surface de prise de contraste est importante et plus le risque de sous estimer le volume tumoral réel est important.

Un autre constat, d'un intérêt certain en clinique, est l'absence de corrélation retrouvée entre le degré de nécrose tumorale constaté sur les coupes tissulaires et l'hétérogénéité du signal en IRM. Il faut également noter qu'il existe une prise de contraste en l'absence d'hyperplasie endothéliale (cf. première partie – Chapitre 2). Ces résultats montrent qu'il n'est pas possible de déterminer le grade d'un astrocytome sur le seul aspect de l'imagerie IRM. Il n'y a, de même, pas de concordance entre l'observation histopathologique d'une

nécrose et d'une hyperplasie endothéliale et une nécrose supposée en IRM. L'hétérogénéité du rehaussement n'est pas seulement imputable à une nécrose tissulaire puisque cette dernière est histologiquement moindre que ne le suggère l'IRM. Ce phénomène paraît davantage lié à des troubles de la perfusion vasculaire en raison du faible nombre de vaisseaux sanguins dans la tumeur et des anomalies importantes du réseau circulatoire, ainsi que l'a montré le marquage du collagène IV de type murin.

La présence de cellules tumorales isolées dans des territoires ne prenant pas le contraste est d'une importance considérable chez l'homme. L'utilisation de biopsies stéréotaxiques a permis de démontrer que les zones d'hypersignal en T2 présentes autour des masses tumorales denses des gliomes sont le siège d'une infiltration par des cellules tumorales isolées (36). Toutefois, l'analyse des marges des zones d'hypersignal T2, considérées comme saines en IRM, révèlent la présence d'une infiltration par des cellules tumorales dans 40% des cas étudiés (96). Ce fait remarquable explique la difficulté à découvrir les limites exactes des gliomes et, par conséquent la fréquence des récurrences après les interventions d'exérèse.

Les images des séquences pondérées en T2 réalisées chez la souris nude sont assez décevantes mais les mesures quantitatives de T2 dans la tumeur et dans le cerveau sain montraient une différence significative ($p < 0.0001$). La différence est probablement due à des variations minimales du contenu en eau, imputables aux modifications de l'architecture microvasculaire, non repérables sur les images d'IRM et de microscopie. La technique de mesure quantitative par ROIs de T2 peut présenter un intérêt pour mieux caractériser certains territoires, lorsque la seule analyse visuelle paraît insuffisante pour reconnaître ou non une infiltration tumorale. Les résultats de ce travail ont porté sur une grande surface de l'image IRM de la tumeur, sans qu'il ne soit possible d'étudier sélectivement la petite composante infiltrante périphérique. Cette technique justifie donc, pour être validée, des travaux complémentaires avec un modèle de gliome beaucoup plus infiltrant, pour augmenter le volume analysable de tissu contenant des cellules tumorales isolées.

L'analyse du chimérisme (cf. première partie – chapitre 3) a permis de démontrer que les cellules tumorales infiltrantes conservent leur capacité de se diviser dans le parenchyme cérébral en l'absence d'œdème identifiable sur les coupes tissulaires et en imagerie, sous réserve des limites de sensibilité de l'appareil d'IRM. Il a également été noté que les vaisseaux sanguins du parenchyme cérébral infiltré deviennent anormalement congestifs au

contact des cellules tumorales, qu'elles soient ou non isolées. Ces anomalies morphologiques peuvent expliquer l'existence, chez l'homme, d'un œdème vasogénique dans les territoires infiltrés par des cellules tumorales. Des études fonctionnelles de la perfusion sanguine tumorale devraient apporter des informations complémentaires non négligeables sur ce phénomène lié à l'infiltration par des cellules isolées. L'IRM de diffusion (33, 82), et surtout de perfusion, sont des techniques fonctionnelles intéressantes, susceptibles de répondre à ces questions et dont l'étude avec ce modèle sont assez faciles à mettre en œuvre (34, 81).

Les résultats de ce travail d'imagerie montrent l'intérêt de développer dans ce domaine des modèles animaux expérimentaux qui offrent l'énorme avantage d'un contrôle histopathologique immédiat, jamais possible chez l'homme. Les applications de l'IRM ne se limitent pas au seul champ de la morphologie. Outre l'approche fonctionnelle, des études du métabolisme tumoral sont également possibles par l'intermédiaire de la Spectroscopie RMN applicables aux tumeurs greffées chez des souris nude comme nous allons le montrer dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 6
ETUDE DE SPECTROSCOPIE PAR RESONANCE
MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU P31

1. QUELQUES RAPPELS RELATIFS A LA SPECTROSCOPIE RMN

Les applications biomédicales potentielles des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) ne s'arrêtent cependant pas au seul domaine de l'imagerie morphologique. La spectroscopie qui constitue, en fait, la première application technique dérivée du phénomène de résonance magnétique nucléaire (70) permet une analyse de la structure et de la conformation spatiale ainsi qu'une étude de la dynamique de molécules comportant des noyaux qui possèdent des propriétés magnétiques (noyau de spin non nul) comme le proton (^1H), bien sur, mais également l'isotope 13 du carbone (^{13}C), le fluor (^{19}F) le phosphore (^{31}P) et le sodium (^{23}Na) (117). L'étude peut être menée *in vitro*, sur des substances isolées, ou *in vivo*, sur des biomolécules non purifiées, mais dans ce cas, il faut que les noyaux étudiés soient présents à des concentrations suffisamment importantes car la sensibilité de la technique est alors 20 fois plus faible (86). Il est également nécessaire que le noyau exploré par la spectroscopie RMN concerne des biomolécules dont la gamme de déplacement chimique est assez étendue pour donner une bonne résolution au spectre qui est obtenu par la transformée de Fourier du signal RMN (appelé FID pour free induction decay) après une impulsion « Radio Fréquence » (RF). Le spectre va permettre d'identifier des biomolécules par la position du pic de résonance qu'elles produisent, repéré en fonction de son décalage de fréquence (le déplacement chimique δ) par rapport au pic d'une espèce chimique choisie comme référence. La hauteur et la largeur de chaque pic va varier en fonction de la quantité absolue du métabolite reconnu et de sa mobilité définissant ainsi un profil spectral propre à chaque tissu étudié.

Le phosphore 31 est un noyau qui s'applique bien aux études du métabolisme énergétique par spectroscopie car il est naturellement abondant dans les tissus biologiques et permet d'obtenir un spectre simple à analyser du fait d'un nombre de pics réduit. On observe respectivement un pic pour le phosphomonoester, le phosphate inorganique, le phosphodiester, la phosphocréatine, et 3 pics pour l'adénosine triphosphate sous ses 3 isoformes (γ , α et β). L'étude du noyau phosphore permet aussi de mesurer le pH tissulaire car le phosphate inorganique a un pK proche du pH du milieu extra ou intracellulaire. Dans ce cas une discrète variation du pH tissulaire s'accompagne d'une modification du déplacement chimique du pic du phosphate inorganique par rapport à celui de la phosphocréatine.

La sélection du volume tissulaire à analyser, ou volume sensible, va dépendre de la technique spectroscopique adoptée. Deux méthodes existent. La plus simple consiste à utiliser une antenne de surface qui va mesurer l'équivalent d'une demi sphère de rayon égal à celui de la spire au contact du tissu à étudier (131). Au niveau du crâne, ceci implique donc que le spectre recueilli est une mesure globale des métabolites présents dans la peau, la boîte osseuse et dans l'encéphale sous jacent. L'autre technique de spectroscopie consiste à sélectionner un volume à partir d'une image IRM, par le système des gradients d'un appareil IRM qui permet en même temps les deux types de mesures. Dans ce cas, le signal reçu est plus faible qu'avec la première méthode et les réglages instrumentaux particulièrement difficiles. En pratique cette technique complexe est utilisée pour apprécier la présence d'un seul métabolite sur une image au niveau d'une région d'intérêt préalablement sélectionnée. Le résultat s'observe sous la forme d'une « image métabolique » et non d'un spectre unique de l'ensemble des métabolites.

Les informations que la spectroscopie RMN est susceptible d'apporter en Neurologie sont d'ordre structural (maladies dégénératives, pathologie malformative et tumeurs), physiologique (interruption de la vascularisation cérébrale) et biochimique (troubles innés du métabolisme) (117). En Neuro-Oncologie, la spectroscopie du proton, réalisable avec des appareils d'IRM à vocation clinique (à champ magnétique supérieur ou égal à 1,5 Teslas) permet de coupler à l'étude morphologique d'une lésion par l'IRM, une étude métabolique. Cette technique a démontré son intérêt diagnostique en permettant de différencier des abcès de gliomes de haut grade (70) mais c'est surtout dans le suivi post-thérapeutique d'une tumeur dont le spectre initial a été enregistré comme référence que la spectroscopie RMN du proton (94) et du phosphore 31 (14, 19, 90) peut être vraiment performante.

L'utilisation d'un modèle animal de tumeurs cérébrales est indispensable si l'on désire comparer les résultats de la spectroscopie RMN et ceux de méthodes invasives, que se soit une mesure biochimique ou une analyse morphologique microscopique (132). Le siège abdominal d'un greffon de tumeur cérébrale rend l'étude spectroscopique par une antenne de surface aisée mais l'analyse du chimérisme a démontré l'influence du site de la greffe sur le mode de développement, infiltrant ou non, du gliome et sur sa vascularisation péri-tumorale. L'implantation hétérotopique d'un gliome humain conduit à une tumeur pseudo encapsulée, non infiltrante, dont l'architecture vasculaire est nécessairement différente de celle d'un gliome orthotopique infiltrant qui va, dans sa partie la plus périphérique d'abord se

développer au détriment du réseau vasculaire cérébral morphologiquement modifié mais toujours imperméable. Il en résulte des conditions de nutrition probablement différentes de celles observées avec un modèle non disséminant.

L'objet de ce chapitre est donc de poursuivre les investigations non invasives du modèle par la RMN en mettant au point un protocole d'étude spectroscopique du phosphore ^{31}P , d'une tumeur greffée dans le crâne de la souris nude. Compte tenu de l'absence de références antérieures à propos de la spectroscopie cérébrale chez la souris, une technique avec antenne de surface calibrée au volume d'un hémisphère cérébral, a d'abord été mise au point sur des animaux témoins non greffés. Les mesures ont été réalisées dans des conditions de perfusion cérébrale différentes (normale, hypoperfusion et arrêt de la perfusion avec mort de l'animal) afin d'obtenir des spectres de référence du métabolisme phosphoré.

Chez la souris greffée, des mesures comparatives ont ensuite été réalisées en regard de l'hémicrâne sain puis de l'hémicrâne greffé. Le statut bioénergétique de chaque hémisphère a ainsi pu être établi en mesurant sur chaque spectre le rapport de l'intégrale du pic du phosphate inorganique sur celle de la phosphocréatine ou de la somme des métabolites organiques. Le pH a également pu être apprécié par une mesure du déplacement chimique du phosphate inorganique.

2. MATERIEL ET METHODES DE SPECTROSCOPIE RMN DU ^{31}P

2.1. L'acquisition des spectres avec le spectromètre Bruker Biospec[®] BMT 100 à 2.4 Teslas

Le travail de spectroscopie est réalisé avec le mini-imageur Bruker Biospec[®] à 2,4 Teslas utilisé pour les études d'imagerie à haut champ. Le protocole d'étude de référence est mis au point sur quatre souris témoins non greffées. Comme pour les travaux d'IRM, les premiers essais expérimentaux ne sont pas rapportés pour éviter des redondances.

Deux souris témoins sont anesthésiées dans des conditions standards puis étudiées chacune par cinq acquisitions spectroscopiques consécutives.

Une souris qui reçoit une surdose de kétamine responsable d'une dépression cardio-pulmonaire à l'origine d'un bas débit cérébral est étudiée en continu par des acquisitions spectroscopiques consécutives jusqu'à la mort clinique constatée de l'animal.

Une souris sacrifiée immédiatement avant d'être positionnée dans l'aimant est étudiée par cinq acquisitions spectroscopiques consécutives.

Le protocole d'étude des greffons orthotopiques est réalisé sur quatre souris greffées avec le glioblastome D. Cinq acquisitions spectroscopiques sont réalisées de manière consécutive, d'abord sur l'hémicrâne greffé ensuite sur l'hémicrâne témoin controlatéral. Une séquence d'imagerie pondérée en T1 après l'injection intra-péritonéale de 0,5 mL de gadolinium complète chacune des séries d'acquisitions spectroscopiques des quatre animaux porteur d'une tumeur.

Une souris est étudiée successivement au 28^{ème}, 34^{ème} et 42^{ème} jour après la greffe.

Une souris est étudiée au 36^{ème} jour après la greffe.

Une souris est étudiée au 49^{ème} jour après la greffe.

Une souris est étudiée au 51^{ème} jour après la greffe.

Les conditions d'anesthésie (sauf cas particulier de surdosage volontaire) et de repérage de la souris dans l'aimant sont les mêmes que celles décrites dans le précédent travail d'imagerie. Il est en effet plus simple, pour corriger l'homogénéité du champ magnétique B0 de d'abord travailler en proton et ensuite de passer à l'antenne phosphore.

L'antenne phosphore utilisée est une antenne de surface confectionnée au laboratoire de méthodologie RMN, réalisée sur le modèle d'une spire à deux tours, de diamètre externe de 8 mm et de diamètre interne de 6 mm. Pour minimiser les couplages, cette spire est orthogonale à l'antenne proton et orientée latéralement à 45° par rapport au plan sagittal médian du crâne de la souris. Le volume sensible de l'antenne est donc une demi-sphère de rayon égal à 4 mm ce qui permet de limiter la mesure à l'hémisphère cérébral homolatéral à la spire, sans chevauchement des mesures droite et gauche (**figure II-4**).

Les spectres phosphore sont acquis de la façon suivante :

La séquence utilisée est une séquence monoimpulsion avec un cyclage de phase de type Cyclops. Le temps de répétition est de 1 seconde ce qui ne correspond pas à une relaxation

total du signal (T_1 pour les métabolites phosphorés peut atteindre 5 secondes) mais à un optimum du rapport signal sur bruit en utilisant l'angle de Ernst pour l'excitation. La fenêtre spectrale (ou plage de sensibilité) est de 2000Hz et le nombre d'acquisition par spectre peut varier entre 400 et 600. La taille du spectre est de 1K (nombre total de points acquis).

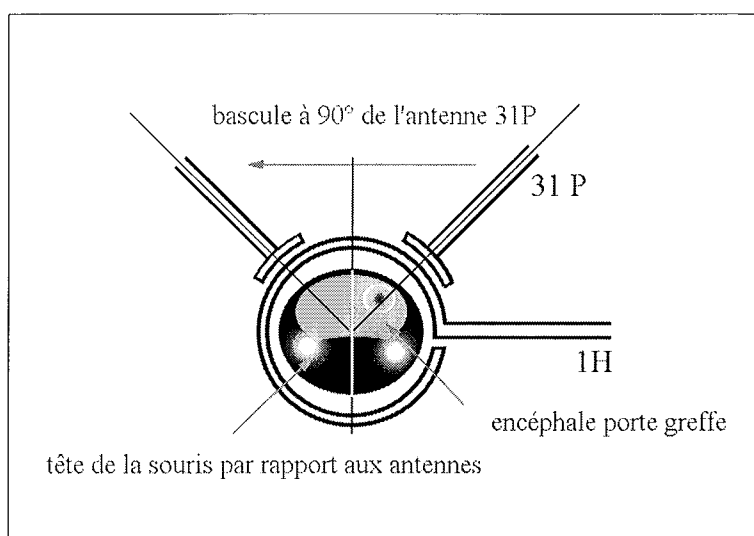


Figure II-4

Schéma de positionnement de la tête de la souris dans l'antenne proton immobilisée par rapport à l'antenne phosphore qui est mobile.

2.2. Le traitement des spectres

2.2.1. La quantification du signal

Les signaux de précessions libres (FIDs pour Free Induction Decay) sont filtrés avec un élargissement de 20 Hz (les raies des métabolites ont des largeurs entre 25 et 50 Hz) et sont transformés par la méthode de Fourier pour produire les spectres. Du fait de la présence de la raie très large du phosphore osseux, une correction est nécessaire. Nous avons choisi de ne pas faire de déconvolution du fait des distorsions introduites donc nous estimons les raies fines des métabolites par rapport à celle de l'os car les signaux sont d'ordre de grandeur très différent. Le programme de traitement utilisé pour cela a été GLINFIT[®] (Docteur A. Bain) sur la station de traitement Bruker (Aspect 1000[®]). Le programme GLINFIT[®] permet de

quantifier les raies expérimentales en les modélisant par des courbes lorentziennes ou gaussiennes, en donnant la position, la largeur et la hauteur (d'où l'intégrale) de chacune. Durant la régression, on modifie ces trois paramètres en optimisant l'écart type affiché à l'écran en continu.

En pratique, les spectres sont analysés pour cinq raies :

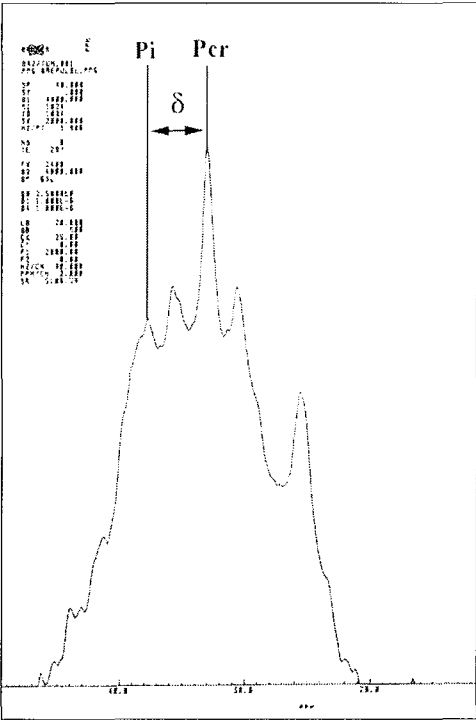
la phosphocréatine (PCr), le phosphate inorganique (Pi) et l'ATP sous ses 3 isoformes (γ , α et β). Bien que les spectres fassent apparaître des pics supplémentaires correspondant aux sucres phosphates (phosphomonoester et phosphodiester) leur présence non systématique et la difficulté de les apprécier les ont exclu de ce travail.

Du fait des mouvements de la souris, des modifications de contact entre l'antenne phosphore et la boîte crânienne évoluent en permanence et en conséquence aucune mesure absolue ne peut être entreprise. Nous avons donc utilisé le traitement usuel des spectres phosphores qui consiste en la détermination des rapports entre les intégrales des pics (Pi / PCr et Pi / somme des intégrales des autres pics). Pour améliorer le rapport signal sur bruit des spectres, nous avons réalisé des enregistrements consécutifs, sommés cinq par cinq avant le traitement des FIDs.

2.2.2. La détermination du pH à partir du déplacement chimique du pic du phosphate inorganique

La spectroscopie du phosphore permet de déterminer de manière non invasive les variations de pH des tissus étudiés par la mesure, en partie par million (ppm) du déplacement chimique (δ) du pic du phosphate inorganique par rapport à celui de la phosphocréatine. L'utilisation d'une table de conversion donne directement la valeur du pH à partir de la mesure de δ à partir du spectre avec le logiciel GLINFIT[®] (**tableau II-4 et figure II-5**)

Table des pH / DELTA (37°C)	
3,7	6,08461538
3,8	6,19781407
3,9	6,29648752
4	6,38543616
4,1	6,46768097
4,2	6,54529668
4,3	6,61982242
4,4	6,69248873
4,5	6,76435815
4,6	6,83642514
4,7	6,90970084
4,8	6,98530142
4,9	7,06456051
5	7,14919701
5,1	7,24159908
5,2	7,34536123
5,3	7,46643143
5,4	7,61598161
5,5	7,81955126
5,6	8,16311341



Détermination du pH à partir de delta (PCr-Pi) à 37°C

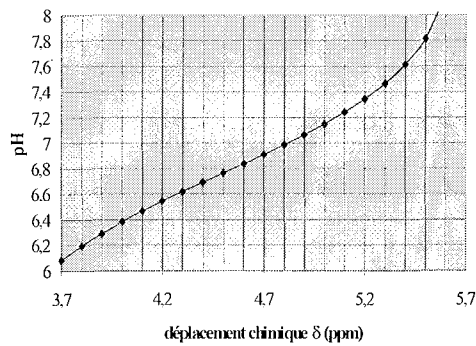


Tableau II-4

Table de conversion du déplacement chimique du phosphate inorganique en pH

Figure II-5

Déplacement chimique δ mesuré en ppm entre le phosphate inorganique (Pi) et la phosphocréatine (PCr).

3. RESULTATS DE LA SPECTROSCOPIE RMN DU ³¹P

3.1. L'évolution des spectres du phosphore chez les souris témoin non greffées

La plus grande intégrale (aire sous la courbe) de pic mesurée à l'aide du logiciel GLINFIT[®] a, par convention, une valeur de 100. La valeur affichée des intégrales des quatre autres pics est donnée en pourcentage de la valeur du pic de référence de 100.

L'examen du **tableau II-5** et de la **figure II-6** permet d'observer des différences très significatives entre les mesures du métabolisme phosphoré réalisées sur l'hémicrâne de souris saines (souris témoins 1 et 2) et sur celui de la souris sacrifiée immédiatement avant l'acquisition du signal RMN, morte avant d'être positionnée dans le spectromètre. Les modifications du signal RMN du phosphore sont extrêmement sensibles à l'état d'hypoperfusion cérébrale car une élévation précoce et rapide des rapports Pi/PCr et Pi/somme apparaît chez la souris soumise à un surdosage mortel de kétamine après son positionnement dans le spectromètre, donc encore vivante lors de la première série de mesures spectroscopiques (durant les 15 premières minutes). Il n'est toutefois pas possible de savoir à quel moment exact s'est produit le décès (durant la série de mesures à 30 ou 45 minutes ?) .

	Pi	PCr	ATP1	ATP2	ATP3	Somme des pics de phosphore organique
souris témoin sain 1	43,94	92	89,4	100	92,55	417,86
souris témoin sain 2	6,95	67,47	24,7	100	87,85	286,98
Dépression cardio respiratoire 15 min	55	78	74	100	94	401,00
Dépression cardio respiratoire 30 min	65	47	63	100	90	365,00
Dépression cardio respiratoire 45 min	88	16	98	100	99	401,00
souris morte	100	4,93	26,7	79,6	44,07	255,29

Tableau II-5

Les valeurs relatives des surfaces (intégrales) des pics mesurées avec le logiciel GLINFIT[®] chez les souris témoins.

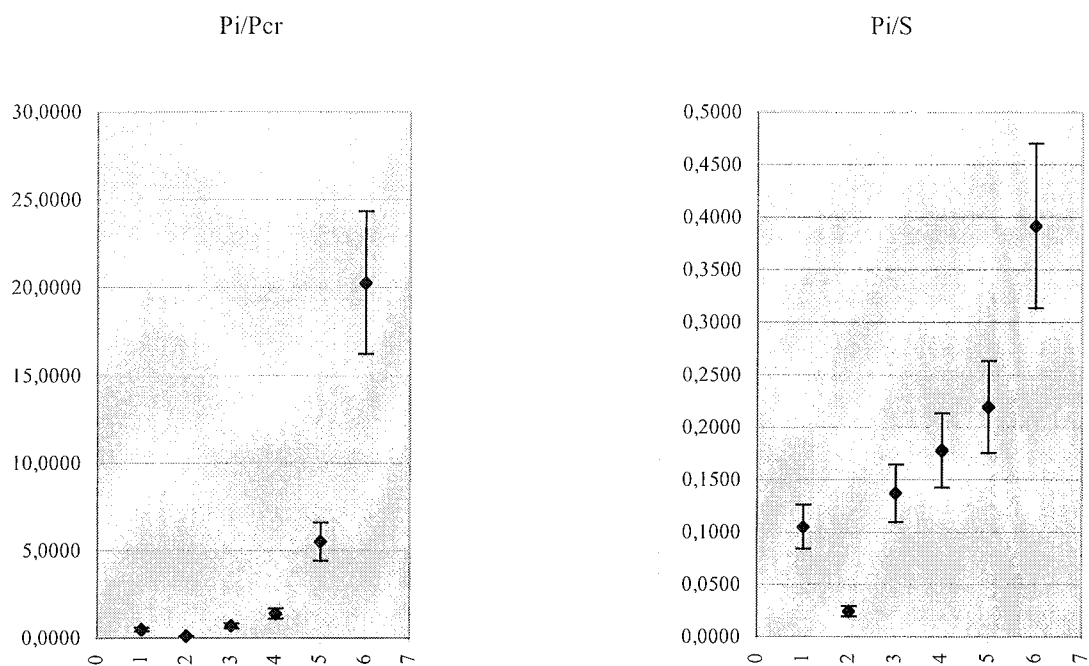


Figure II-6
L'évolution des rapports entre les intégrales des pics du phosphate inorganique sur celles de la phosphocréatine et sur celles de la somme des pics des métabolites phosphorés organiques, chez les souris non greffées.

3.2. L'évolution des spectres du phosphore chez les souris greffées avec le glioblastome D

L'antenne de surface a été conçue pour permettre une mesure sur un hémicrâne. Chaque souris greffée a donc bénéficié de deux mesures, l'une du côté sain, l'autre du côté greffé. Aucune mesure n'a été réalisée à J51 côté supposé sain car l'hémicrâne gauche était macroscopiquement le siège d'une tumeur donc probablement infiltré par le greffon. (**tableau II-6**).

<i>date d'examen</i>	<i>souris</i>	<i>Pi</i>	<i>PCr</i>	<i>ATP1</i>	<i>ATP2</i>	<i>ATP3</i>	<i>Somme des pics de phosphore organique</i>
Tumeur jour 28	1 D5a	22,6	68,53	59,12	100	60,35	310,6
jour 34	2 D5a	30,39	68,16	49,73	100	63,35	311,63
jour 36	3 D5b	17,45	67,05	73,69	100	41,9	300,09
jour 42	4 D5a	36,99	100	99,9	90,95	43,45	371,29
jour 49	5 D5c	28,36	37,67	36,87	100	43,74	246,64
jour 51	6 D5d	100	81,17	79,01	65,35	75,9	401,43
Témoin jour 28	1 D5a	20,51	96,3	84,24	100	60,26	361,31
jour 34	2 D5a	21,97	85,02	45,33	100	39,95	292,27
jour 36	3 D5b	8,68	86,36	54	100	52,62	301,66
jour 42	4 D5a	17,9	80,48	39,5	100	44,14	282,02
jour 49	5 D5c	22,01	45,05	100	89,56	60,86	317,48

Tableau II-6
Les valeurs relatives des surfaces des pics mesurées avec le logiciel GLINFIT® chez la souris porteuse d'un glioblastome intra-crânien.

Les résultats comparés des rapports montrent que, pour un risque d'erreur estimé à 20%, la différence entre les deux cotés, sain et tumoral, du rapport Pi/PCr est significative et ceci pour toutes les souris étudiées (**figure II-7**).

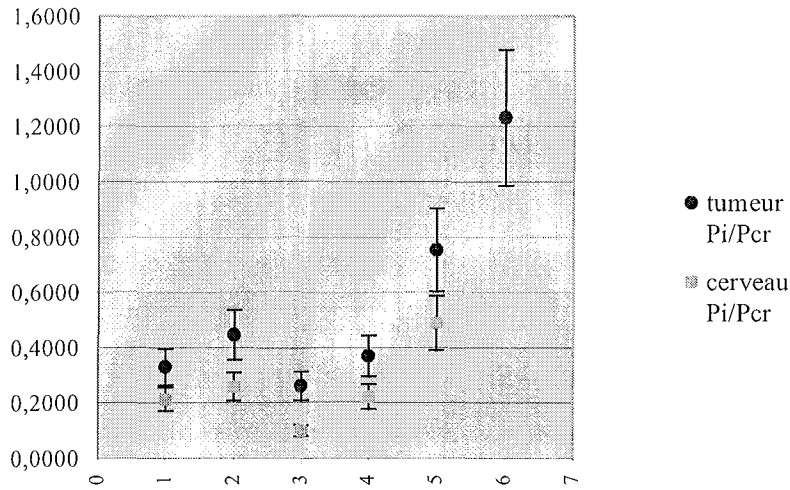


Figure II-7
L'évolution comparée des rapports du pic de phosphate inorganique sur celui de la phosphocréatine dans l'hémicrâne sain et dans l'hémicrâne greffé. Une seule mesure a été réalisée à J51 car l'hémicrâne gauche (« sain ») était macroscopiquement infiltré par la tumeur.

En revanche, avec le rapport $Pi/somme$ la différence n'est significative qu'à partir du cas N°3 (figure II-8).

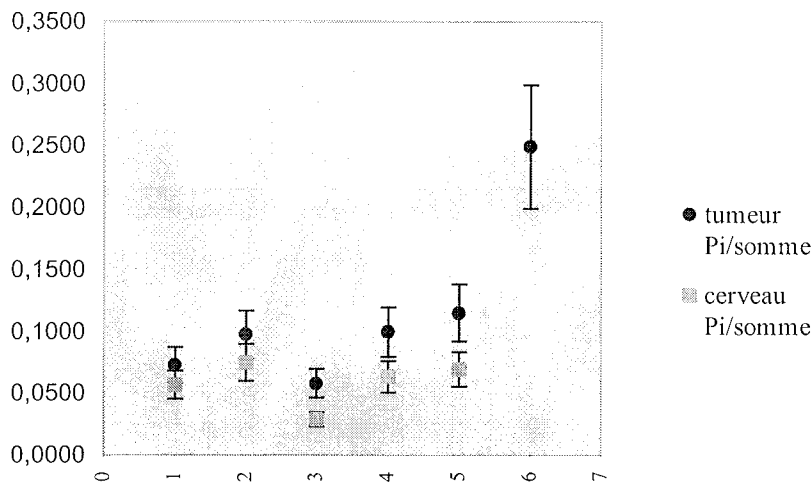
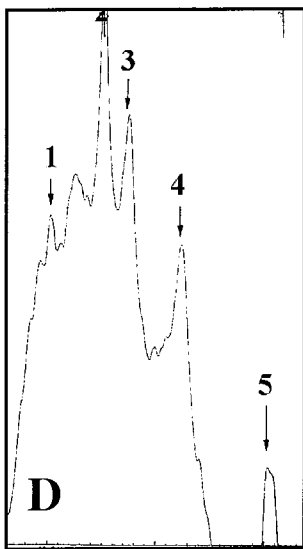
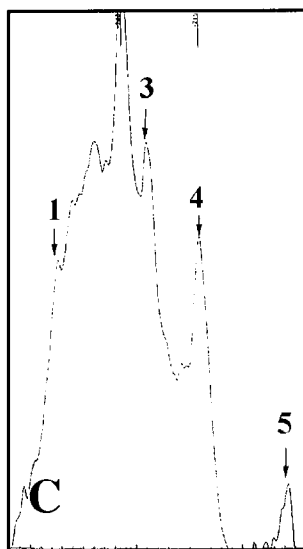
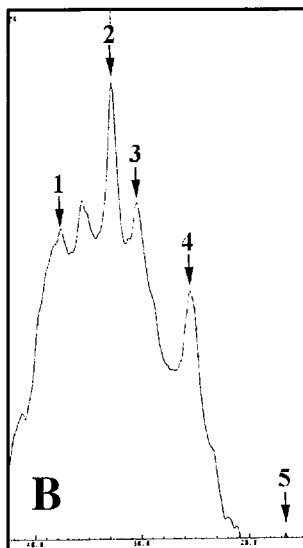
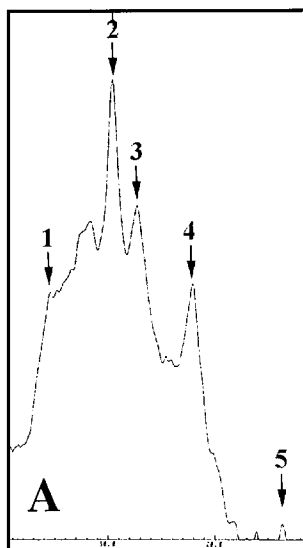


Figure II-8

L'évolution comparée des rapports du pic de phosphate inorganique sur celui de la somme des pics des métabolites phosphorés organiques dans l'hémicrâne sain et dans l'hémicrâne greffé. Une seule mesure a été réalisée à J51 car l'hémicrâne gauche (sain) était macroscopiquement infiltré par la tumeur.

3.3. La détermination du pH par le mesure du déplacement chimique du phosphate inorganique chez les souris greffées avec le glioblastome D

Le pH mesuré dans l'hémicrâne sain paraît toujours plus basique que celui mesuré dans l'hémicrâne où se trouve le greffon tumoral (figure II-9) ce qui pourrait témoigner d'une acidose dans le greffon tumoral, toutefois il s'agit d'une tendance qui n'est pas statistiquement validée du fait d'un risque d'erreur de mesure important qui se traduit notamment pas une mesure de pH anormalement trop basique au niveau de l'hémicrâne témoin chez la souris D5a (cas 1).



Le suivi par la spectroscopie RMN du phosphore 31, de la croissance d'un greffon orthotopique du glioblastome E montre une modification du spectre phosphoré en fonction du territoire étudié.

Le décalage, en "dôme" du signal est lié à la présence du phosphate osseux. L'analyse des pics par le logiciel GLINFIT permet d'en corriger les effets (à noter un sous décalage artificiel du spectre lié au logiciel d'impression).

- 1: phosphate inorganique
- 2: phosphocréatine
- 3: ATP γ
- 4: ATP α
- 5: ATP β

A: hémisphère sain à J28.

B: hémisphère tumoral à J28.

C: hémisphère sain à J42.

D: hémisphère tumoral à J42.

Le signal du phosphate inorganique est plus important du côté de la tumeur.

E: antennes proton (1H) et phosphore (31P).

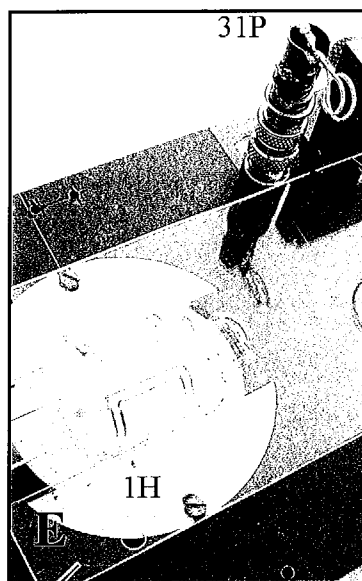


PLANCHE 8

La Spectroscopie RMN du phosphore 31

		pH	
		tumeur	sain
Cas 1	D5a J28	7,06	8,16
Cas 2	D5a J34	6,77	6,91
Cas 3	D5b J36	6,7	7,14
Cas 4	D5a J42	6,92	7,1
Cas 5	D5c J49	6,62	6,77
Cas 6	D5d J51	6,7	

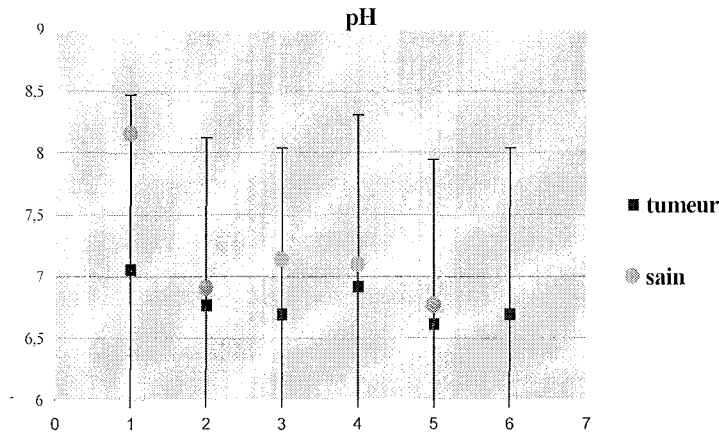


Figure II-9
Les valeurs du pH en fonction du déplacement chimique du phosphate inorganique chez des souris greffées avec le glioblastome D

4. DISCUSSION DES TRAVAUX DE SPECTROSCOPIE RMN DU ^{31}P

LA PLACE DE LA SPECTROSCOPIE RMN EN NEURO-ONCOLOGIE

L'expression la plus caractéristique d'un glioblastome, au scanner ou en IRM, est celle d'une lésion à rehaussement annulaire, développée dans la substance blanche supratentorielle, qui exerce un effet de masse considérable. Cet aspect n'est pas spécifique et de nombreux diagnostics différentiels sont possibles (113). En conséquence, le diagnostic positif d'astrocytome va dépendre de l'examen histopathologique réalisé à partir de biopsies stéréotaxiques qui ne peuvent qu'être limitées en volume. Dans la mesure où la majorité des gliomes malins ont une distribution spatiale hétérogène, une sous estimation du grade tumoral est fréquente dans la mesure où le diagnostic de glioblastome requiert la mise en évidence microscopique, ou d'une nécrose tumorale, ou d'une prolifération endothéliale importante. Ces aspects caractéristiques sont présents au sein de la masse tumorale dense mais font défaut au niveau de la composante infiltrante et ne sont donc pas observables si la biopsie est réalisée trop en périphérie du foyer dense. Cette hétérogénéité régionale est ainsi à l'origine d'une discordance entre l'imagerie et l'histopathologie occasionnant alors une difficulté diagnostique importante.

Une technique d'imagerie biomédicale complémentaire non invasive, capable de reconnaître une tumeur à vitalité certaine d'une tumeur nécrosée serait dans ce cas d'un intérêt diagnostique non négligeable. La spectroscopie RMN répond à cet objectif. Il a, avec cette méthode, été possible d'individualiser, à partir de mesures sur des spectres, des tumeurs bien vascularisées, des tumeurs ischémiques et des tumeurs nécrosées. Chez des patients atteints de tumeurs cérébrales, des anomalies du phosphate inorganique (Pi), de la phosphocréatine (PCr), du phosphomonoester (PME), et du pH ont pu être appréciées *in vivo* par la spectroscopie RMN du phosphore 31 (90, 94, 117).

En recherche expérimentale animale, la spectroscopie RMN du phosphore 31 plus rarement exploitée que la spectroscopie RMN du proton, a permis d'étudier le statut bioénergétique de xénogreffes de gliomes humains implantées dans le flanc de souris nude (17, 132). Des travaux de corrélation entre les mesures spectroscopiques et certains paramètres morphométriques de la vascularisation ont été réalisés à partir d'un modèle de gliome hétérotopique mais jamais à partir de greffon orthotopique (132).

Dans notre modèle, la vascularisation du greffon tumoral présente des caractéristiques différentes selon que la tumeur est hétérotopique ou orthotopique avec en particulier la mise en évidence d'un « détournement » des vaisseaux au profit de cellules tumorales isolées dans le cerveau avant que ne se constitue une masse tumorale dense et une altération de la barrière hémato-encéphalique. Les modèles hétérotopiques ne reproduisent jamais ce processus car il n'existe pas de composante disséminant à grande distance. Il apparaît alors nécessaire, pour évaluer plus justement le métabolisme d'un gliome tel qu'il se développe habituellement dans le cerveau de l'homme, de réaliser des mesures spectroscopiques sur une tumeur implantée en position orthotopique.

Pour ce faire, nous avons mis au point un protocole de mesure spectroscopique du phosphore spécialement adapté au cerveau de la souris nude, afin de mesurer le métabolisme phosphoré dans un volume tissulaire correspondant à un hémisphère cérébral. Cette méthode a permis de réaliser chez la souris nude des mesures successives sur l'hémi-encéphale infiltré et sur le territoire controlatéral sain. Afin d'obtenir des spectres de référence du métabolisme phosphoré chez un animal témoin, il a été nécessaire, au préalable, de réaliser des mesures chez des animaux non porteurs de tumeurs dans des conditions de vascularisation normale et en état d'anoxie, en sacrifiant l'animal par un surdosage en kétamine pour obtenir un bas débit cérébral.

DISCUSSION DES RESULTATS DE LA SPECTROSCOPIE RMN DU ^{31}P CHEZ LA SOURIS NUDE

La correction d'homogénéité du champ magnétique est réalisée avec l'antenne proton car le signal de l'eau est beaucoup plus important que celui du phosphore et donc plus aisée à réaliser. Le passage à l'antenne phosphore peut être responsable d'une modification de cette correction d'homogénéité entraînant une petite diminution du rapport signal sur bruit. Les études préliminaires sur témoins montrent cependant qu'il est possible d'obtenir des signaux analysables et que la méthode est sensible. Une mesure unique, sans comparaison entre les deux cotés, ne permet toutefois pas d'apprécier le rôle de la peau, de la voûte crânienne et du cerveau dans la formation du signal spectroscopique. Seule une méthode par spectroscopie utilisant les gradients, capable de fournir une image métabolique permettrait de localiser le signal de chacun des territoires anatomiques.

Les résultats montrent le caractère extrêmement prédictif de la méthode spectroscopique. Elle est en effet capable d'apprécier une souffrance cellulaire bien avant sa traduction morphologique, aucune anomalie histologique n'étant détectable sur le cerveau des souris mortes pendant ou avant l'expérience.

En ce qui concerne les mesures réalisées chez les souris greffées nous estimons que les comparaisons entre les hémisphères sont significatives dans la mesure où sur chaque hémicrâne le rôle du phosphore imputable à la peau et à l'os se retrouve de chaque côté. On ne peut toutefois pas exclure une différence qui pourrait être liée à la réparation tissulaire au niveau du foyer d'ostéotomie mais sur les examens de contrôle histologique on ne retrouve jamais de phénomènes inflammatoire évolutif aux moments étudiés. Il faudrait alors pour éliminer de manière plus formelle l'effet de la cicatrisation réaliser des mesures sur un plus grand nombre d'animaux ou entreprendre une crâniotomie bilatérale de même taille dont un servirait de témoin.

La valeur du rapport Pi/PCr est plus sensible aux modifications métaboliques mais elle présente un plus grand risque d'erreur lors de son estimation que le rapport $Pi/somme$ car les deux valeurs Pi et PCr varient rapidement en même temps : Pi augmente et PCr diminue. Le rapport $Pi/somme$ est estimé plus régulier (son évolution est plus linéaire) mais sa sensibilité est moins grande : pour les mesures réalisées sur des tumeurs aux temps les plus précoces après la greffe, le caractère significatif de la différence entre les mesures réalisées du côté sain et du côté de la tumeur n'est pas évident avant l'examen d'un greffon étudié à J36 pour une seuil à J28 avec le rapport Pi / PCr . La marge d'erreur de la méthode de mesure GLINFIT[®] est estimée à 20% à partir d'une lecture réalisée en double aveugle (Laurent Antunes / Jean Marie Escanyé)

La mesure du pH au niveau de l'hémisphère tumoral donne des résultats plus aléatoires que celle des intégrales des pics. En effet, l'appréciation exacte du déplacement chimique du phosphate inorganique est sujette à discussion car le risque d'erreur lors de la mesure de cette valeur est grand car le pic du phosphate inorganique est souvent large et étalé (la barre d'erreur est estimée à 0,2 unités sur des travaux déjà réalisés au laboratoire de Méthodologie RMN. JM Escanyé, résultats personnels). L'observation d'une différence importante pour une petite tumeur mesurée à 28 jours de greffe montre bien le caractère

aléatoire de la mesure toutefois on note une tendance à l'acidose au niveau des greffons ce qui témoigne en toute logique d'un métabolisme anaérobie.

COMPARAISON DES RESULTATS DE LA SPECTROSCOPIE RMN DU ^{31}P A CEUX DE LA MORPHOLOGIE (IRM ET MICROSCOPIE)

De nombreuses expérimentations préalables ont été nécessaires avant que ne soit mis au point le protocole d'étude spectroscopique ce qui explique le petit nombre de cas étudiés. Avec ce petit effectif, il est difficile de réaliser une étude de corrélation statistiquement significative entre la morphologie de la tumeur et ses anomalies spectroscopiques. Toutefois, on peut déjà constater qu'il n'y a pas de corrélation évidente entre la nécrose tumorale (qui apparaît tardivement et de manière focale dans la tumeur) et les anomalies du métabolisme phosphoré qui sont très précoces. A l'instar d'un travail (132) ayant démontré une corrélation entre les anomalies constatées en spectroscopie du phosphore et celles des vaisseaux anarchiques de la tumeur il serait judicieux d'étudier plus particulièrement la vascularisation. En effet, il a été démontré qu'une distance intervasculaire moyenne supérieure à 200 μm , seuil au delà duquel un métabolisme aérobie n'est plus possible, s'accompagnait d'une élévation rapide du rapport du phosphate inorganique sur celui du nucléoside triphosphate.

En définitive, il est possible d'utiliser le modèle que nous avons développé pour des études en RMN même si le nombre de résultats directement exploitables reste modeste. Les études de faisabilité réalisées ont prouvé qu'il est possible d'explorer le cerveau de la souris par des méthodes RMN, quelles soient morphologique ou métaboliques. A ce stade de notre travail des études sur de grandes séries peuvent être réalisées pour améliorer les études de corrélation et individualiser plus particulièrement des critères capables de mieux comprendre la maladie cancéreuse à traiter.

L'intérêt du modèle ne s'arrête cependant pas au seul cadre du diagnostic. Dans cette perspective, une étude préclinique d'intérêt thérapeutique est développée dans le chapitre suivant tirant parti de l'ensemble des résultats déjà acquis et démontrant les possibilités illimitées qui sont offertes par l'expérimentation avec des gliomes xénogreffés chez la souris nude.

CHAPITRE 7

ETUDE DE LA DISTRIBUTION TISSULAIRE

D'OLIGONUCLEOTIDES

PHOSPHOROTHIOATE

1. CONSIDERATIONS GENERALES

L'utilisation des oligonucléotides antisens comme méthode de régulation artificielle de l'expression génique était conceptuellement envisageable dès la fin des années cinquante, c'est-à-dire dès la découverte de la structure en double hélice de l'ADN. En effet, cette approche implique de cibler une séquence d'acide nucléique, ADN ou ARN, par sa séquence complémentaire (73, 93). Connaissant l'enchaînement des nucléotides qui constituent la séquence dite "sens" visée, c'est-à-dire celle qui porte l'information, la séquence antisens peut être immédiatement déduite en suivant la règle de complémentarité des bases, c'est-à-dire en faisant correspondre une guanine à une cytosine et une adénine à une thymine (s'il s'agit d'ADN) ou un uracile (s'il s'agit d'ARN). On peut penser que la formation de l'hybride entre les brins sens et antisens perturbe le décryptage de l'information génétique, faisant du brin antisens un inhibiteur de l'expression du gène choisi comme cible. Les cibles thérapeutiques potentielles des antisens sont assez précises. Il s'agit de toute séquence permettant d'éliminer les synthèses protéiques liées à oligonucléotides phosphorothioate, qu'il soit étranger à l'organisme (virus, bactérie et parasite) ou modifié, comme dans le cas des cellules cancéreuses. Une autre cible peut être une protéine dont on cherche à moduler l'expression. L'utilisation des oligonucléotides antisens combine donc une grande simplicité conceptuelle à une grande spécificité potentielle.

Sous le regard sceptique puis curieux des industriels, les scientifiques ont développé les concepts et les outils qui rendaient cette méthode très prometteuse. De nombreux résultats ont été obtenus en culture de cellules, des études pharmacocinétiques ont été réalisées chez l'animal et des essais thérapeutiques de phase II sont actuellement en cours d'évaluation chez l'homme (114, 133). Les applications potentielles les plus prometteuses des oligonucléotides antisens se situent dans le domaine de la cancérologie, avec notamment des résultats préliminaires encourageants pour le traitement de lymphomes malins non hodgkiniens, en réalisant une inhibition de la protéine kinase C α et de Bcl2 (18, 72, 74, 97, 107, 128, 130, 137, 140).

En dépit des travaux réalisés, la biodistribution des oligonucléotides après administration par voie parentérale reste mal connue. Des études pharmacocinétiques effectuées chez la souris, le rat, le lapin ou le singe, essentiellement avec des oligonucléotides modifiés pour mieux résister aux nucléases, montrent que ces composés sont répartis de façon

diffuse dans l'organisme, les concentrations les plus élevées étant observées au niveau du foie et du rein. Ces résultats sont cependant obtenus avec des méthodes biochimiques qui ne permettent pas d'identifier avec précision au sein d'un organe le ou les types cellulaires ou tissulaires qui contiennent les oligonucléotides et n'apportent pas d'informations sur les variations d'une cellule à l'autre de la concentration de l'oligonucléotide. Une localisation exacte de la distribution *in vivo* de ces composés ne peut être apportée que par des méthodes morphologiques qui ont la capacité de donner avec précision un signal au sein d'un tissu complexe.

Dans un précédent travail réalisé au Laboratoire d'Histopathologie Expérimentale et Moléculaire de la Faculté de Médecine de Nancy, (108) la répartition tissulaire de deux pentadéca-oligonucléotides phosphodiester a été décrite chez des souris nude témoins et porteuses de tumeurs (un adénocarcinome mucosécrétant bronchique et un carcinome épidermoïde kératinisant bien différencié). La séquence du premier oligonucléotide était complémentaire de la région d'initiation de la traduction de l'ARNm de l'oncogène *c-myc*, le deuxième un homo-oligomère de β -désoxythymidine. De façon à protéger les oligonucléotides des activités nucléasiques sanguines et cellulaires, des dérivés modifiés ont été préparés par l'ajout de résidus NH_2 aux extrémités 5'. Ces dérivés ont fait ensuite l'objet d'un marquage 3' terminal à la digoxigénine. D'autres analogues, porteurs d'un groupement fluoresceinyl en 3' et NH_2 en 5' ont été synthétisés. Les oligonucléotides non modifiés en 5' ont, de plus, fait l'objet d'un marquage de cette même extrémité au soufre radioactif. La stabilité *in vitro* de ces oligonucléotides, a été testée dans du sérum murin contenant ou non des fragments de tissu hépatique. Comme le prouvait l'examen d'électrophorégramme des acides nucléiques extraits des milieux d'incubation, les oligonucléotides modifiés en 3' n'étaient pas, pendant les 24 premières heures, le siège d'une dégradation significative. En revanche, comme on pouvait s'y attendre, les oligonucléotides non modifiés étaient rapidement dégradés et le thiophosphate radioactif en 5' était rapidement libéré sous l'action des phosphatases. Cependant, le caractère limité de l'hydrolyse pendant les 10 premières minutes a permis l'étude de la biodistribution de ces composés par autoradiographie macro et microscopique aux temps 3 et 10 minutes. Après ce délai, la distribution des oligonucléotides a été appréciée par fluorescence directe ou par mise en évidence immunohistochimique des résidus digoxigénine. Il a ainsi pu être montré : 1) que dans un délai de 3 minutes, les oligonucléotides pénètrent toutes les cellules de l'organisme, à l'exception des érythrocytes et

des cellules des disques intervertébraux, 2) que la distribution tissulaire et cellulaire ne dépend pas de la séquence des pentadécamers administrés ni des résidus dont ils sont éventuellement porteurs, 3) que la concentration des oligonucléotides est plus élevée dans les cellules du tissu conjonctif que dans la matrice extracellulaire, 4) qu'aux concentrations les plus élevées, les oligonucléotides pénètrent tous les compartiments cellulaires, y compris le noyau, 5) que dans les tumeurs greffées, la paroi des vaisseaux et la matrice extracellulaire ne constituent pas des obstacles à la diffusion des oligomères vers les cellules tumorales. La situation est donc très différente de celle observée avec les anticorps monoclonaux dont la diffusion est freinée par la matrice extracellulaire. Le travail du professeur F. Plénat et de ses collaborateurs a porté sur des oligonucléotides dont les fonctions phosphodiester n'étaient pas modifiées. Désormais, la plupart des essais cliniques sont relatifs à des composés modifiés pour mieux résister à l'action hydrolytique des nucléases, principalement à des oligonucléotides phosphorothioate dans lesquels un atome d'oxygène de chaque liaison phosphodiester est remplacée par un atome de soufre.

Le travail rapporté dans ce chapitre consiste d'abord à étudier la distribution tissulaire chez la souris nude témoin d'un pentadécamère phosphorothioate également complémentaire de la séquence de *c-myc* marqué à la fluorescéine et révélé sur coupe tissulaire par une technique immunohistochimique.

Pour qu'une thérapeutique antisens puisse être envisagée, il est indispensable que les oligonucléotides administrés arrivent intacts à toutes les cellules tumorales, à l'exception des cas où les cellules endothéliales sont la cible choisie. Dans le système nerveux central les oligonucléotides antisens ne peuvent atteindre leurs cibles cellulaires, gliale ou neuronale, qu'après avoir traversé la barrière hématoencéphalique, ce qui constitue une particularité par rapport à tous les autres tissus. Des études de biodistribution ont montré que les oligonucléotides phosphorothioate ne franchissent pas cette barrière (134). Une façon de surmonter cette difficulté consiste à faciliter le passage de la barrière en greffant sur la molécule soit des résidus hydrophobes facilitant la diffusion transmembranaire de l'oligonucléotide soit des ligands dont les cellules endothéliales expriment les récepteurs. Le passage de la barrière est alors obtenu dans ce dernier cas par un mécanisme d'endocytose médiée par les récepteurs si lors du transport la molécule n'est pas modifiée. Cette approche est séduisante mais elle ignore, cependant, que la barrière hémato-encéphalique est rompue dans les gliomes de haut grade.

Notre modèle de porte greffe va permettre d'observer, toujours grâce à une technique immunohistochimique, si l'oligonucléotide phosphorothioate marqué, passe dans les cellules tumorales du greffon orthotopique humain, compte tenu de la rupture de la barrière hémato-encéphalique. Un essai de quantification dans la tumeur de l'oligonucléotide antisens est réalisée dans une étude complémentaire par autohistoradiographie utilisant un oligonucléotide phosphorothioate radioactif par marquage en 5' au soufre 35.

2. SYNTHÈSE, MARQUAGE, ADMINISTRATION A LA SOURIS ET DETECTION TISSULAIRE DES OLIGONUCLEOTIDES PHOSPHOROTHIOATE

2.1. La synthèse et le marquage des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine

La séquence 5'-GCA CAG CTC GGG GGT-3' de l'oligonucléotide synthétisé est complémentaire de celle de la région d'initiation de la traduction de l'ARNm du gène *c-myc*. La préparation de cet oligonucléotide est réalisée à l'aide d'un synthétiseur automatique (modèle 392, Applied Biosystems, Roissy, France) utilisant la technique des phosphoramidites en phase solide, conformément au protocole du fabricant. L'emploi d'une colonne "3' fluorescein-on CPG[®]" (Clontech, Montigny le Bretonneux, France) permet d'obtenir un oligonucléotide, porteur d'un groupement fluorescéinyl en l'accrochant de façon covalente à l'OH situé en 3' sur le désoxyribose de l'extrémité 3' de l'oligonucléotide. La sulfuration de chacune des liaisons phosphodiester est réalisée au cours de la synthèse par l'oxydation au TETD/Acetonitrile[®] (Applied Biosystems). L'oligonucléotide est détaché de la colonne puis les sites protégés sont rendus actifs par un passage dans de l'ammoniaque à 33%, pendant 16 heures à +55°C. Ensuite, ces oligonucléotides sont purifiés par chromatographie en phase inverse sur une colonne OPC[®] (Applied Biosystems France). L'éluat est séché et mis en solution dans environ 100µL de sérum salé isotonique, à 0,9% afin que l'oligonucléotide puisse être injecté dans des conditions d'osmolarité sensiblement normales. Les oligonucléotides sont ensuite dosés par spectrométrie UV, à 260nm (DU 64[®], Beckman) et conservés à -20°C, à l'abri de la lumière sous la forme d'aliquots. Leur concentration est exprimée en microgramme par microlitre et en picomole par microlitre. Un contrôle de la qualité de l'oligonucléotide synthétisé est effectué par une électrophorèse en gel de

polyacrylamide à 20 %, dénaturant (7 M urée) avec observation des bandes obtenues par transparence UV (UV shadowing).

Une vérification de l'efficiencia de la sulfurisation des liaisons phosphodiesters est réalisée dans un spectromètre RMN Bucker Avance DRX à aimant de 9,4 Teslas correspondant à une fréquence de résonance du ^{31}P de 161,98 MHz, au Laboratoire de Méthodologie RMN - Université Henri Poincaré Nancy (Pr D. Canet, Docteur J.M. Escanyé et M.P. Mutzenhardt.). 5 μg d'oligonucléotides sont dilués dans 400 μL de deutérium et sont déposés dans une chambre de spectromètre. L'acquisition des spectres est effectuée après une séquence mono-impulsion d'angle de 12 degrés et un temps de répétition de 1 seconde. 32 000 répétitions sont nécessaires, soit une durée d'acquisition de 8 heures 54 minutes. Les spectres acquis sur 16 000 points à +25°C sont obtenus par Transformée de Fourier en utilisant un élargissement de 10 Hz (et "zero filling"). La référence 0 ppm correspondant à l'acide phosphorique, la méthode d'intégration de Bruker permet de déterminer que la sulfurisation des liaisons phosphodiesters est de 98 % (**figure II-10**).

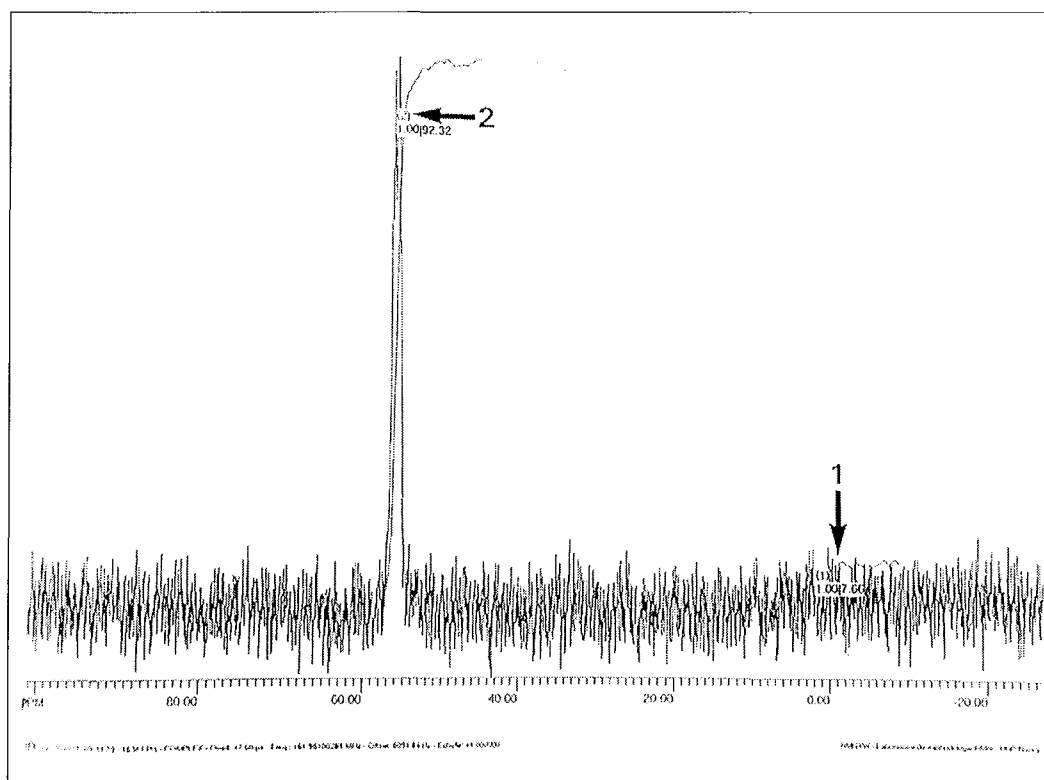


Figure II-10

Spectrogramme RMN de l'oligonucléotide phosphorothioate marqué par la fluorescéine.

1. Intégrale du spectre de l'acide phosphorique.

2. Intégrale du spectre de l'oligonucléotide.

Enfin, il est indispensable de vérifier que les signaux qui seront obtenus par une détection immunohistochimique correspondent bien à l'oligonucléotide phosphorothioate marqué et non à la fluorescéine libérée par une hydrolyse enzymatique. *In vitro*, la stabilité des oligonucléotides phosphorothioate marqués est analysée au cours d'une incubation du composé dans du sérum de souris, qui est un milieu riche en nucléases. Pour ce faire, 20 µg d'oligonucléotides phosphorothioate fluorescéine dissous dans 30 µL de sérum murin (Sigma S 7273) sont incubés à +37°C pendant des durées variables allant de 0 à 24 heures (0, 10 minutes, 1 heure, 6 heures, 24 heures). Après incubation, les oligonucléotides phosphorothioate sont purifiés par extractions phénoliques répétées, puis précipités à l'éthanol après élimination du phénol résiduel par une extraction réalisée à l'aide d'un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique. Le culot est remis en solution dans environ 5 µL de tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH8. Les oligonucléotides phosphorothioate fluorescéine sont ensuite analysés sur un gel de polyacrylamide à 20%, dénaturant (7 M urée). Les bandes de migration sont visualisées par transparence UV (UV shadowing).

2.2. Les oligonucléotides phosphorothioate marqués au soufre 35

L'oligonucléotide utilisé est un homo-oligomère 15 mer phosphorylé de β deoxythymidine du commerce produit par le laboratoire Pharmacia (France).

Le marquage en 5' est réalisé par une réaction d'échange utilisant une adénosine 5'-(γ-thio) triphosphate ³⁵S (54.7 TBq/mmol) et 150 unités de T4 polynucléotide kinase (Pharmacia, France). La réaction est entreprise à 37°C pendant 5 heures en incubant 100 pmol des oligonucléotides dans 100 µL de la solution suivante : 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 10 mM de MgCl₂, 0.1 mM de spermidine, 0.1 mM d'EDTA et 5 mM de dithiothréitol. Le marquage est suivi par une purification sur un gel dénaturant. Les bandes obtenues, localisées par autohistoradiographie, sont dissoutes dans de l'eau. Les éluats sont désalés par dialyse, lyophilisés et resuspendus dans du sérum salé stérile avant leur utilisation.

2.3. L'administration parentérale des oligonucléotides phosphorothioate

Les oligonucléotides sont administrés par une injection intravasculaire rapide grâce à un cathéter introduit dans l'artère fémorale (cf. première partie – chapitre 1). La tubulure est rincée par un reflux sanguin immédiatement réinjecté, afin d'introduire la totalité de la dose prévue.

- Pour les études immunohistochimiques 2 μ g d'oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine par g de poids corporel de la souris, sont dilués dans un volume total de 200 μ L de NaCl à 0,9 % et sont injectés chez 5 souris témoins et chez 4 souris greffées.
- Pour les études autohistoradiographiques 4 μ Ci d'oligonucléotides phosphorothioate marqués au soufre 35, dissous dans 500 μ L de sérum salé isotonique, sont injectés chez 4 souris greffées.

2.3.1. L'injection chez des souris témoins des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine

Cinq expériences sont réalisées. L'intervalle de temps séparant l'injection de l'oligonucléotide phosphorothioate marqué à la fluorescéine du prélèvement des organes est de :

- 1mn (souris 1)
- 10mn (souris 2)
- 60mn (souris 3)
- 6heures (souris 4)
- 24heures (souris 5)

2.3.2. L'injection chez des souris greffées des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine

Quatre expériences sont réalisées chez des animaux greffés avec le glioblastome D (souris D3a, D3b, D3e et D4c). L'intervalle de temps séparant l'injection de l'oligonucléotide

phosphorothioate marqué à la fluorescéine du prélèvement de l'encéphale est de 10 min. pour tous les animaux.

2.3.3. L'injection chez des souris greffée des oligonucléotides phosphorothioate marqués au soufre 35

Quatre expériences sont réalisées chez des animaux greffés avec le glioblastome D (souris D3g, D3h, D3i et D4j).

Deux souris (E3a, E3b) sont sacrifiées 10 minutes après l'injection, les deux autres souris 24 heures après l'injection.

2.4. Les techniques de détection des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine

2.4.1. Le prélèvement et la fixation des tissus

Chez les souris témoins, le cerveau, les poumons, le coeur, les muscles squelettiques, le foie, les reins, le pancréas, les glandes salivaires et, le cas échéant, les testicules sont systématiquement prélevés. Les organes sont congelés dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide. Avant la congélation, l'encéphale est coupé en tranches frontales de 5 à 8mm d'épaisseur. Les tissus congelés sont ensuite stockés à -80°C dans une boîte hermétique.

Seul l'encéphale est prélevé chez les souris porteuses d'une tumeur cérébrale. Plusieurs modalités de détection sont alors utilisées :

Des petits fragments tumoraux (souris D3a et D3b), de moins d'un mm de côté, sont d'abord prélevés et fixés, à +4°C pendant 12 heures, dans du tampon PBS contenant 0,2% (m/v) d'acide picrique et 1% (m/v) de glutaraldéhyde, pour une immunodétection en microscopie électronique à transmission. Le reste des greffons orthotopiques est ensuite sectionné en deux fragments de même taille. Une partie de la tumeur est congelée dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide puis conservée à -80°C dans une boîte hermétique tandis que l'autre partie est fixée dans du formol à 10% (v/v) dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4. Les

manipulations des fragments sont ensuite réalisées à l'abri de la lumière car la fluorescéine, soumise à des radiations lumineuses, perd une partie de ses caractéristiques antigéniques.

Au total, trois techniques différentes d'immunodétection de la fluorescéine (en microscopie optique sur coupes à congélation et sur coupes déparaffinées puis en microscopie électronique à transmission sur coupes ultra fines) sont utilisées afin d'être comparées pour déterminer avec le plus de justesse possible la localisation des oligonucléotides phosphorothioate fluorescéine dans les cellules du gliome greffé.

2.4.2. L'immunodétection de la fluorescéine en microscopie optique sur coupes à congélation

Pour chacun des prélèvements étudiés, des coupes à congélation de 5µm d'épaisseur, sont réalisées au cryostat et recueillies sur des lames Superfrost[®]. Les coupes sont séchées 15 minutes à l'air libre avant d'être plongées pendant 15 minutes, à température ambiante, dans un fixateur constitué de formaldéhyde à 10% (m/v) et de glutaraldéhyde à 2% (m/v) dans du tampon PBS 0,1 M pH 7,4. L'excès de fixateur est ensuite éliminé par deux rinçages de 5 minutes dans du tampon TBS-Tween à la température ambiante.

Dans un premier temps, un blocage du bruit de fond engendré par l'interaction entre les solutions d'anticorps et les groupements aldéhydiques libres tissulaires issus de la fixation par le glutaraldéhyde, est réalisé par réduction de ces groupements en immergeant les coupes dans une solution de NaBH₄ à 5% (m/v) dans du PBS 0.1 M pH 8,2 pendant 15 minutes. Les coupes sont ensuite rincées 2 fois durant 5 minutes dans du tampon TBS-Tween.

La mise en évidence de la fluorescéine est réalisée à l'aide d'un antisérum de lapin anti-FITC (P 404 Dako), dilué au 1/300 dans du tampon TBS et incubé 15 heures en chambre humide à +4°C. La technique immunohistochimique est un montage en trois couches faisant appel au couple biotine/streptavidine, cette dernière étant marquée à la phosphatase alcaline. L'activité de l'enzyme est révélée par la méthode au naphthol-AS-MX phosphate/Fast red TR (cf. première partie – chapitre 3).

Des témoins négatifs par omission de l'anticorps primaire sont inclus dans chaque série d'étude.

2.4.3. L’immunodétection de la fluorescéine en microscopie optique sur coupes déparaffinées

La réalisation de coupes histologiques à partir de tissus fixés et inclus à la paraffine est plus aisée que celle effectuée à partir de tissus congelés et offre une bien meilleure définition histologique et cytologique. Ayant préalablement constaté sur des coupes à congélation que le passage dans les solvants organiques comme l’acétone ou l’éthanol pur et ce, avant fixation par le mélange paraformaldéhyde-glutaraldéhyde, ne déteriorait pas le signal attendu, nous avons expérimenté une technique immunohistochimique sur coupes déparaffinées. Deux montages immunohistochimiques différents sont utilisés :

- un montage standard en trois couches à la streptavidine marquée par de la peroxydase (cf. première partie – chapitre 3)
- un montage amplifié à la tyramine biotinylée (110) dont le principe a été imaginé par Bobrow *et al.* en 1989 (26) (**tableau II-7**).

1) Des coupes épaisses de 5µm sont recueillies sur lames Superfrost® puis séchées une heure à +50°C et conservées à l’étuve à +37°C.
2) Après déparaffinage, réhydratation et blocage des sites de fixation non spécifiques par l’albumine bovine à 3 % dans du PBS 0,1 M pH 7,4, les coupes sont incubées avec l’anticorps primaire, 15 heures à +4°C. La concentration d’utilisation est quatre fois plus faible que celle employée pour une technique classique, ceci afin d’éviter l’apparition d’un bruit de fond, dû à la technique d’amplification.
3) Après deux lavages de 5 minutes dans du tampon PBSTween, les coupes sont incubées 30 minutes à température ambiante avec de l’albumine à 0,5% (m/v) dans du tampon PBSTween, afin de fournir le dépôt protéique nécessaire à la fixation de la tyramine activée aux sites de la réaction immunologique.
4) Après élimination de l’excès, les coupes sont incubées une heure à température ambiante, avec un anticorps anti-lapin biotinylé, dilué au 1/200.
5) Après deux lavages de 5 minutes dans du tampon PBSTween, les coupes sont incubées 15 minutes, à température ambiante, avec de l’H ₂ O ₂ à 6% afin de bloquer l’action peroxydasique endogène.
6) Après deux lavages de 5 minutes dans du tampon PBSTween, les coupes sont incubées 30 minutes à température ambiante avec une solution de streptavidine peroxydase diluée au 1/200.
7) Après deux lavages de 5 minutes dans du tampon PBSTween, les coupes sont incubées 30 minutes à température ambiante avec une solution de tyramine biotinylée diluée au 1/100 dans 1 ml de tampon TrisHCl 200 mM, pH 8,8/imidazole 10 mM en présence de 1 ml d’H ₂ O ₂ à 30%.

La tyramine biotinylée (56) est synthétisée préalablement de la manière suivante : 5ml d'une solution 8,8mM d'ester de succinimide de biotine (Pierce) dans du tampon borate de sodium, pH 8,0 sont mélangés à un volume équivalent d'une solution 7,4mM de tyramineHCl (Sigma) dans le même tampon. Les esters de succinimide sont solubilisés dans un volume minimum de diméthylformamide anhydre avant la mise en solution dans du tampon borate. Les mélanges sont agités pendant 16 heures à l'obscurité à température ambiante, lyophilisés et remis en solution dans 10ml d'éthanol à 85%.
8) Après deux lavages de 5 minutes dans du tampon PBSTween, les coupes sont incubées 30 minutes à température ambiante avec une solution de streptavidine peroxydase diluée au 1/200.
9) Après deux lavages des coupes de 5 minutes dans du tampon PBSTween, les activités enzymatiques sont révélées par une technique à la DAB, après quoi les coupes sont contrecolorées à l'hématéine et montées à l'Eukitt.
10) Des témoins négatifs par omission de l'anticorps primaire sont inclus dans chaque série d'étude.

Tableau II-7

Technique immunohistochimique amplifiée adaptée faisant appel aux dérivés de la tyramine.

2.4.4. L'immunodétection de la fluorescéine en microscopie électronique à transmission

- 1) Après un passage de 12 heures à +4°C dans du PBS contenant 0,2% (m/v) d'acide picrique et 1% (m/v) de glutaraldéhyde, le prélèvement est rincé 3 fois 5 minutes dans du tampon PBS.
- 2) Une déshydratation est ensuite réalisée à température ambiante, sans post-fixation préalable par le passage dans des bains successifs d'éthanol de degrés croissant (3 fois à 80°, 3 fois à 90°, 3 fois à 96°, 3 fois à 100°), chaque bain durant 5 minutes.
- 3) L'imprégnation est réalisée à température ambiante par passages successifs des prélèvements dans les mélanges suivants : éthanol pur/Unicryl™ (2/1) (v/v) pendant une heure, éthanol pur/Unicryl™ (1/2) (v/v) pendant une heure, enfin Unicryl™ pur, deux fois une heure.
- 4) L'inclusion finale des prélèvements, déposés dans des capsules de Beem, est effectuée par immersion dans de l'Unicryl™ pur pendant 12 heures à température ambiante. La polymérisation de la résine est obtenue par chauffage à 56°C, pendant 72 heures.
- 5) Des coupes semi-fines de 2,5µm d'épaisseur sont réalisées afin de présélectionner les territoires à analyser.
- 6) L'immunodétection est enfin effectuée sur coupes ultra-fines de 0,08mm d'épaisseur, déposées sur grilles de nickel. Après une réhydratation des coupes dans du tampon PBS pendant 15 minutes et un blocage des sites de fixation non spécifique est obtenu par

incubation dans l'albumine bovine à 3% (m/v) dans le PBS 0,1 M, pH 7,4 pendant 15 minutes.

7) La technique immunohistochimique employée fait appel à un montage standard en trois couches, à la streptavidine-or. Le protocole technique est identique à celui employé pour la mise en évidence de la fluorescéine sur coupes à congélation à l'exclusion de la streptavidine peroxydase remplacée par la streptavidine-or (Euromedex[®], Electron Microscopy Sciences, réf. 25269, taille des particules d'or 10nm) diluée au 1/20 dans du tampon PBS et incubée pendant une heure à température ambiante.

8) Les grilles sont ensuite rincées à l'eau distillée puis séchées à l'air libre avant d'être examinées au microscope électronique Philips C M 10[®].

9) Des témoins négatifs par omission de l'anticorps primaire sont inclus dans chaque série d'étude.

2.5. Les techniques de détection des oligonucléotides phosphorothioate marqués au soufre 35

2.5.1. Le conditionnement des coupes tissulaires

L'encéphale porte greffe, séparé du reste du corps, est congelé immédiatement par immersion dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide puis stocké à -80°C dans une boîte hermétique.

Pour chacun des cerveaux étudiés, des coupes frontales, à congélation, de 20µm d'épaisseur, sont réalisées au cryostat et recueillies sur des lames Superfrost+[®]. Les coupes sont lyophilisées à -20°C par dépose dans une boîte hermétique contenant de la drierite, durant une semaine.

Le corps de la souris est congelé en bloc par une immersion lente dans de l'isopentane refroidi par de la neige carbonique puis sectionné à la scie en différents segments intéressant le thorax et l'abdomen, afin de permettre, sur coupes montées effectuées par microtomie à congélation, une étude in situ de l'activité radioactive des différents organes. Un gel de carboxyméthyl cellulose est utilisé pour l'enrobage comme milieu de montage afin de permettre la coupe par microtomie à congélation. Les coupes, réalisées perpendiculairement à l'axe sagittal de la souris, de 20µm d'épaisseur, sont réalisées dans une enceinte refroidie. Afin de conserver intacte la coupe, un ruban adhésif (810[®], 3 M France) est appliqué sur l'ensemble de la

surface du bloc avant le passage du rasoir. Les coupes sont également séchées par lyophilisation, selon le même procédé que pour les cerveaux mais durant deux semaines.

2.5.2. L'autohistoradiographie

Deux séries d'autoradiogrammes par cas sont ensuite réalisées par l'apposition des coupes séchées sur un film Amersham hyperfilm β max[®] (Amersham, France) durant soit 3 semaines soit 6 semaines afin d'observer un signal, même très faible. Une échelle témoin de l'intensité du radio marquage (Amersham, France) est fixée sur chacun des films en complément des coupes tissulaires pour permettre une comparaison et une quantification du signal de chaque organe. A la fin de l'exposition, les films sont développés à la main dans un révélateur Kodak D-19 developer[®] (Kodak, France) pendant 3 minutes à 17°C en agitant le film et sont rincés pendant 30 secondes dans de l'eau désionisée et fixés par un fixateur Kodak Unifix[®] (Kodak, France) pendant 20 min. à 17°C. Les films sont ensuite lavés au minimum 15 minutes dans l'eau courante et sont suspendus pour le séchage.

3. RESULTATS

3.1. L'étude *in vitro* de la stabilité des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine

L'incubation des oligonucléotides phosphorothioate fluorescéine dans le sérum murin n'a pas affecté leur taille, et ceci quelle que soit la durée d'incubation testée. Sur les électrophorégrammes, on n'observe en effet par dépôt qu'une seule bande qui correspond à la taille initiale de l'oligonucléotide phosphorothioate fluorescéine (**figure II-11**).

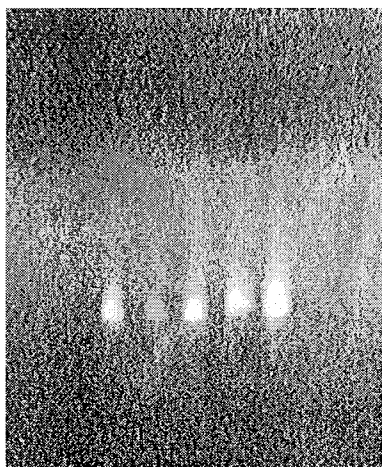


Figure II-11

Test de stabilité des oligonucléotides phosphorothioate in vitro. Gel de polyacrylamide à 20%; UV shadowing. De gauche à droite : 0 minute, 10 minutes, 1 heure, 6 heures, 24 heures : oligonucléotides non dégradés.

3.2. L'analyse morphologique de la distribution tissulaire des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine

3.2.1. Les études en microscopie optique

3.2.1.1. La distribution des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine chez la souris nude témoin

Seule la technique d'immunodétection sur coupes à congélation est réalisée. L'intensité du signal est consignée organe par organe, de manière semi-quantitative, sous la forme d'un rapport du signal sur le bruit de fond qui est évalué sur les témoins négatifs.

La topographie du marquage est précisée à l'échelle du tissu (organes, paroi des vaisseaux, lumière glandulaire ou tubulaire, espaces extra-cellulaires) et de la cellule (cytoplasme, noyau). L'aspect du marquage est apprécié d'après son caractère granulaire ou laqué et diffus ou localisé (**tableau II-8**)

signal nul : o
signal faible : +
signal modéré : ++
signal intense : +++

Les résultats sont exposés sous la forme d'un rapport signal sur bruit de fond.

témoin C 11 1 mn	Paroi vasculaire	Lumière (glande et tube)	Cellule	
			Cytoplasme	Noyau
Cerveau 2 mn	$\frac{++ \text{ à } +++}{+}$		$\frac{++}{+}$ diffus granulaire	$\frac{+ \text{ à } ++}{+}$ granulaire ou laqué inconstant
Poumon	$\frac{+++}{+}$		$\frac{+++}{+}$ granulaire diffus	$\frac{++ \text{ à } +}{+}$ granulaire
Coeur	$\frac{+++}{+}$		$\frac{++}{+}$ diffus granulaire	$\frac{+ \text{ à } ++}{+}$ granulaire
Muscle squelettique	$\frac{+++}{+}$		$\frac{+++}{+}$ le long des stries granulaire	$\frac{++}{+}$ granulaire
Foie 1 mn strictement	$\frac{+++}{+}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{++}{+}$ diffus granulaire	$\frac{+ \text{ à } ++}{+}$ granulaire, périphérique
Rein droit 1 mn strictement	$\frac{+++}{+}$	$\frac{++}{+}$ granulaire	$\frac{++}{+}$ diffus granulaire	$\frac{+ \text{ à } ++}{+}$ granulaire ou laqué
Pancréas	$\frac{+++}{+}$	$\frac{+++}{+}$ granulaire	$\frac{++}{+}$ diffus granulaire	$\frac{+ \text{ à } ++}{+}$ granulaire ou laqué
Rate	$\frac{+++}{+}$		$\frac{++}{+}$ diffus granulaire (pulpe rouge)	$\frac{+ \text{ à } ++}{+}$ très inconstant
Glande salivaire	$\frac{+++}{+}$	$\frac{+++}{+}$ granulaire	$\frac{++}{+}$ diffus granulaire	$\frac{+ \text{ à } ++}{+}$ granulaire ou laqué

Tableau II-8a

témoin C 86 10 mn	Paroi vasculaire	Lumière (glande et tube)	Cellule	
			Cytoplasme	Noyau
Cerveau	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++ à +++</u> + granulaire/laqué
Poumon	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++</u> + granulaire
Coeur	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire	<u>+</u> +
Muscle squelettique	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire	<u>+ à ++</u> + granulaire
Foie	<u>+++</u> +	<u>+++</u> +	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++ à +++</u> + granulaire
Rein	<u>+++</u> +	<u>+++</u> + laqué	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+ à ++</u> + granulaire
Pancréas	<u>+++</u> +	<u>+++</u> +	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++ à +++</u> + granulaire
Rate	<u>++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+ à ++</u> + granulaire
Glande salivaire	<u>+ à ++</u> +	<u>+++</u> +	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+ à ++</u> + granulaire

Tableau II-8b

témoin B 806 1 heure	Paroi vasculaire	Lumière (glande et tube)	Cellule	
			Cytoplasme	Noyau
Cerveau	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+++</u> + granulaire laqué
Poumon	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++</u> + granulaire
Coeur	<u>+++</u> +		<u>++ à +++</u> + granulaire diffus	<u>+ à ++</u> + granulaire
Muscle squelettique	<u>+++</u> +		<u>++ à +++</u> + granulaire diffus	<u>+ à ++</u> + granulaire
Foie	<u>+++</u> +	<u>++</u> +	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+++</u> + laqué
Rein	<u>+++</u> +	<u>+++</u> + laqué	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+ à ++</u> + laqué
Pancréas	<u>+++</u> +	<u>+++</u> +	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+ à ++</u> + laqué granulaire
Rate	<u>++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++</u> + laqué granulaire
Glande salivaire	<u>+ à ++</u> +	<u>+++</u> +	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++</u> + granulaire
Epididyme Testicule	<u>+++</u> +	<u>+</u> +	<u>+++</u> + granulaire	<u>++</u> + granulaire

Tableau II-8c

témoin B 992 6 heures	Paroi vasculaire	Lumière (glande et tube)	Cellule	
			Cytoplasme	Noyau
Cerveau	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+++</u> + granulaire laqué
Poumon	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+++</u> + laqué
Coeur	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++</u> + granulaire
Muscle squelettique	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++</u> + granulaire
Foie	<u>+++</u> +	<u>++ à +++</u> + laqué	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+++</u> + laqué
Rein	<u>+++</u> +	<u>+++</u> + laqué	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++</u> + granulaire
Pancréas	<u>+++</u> +	<u>++</u> +	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+++</u> + laqué granulaire
Rate	<u>+++</u> +		<u>+++</u> +	<u>++</u> +
Glande salivaire	<u>+++</u> +	<u>+++</u> +	<u>+++</u> +	<u>+++</u> + granulaire laqué
Peau	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + épiderme	<u>+++</u> + épiderme

Tableau II-8d

témoin C 24 24 heures	Paroi vasculaire	Lumière (glande et tube)	Cellule	
			Cytoplasme	Noyau
Cerveau	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++ à +++</u> + granulaire laqué
Poumon	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+++</u> + laqué
Coeur	<u>+++</u> +		<u>++</u> + granulaire diffus	<u>+ à ++</u> + granulaire
Muscle squelettique	<u>+++</u> +		<u>++</u> + granulaire diffus	<u>+ à ++</u> + granulaire
Foie	<u>+++</u> +	<u>++</u> +	<u>++ à +++</u> + granulaire laqué	<u>++ à +++</u> + granulaire
Rein	<u>+++</u> +	<u>++</u> + laqué	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++ à +++</u> + granulaire
Pancréas	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>++</u> + granulaire
Rate	<u>+++</u> +		<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+ à ++</u> + granulaire
Glande salivaire	<u>+++</u> +	<u>+++</u> +	<u>+++</u> + granulaire diffus	<u>+ à ++</u> + granulaire
Epididyme Testicule	<u>+++</u> +	<u>++</u> +	<u>+++</u> +	<u>++</u> +

Tableau II-8e

Ces différents tableaux permettent de retenir les caractéristiques suivantes :

- **chronologiques**

Les oligonucléotides phosphorothioate pénètrent rapidement dans les cellules puisque ces derniers y sont observés **dès la première minute** après leur injection (**tableaux II-8a**) (**planche 9, figure A et B**).

les signaux les plus importants sont constatés sur les prélèvements recueillis **à la première et à la sixième heures** après l'injection (**tableaux II-8c et d**) (**planche 9, figure C**).

Les oligonucléotides phosphorothioate persistent longtemps dans les tissus car des signaux intenses sont **encore observés 24 heures** après leur injection sur la plupart des coupes de tissus recueillis (**tableaux II-8e**) (**planche 9, figure D**).

- **topographiques**

Le marquage est en règle générale plus intense dans les territoires jouxtant immédiatement les vaisseaux qu'à distance.

Au niveau de la cellule, les oligonucléotides sont détectés à la fois dans le cytoplasme, sous un aspect granulaire, et dans le noyau mais à ce niveau la coloration apparaît plus laquée.

Au sein du lit microcirculatoire hépatique, des vacuoles de taille variée (2 μm à 15 μm), homogènes, à limites nettes (**planche 9, figure C**) sont observées. De par leur forme, ces vacuoles évoquent des structures lipidiques et suggère donc l'internalisation ou la dissolution des oligonucléotides dans des structures hydrophobes. La nature de ces dernières n'a pu être démontrée lors de cette étude.

Dans les muscles striés, le marquage prédomine le long des stries transversales des fibres. Au niveau des glandes exocrines, il est situé au pôle apical des cellules sécrétrices et des canaux excréteurs, ainsi que dans la lumière des glandes mucosécrétantes. Au niveau cutané, il est retrouvé non seulement au niveau des structures épithéliales, mais également dans la paroi des vaisseaux et en quantité relativement importante sur les fibres de collagène.

Dans le rein, les oligonucléotides sont essentiellement observés au niveau des tubes contournés proximaux et distaux, ces composés étant représentés en faible concentration au niveau des glomérules et de la médullaire.

Dans le cerveau, les oligonucléotides sont plus concentrés au niveau de la substance grise que de la substance blanche et sont décelés tant dans les cellules gliales que dans les neurones. Les marquages nucléaires sont fréquents. Il n'est pas observé de surconcentration au niveau des organes circumventriculaires. En revanche, la léptoméninge, les vaisseaux et les plexus choroïdes sont fortement marqués.

On observe par ailleurs, au niveau des tissus conjonctifs, un marquage de la matrice extracellulaire (non reporté sur ces tableaux) qui est toujours moins intense que celui des cellules.

3.2.1.2. La distribution des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine dans le glioblastome D greffé chez la souris nude

Le montage immunohistochimique standard a été à l'origine d'un signal très faible mais visible, tandis que la technique amplifiée a produit un signal intense. Pour chaque procédé exploré, un témoin négatif a été inclus avec les lames d'étude. Aucun marquage n'a été constaté sur ces coupes témoins, quelle que soit la technique utilisée. En conséquence, nous travaillons désormais sur des échantillons de tissus tumoraux fixés en formol et employons une technique immunohistochimique amplifiée adaptée faisant appel aux dérivés de la tyramine (110).

L'étude de l'aspect, de la topographie et de l'intensité du signal (**tableau II-9**) révèle que :

1) L'aspect des marquages varie selon le mode de révélation enzymatique adopté. En phosphatase alcaline (sur coupes à congélation), le signal intracytoplasmique est toujours granulaire tandis que dans le noyau, il est laqué, diffus et inconstant. En peroxydase (sur coupes déparaffinées), le signal est fin et diffus, quelle que soit sa localisation dans la cellule. Toutefois, à ces quelques variantes près, la localisation et l'intensité des marquages sont superposables d'une technique de révélation à l'autre (**planche 9, figures E et F**).

2) Quel que soit le territoire du parenchyme cérébral sain observé, on constate qu'un signal intracellulaire est toujours présent et particulièrement intense dans les péricaryons des neurones. Au niveau de la léptoméninge, autour des plexus choroïdes et dans les organes circumventriculaires, aucune accentuation de la concentration de marquage n'est notée sauf parfois dans les cytoplasmes des cellules endothéliales des vaisseaux. On ne retrouve en revanche pas d'accumulation du marquage au niveau des membranes basales et des espaces intercellulaires, où le neuropile est visible.

3) Dans les greffons du glioblastome D, le marquage constaté dans les cellules tumorales est toujours important, préférentiellement intracytoplasmique bien que des signaux nucléaires puissent être focalement observés. Ce signal est toujours supérieur ou égal à celui constaté dans les péricaryons des neurones (**planche 9, figure F**). Il semble de plus particulièrement intense dans le cytoplasme des cellules tumorales en mitose (**planche 9 figure H**).

Sur les coupes déparaffinées, sans bruit de fond, une absence de signal est notée au niveau des plages de nécrose tumorale. On y observe seulement des cellules inflammatoire non marquées (**planche 9, figure G**).

signal nul : o
signal faible : +
signal modéré : ++
signal intense : +++
Les résultats sont exposés sous la forme d'un rapport signal sur bruit de fond.

	Cytoplasme	Noyau
<i>cerveau sain</i>		
- Cellules gliales et neuronales (substance grise)	<u>++ à +++</u> o	<u>+++</u> o
Neurones	accumulation périnucléaire du marquage (+++)	
Fibres nerveuses (substance blanche)	<u>+ à ++</u> o	
- Plexus choroides et vaisseaux (leptoméninges et parenchyme)	<u>+++</u> o	<u>+++</u> o
Greffons du glioblastome D	<u>+++</u> o signal homogène et diffus quelque soit le plan de coupe examiné sauf au niveau des plages de nécrose	<u>++</u> o

Tableau II-9
Appréciation semi-quantitative du signal dans le cerveau sain et dans le greffon tumoral.

3.2.2. La distribution intracellulaire des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine en microscopie électronique

La présence de billes d'or, tant dans le parenchyme cérébral sain que dans le greffon, confirme les résultats obtenus avec les techniques d'immunodétection en microscopie optique. Un signal est présent dans les prolongements cytoplasmiques, dans les péricaryons et dans les noyaux. La matrice extracellulaire est également marquée, des billes d'or étant notamment observées entre les cellules endothéliales. **En revanche, il n'est pas possible de définir la localisation ultrastructurale exacte des signaux.** En effet, le contraste des images, notamment des membranes, est insuffisant pour permettre de savoir si les billes d'or sont présentes dans des vésicules d'endocytose ou libres dans le hyaloplasme ; toutefois, rien n'a été observé dans les mitochondries (**figure II-12**).

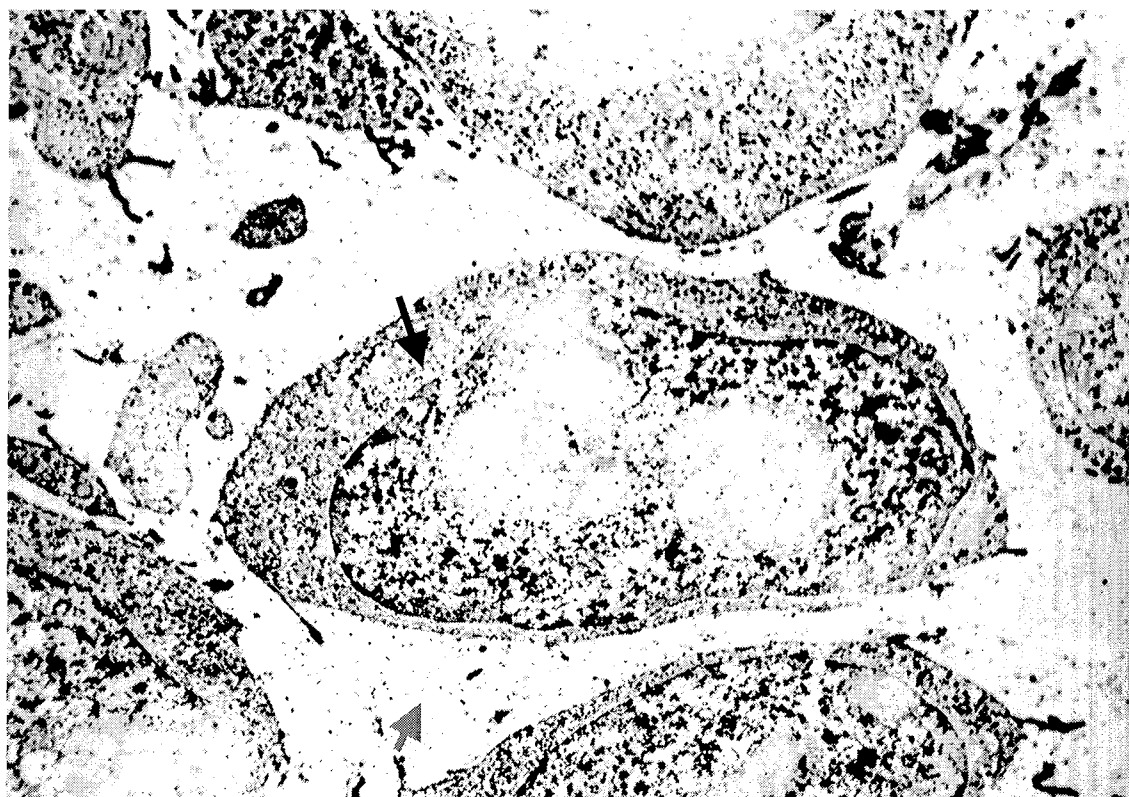


Figure II-12

Présence de billes d'or dans la matrice (→) et dans les cellules tumorales (cytoplasme et noyau) (→) (X 2 950)

3.3. La localisation tissulaire des oligonucléotides phosphorothioate marqués au soufre 35 par autohistoradiographie

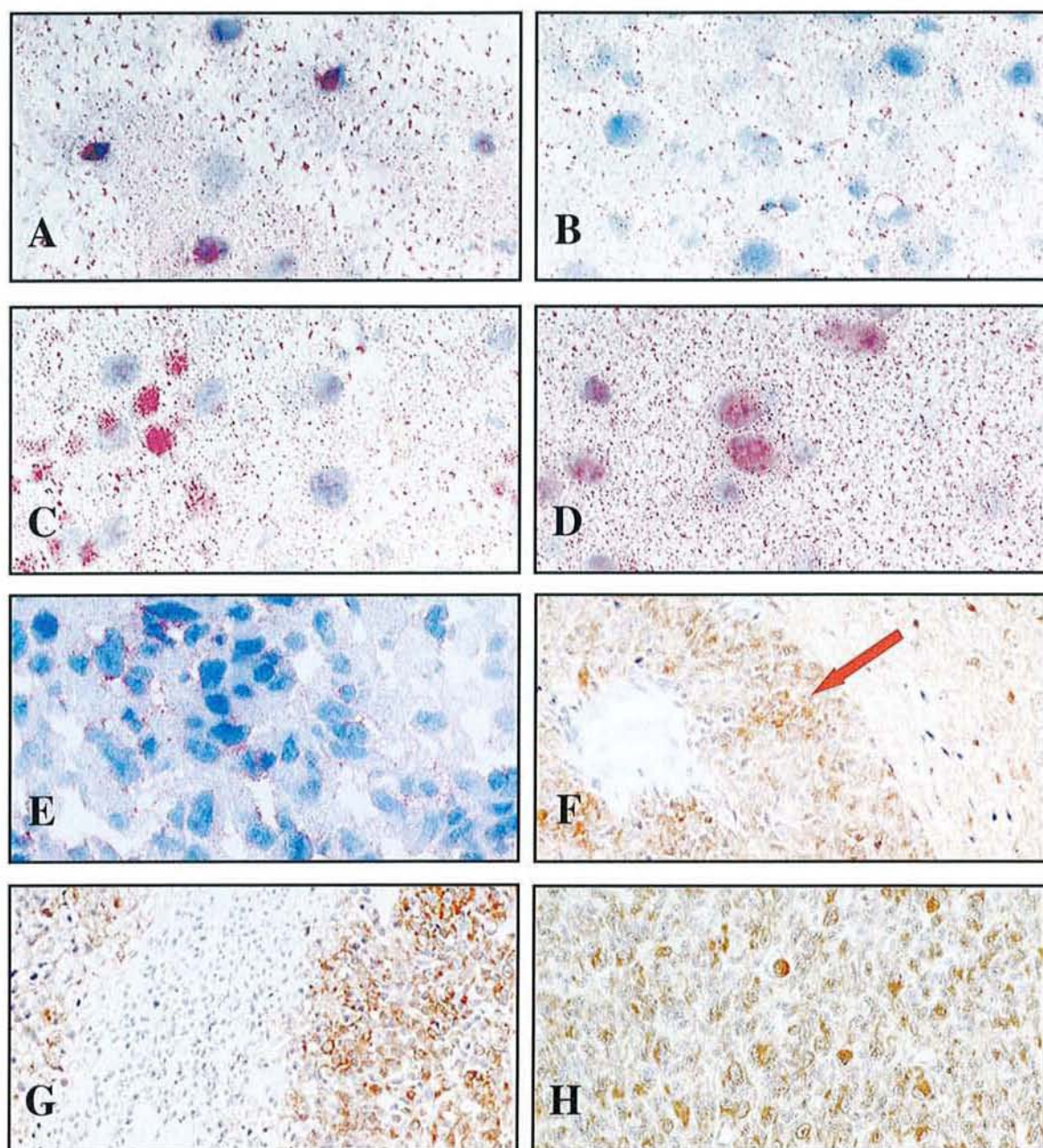


PLANCHE 9

La détection des oligonucléotides par l'immunohistochimie

A : Encéphale - B : Foie - mise en évidence d'oligonucléotides 1 min. après l'injection (phosphatase alcaline / fast red), X400.

C : Foie - mise en évidence d'oligonucléotides 1 heure après l'injection; marquage globulaire intra-cellulaire (phosphatase alcaline / fast red), X400.

D : Encéphale - mise en évidence d'oligonucléotides 24 H. après l'injection; marquage intra-cellulaire préférentiel (phosphatase alcaline / fast red), X400.

E : Greffon orthotopique du glioblastome D - mise en évidence d'oligonucléotides 10 min. après l'injection (phosphatase alcaline / fast red), X400.

F : Greffon orthotopique du glioblastome D - mise en évidence d'oligonucléotides accumulés dans la tumeur, 10 min. après de l'injection (péroxydase / DAB / amplification tyramine), X400.

G et H : Greffon orthotopique du glioblastome D - absence d'oligonucléotides dans les plages de nécrose tumorale, 10 min. après l'injection, en revanche, intense marquage dans les cellules tumorales en mitose (péroxydase / H2O2-DAB amplification tyramine), X400.

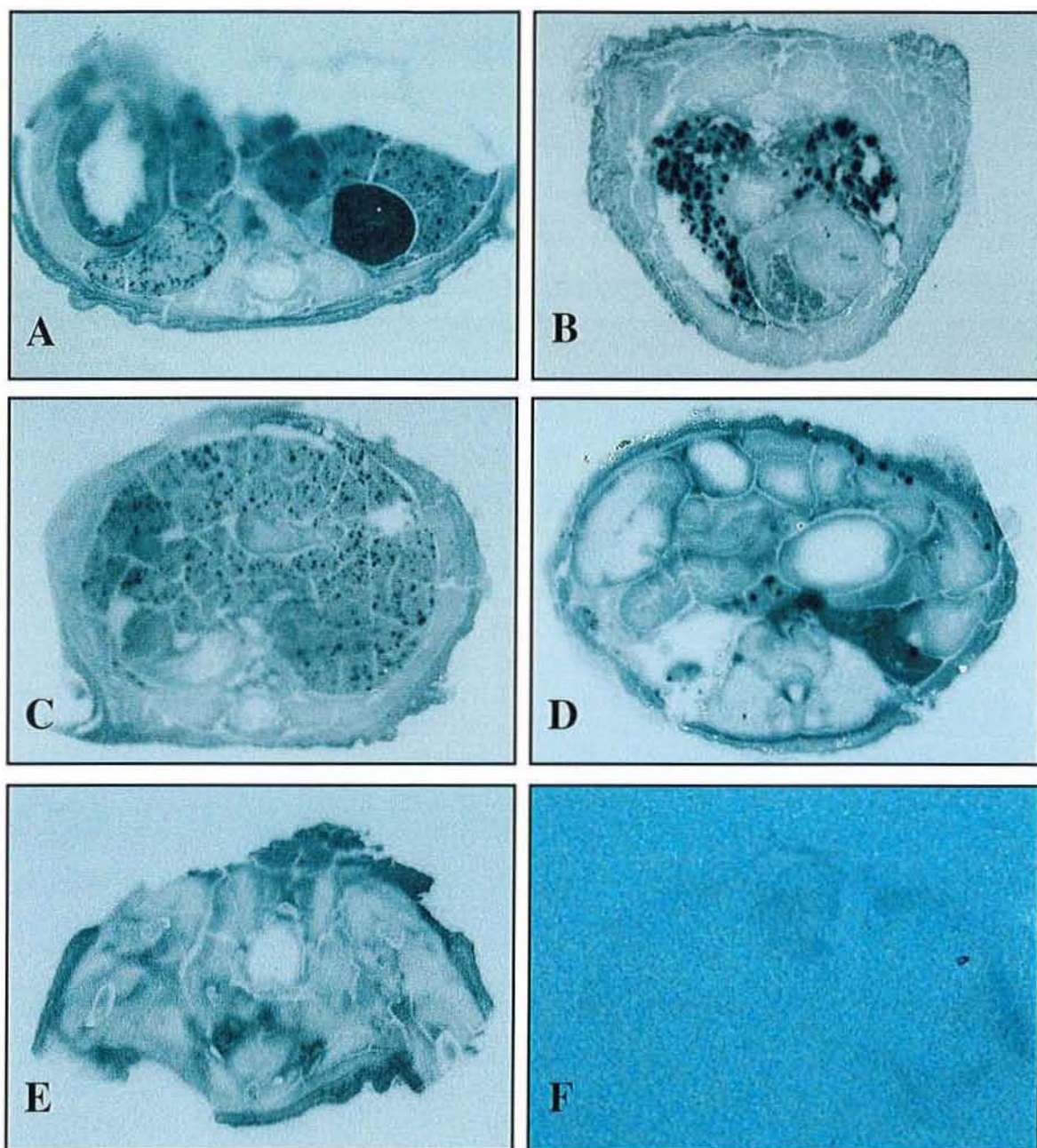


PLANCHE 10 **La détection des oligonucléotides par l'autohistoradiographie**

Après une administration intra-artérielle de l'oligonucléotide phosphorothioate radioactif on retrouve une distribution tissulaire analogue à celle des phosphodiesteres avec :

*un signal intense dans le parenchyme rénal (A) et les poumons (B).
 Le signal est important dans le foie (C), la paroi du tube digestif (D) et les tissus sous cutanés (E).*

Il est modéré dans les muscles squelettiques (E).

En revanche, il est faible dans l'encéphale avec toutefois une discrète accumulation dans la tumeur orthotopique (F).

L'étude par autohistoradiographie de la distribution des oligonucléotides phosphorothioate donne des résultats analogues à ceux observés avec des oligonucléotides phosphodiester en terme de topographie et de chronologie de marquage. Le signal observé, directement dépendant du nombre de molécules radioactives, permet d'apprécier la quantité d'oligonucléotides phosphorothioate dans les tissus tandis que les techniques immunohistochimiques, qui utilisent des méthodes d'amplification du signal, ne sont pas quantitatives.

Le signal le plus important est observé dans la lumière des vaisseaux, la rate, les poumons, le foie, le cœur et les reins. Un signal moins intense est présent dans la paroi du tube digestif, les muscles squelettiques, le tissu sous cutané et la peau. **(planche 10, figures A à E)**

En revanche, dans le système nerveux central, le signal est très peu visible et se situe en dessous du seuil de quantification avec la méthode utilisée. Il est légèrement plus important dans la tumeur que dans le cerveau à priori non infiltré mais toujours moindre que celui observé dans les différents autres organes **(planche 10, figure F)**.

4. DISCUSSION DE L'ETUDE DES OLIGONUCLEOTIDES PHOSPHOROTHIOATE

Les oligonucléotides phosphorothioate constitue la famille chimique d'oligonucléotides actuellement la plus étudiée en pharmacologie. Sous leur forme libre, ces molécules sont réputées ne pas traverser, ou peu, la barrière hémato-encéphalique. Dans une étude quantitative de la biodistribution d'oligonucléotides phosphorothioate marqués au soufre 35, Agrawal et ses collaborateurs. rapportent qu'après une administration intraveineuse à la souris, de 30mg/kg d'oligonucléotides, la concentration détectée dans le cerveau, après extraction et électrophorèse des acides nucléiques, est seulement de 0,2mg/kg, tandis qu'elle est de 105mg/kg dans le rein, de 40mg/kg dans l'intestin et de 20mg/kg dans le foie. (2).

L'addition covalente sur l'oligonucléotide phosphorothioate en 3' d'une molécule hydrophobe est-elle susceptible d'en modifier la pharmacocinétique ? Afin de vérifier cette hypothèse, une première étude de la biodistribution tissulaire et cellulaire d'oligonucléotides phosphorothioate pentadécamères porteurs en 3' d'une molécule de fluorescéine [oligonucléotide phosphorothioate (FITC)] a été entreprise dans le Laboratoire d'Histopathologie Expérimentale et Moléculaire de la Faculté de Médecine de Nancy, chez

des souris nude témoins et d'autres porteuses d'un gliome expérimental murin (C6) intracérébral. Dans ce travail antérieur, réalisé dans le cadre de notre DEA (9), il avait été démontré qu'ainsi modifiés, des oligonucléotides phosphorothioate, administrés par voie artérielle, pouvaient être mis en évidence par immunodétection de la fluorescéine, dans toutes les cellules des organes étudiés, système nerveux central compris, à l'instar des travaux réalisés avec leurs homologues phosphodiester. La densité de marquage était particulièrement importante dans les territoires frontières situés autour du gliome expérimental murin. Une explication possible était qu'à ce niveau, la matrice extracellulaire était encombrée de nombreuses macromolécules, notamment protéiques, ayant diffusé depuis le compartiment intravasculaire, à travers la paroi des vaisseaux. Ces macromolécules pouvaient alors constituer un frein à la diffusion des oligonucléotides vers leur cible cellulaire tumorale.

Les résultats de l'étude entreprise dans cette thèse sur des souris témoins sont les mêmes que ceux rapportés dans notre mémoire de DEA. La concentration des oligonucléotides est toujours plus importante dans les cellules que dans la matrice extracellulaire. Un marquage de tous les tissus est constaté dès la première minute suivant l'injection et reste visible 24 heures après l'administration des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine. Dans le système nerveux central, il existe un marquage, sans concentration au niveau des membranes basales ou dans la matrice extracellulaire. Les signaux sont observés dans la substance blanche, mais surtout dans la substance grise, sans accentuation au niveau des organes circumventriculaires où la barrière hémato-encéphalique est pourtant absente.

Si on examine les caractéristiques des marquages obtenus après l'injection d'oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine à la souris nude porteuse d'un gliome humain intracrânien, on constate, en revanche, que les signaux sont différents de ceux obtenus après l'injection des mêmes oligonucléotides chez la souris nude porteuse du gliome C6. Les deux fournissent toutefois des informations comparables entre elles et reproductibles d'un animal à l'autre.

En effet, quelle que soit la technique d'immunodétection employée en microscopie optique, il n'existe pas de concentration péri-tumorale du marquage au niveau de l'interface gliome humain / hôte, bien que la présence, dans la composante dense de la tumeur, de protéines murines d'origine sérique ait été prouvée par une immunodétection du fibrinogène sur coupes à congélation (cf. première partie – chapitre3). A l'instar des travaux de

biodistribution réalisés avec des xénogreffes tumorales humaines non gliales, implantées en position sous-cutanée (108), la présence de protéines ne constitue pas, dans ce cas, une barrière à la diffusion des oligonucléotides. Au contraire, dans l'encéphale le marquage immunohistochimique le plus important est retrouvé dans les cellules tumorales viables de la composante dense de la tumeur. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer ce signal. D'abord on peut évoquer le rôle de la rupture de la barrière hématoencéphalique, responsable d'une augmentation de perméabilité du réseau vasculaire. Le rôle du débit sanguin dans le gliome n'est pas, en revanche, un facteur qui semble intervenir compte tenu des résultats de l'imagerie et de l'étude microscopique du réseau vasculaire. En effet, dans la composante cellulaire de la tumeur, l'hétérogénéité de passage du gadolinium en IRM et le faible nombre de vaisseaux sanguins vus en microscopie ne paraissent pas pouvoir assurer un haut débit. Une autre hypothèse est celle d'une plus grande affinité des oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine pour les cellules métaboliquement actives, comme les cellules tumorales, que pour les autres cellules présentes dans le système nerveux central. Quel que soit le mécanisme de passage intracellulaire, cette hypothèse est au moins vraie pour les astrocytes tumoraux en division puisque qu'un signal est observé dans leur cytoplasme, plus intense que dans celui des autres cellules.

L'ensemble de ces résultats remet en question l'idée selon laquelle il serait nécessaire, pour obtenir un franchissement de la barrière hémato-encéphalique tumorale, qu'une vectorisation des oligonucléotides avec des molécules servant de ligands à des récepteurs présents sur la membrane plasmique des cellules endothéliales cérébrales soit mise en oeuvre. Une telle stratégie a été élaborée par Walker *et al.* (134) qui a préparé des oligonucléotides phosphorothioate modifiés en 3' par ajout d'une molécule de transferrine. L'efficacité de ce procédé a été testée par cet auteur, sur des cultures de cellules endothéliales, mais jamais *in vivo*.

En définitive, les seuls territoires inaccessibles aux oligonucléotides phosphorothioate marqués à la fluorescéine et administrés par voie vasculaire, sont les foyers de nécrose. Il existe un passage spontané au niveau du système nerveux central, ce qui rend les molécules accessibles aux cellules tumorales isolées, et un passage au moins aussi important vers les cellules de la composante tumorale dense. Toutefois, si le signal immunohistochimique est plus important dans le cytoplasme des cellules tumorales humaines que dans celui des cellules

murines non tumorales, il n'est pas possible, avec cette méthode, d'évaluer la quantité d'oligonucléotides phosphorothioate réellement présente dans les cellules.

A l'échelle de l'organe, à partir de coupes montées, l'autohistoradiographie apporte des informations sur la quantité réelle d'oligonucléotides phosphorothioate radioactifs présents chez la souris. Au niveau du système nerveux central, la quantité est faible et toujours moindre que celle retrouvée au niveau des tissus périphériques même si le signal est plus important dans la tumeur que dans le cerveau non infiltré. Dans notre travail, le signal était trop faible pour pouvoir être quantifié à partir du témoin de mesure de radioactivité. Ces résultats rejoignent ceux publiés par Agrawal et ses collaborateurs (2) et montrent, en définitive, que par voie générale, quelle que soit la stratégie adoptée pour optimiser le passage des oligonucléotides phosphorothioate vers le gliome, la plus grande partie des molécules passe dans les organes périphériques. L'effet antisens ne se limite donc pas aux cellules tumorales. Dans l'hypothèse d'un passage en quantité suffisante pour être efficace des oligonucléotides phosphorothioate vers les cellules tumorales il faudrait alors cibler de manière très sélective la séquence d'acide nucléique à inhiber afin d'épargner les tissus périphériques de l'effet antisens. Si une telle cible était retrouvée, il serait alors possible, en combinant les différents modes d'explorations développés dans ce travail de thèse de suivre, d'abord grâce à l'imagerie et à la spectroscopie RMN ensuite par une analyse microscopique, les effets d'une thérapie par oligonucléotides phosphorothioate sur des glioblastomes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans la première partie de cette thèse, nous avons montré que les caractéristiques du modèle animal fondé sur la xénogreffe orthotopique d'un fragment de gliome humain que nous avons créé, étaient, à l'exception de la cinétique des cellules endothéliales de ses vaisseaux, semblables à celles des gliomes évoluant spontanément chez l'homme (11). Ce modèle représentatif de la pathologie humaine permet d'étudier *in vivo*, sans aucune restriction éthique, la biologie spontanée de cette variété de tumeur et les réactions cellulaires de l'organe hôte à son contact, les effets favorables et iatrogènes de toutes les thérapeutiques connues actuellement à l'exception des anti-angiogènes et enfin les techniques d'explorations paracliniques d'imageries, de spectroscopie et de médecine nucléaire disponibles.

Le chimérisme cellulaire comme marqueur d'origine des cellules, qui a été si heuristique en embryologie expérimentale, trouve une application de choix pour l'étude des migrations des cellules malignes, notamment pour différencier les réactions hyperplasiques des infiltrations néoplasiques à cellules peu atypiques ou pour suivre les déplacements des cellules douées d'actions thérapeutiques.

Ce modèle permettant d'étudier *in vivo* directement les tissus humains, donc sans extrapolation des résultats d'une espèce à une autre comme dans les autres modèles, correspond à un authentique modèle d'études précliniques dont les conclusions des expériences peuvent, après une simple vérification chez l'homme, lui être appliqué en clinique. Pour illustrer la multitude d'applications possibles de ce modèle de recherches pré cliniques, nous avons choisi quelques domaines d'utilisation que nous avons présentés dans la seconde partie de cet ouvrage.

Dans la seconde partie de ce travail, nous n'avons pas eu pour objectifs d'obtenir des résultats complets sur chaque thème choisi mais de montrer qu'avec les instruments disponibles en clinique et avec les techniques utilisées pour des explorations paracliniques de routine appliqués au modèle, des études impossibles, pour des raisons éthiques et scientifiques, à entreprendre *in vivo* sur des tissus humains devenaient possibles. Ces domaines simplement évoqués pour montrer la faisabilité des études pourront aisément faire l'objet d'études exhaustives en utilisant les techniques présentées mais en accroissant de façon conséquente le nombre de cas étudiés.

Enfin, en amont de la recherche préclinique et de ses applications immédiates à l'homme, le modèle présenté est aisément utilisable notamment pour des recherches fondamentales sur le devenir et la migration des cellules souches dans l'organe hôte ou dans la tumeur (33, 82, 126). Le chimérisme, dans ce cas, retrouve sa vocation première comme outil de recherche en biologie du développement normal mais aussi pathologique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ABOODY KS, BROWN A, RAINOV NG, BOWER KA, LIU S, YANG W, SMALL JE, HERRLINGER U, OUREDNIK V, BLACK PM, BREAKFIELD XO, SNYDER EY
From the cover: neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas.
Proc Natl Acad Sci USA 2000;97(23):12846-51
- 2 AGRAWAL S, TEMSAMANI T, TIANG JY
Pharmacokinetics, biodistribution and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice.
Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:7595-7599
- 3 AKBASAK A, TOEVS CC, LASKE DW
Reconstituted basement membrane (matrigel) enhances the growth of human glioma cell lines in nude mice.
J Neurooncol 1996;27:23-30
- 4 AMAR AP, DE ARMOND SJ, SPENCER DR, COOPERSMITH PF, RAMOS DM, ROSENBLUM ML
Development of an *in vitro* extracellular matrix assay for studies of brain tumor cell invasion.
J Neurooncol 1994;20:1-15
- 5 ANGIOI K, DUPREZ A
Pour une experimentation humaine in vivo éthique et scientifique.
Rev Pneumol Clin 1999;55 :199-202
- 6 ANGIOI K, HATIER R, MERLE M, DUPREZ A
Xenografted human whole embryonic and fetal entoblastic organs develop and become functional adult like micro-organs.
J Surg Research 2002;102:85-94
- 7 ANGIOI K, HATIER R, MUHALE F, PLENAT F, DUPREZ A
Morphologic and functional development of whole human fetal stomachs grafted into nude mice.
Develop Growth Differ 2001;43:425-435
- 8 ANGIOI-DUPREZ K
La souris nude : un modèle d'études expérimentales des xénogreffes de tissus humains.
Th Doctorat Nancy I, 1993:199 p
- 9 ANTUNES L
Distribution tissulaire et cellulaire d'oligonucléotides phosphorothioates marqués chez la souris nude saine et porteuse d'un gliome expérimental.
DEA Génie Biologique, Nancy I, 1996, 26 p.
- 10 ANTUNES L
Greffes de fragments de gliomes humains dans le cerveau de souris nude : un modèle de neurooncologie expérimental.
Thèse d'exercice Nancy I, 1997:169

- 11 ANTUNES L, ANGIOFDUPREZ KS, BRACARD SR, KLEIN-MONHOVEN NA, LE FAOU AE, DUPREZ AM, PLENAT FM
Analysis of tissue chimerism in nude mouse brain and abdominal xenograft models of human glioblastoma multiforme: what does it tell us about the models and about glioblastoma biology and therapy?
J Histochem Cytochem 2000;48(6):847858.
- 12 ARIZA A, LOPEZ D, MATE JL, ISAMAT M, MUSULEN E, PUJOL M, LEY A, NAVASPALACIOS JJ
Role of CD44 in the invasiveness of glioblastoma multiforme and the noninvasiveness of meningioma: an immunohistochemistry study.
Hum Pathol 1995;26n°10:11441147
- 13 ARMITAGE P, BERRY G
Statistical methods in medical research. 3d ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications;1994.
- 14 ARNOLD DL, SHOUBRIDGE EA, VILLEMURE JG, FEINDEL W
Proton and phosphorus magnetic resonance spectroscopy of human astrocytomes in vivo. Preliminary observations on tumor grading.
NMR Biomed 1990;3:18489
- 15 ASAI A, MIYAGI Y, SUGIYAMA A, GAMANUMA M, HONG SI, TAKAMOTO S, NOMURA K, MATSUTANI M, TAKAKURA K, KUCHINO Y
Negative effects of wild-type p53 and *s-myc* on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implication of the tumor suppressor genes for gene therapy.
J Neurooncol 1994;19:259268
- 16 BACCIOCCHI G, GIBELLI N, ZIBERA C, PEDRAZZOLI P, BERGAMASCHI G, DE PICEIS POLVER P, DANOVA M, MAZZANI G, PALOMBA L, TUPLER R, ROBUSTELLI DELLA CUNA G
Establishment and characterization of two cell lines derived from human glioblastoma multiforme.
Anticancer Res 1992;12:853862
- 17 BARDOT V, DUTRILLAUX AM, REILLAUDOU M, DUTRILLAUX B, LUCCIONI C
Métabolisme des nucléotides dans les gliomes humainscomparaison de tumeurs primaires, de tumeurs implantées sur souris nude et de lignées
Bull Cancer 1994;81 :297-302
- 18 BAYEVER E, IVERSEN PL, BISHOP MR
Systemic administration of a phosphorothioate oligonucleotide with a sequence complementary to p53 for acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome : initial results of a phase I trial.
Antisense Res. Dev. 1993;3:383-390
- 19 BEN YOSEPH O, LYONS LC, SONG CW, ROSS BD
MECHANISM OF ACTION OF lonidamine in the 9L brain tumor model involves inhibition of lactate efflux and intracellular acidification.
J Neurooncol 1998;36:149-57

- 20 BENDA P, LIGHTBODY J, SATO G, LEVINE L, SWEET W
Differential rat glial cell strain in tissue culture.
Science 1968;161:370-371
- 21 BERKMAN RA, MERRILL MJ, REINHOLD WC, MONACCI WT, SAXENA A, CLARK WC, ROBERTSON JT, ALI IU, OLDFIELD EH
Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms.
J Clin Invest 1993;91:153-159
- 22 BERNSTEIN JJ, GOLDGERG W, LAWS ER
Human malignant astrocytoma xenografts migrate in rat brain: a model for central nervous system cancer research.
J Neurosci Res 1989;22:134-144
- 23 BINDAL AK, HAMMOUD M, SHI WM, WU SZ, SAWAYA R, RAO JS
Prognostic significance of proteolytic enzymes in human brain tumors.
J Neurooncol 1994;22:101-110
- 24 BLAND JM, ALTMAN DG
Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.
Lancet 1986;1(8476):307-310.
- 25 BLAND JM, ALTMAN DG
Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading.
Lancet 1995;346(8982):1085-1087.
- 26 BOBROW MN, HARRIS TD, SHAUGHNESSY KJ, LITT GJ
Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays.
J Immun Meth 1989;125:279-285
- 27 BOSMA GC
Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) scid mice.
J Exp Med 1988;167:1016-1033
- 28 BOSMA GC, CUSTER RP, BOSMA MJ
A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse.
Nature 1983;301:527-530
- 29 BRADLEY NJ, BLOOM JG, DAWIES AJS, SWIFT SM
Growth of human gliomas in immunodeficient mice: a possible model for preclinical therapy studies.
Br J Cancer 1978;38:263-272
- 30 BREM S, COTRAN R, FOLKMAN J
Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading.
J Natl Cancer Inst 1972;48:347-356.
- 31 BRONEN RA
Magnetic resonance imaging contrast agents: theory and application to the central nervous system.
J Neurosurg 1990;73n°6:820-839

- 32 BULLARD DE, SCHOLD SC, BIGNER SH, BIGNER DD
Growth and chemotherapeutic response in athymic mice of tumors arising from human glioma-derived cell lines.
J Neuropath Exp Neurol 1981;40:410-427
- 33 CASTILLO M, SMITH JK, KWOCK L, WILBER K
Apparent diffusion coefficients in the evaluation of high-grade cerebral gliomas.
Am J Neuroradiol 2001;22(1):60-64.
- 34 CHA S, KNOPP EA, JOHNSON G, WETZEL SG, LITT AW, ZAGZAG D
Intracranial Mass Lesions: Dynamic Contrast-enhanced Susceptibility-weighted Echo-planar Perfusion MR Imaging.
Radiology 2002;223:11-29
- 35 CHAVANY C, CONNELL Y, NECKERS L
Contribution of sequence and phosphorothioate content to inhibition of cell growth and adhesion caused by *c-myc* antisense oligomers.
Mol Pharmacol 1995;48:738-746
- 36 DAUMAS-DUPORT C, BEUVON F, VARLET P, FALLET BIANCO C
Gliomes : classifications de l'OMS et de l'Hôpital Sainte Anne.
Ann Pathol 2000;20 :413-28
- 37 DAUMAS-DUPORT C, MONSAINGEON V, BLOND S
Serial stereotactic biopsies and CT scan in gliomas: correlative study in 100 astrocytomas, oligoastrocytomas and oligodendrocytomas.
J Neurooncol 1986;4:317-328.
- 38 DAUMAS-DUPORT C, MONSAINGEON V, N'GUYEN JP, MISSIR O, SZIKLA G
Some correlations between histological and CT aspects of cerebral gliomas contributing to the choice of significant trajectories for stereotactic biopsies.
Acta Neurochir 1984;Suppl 33:185-194
- 39 DAUMAS-DUPORT C, MONSAINGEON V, SZENTHE L, SZIKLA G
Serial stereotactic biopsies: a double histological code of gliomas according to malignancy and configuration, as an aid to therapeutic decision and assessment of results.
Appl Neurophysiol 1982;45:431-437
- 40 DAUMAS-DUPORT C, SCHEITHAUER B, O'FALLON J, KELLY P
Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method.
Cancer 1988;62:2152-2165.
- 41 DAUMAS-DUPORT C, SCHEITHAUER BW, KELLY PJ
An histologic and cytologic method for the spatial definition of gliomas.
Mayo Clin Proc 1987;62:435-449.
- 42 DAUMAS-DUPORT C, SCHEITHAUER BW, KELLY PJ
A histologic and cytologic method for the spatial definition of gliomas.
Mayo Clin Proc 1987;62:435-449

- 43 DAUMAS-DUPORT C, SZIKLA G
Délimitation et configuration spatiale des gliomes cérébraux. Données histologiques, incidences thérapeutiques.
Neurochir 1981;27:273-284
- 44 DE ARMOND SJ, STOWRING L, AMAR A, COOPERSMITH P, DOUGHERTY D, SPENCER D, MIKKELSEN T, ROSENBLUM M
Development of a non-selecting, non-perturbing method for study human brain tumor cell invasion in murine brain.
J Neurooncol 1994;20n°1:27-34
- 45 DEEN DF, CHIARODO A, GRIMM EA, FIKE JR, ISRAEL MA, KUN LE, LEVIN VA, MARTIN LJ, PACKER RJ, PEGG EA et al
Brain tumor working group on the 9th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. Organ system program, National Cancer Institute.
J Neurooncol 1993;16n°3:243-272
- 46 DIRKS PB
Glioma migration: clues from the biology of neural progenitor cells and embryonic CNS cell migration.
J Neurooncol 2001;53:203-212
- 47 DUPREZ A
Etude macroscopique et microscopique de la reprise des greffes de peaux de cadavres humains chez la souris athymique nu/nu.
CR Acad Sci Paris 1979;288Série D:1505-1508
- 48 DUPREZ A
Greffes chez la souris athymique nu/nu de peaux humaines porteuses de naevi ou de naevocarcinomes superficiels : étude macroscopique et microscopique.
CR Acad Sci Paris 1980;290Série D:461-464
- 49 DUPREZ A
Greffes chirurgicales de mélanomes malins humains chez la souris athymique nu/nu : étude macroscopique et microscopique.
CR Acad Sci Paris 1980;290Série D:1561-1564
- 50 DUPREZ A
La malignité des cancers humains peut-elle être expérimentalement inhibée ? Etude microchirurgicale chez la souris nude.
Sci Tech Anim Lab 1986;11n°1:69-75
- 51 DUPREZ A, ANGIOI K
Etude de la prolifération cellulaire des cancers humains par incorporation *in vivo* de la 5-iododésoxyuridine.
Rev Fr Lab 1992;243:43-47

- 52 DUPREZ A, BARAT JL, GIRARD A, HOFFMANN M, HEPNER H
La prolifération cellulaire des tumeurs cérébrales humaines. Etude *in vivo* de 45 cas par incorporation de 5-Iododésoxyuridine.
Neurochir 1990;36:157-166
- 53 DUPREZ A, BORRELLY J, GROSDIDIER G, HOFFMANN M, BOILEAU S
L'exploration *in vivo* des cinétiques cellulaires humaines sera-t-elle déterminante pour les indications opératoires des tumeurs thoraciques malignes ?
Chirurgie 1988;114:689-702
- 54 DUPREZ A, BORRELLY J, GROSDIDIER G, HOFFMANN M, BOILEAU S
Etude *in vivo* de la prolifération cellulaire de tumeurs humaines, par histéimmunodétection de la 5 Iododésoxyuridine incorporée dans l'ADN.
CR Acad Sci Paris 1989;308sérieIII:313-319
- 55 DUPREZ A, FERY A, SOMMELET J
Transplantation microchirurgicale chez la souris nude athymique des tumeurs osseuses de pronostic incertain.
Rev Chir Orthop 1986;72:381-392
- 56 DUPREZ A, FERY A, SOMMELET J
La transplantation microchirurgicale de tumeurs humaines, osseuses et des parties molles, chez la souris nude. Un moyen de diagnostic et de pronostic ?
Chir 1987;113:677-688
- 57 DUPREZ A, GUERRET S, VIGNAUD JM, PLENAT F, HARTMANN D, GRIMAUD JA
The interstitial matrix of human carcinomas and sarcomas transplanted to the nude mouse: immunolocalization of some human and murine components.
Cell Mol Biol 1987;33n°5:647-654
- 58 DUPREZ A, GUERRET-STOCKER S, PLENAT F, VIGNAUD JM, HARTMANN D, GRIMAUD JA
Histo-immunolocalisation des collagènes de type I et III humains et murins de cancers humains greffés chez la souris athymique congénitale.
CR Acad Sci Paris 1987;304SérieIIIn°7:155-160
- 59 DUPREZ K
Le mélanome malin oculaire et le rétinoblastome : deux modèles d'études cliniques et expérimentales *in vivo* de la prolifération cancéreuse humaine (à propos de 12 observations).
Th : Méd : Nancy I : 1991 ; 253 p
- 60 DUPREZ K, BOUR C, MERLE M, DUPREZ A
Human nerve xenografting in nude mouse: experimental study of graft revascularization.
Microsurgery 1991;12:1-8
- 61 DVORAK H
Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies.
Cancer Cells 1991;3:77-85

- 62 FINE HA
Novel biologic therapies for malignant gliomas. Anti-angiogenesis, immunotherapy and gene therapy.
Neurol Clin 1995;13n°4:827-846
- 63 FLEURY A, MENEGOZ F, GROSCLAUDE P, DAURES JP, HENRYAMAR M, RAVERDY N, SCHAEFFER P, POISSON M, DELATRE JY
Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in France.
Cancer 1997;79n°6:1195-1202
- 64 FOGH J, GIOVANNELLA B
The nude mouse in experimental and clinical research.
New-York Academic Press, 1978 vol 1 :502 p et 1982 vol 2 :587 p
- 65 FRANK S, RIHS HP, STOCKER W, MULLER J, DUMONT B, BAUR X, SCHACKERT HK, SCHACKERT G
Combined detection of CD44 isoforms by exon-specific RT-PCR and immunohistochemistry in primary human brain tumors and brain metastases.
Biochem Biophys Res Commun 1996;222(3):794-801
- 66 FRICKER RA, CARPENTER MK, WINKLER C, GRECO C, GATES MA, BJORKLUND A
Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain
J Neurosci 1999;19(14):5990-6005
- 67 GEER CP, GROSSMAN SA
Interstitial fluid flow along white matter tracts: a potentially important mechanism for the dissemination of primary brain tumors.
J Neurooncol 1997;33:193-201
- 68 GIOVANELLA BC, STEHLIN Jr JS, WILLIAMS LJ, LEE SS, SHEPARD RC
Heterotransplantation of human cancers into nude mice. A model system for human cancer chemotherapy.
Cancer 1978;42:2269-2281
- 69 GORDON J, MOHAMED F, VINITSKI S, KNOBLER RL, CURTIS M, FAROS, KHALILI K
Utilization of experimental animal model for correlative multispectral MRI and pathological analysis of brain tumors.
Magn Reson Imaging 1999;17(10):1495-1502.
- 70 GRAND S, ESTEVE F, REMY C, RUBIN C, LE BAS JF
La spectroscopie ^1H : une approche métabolique des tumeurs cérébrales et de leur suivi après irradiation externe
Rev Med Interne 1997;18 :865-875
- 71 GRATZNER HG
Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication.
Science 1982;218:474-475

- 72 HALL WA, FLORES EP, LOW WC
Antisense oligonucleotides for central nervous system tumors.
Neurosurg 1996;38n°2:376-383
- 73 HELENE C AND TOULMEJJ
Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigenic nucleic acid.
Biochim Biophys Acta 1990;1049:99-125
- 74 HJIA N
Biologic and therapeutic significance of MYB expression in human melanoma.
Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:4499-4503
- 75 HOEHN-BERLAGE M, BOCKHORST K
Quantitative magnetic resonance imaging of rat brain tumors: *in vivo* NMR relaxometry for the discrimination of normal and pathological tissues.
Technol Health Care 1994;2(4):247-254.
- 76 HUK WJ, GADEMANN G
Magnetic resonance imaging (MRI): method and early clinical experiences in diseases of the central nervous system.
Neurosurg Rev 1984;7(4):259-280.
- 77 JONES TR, BIGNER SH, SCHOLD SC, ENG LF, BIGNER DD
Anaplastic human gliomas grown in athymic mice. Morphology and glial fibrillary acidic protein expression.
Am J Pathol 1981;105:316-327
- 78 KASTLER B
Comprendre l'IRM – Manuel d'auto-apprentissage. Quatrième édition
Masson – Paris 1994 265 pages
- 79 KLEIHUES P, BURGER PC, SCHEITHAUER BW
Histological typing of tumors of the central nervous system.
World Health Organization. International histological classification of tumours. 2ed. Springer Verlag 1992. 112p.
- 80 KLEIHUES P, CAVENEE WK
World Health Organization. Tumours of the nervous system, pathology and genetics classification of tumours. 2000, Lyon: IARC Press; 294p.
- 81 KNOPP EA, CHA S, JOHNSON G, MAZUMDAR A, GOLFINOS JG, ZAGZAG D, MILLER DC, KELLY PJ, KRICHIEFF II
Glial neoplasms: dynamic contrast-enhanced T2*-weighted MR imaging.
Radiology 1999;211:791-798.
- 82 KONO K, INOUE Y, NAKAYAMA K, SHAKUDO M, MORINO M, OHATA K, WAKASA K, YAMADA R
The role of diffusion-weighted imaging in patients with brain tumors.
Am J Neuroradiol 2001;22:1081-1088.

- 83 KRUSHELNYCKY BW, FART-JONES MA, MIELKE B, McKEAN JD, WEIR BK, PETRUK KC
Development of a large-animal human brain tumor xenograft model in immunosuppressed cats.
Cancer Res 1991;51:2430-2437
- 84 KUPPNER MC, VAN MEIR E, GAUTHIER Th, HAMOU MF, DE TRIBOLET N
Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumors.
Int J Cancer 1992;50:572-577
- 85 LAWS ER, GOLDBERG WJ, BERNSTEIN JJ
Migration of human malignant astrocytoma cells in the mammalian brain: Scherer revisited.
Int J Devl Neuroscience 1993;11n°5:691-697
- 86 LE MOYEC, L BENOIST L, DE CERTAINES J
Perspectives d'application de la RMN du phosphore 31 à la surveillance des traitements anticancéreux
Bull Cancer 1985;72 :506-515
- 87 LESTER DS, OLDS JL
Biomedical Imaging: 2001 and Beyond
Anat Rec (New Anat) 2001;265:3536
- 88 LI H, HAMOU MF, DE TRIBOLET N, JAUFERALLY R, HOFMANN M, DISERENS AC, VAN MEIR EG
Variant CD44 adhesion molecules are expressed in human brain metastases but not in glioblastomas.
Cancer Res 1993;53:5345-5349
- 89 LIGIER Y, RATIB O, LOGEAN M, GIRARD C
Osiris: a medical image manipulation system,
MD Comput. 1994;11(4):212-218.
- 90 MAINTZ D HEINDEL W KUGEL H JAEGER R LACKNER KJ
Phosphorus-31 MR spectroscopy of normal adult human brain and brain tumours.
NMR Biomed 2002;15:18-27
- 91 MEADOR VP
Epicardial and corneal mineralization in clinically normal severe combined immunodeficiency (SCID) mice.
Vet Pathol 1992;29n°3:247-249
- 92 MERZAK A, KOOCHECKPOUR S, PILKINGTON GJ
CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion *in vitro*.
Cancer Res 1994;54:3988-3992
- 93 MESMAEKER A
Antisense oligonucleotides.
Acc. Chem. Res. 1995;28:366-374
- 94 MOLLER-HARTMANN W, HERMINGHAUS S, KRINGS T, MARQUARDT G, LANFERMANN H
PILATUS U, ZANELLA FE
Clinical application of proton magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of intracranial mass lesions.
Neuroradiology 2002;44:371-81

- 95 MONACCI WT, MERRILL MJ, OLDFIELD EH
Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues.
Am J Physiol 1993;264(Cell Physiol33):C995C1002
- 96 NAGASHIMA G, SUZUKI R, HOKAKU H, TAKAHASHI M, MIYO T, ASAI J, NAKAGAWA N, FUJIMOTO T
Graphic analysis of microscopic tumor cell infiltration, proliferative potential, and vascular endothelial growth factor expression in an autopsy brain with glioblastoma.
Surg Neurol 1999;51:292-299.
- 97 OFFENSBERGER WB, OFFENSBERGER S, WALTER E, TENBNEI K, IGLOI G, BLUM HE, GEROK W
In vivo inhibition of duck hepatitis B virus replication and gene expression by phosphorothioate modified antisense oligodeoxy nucleotide, EMBO J 1993;12:1257-1262
- 98 OHNISHI T, ARITA N, HAYAKAWA T, IZUMOTO S, TAKI T, YAMAMOTO H
Motility factor produced by malignant glioma cells: role in tumor invasion.
J Neurosurg 1990;73:881-888
- 99 PANTELOURIS EM
Absence of thymus in a mouse mutant.
Nature 1968;217:370-371
- 100 PANTELOURIS EM
Observations on the immunobiology of "nude" mice.
Immunobiology 1971;20:247-252
- 101 PEDERSEN PH, MARIENHAGEN K, MORK S, BJERKVIG R
Migratory pattern of fetal rat brain cells and human glioma cells in the adult rat brain.
Cancer Res 1993;53:5158-5165
- 102 PEDERSEN PH, RUCKLIDGE GJ, MORK SJ, TERZIS AJA, ENGBRAATEN O, LUNDJOHANSEN M, BACKLUND EO, LAERUM OD, BJERKVIG R
Leptomeningeal tissue: a barrier against brain tumor cell invasion.
J Natl Cancer Inst 1994;86n°21:1593-1599
- 103 PILKINGTON GJ
Mechanisms underlying local invasive behavior of brain tumors (Meeting abstract).
Anticancer Res 1995;15(5A):1675-1676
- 104 PLATE KH
Gene therapy of malignant glioma via inhibition of tumor angiogenesis.
Cancer Metastasis Review 1996;15:237-240
- 105 PLATE KH, RISAU W
Angiogenesis in malignant gliomas.
Glia 1995;15:339-347
- 106 PLENAT F
Animal models of antisense oligonucleotides: lessons for use in humans.
Mol Med Today 1996; 2: 250-257

- 107 PLENAT F, DUPREZ A
Chimérisme tissulaire hommésouris nude : caractérisation des populations cellulaires par hybridation *in situ*.
CR Acad Sci Paris 1990;310Série III:5359
- 108 PLENAT F, KLEIN-MONHOVEN N, MARIE B, VIGNAUD JM, DUPREZ A
Cell and tissue distribution of synthetic oligonucleotides in healthy and tumorbearing nude mice. An autoradiographic, immunohistochemical, and direct fluorescence microscopy study.
Am J Pathol 1995;147:124135
- 109 PLENAT F, MARTINET Y, MARTINET N, VIGNAUD JM
Immunohistochemical methods for studying mononuclear phagocytes in tissue sections.
J Immunol Meth 1994;174: 133-154
- 110 PLENAT F, PICARD E, ANTUNES L, VIGNAUD JM, MARIE B, CHALABREYSSE P, MUHALE F
L'amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique aux sites de réaction de dérivés de la tyramine.
Ann Pathol 1997;17n°1:17-23
- 111 PLENAT F, VIGNAUD JM, GUERRET-STOCKER S, HARTMANN D, DUPREZ K, DUPREZ A
Host-donor interactions in healing of human splitthickness skin grafts onto nude mice: *in situ* hybridization, immunohistochemical and histochemical studies.
Transplantation 1992;53:1002-1010.
- 112 RANA MW, PINKERTON H, THORNTON H, NAGY D
Heterotransplantation of human glioblastoma multiforme and meningioma to nude mice (39750).
Proc Soc Exp Biol Med 1977;155:8588
- 113 REES JH, SMIRNIOTOPOULOS JG, JONES RV
Glioblastoma multiforme: radiologiepathologic correlation.
Radiographics 1996;16:1413-1438.
- 114 ROBERTSON D
Crohn's trial shows the pros of antisense.
Nat Biotechnol 1997;15n°3:209
- 115 ROSENBLUM ML, EISENBERG AD, NORMAN D
Brain tumor invasion: clinical patterns of malignant astrocytoma spread.
J Neurosurg 1992;76:383A
- 116 ROSS B, BLUML S
Magnetic Resonance Spectroscopy of the Human Brain
Anat Rec (New Anat) 2001;265:5484
- 117 RUTKA JT, GIBLIN JR, DOUGHERTY DY, LIU HC, McCULLOCH JR, BELL CW, STERN RS, WILSON CB, ROSENBLUM ML
Establishment and characterization of five cell lines derived from human malignant gliomas.
Acta Neuropathol (Berl) 1987;75:92-103

- 118 RYGAARD J
Thymus and self.
Immunobiology of the mouse mutant «nude ».
1973. John Wiley, Londres
- 119 RYGAARD J, POVLSEN CO
Heterotransplantation of a human malignant tumour to "nude" mice.
Acta Path Microbiol Scand 1969;77:758760
- 120 SCHERER HL
The form of growth in gliomas and their practical significance.
Brain 1940;63:1-34
- 121 SEIGNEURIN D, GUILLAUD Ph
L'antigène Ki-67, marqueur du cycle cellulaire et de la prolifération tumorale.
Path Biol 1991;39n°10 :1020-1028
- 122 SHAPIRO WR, BASLER GA, CHERNIK NL, POSNER JB
Human brain tumor transplantation into nude mice.
J Natl Cancer Inst 1979;62n°3:447-453
- 123 SHIBUYA M, ITO S, MIWA T, DAVIS RL, WILSON CB, HOSHINO T
Proliferative potential of brain tumors. Analyses with Ki67 and anti-DNA polymerase alpha monoclonal antibodies, bromodeoxyuridine labeling and nucleolar organizer region counts.
Cancer 1993;71:199-206
- 124 SPARROW S
The importance of disease in immunodeficient mice and rats. In immunodeficient animals for cancer research. Sparrow S. (ed.), 1980, MacMillan Press Ltd., Londres: 2541.
- 125 STADNIK TW, CHASKIS C, MICHOTTE A, SHABANA WM, VAN ROMPAEY K, LUYPAERT R, BUDINSKY L, JELLUS V, OSTEALUX M.
Diffusion-weighted MR imaging of intracerebral masses: comparison with conventional MR imaging and histologic findings.
Am J Neuroradiol 2001;22(5):969-976.
- 126 STAN AC, NEMATI MN, PIETSCH T, WALTER GF, DIETZ H
In vivo inhibition of angiogenesis and growth of the human U87 malignant glial tumor by treatment with an antibody against basic fibroblast growth factor.
J Neurosurg 1995;82:1044-1052
- 127 SWANNIE HC, KAYE SB
Protein kinase C inhibitors.
Curr Oncol Rep 2002;4:37-46
- 128 TAKANO S, YOSHII Y, KONDO S, SUZUKI H, MARUNO T, SHIRAI S, NOSE T
Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients.
Cancer Res 1996;56:2185-2190

- 129 TIDD DM AND WARENIUSHM
Partial protection of oncogene, antisense oligodeoxynucleotides against serum nuclease degradation using terminal methylphosphonate groups.
Br J Cancer 1989;60:343-360
- 130 TOFTS PS CADY EB DELPY DT COSTELLO AM HOPE PL REYNOLDS EO WILKIE DR GOULD SJ EDWARDS D
Surface coil NMR spectroscopy of brain.
Lancet 1984;1:459
- 131 VAN DER SANDEN BPJ, RIJKEN PFJW, HEERSCHAP A, BERNSEN HJJA, VAN DER KOGEL AJ
In vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy and morphometric analysis of the perfused vascular architecture of human glioma xenografts in nude mice
Br J Cancer 1997;75:1432-1438
- 132 WAHLESTEDT C
Antisense oligonucleotide strategies in neuropharmacology.
Trends Pharmacol Sci 1994;15:4246
- 133 WALKER I, IRWIN WJ, AKHTAR S
Improved cellular delivery of antisense oligonucleotides using transferrin receptor antibody oligonucleotide conjugates.
Pharm Res 1995;12:1548-1553
- 134 WATANABE K, OGATA N, VON AMMON K
Immunohistochemical assessments of *p53* protein accumulation and tumor growth fraction during the progression of astrocytomes.
NAGAI M ed. Brain tumour research and therapy.
Tokyo : Springer Verlag, 1995
- 135 WATANABE M, TANAKA R, TAKEDA N
Magnetic resonance imaging and histopathology of cerebral gliomas.
Neuroradiology 1992;34(6):463-469.
- 136 WEEB A, CUNNINGHAM D, COTTER F, CLARKE PA, DI STEFANO F, ROSS P, CORBO M, DZIEWANOWSKA Z
Bcl-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma.
Lancet 1997;349:1137-1141
- 137 WEIZSAECKER M, DEENDE, ROSENBLUM ML, HOSHINO T, GUTIN PH, BARKER M
The 9L rat brain tumor: description and application of an animal model.
J Neurol 1981;224:183-192.
- 138 WESSELING P, RUITER DJ, BURGER PC
Angiogenesis in brain tumors: pathobiological and clinical aspects.
J Neurooncol 1997;32:253-265
- 139 WHITESELL L, ROSOLEN A, NECKERS LM
In vivo modulation of *N-myc* expression by continuous perfusion with an antisense oligonucleotide
Antisense Res Dev 1991;1:349-350

- 140 WIE BA, GROSSMAN SA, WHARAM MD, CHUN M
Dissemination of high grade astrocytomas (HGA) along white matter tracts (WMT):observations and therapeutic implications.
Proceeding of ASCO 1993;12:177
- 141 WILKINS DE, RAAPHORST GP, SAUNDERS JK, SUTHERLAND GR, SMITHICP
Correlation between Gd-enhanced MR imaging and histopathology in treated and untreated 9L rat brain tumors.
Magn Reson Imaging 1995;1389-96.
- 142 YOSHIDA Y, IKUTA F
Microvasculature in experimental glioma and developing brain, rat.
Nervous system. Monographs on Pathology of Laboratory Animals.
TC JONES RD HUNT EDS SPRINGER VERLAG
- 143 ZAGZAG D, BREM S, ROBERT F
Neovascularization and tumor growth in the rabbit brain. A model for experimental studies of angiogenesis and the blood-brain barrier.
Am J Pathol 1988;131n°2:361-372
- 144 ZIETMAN AL, SUIT HD, RAMSAY JR, SILOBRCIC V, SEDLACEK RS
Quantitative studies on the transplantability of murine and human tumors into the brain and subcutaneous tissues of NCr/Sed nude mice.
Cancer Res 1988;48:6510-6516

PUBLICATIONS

ARTICLE

Analysis of Tissue Chimerism in Nude Mouse Brain and Abdominal Xenograft Models of Human Glioblastoma Multiforme: What Does It Tell Us About the Models and About Glioblastoma Biology and Therapy?

Laurent Antunes, Karine S. Angioi-Duprez, Serge R. Bracard, Nathalie A. Klein-Monhoven, Alain E. Le Faou, Adrien M. Duprez, and François M. Plénat

Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, EP CNRS 616, Faculté de Médecine Nancy (LA,AMD,FMP); Département de Neuroradiologie, Centre Hospitalier Universitaire Nancy (SRB); Service d'Ophtalmologie, Centre Hospitalier Universitaire Nancy (KSA-D); Laboratoire Commun de Biologie Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire Nancy (NAK-M); and Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire Nancy (AELF), Nancy, France

SUMMARY In situ hybridization coupled to immunohistochemistry for antigens of interest allows unequivocal identification of tumor cells from reactive stroma cells and normal adjacent structures in human glioblastoma multiforme grafts transplanted into nude mice. With this methodology, we have explored the development of glioblastoma multiforme solid grafts transplanted into nude mouse brains or flanks. The brain transplants closely resembled the human situation, particularly in relation to differentiation and growth patterns. The morphological features of peritumoral reactive gliosis were similar to those observed in humans. A mouse glial stroma within the main tumor masses was also demonstrated. Kinetic studies showed that the compartment of isolated tumor cells that infiltrated host brains and the reactive gliosis constituted two cycling cell populations. Despite VEGF protein expression by tumor cells and some reactive astrocytes, the abnormally permeable microvascular beds were not hyperplastic. The observation of a non-infiltrative pattern of growth when grafts were established in host flanks demonstrated that the organ-specific environment plays a determining role in the growth and invasive properties of glioblastoma. The phylogenetic distance between man and mouse and the recipient immunoincompetence should not impose serious limitations on the use of this model for studying malignant glioma biology and therapy in vivo. (*J Histochem Cytochem* 48:847–858, 2000)

KEY WORDS

in situ hybridization
chimerism
glioblastoma multiforme
nude mice

INSIGHTS into human malignant tumor biology and therapy that can be gained through animal models are limited unless analytical methods are available to discriminate neoplastic cells from normal or reactive cells and structures of the organs in which the tumor develops. Prior studies from our laboratory (Plénat and Duprez 1990) have shown that human tumor xenografts to nude mice are not only convenient and repro-

ducible animal models but also, because the resulting tumors are mouse/human-interspecific transplantation chimeras, are models in which the relationship between the tumor cells and the host tissues can be easily analyzed. We have shown that in situ hybridization (ISH) using hapten-labeled, sonicated total genomic DNAs as probes may allow unequivocal identification of the species of origin of every nucleated cell in tissue sections of human heterotransplants to nude mice in a system in which it is possible to counterstain by immunohistochemistry for antigens of interest (Plénat and Duprez 1990; Plénat et al. 1992).

With the availability of such non-selecting, non-perturbing, specific and topographically precise meth-

Correspondence to: Prof. F. Plénat, Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, EP CNRS 616, Faculté de Médecine Nancy, BP 184, 54505 Vandoeuvre Les Nancy Cedex, France. E-mail: plenat@facmed.u-nancy.fr

Received for publication November 23, 1999; accepted January 26, 2000 (9A5135).

ods, we have explored the development of human glioblastoma multiforme (GBM) solid grafts transplanted into nude mouse brains after being passaged within mouse flanks. Particular attention has been paid to the following characteristics: (a) tumor differentiation and pattern of growth within the host brain; (b) the reactive gliosis at the tumor-host interface and in the tumor solid component; (c) the proliferative activity of the malignant astrocytoma cells, not only in the main tumor masses but also in the compartments of isolated tumor cells infiltrating the normal host brains, whose existence was easily demonstrated on ISH and immunohistochemically stained microscopic sections; and (d) the graft microvascular bed, because endothelial proliferation and rupture of the blood-brain barrier are two highly characteristic alterations of GBM in humans. Furthermore, we have studied the contrasting pattern of growth of GBMs established in host flank, demonstrating that, as for other malignant tumors, the organ-specific microenvironment plays a determining role in the growth and invasive properties of malignant astrocytoma.

Materials and Methods

Donor Tissue

The donor tissue consisted of fresh samples of typical glioblastomas multiforme (WHO classification 1993) from two patients (Patients V and D) taken from the pathological specimens obtained at surgery. Tumor tissue was dissected free of necrotic areas and blood clots, rinsed, and then cut into 1.5-mm-thick slices, which were placed in a sterile isotonic glucose solution until grafting.

Animals and Tumor Transplantation

Animals. Four- to 7-week-old, pathogen-free, congenitally athymic nude mice, on a Swiss nu/nu background, were obtained from IFFA-CREDO Breeding Laboratories (Lyon, France). Animal experiments were performed according to institutional and national guidelines. All the surgical procedures, as well as the magnetic resonance imaging (MRI) of brain xenografts, were carried out under general anesthesia with IP ketamine (0.1 mg/g body weight).

GBM Primary Flank Implantation into Nude Mice and Further Propagation. Tumor slices from both patients were inserted into the flanks of five mice (four fragments per mouse) between the rectus abdominis and the posterior lamina of its sheath, in close proximity to the epigastric vessels. The abdominal tumors were excised at 1–2 cm³ in size, morphologically examined, and transplanted into the abdominal wall of another group of mice or into mouse brains. In total, the two original tumors were passed from animals to animals for 3 years (five generations of mice, five mice per generation and per original surgical specimen). Finally, tumor grafts were implanted into the flanks of three more mice to study the early stage of the primary abdominal implant take.

Intracerebral Grafts. Forty animals (10 per generation of mice) that had received grafts into their abdominal wall were also transplanted intracerebrally, both transplantations being performed during the same surgical procedure. For transplantation into the mouse brain, a bifrontal coronal incision was made and the scalp, including the pericranium, was separated from the cranial vault and turned inferiorly over the face. Next, a right monofrontal osteoplastic bone flap was performed. After incision of the dura, one tumor fragment 2–3 mm³ in size was implanted a few millimeters behind the central sulcus to a depth of about 1.5 mm. The craniotomy flap was then replaced.

Magnetic Resonance Imaging

A 1.5 T clinical Signa version 5.5.1. (General Electric MS) was used for brain imaging. Seventeen apparently normal mice were studied at various times from Day 45 to Day 211 after tumor implantation. Five animals were examined twice, with an interval of 20 days between the examinations. The contrast material, gadopentate dimeglumine (Magnevist; Schering, Lys Les Tannoy, France) 0.5 ml (0.25 mmol) was injected IP 10 min before examination, performed with a 3GP antenna (GEMS). The console settings chosen to optimize signal-to-noise ratio and spatial resolution were as follows: image matrix 256 × 192; field of view 8 × 6 cm; slice thickness 3 mm. T₁ spin-echo pulse sequence was used with a repetition time of 300 msec. The echo time was 12 msec, with two excitations. The duration of this sequence was 90 sec. Four coronal and sagittal 3-mm slices were obtained per brain, with 0.3-mm of interslice.

Study of Tumor Microvasculature Permeability

Abnormal permeability of the tumor microvasculature was looked for in three mice, sacrificed on Day 65 (one mouse) and Day 106 (two mice), by studying the volume of distribution of Evans blue after a single IV injection of 200 µl of a 2% (w/v) solution of the colored tracer in a 0.9% (m/v) NaCl solution injected 2 hr before sacrifice.

Tissue Collection and Morphological Studies

Tissue Collection. The three mice that received flank implants for studying the early stages of the primary abdominal graft take were sacrificed on Day 3, 10, or 15. Similarly, three mice from the second generation were sacrificed on Day 3, 10, or 15 to study early brain tumor take. Three of the 37 remaining mice with intracranial grafts died spontaneously and were autopsied. The other mice were sacrificed when they became cachectic or at various post-implantation times for morphological studies. From each of the two initial brain tumor samples and from each abdominal and intracerebral transplant, several slices were cut and fixed in either ethanol/acetic acid 3/1 (v/v) or 4% (m/v) buffered formaldehyde for 16 hr and embedded in paraffin. Slices of three intracerebral tumor transplants were also frozen in isopentane precooled in liquid nitrogen.

Histochemical Staining. Sections of all paraffin-embedded blocks were stained with hematoxylin-eosin (HE) and with the Bodian stain for demonstration of nerve fibers and neurofibrils.

Detection of Cell Genotypes by ISH. ISH was performed on ethanol-acetic acid-fixed, paraffin-embedded sections with fragmented total mouse or human genomic DNAs, digoxigenin-labeled by the random primer labeling method (Plénat and Duprez 1990). Detection of the digoxigenin label was achieved by incubating the sections in a solution of Fab fragments of alkaline phosphatase-labeled sheep antibodies (Boehringer; Meylan, France), diluted 1:200 in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween-20 for 1 hr at room temperature. The color development was carried out by incubating the slides for 30 min with substrate solution: 0.33 mg/ml 5-bromo-chloro-indolyl phosphate (BCIP), 0.33 mg/ml nitroblue tetrazolium (NBT), 0.77% (v/v) *N,N*-dimethylformamide in 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl₂, pH 9.4 (McGadley 1970).

When double ISH with mouse and human genomic DNAs was carried out in successive steps on the same sections, the tissue sites of the first probe were visualized with the BCIP/NBT method, which produces a dark-blue reaction product. The second probe was also detected with the alkaline phosphatase-labeled anti-digoxigenin antibody, the alkaline phosphatase activity being developed with a naphthol AS-MX/Fast Red TR salt method.

Antibodies and Immunostaining Procedures

Antibodies. Formaldehyde-fixed tissue sections of the two original tumors and every transplant were studied with a species-specific monoclonal antibody to human vimentin (Dako, Trappes, France, diluted 1:400) and a cross-species-specific antiserum to glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Dako; diluted 1:800) for analyzing the evolution of tumor cell differentiation with successive passages. A combined immunohistochemical-ISH method was carried out with antiserum to GFAP and the mouse DNA probe to study the morphological and topographical characteristics of gliosis reactive to tumor development in the mouse brain. Tumor growth fractions were measured on sections stained with the species-nonspecific monoclonal antibody MIB-1, directed to the cell cycle-associated antigen Ki-67 (Immunotech, Marseille, France; diluted 1:400), by recording the percentage of positively labeled tumor cells in five independent areas of the main tumor masses. Each area included 800–1000 cells at a $\times 200$ magnification. Dual immunohistochemistry on the same section using successively antibodies to either human vimentin or GFAP and then to Ki-67 was also performed on selected sections to appraise the proliferative activity of the compartment of malignant astrocytes infiltrating the normal brain parenchyma. The presence of cycling astrocytes in the mouse reactive gliosis was looked for by double staining sections with antibodies to GFAP and Ki-67 and comparing the data thus obtained with those of ISH techniques with the mouse DNA probe performed on alternating sections. On microscopic preparations immunostained with the MIB-1 antibody, the endothelial cells were most often difficult to recognize with confidence. Therefore, dual immunohistochemical techniques with the MIB-1 antibody and a species-nonspecific antibody to mouse Type IV collagen (Immunotech; diluted 1:500), followed by light hematoxylin counterstaining, were also carried out to identify the fraction of cycling endothelial cells.

The development of tumor vasculature was investigated with a cross-species-specific antiserum to factor VIII-related antigen (Dako; diluted 1:50), as well as with species-specific antibodies to human Type IV collagen (a generous gift of S. Guerret-Stocker, Institut Merieux, France; diluted 1:500) or to mouse Type IV collagen (Immunotech; diluted 1:500). Dual immunohistochemical techniques on the same section were performed on selected slides with the antibodies raised against factor VIII-related antigen and murine Type IV collagen to look for possible blood channels without basement membrane. In addition, combined immunohistochemical-ISH studies with the antibody to mouse Type IV collagen and either the mouse or human DNA probe were carried out to determine the tumor endothelial cell genotype. Because preliminary studies had shown that the vascular basement membranes appeared continuous on sections immunostained for murine Type IV collagen, microvessels were counted on sections immunostained for this antigen. Angiogenesis was scored using the vasoproliferative component of the microscopic grading system scale used to quantify angiogenesis in a variety of tumors (Brem et al. 1972). The histological slides were first scanned at low magnification, and the areas of maximal vascular density were selected for grading. Microvessels were then counted in 10 high-power fields, each measuring 0.414 mm². Pericytes were looked for with a cross-species-specific antibody to α -smooth cell actin (Dako; diluted 1:1000) and VEGF protein synthesis with a cross-species-specific monoclonal antibody (Calbiochem, Meudon, France; diluted 1:40). The species of origin of the cells synthesizing this growth factor was determined on selected slides by a combined immunohistochemical-ISH approach. Finally, dual immunohistochemical techniques on the same section were carried out on selected slides with the antibodies raised against human vimentin and murine Type IV collagen to study the possible relationship between the migrating tumor cells and basal membranes in the brain.

The presence of fibrin and murine IgGs in the nonvascular tumor extracellular matrix, testifying to an abnormal permeability of the tumor microcirculatory bed, was looked for in the brains and the abdominal tumors of three mice sacrificed 65 (one mouse) or 106 (two mice) days after tumor implantation. These experiments were carried out with appropriate fluorescein-conjugated primary antibodies (Institut Pasteur, Paris, France; diluted 1:10 and 1:40 for fibrin and murine IgGs, respectively).

Staining Procedures. One-hr incubations with the antibodies to fibrin and murine IgGs were carried out on 6- μ m-thick unfixed frozen sections that were subsequently counterstained with a 6 mg/ml solution of ethidium bromide in a 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. All the remaining primary antibodies were applied for 16 hr at 4°C. Detection of tissue-bound primary antibodies was performed using the biotinylated antibody/streptavidin-peroxidase detection system. Bound peroxidase was identified using either the diaminobenzidine-H₂O₂ or the 3-amino-9-ethylcarbazole method (Plénat et al. 1994). When double immunostaining was performed, streptavidin-alkaline phosphatase conjugate was often used in place of the streptavidin-peroxidase one. Alkaline phosphatase activity was visualized with either the naphthol AS-MX phosphate/Fast Red TR salt or the BCIP/NBT method

for the first step, and a naphthol AS-MX phosphate/Fast Blue BB salt for the second step (Plénat et al. 1994). Some dual immunolabelings were performed, however, with streptavidin-peroxidase complex and the 3-amino-9-ethyl-carbazole method of revelation of peroxidase activity as the first step and streptavidin-alkaline phosphatase and the BCIP/NBT method for the second one.

Antibodies to vimentin, GFAP, and factor-VIII-related antigen were applied on sections previously pressure-cooked for 5 min in a 0.01 M sodium citrate buffer, pH 6.0. Furthermore, for Type IV collagen detection, Before being pressure cooked, slides were enzyme-digested by incubation in a 0.1% (w/v) solution of trypsin in 0.1% (w/v) CaCl_2 , pH 7.8, for 15 min at 37°C. When the immunoenzymatic detection of vimentin, GFAP, and VEGF was combined with the detection of cell genotype by ISH on the same section, immunohistochemistry was performed before ISH, using the biotinylated antibody/streptavidin-alkaline phosphatase detection system and the naphthol AS-MX/Fast Red method of visualization of alkaline phosphatase activity. The DNA probes were visualized as described above. All immunohistochemistry was controlled by substituting non-immune serum for the primary antibodies.

Results

Tumor Take

All the mice survived the surgical procedures, and the animals' clinical status was in all cases normal after the recovery from anesthesia.

At least one of the four parieto-abdominal transplants in each animal grew, producing a palpable nodule. Initial growth of the primary abdominal implants was delayed for a mean time of 21 weeks before tumors became palpable. The delay was shorter after the first passage: 5.5 weeks for the second generation, 4.9 weeks for the third, and 2.2 weeks for the last two generations. Secondary regression of the abdominal tumors was never observed.

None of the mice with a brain graft developed focal neurological signs until the end of the observation period. Every intracranial transplantation produced a tumor. Seventeen of the 37 mice that were grafted intracranially were sacrificed at various intervals after surgery for morphological studies. Three other mice died spontaneously, and the remaining 17 were sacrificed because of cachexia. Death of these last 20 animals occurred as early as Day 45 and as late as Day 217, the mean survival time after transplantation being 106 days (99 for the mice grafted with the V tumor line and 125 for those from the D line).

Morphology of the Cerebral Tumor Transplants Harvested After Day 15 Post Grafting

Gross Morphology. In only 26 of the 37 animals that received intracerebral grafts was the tumor macroscopically evident, localized in the right hemisphere

above the lateral ventricle. Of these 26 tumors, 22 measured more than 6 mm in largest diameter and four from 3 to 6 mm. In three tumors whose diameter exceeded 6 mm, the growth insinuated itself between the bony flap edges and the skull, and infiltrated the scalp soft tissue. In these three cases, the extracranial portion of the tumor was vascularized by branches of the external carotid artery. In all other cases, healing of the bony opening in the calvaria had occurred, and the tumors were vascularized by branches of the circulus arteriosus only. In five cases, which included the three tumors with extracranial extension, the tumor invaded the dura and the subdural space. There was no macroscopic tumor spread to the contralateral side, even though severe midline shift and compression of the ventricular system and brainstem were observed in the largest tumors. Except for the tumors with an extracranial extension, tumor necrosis was not macroscopically observed. In 11 animals, the tumors were microscopic, no brain alterations being visible at the macroscopic level.

Neuroimaging. The signal-to-noise ratio on T_2 -weighted imaging was poor, and the tumor grafts could never be detected. No signal abnormalities were seen on the precontrast T_1 -weighted images. Each time, the post-gadolinium T_1 sequences revealed typical intense contrast enhancement in the right hemisphere (Figure 1). The contrast-enhanced zones corresponded to the solid tumor component and did not represent the outer tumor border, because isolated tumor cells were identified on ISH-stained sections of the corresponding brains, far away from the main tumor masses. In one animal, contrast enhancement was observed as early as Day 45 post grafting. On two occasions, contrast enhancement that was not observed on Day 45 appeared clearly visible 20 days later. In three mice, tumor growth was well visible on successive MRI evaluations.

Histological Study. In HE-stained sections, features common to brain xenotransplants were representative of high-grade astrocytomas (Figure 2) and included (a) high cellular density with frequent nuclear crowding, (b) moderately differentiated cells, some multinucleated, with astrocytic features of abundant pink cytoplasm and short and ramified processes that disappeared into the background in a disorganized pattern, (c) frequent mitoses, and (d) pseudo-palisading of tumor cells around serpiginous areas of necrosis. This latter feature was observed in five cerebral transplants whose largest diameter was in excess of 6 mm.

All intracerebral transplants appeared to be composed of two components (Figures 3A and 3B): solid tumor tissue in which tumor cells were crowded, always containing remains of neurites in Bodian-stained sections, and tumor cells, most often isolated, some-

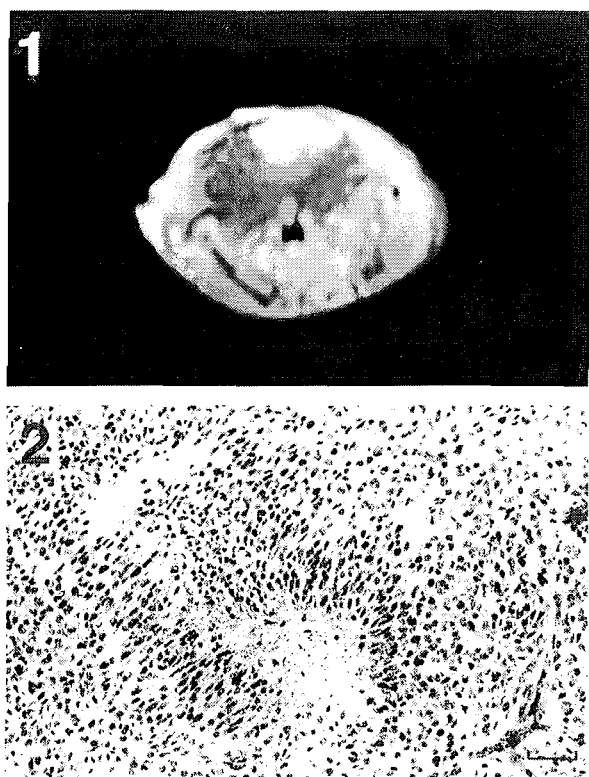


Figure 1 Coronal T₁-weighted MRI showing intense contrast enhancement 30 min after IP injection of a gadolinium chelate contrasting agent. Neuroimaging was performed on Day 51 post grafting. The contrast-enhanced structures correspond to peripheral areas of the main tumor mass but do not represent the outer tumor border, because isolated tumor cells were identified in sections of the corresponding brain far away from the main tumor mass. Bar = 4 mm.

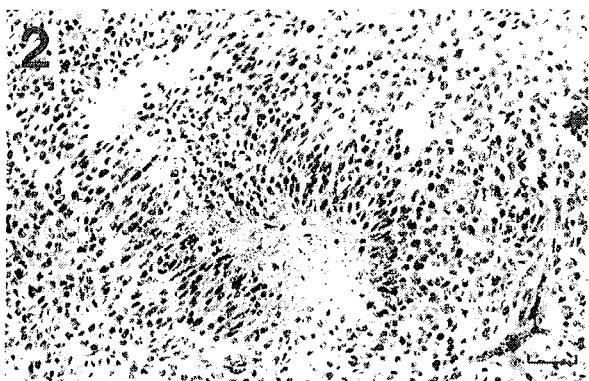


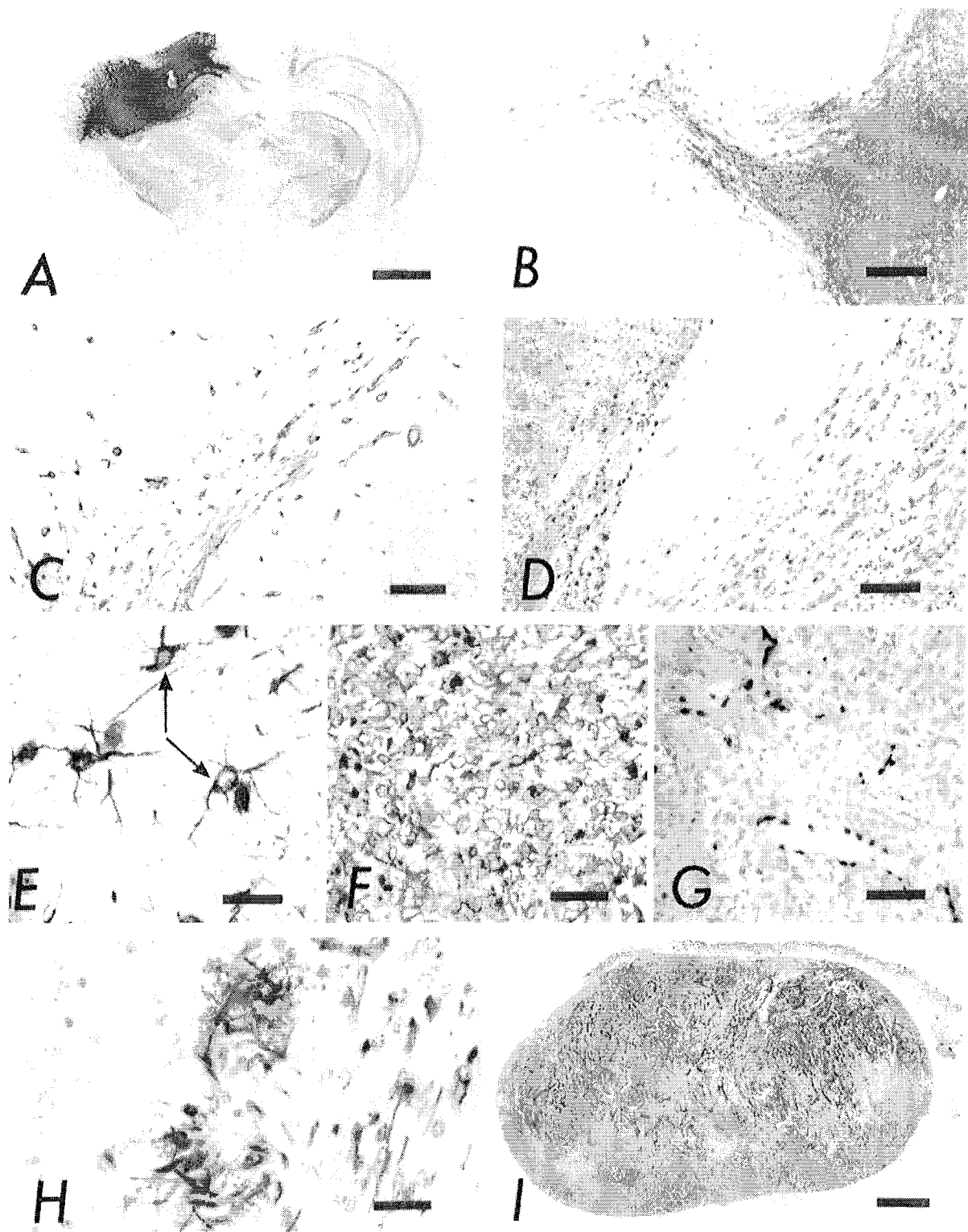
Figure 2 Serpentine area of necrosis surrounded by pleiomorphic neoplastic astrocytes (pseudo-palisading) in a xenograft removed on Day 119 post grafting. Bar = 45 μ m.

times grouped in small non-cohesive nests within an apparently normal brain parenchyma. Combined immunohistochemical-ISH assays showed that whatever the tumor and the site of engraftment, the cytoplasm of every tumor cell was strongly stained by the species-specific antibody to human vimentin. In addition, because all the cells in the transplants harvested more than 15 days after grafting that expressed the intermediate filament had a malignant glial phenotype, tumor invasion could be very precisely studied on vimentin-stained sections. The extent of normal brain invasion by the neoplastic astrocytes varied from tumor to tumor but was not correlated with postoperative survival. In every case, the main tumor mass extended through the cortex and came to the surface of the right hemisphere, penetrating the overlying subarachnoid space. In 20 tumors, astrocytoma cells ex-

tended further into the adjoining subdural space. From the main tumor masses, astrocytoma cells spread out laterally on the dorsal surfaces of the two cerebral hemispheres beneath the glia limitans, where they formed a carpet one or two cells thick, and into the spaces of Virchow-Robin as blood vessels entered the brain.

Tumor cells, isolated or grouped in nests, were always observed within the semioval center of the right ventricle and in the cortex of the right frontal and parietal lobes. In 32 cases, a large number of astrocytoma cells were observed bilaterally along the corpus callosum-cortical Layer VI interface, but also deeper within the corpus callosum itself (Figure 3B). In 30 of the 35 tumors, neoplastic cells were found in the left internal capsule, a few tumor cells being detected within the deeper cortical layers of the left frontal and parietal lobes. In 10 tumors, malignant astrocytes were observed in the dorsal thalamus and the subependymal space, surrounding the lateral and third ventricles. In two tumors, the walls of these ventricles were focally destroyed and tumor cells proliferated within the corresponding ventricle cavities. In one tumor, astrocytoma cells had migrated to the ventral surface of the brain and formed a carpet many cells thick on the ventral chiasma and other medial structures.

Compared with the human surgical material, the mouse-grown tumors contained the same morphological cell types but appeared somewhat more homogeneous. As could be seen in HE-stained sections, tumor cell differentiation was stable with increasing passage. The stability of tumor cell differentiation was also substantiated by the study of intermediate filament expression by tumor cells. Whatever the tumor passage and the site of grafting, all the tumor cells expressed the intermediate filament vimentin, and 90% of them co-expressed GFAP, a proportion similar to that observed in the two original tumors. In sections immunostained for vimentin and then hybridized with the human DNA probe, the neoplastic astrocytes in the central core of the tumors, in the transition zone between areas of solid tumor and those showing isolated tumor cell infiltration, as well as those that lined up beneath the pia mater or grew in the subependymal regions, showed moderately abundant cytoplasm and multiple ramified cell processes of various lengths and were GFAP-positive. The vimentin-positive isolated tumor cells in otherwise intact brain parenchyma tended to be elongated, with scantier cytoplasm and unbranched processes. They most often appeared as naked nuclei on corresponding HE-stained sections and were GFAP-negative. Double immunostaining with the antibodies to human vimentin and to mouse Type IV collagen revealed that most of the migrating malignant astrocytes aligned themselves along the basement membranes of parenchymal blood vessels and the glia limitans externa, expansions of astrocytic foot



processes being in intimate relationship with these basement membranes (Figure 3C).

Tumor Proliferative Activity. Proliferative activity was variable from tumor to tumor but was always prominent. The median distribution of the growth fractions was 26% for the intracranial transplants, with extreme values of 8% and 67%. Palisading cells around areas of necrosis always failed to express the cell proliferation-associated antigen. Dual immunohistochemistry on selected slides with the MIB-1 antibody and the antibody to human vimentin showed that in each animal the proliferative activity was of the same intensity in the main tumor mass and in the compartment of isolated cells that infiltrated the normal brain parenchyma (Figure 3D).

Reactive Gliosis in the Recipient Brain. An acute reactive astrogliosis always developed at the tumor–host interface. As observed in tissue sections immunostained for GFAP and then hybridized with the mouse DNA probe, reactive astrocytes in the brain parenchyma adjoining the tumors made monomorphous populations of uniformly spaced, stellate fibrillary astrocytes, with rare branched, attenuated processes of similar length radiating in all directions from small cell bodies, and a nuclear to cytoplasmic ratio less than that of the neoplastic cells. These reactive mouse astrocytes always appeared smaller than their human tumor counterparts.

Immunohistochemistry on successive sections with the antibodies to Ki-67 and to GFAP showed that reactive mouse astrocytes at the tumor borders constituted a cycling cell population (Figure 3E). Reactive astrocytes could also be detected within the main tumor masses (Figure 3F). Hybridization with the mouse DNA probe showed that an average of 5% of the cells in the main tumor masses were of murine origin, of which 30% appeared to be reactive mouse astrocytes in combined immunohistochemical–ISH studies. The

remaining mouse cells were mainly the endothelial cells of the tumor microcirculatory bed (see below) and a few macrophages either dispersed or grouped around areas of necrosis. Neuron cell bodies were never observed.

Tumor Vascularization. The vascular density in the intracranial tumors harvested more than 15 days after grafting varied widely from tumor to tumor and within different areas of the same tumor. The median distribution of the number of vessels in 10 high-power fields in the 23 intracranial tumors in which this count could be performed was 61 (range 27–227). The mean vascular density in the intracranial tumors (62) was on average more than three times lower than that established for the normal mouse brain hemispheres (201) using the same methodology. Furthermore, the normally highly ordered arrangement of the brain microcirculatory bed was destroyed. The tumor vessels were tortuous, larger, and more irregular in cross-section compared to normal brain vessels.

The basement membranes of the tumor microcirculatory beds, as well as the glia limitans externa covering the brain cortical surface and in the subependymal spaces in the intracranial grafts, were uniformly stained by the murine-specific antibody to Type IV collagen but never by the human-specific antibody. The basement membranes appeared continuous, focally thickened, and often multilayered. In sections stained with the monoclonal antibody to factor VIII-related antigen, the tumor microvessels appeared to consist of a continuous single layer of thickened endothelial cells that never formed glomeruloid microvascular proliferation. The antibody to α -smooth cell actin showed exceptional isolated pericytes dispersed along the tumor microvascular network, whereas pericytes formed an extensive yet incomplete layer around the normal brain and abdominal wall vessels. In ISH-stained sections, all of the endothelial cells were of murine origin (Figure 3G). Because of the small size of the grafts, the

Figure 3 (A) Coronal section of a nude mouse brain showing a transplanted human malignant astrocytoma. Transplant harvested on day 83 post grafting. Immunoperoxidase labeling of human vimentin using the diaminobenzidine/ H_2O_2 substrate. Tumor displays invasive growth with extensive peripheral invasion. Bar = 1.5 mm. (B) Immunoperoxidase staining of human vimentin using the diaminobenzidine/ H_2O_2 substrate. Malignant astrocytoma cells invade the corpus callosum (arrows) and the left semi-oval center. Tumor removed on Day 83 post grafting. Bar = 150 μ m. (C) Transplant removed on Day 84 post grafting, stained for human vimentin and murine Type IV collagen (blue and red, respectively). Most migrating astrocytes align themselves along basement membranes of parenchymal blood vessels. Bar = 70 μ m. (D) Transplant removed on Day 90 post grafting, stained for human vimentin and Ki-67 antigen (red and blue, respectively). The proliferative activity is of the same intensity in the main tumor mass and the compartment of isolated cells that infiltrates the normal brain parenchyma. Bar = 60 μ m. (E) Transplant removed on Day 90 post grafting, stained for GFAP and Ki-67 (brown and blue, respectively). Mouse reactive astrocytes at the tumor border constitute a cycling population. Arrows: nuclei of noncycling astrocytes. Bar = 20 μ m. (F) Combined immunoperoxidase/ISH method with a species-nonspecific antibody to GFAP and the mouse DNA probe. Cytoplasm of astrocytes are stained in brown using the diaminobenzidine/ H_2O_2 substrate. Nuclei of mouse-reactive astrocytes are stained in blue by the BCIP/NBT method of revelation of alkaline phosphatase activity. Transplants removed on Day 90. Bar = 30 μ m. (G) Double ISH staining for human and mouse DNAs (red and blue respectively). Dilated vascular lamina are lined by mouse endothelial cells. Transplants removed on Day 90 post grafting. Bar = 40 μ m. (H) Staining of malignant astrocytoma cells in the main tumor mass for VEGF protein. Transplants removed on Day 90 post grafting. Bar = 20 μ m. (I) Immunoperoxidase staining for human vimentin. Abdominal transplant removed on Day 5 post grafting. The tumor transplant appears well-limited. Bar = 8 μ m.

number of endothelial cells that could be counted in each tumor section was always less than 100. Therefore, true MIB-1 indices could not be established. However, whatever the tumor and the site of grafting, the percentage of MIB-1 endothelium-positive cells within the tumor microvascular beds was always less than 1%.

In the three cases studied for disruption of the blood-brain barrier by analysis of the intracerebral distribution of Evans blue, dye extravasation into the tumor masses was marked but no dye leakage was observed elsewhere in the brain. In sections of each of these three tumors, fibrin and murine IgGs, proteins that are physiologically excluded from the brain extracellular space, were detected immunohistochemically within the nonvascular extracellular matrix in territories stained by Evans blue.

Immunohistochemical staining for VEGF protein was performed in sections from the two initial surgical biopsies and from each of the intracranial and abdominal transplants. The staining patterns of the main tumor masses were identical whatever the sections studied. Immunopositivity was, on average, observed in the cytoplasm of 30% of cells that made up the main tumor masses (Figure 3H), with a preferential localization to astrocytes organized in perinecrotic palisades. Cells of tumor vasculature were always negative. Dual immunohistochemical-ISH studies with the antibody to the VEGF protein and the human or the mouse DNA probe performed on selected intracranial transplants made it possible to demonstrate unequivocally that most of the VEGF-synthesizing astrocytes in the main tumor masses were of human origin. However, all the mouse reactive astrocytes at the tumor borders and a few normal-looking mouse astrocytes in subpial or subependymal locations also expressed the protein.

Morphology of the Abdominal Grafts Removed More Than 15 Days After Grafting

Abdominal tumors grew as discrete, lobulated, firm gray or yellowish masses (Figure 3I). Central intratumoral necrosis and petechial hemorrhage were observed in every transplant. Although at low magnification they appeared well circumscribed, the abdominal tumors were not encapsulated. Staining for human vimentin often revealed nests of tumor cells within the parietal striated muscles and the connective tissue layers of the superficial fascia, but not in the dermis or in the fascia deep to the muscle. However, serial sections revealed that the tumor nests that appeared isolated were actually connected to the main tumor masses. Spreading of isolated tumor cells from the main tumor masses into adjacent connective tissue was never observed. The tumors contained the same morphological

cell types as those observed in the original surgical specimens and in the brain transplants.

Tumor differentiation was stable with increasing passages. Every tumor cell expressed vimentin, and on average 85% of them expressed GFAP. The median distribution of growth fractions was 40%, with extremes of 13% and 70%. The mean vascular density was 110 (range 75–257). The vessels in the abdominal graft transplants were always of larger diameter than those of the cerebral grafts. On sections immunostained with the antibody to mouse Type IV collagen, the basement membranes of the tumor microvessels appeared continuous and often multilayered. No staining was observed with the antibody to human Type IV collagen. On sections double-stained with antibodies to mouse Type IV collagen and to human vimentin, alignment of tumor cells along the tumor microvessels was never observed. ISH showed that all endothelial cells were of murine origin. An increase in microvasculature permeability was shown by diffuse and intense bluing of the three tumors studied after IV injection of Evans blue, as well as by heavy and diffuse deposits of fibrin and murine IgG within the tumor extracellular matrix in frozen sections immunostained for these proteins. On average, VEGF immunopositivity was observed in the cytoplasm of 45% of the tumor cells, but cells of the tumor vasculature were always negative.

Morphology of the Grafts Removed Within the First 15 Days After Grafting

Coagulative necrosis was not observed in the three intracranial transplants removed within 15 days of grafting. Non-necrotic-looking tumor cells were dispersed in a spongy neuropil. In sections double-stained for human vimentin and mouse Type IV collagen, neoplastic astrocytes were always observed in close contact with the basement membranes of recipient vessels.

The abdominal transplant removed on Day 3 showed extensive areas of ischemic necrosis of both the tumor cells and the adjoining mouse connective tissue, with tissue congestion and with macrophage and neutrophil emigration. The inflammatory infiltrate was less dense in the two grafts removed on Days 10 and 15. At that time, granulation tissue had formed in the tissue surrounding the necrotic territories. In the center of each of these three grafts, vessels with a human basement membrane were visible on sections immunostained with the species-specific antibody to human Type IV collagen. On ISH-stained sections, most of the endothelial cells of the grafts' microcirculatory beds were human, whereas all the inflammatory cells and those of the granulation tissue were murine. However, in the graft removed on Day 15, some murine en-

endothelial cells could be detected in vessels underlined by a human basement membrane.

Discussion

The desire to experiment on human glioblastomas within a convenient *in vivo* system eventually led to the use of immunodeficient animals, most commonly in athymic nude mice or rats, which can serve as tolerant hosts for human neoplasms (Rana et al. 1977). The resulting tumors are interspecific transplantation chimeras and therefore constitute experimental systems in which the relationship between the tumor cells and the host tissues can be easily analyzed. Species divergence in repetitive DNA sequences makes it possible to distinguish human GBM cells from normal or reactive cells of the mouse brains by ISH, in a system where it is possible to analyze the cell phenotypes and the extracellular matrix macromolecules by immunohistochemistry (Plénat and Duprez 1990).

Hapten-labeled oligonucleotide probes for the human specific repetitive sequences Alu and their mouse equivalents can be used for such studies and give excellent morphological results when each probe is used individually (De Armond et al. 1994). In our studies, however, single oligonucleotide probes nonradioactively labeled on their 3' end with terminal deoxynucleotidyl transferase are not sensitive enough for dual hybridization or combined ISH/immunohistochemistry methods to be performed successfully on the same slide. It is now necessary for double ISH methods to be performed because, even in optimally stained sections, the nuclei of a few cells of one species may be unstained by the corresponding probe. We previously reported that hapten-labeled, sonicated total genomic DNA probes make it possible to perform dual or combined studies with excellent morphological results and essentially no cross-hybridization (Plénat and Duprez 1990; Plénat et al. 1992). Similar results should be achieved with pools of terminally labeled oligonucleotides whose sequences are complementary with Alu sequences or with probes generated by the polymerase chain reaction, using mouse or human DNA as a template and oligonucleotides, the sequences of which are complementary to the Alu sequence, as primers. For cell migration studies in transplantation chimeras, these ISH methods should take the place of other marker systems, such as (a) the prelabeled cells with fluorescent vital dyes or lectins, because such tracers are necessarily progressively washed out due to halving of their amount on each cell division, allowing tumor cell migration studies for only 3–4 weeks (Bernstein et al. 1989; Laws et al. 1993), and (b) the transfer of non-human genetic material into the GBM cells, such as the lacZ gene that codes for a bacterial β -galactosidase for which the enzyme activity can be detected in histological sections (Lampson et al. 1993; Pedersen

et al. 1995). Indeed, transfection might select subsets of human brain tumor cells or alter their invasiveness.

Because of their high proliferative rates, transplantable GBM models in which tumor cells are implanted as cell suspensions are often considered as failing to invade the contiguous brain, progressing by expansive rather than diffuse infiltrative/invasive growth (Pilkington et al. 1997). The success of recent gene therapy experiments using the 9L transplantable gliosarcoma may be attributed in part, to the lack of invasion in this model (Culver et al. 1992). However, some models, such as the rat C6 line, demonstrate invasion along vascular pathways and migration along white matter tracts (Nagano et al. 1993). In this work, the xenografted GBMs combined an expansile central mass with diffusely infiltrative margins, a mixed expansive-infiltrative pattern of growth that may be seen in low-grade tumors in humans but is characteristic of high-grade gliomas. The population of astrocytoma cells, isolated or grouped in small cell nests, infiltrates the normal brain along white matter tracts such as the corpus callosum, along blood vessels, beneath the pia, and between the ependymal and subependymal layers of the third and lateral ventricles. Furthermore, as described above, the phenotype of these migrating cells did resemble that of the infiltrating tumor cells in humans. The growth and invasive properties of human GBMs transplanted orthotopically very closely resemble those of GBMs in humans. Therefore, despite the phylogenetic distance between human and mouse, our results suggest that this should not impose any serious limitations on the use of nude mouse brain xenograft models of human GBM for studying brain invasion *in vivo*.

The combination of immunohistochemistry and ISH made it possible to demonstrate unequivocally the presence of a mouse glial nonvascular stroma within the main tumor mass. Such a stroma in the tumor tissue proper was impossible to discriminate both on HE-stained sections and on microscopic preparations immunostained for GFAP. In the tumor periphery and peritumorally, however, the human neoplastic astrocytes were easily distinguished from the mouse reactive astrocytes in that they lacked the regular arrangement and symmetric stellate processes of reactive cells, which is best visualized by the GFAP reaction. Our results therefore validate the morphologic criteria for identification of acute reactive peritumoral gliosis in humans established by Dumas-Duport et al. (1987). Moreover, the fact that the reactive astrocytes, both in the central core of the tumor and in the tumor periphery, constitute a cycling cell population and take part in the VEGF protein synthesis, although in a small way, is firmly established in this work. On the other hand, because of difficulties in distinguishing stromal reactive astrocytes from tumor cells, such properties are often impossible to ascertain in surgical specimens of human GBMs.

In this study, double immunostaining for human vimentin and MIB-1 antigen made it possible to demonstrate unequivocally that the compartment of isolated human tumor cells that permeate largely intact brain parenchyma constitutes a cycling population and possesses a growth potential similar to that of cells in the cellular cores. Because of the difficulty in discriminating between invading isolated cells and reactive astrocytes, especially in immunostained sections, the proliferative potential of this cell compartment in human GBMs is difficult to appreciate. If this potential is identical to that observed in our model, recurrence in humans may result from proliferation of individual tumor cells that escape the surgeon and infiltrate beyond the standard radiation treatment volume.

In contrast to brain transplants, the flank tumors studied here grew mainly by expansion. Migration of isolated cells away from the main tumor mass was never observed. The same applied to close contacts between expansions of astrocytic foot processes and the Type IV collagen component of the vascular basement membranes. The migrating capacities of the GBM cells are therefore not entirely determined by genetic variations of tumor cells but rather depend on interactions with host factors, including a particular environment specific to the site of engraftment. In the brain xenografts as in GBMs in humans, the basement membranes form a major route of tumor cell migration, a role that they do not play in the abdominal grafts. Additional differences between the brain and abdominal xenografts were the more rapid speed of growth of the abdominal tumors and the higher permeability of their microvascular tree.

Tumors other than GBMs proliferate in nude mice in a pattern similar to that in patients if the cells are grown orthotopically. Orthotopic rodent models have been developed for human gastric carcinoma (Yamashita 1989), colon carcinoma (Morikawa et al. 1988; Fu et al. 1991), renal carcinoma (Naito et al. 1987), lung carcinoma (McLemore et al. 1987; Howard et al. 1991), prostate carcinoma (Kozlowski et al. 1984), pancreas carcinoma (Vezeridis et al. 1989), and malignant melanomas (Juhász et al. 1993). Studies in these models have demonstrated that the organ-specific microenvironment plays a determining role in tumor growth, stroma formation, angiogenesis, and invasion. Selection of the transplantation site is therefore of importance. When used for experimental therapy, the easily accomplished SC implantation of a tumor is a model that allows the question of cell sensitivity to be separated from the problem of drug delivery. However, it is clear that intracranial growth better simulates the clinical situation.

The mean vascular density in the brain xenografts removed more than 15 days after implantation was always low, even though tumor ischemic necrosis was

never extensive. Vascular proliferation in glomeruloid tuft form was never observed. The DNA indices for the microvascular cell population were always estimated to be less than 1%, whereas Watanabe et al. (1995) showed that vessels in human gliomas have a mean MIB-1 index of 2.6%.

Angiogenesis is a complex process, which is regulated by multiple stimulatory and inhibitory factors that are able to modulate the migration and/or proliferation of microvascular cells (Ferrara and Davis-Smyth 1997). Recent data suggest that in human gliomas, VEGF protein is the principal mediator of tumor-induced angiogenesis (Berkman et al. 1993). VEGF binds to endothelial cells that express its receptors. In our model, about 30% of the tumor cells, some reactive astrocytes from the host, but no endothelial cells, were stained by the antibody to VEGF protein. The percentage of tumor cells secreting VEGF was similar to that observed in the original surgical biopsies in which capillary endothelial proliferation with a glomerulus-like structure and endothelial cell staining were observed. These data therefore suggest the absence of a paracrine angiogenesis loop that could be explained by the lack of appropriate receptors for the human VEGF protein on the endothelial lining of the tumor microcirculatory beds, all of which are of murine origin.

In most previously published orthotopic animal models of human GBM (Rana et al. 1977; Bradley et al. 1978; Shapiro et al. 1979; Bullard et al. 1981; Horten et al. 1981; Jones et al. 1981; Basler and Shapiro 1982; Marno et al. 1982; De Armond et al. 1994), the tumors were implanted not in solid pieces but by stereotaxic injection of cell suspensions. The cell suspension methods of grafting have the distinctive advantage of limited surgical trauma. However, it can be estimated from different published figures that direct implantation of cell suspensions results in an overall take rate of less than 70%. Furthermore, injected cells may flow back along the shaft of the needle and therefore into the arachnoid space, or may be carried away into the normal brain parenchyma or the ventricles by the liquid of the cell suspensions. Recently, GBMs have been also transplanted as spheroids from precultured biopsy specimens, with a success rate of 87.7–100% (Engebraaten et al. 1999). As far as we know, only one group (Shapiro et al. 1979; Horten et al. 1981; Basler and Shapiro 1982) have reported GBM grafting as solid explants into brains of nude mice. The authors who transplanted fragments of human Grade II–IV astrocytomas directly from the patient into mouse brain observed an overall take rate of only 16%, the mean take rate of Grade III and IV astrocytomas being 24%. In the present work, we have shown that human GBM explantation into nude mouse brain is always successful when the tumors are grown within the mouse abdominal walls before being heterotransplanted into the brain.

In our experiments, the abdominal engraftment of human GBMs was always successful. Because the volume of the abdominal tumors after a few weeks is such that several scores of intracerebral transplants can be performed from a single abdominal tumor, a large number of mice can be grafted with tumor tissue from one original surgical specimen, making large homogeneous experimental lots of animals available for well-designed assays. The constant take of the abdominal primary transplants may be explained by the way we carefully seated the tumor fragments in a richly vascularized site, in close contact with the epigastric vessels. Furthermore, we showed that, during the first abdominal passage, the tumor grafts acquire a microvasculature from the host. This may allow fast subsequent graft revascularization by end-to-end anastomosis between the transplants and the host microvasculature beds which, at the time of grafting, are made of both cells and extracellular matrix molecules of murine origin. An accelerated revascularization may largely explain the shortening of the lag phases with successive abdominal passages, the lag phase brevity between the tumor intracranial transplantation and tumor detectability by MRI, and the constant take of the brain transplants observed in this study. Another factor would be the multistep selection during the abdominal passages of cell populations growing more rapidly than those at earlier passages, with subsequent stabilization.

In addition to its constant take and unquestionable similarities in overall histological structures and patterns of invasion between the intracranial tumor transplants and spontaneous human malignant gliomas, the transplanted brain tumor model described above has the following additional advantages: (a) tumor development is rapid enough for testing of most therapeutic modalities within a reasonable time period, while mean survival times as long as 1 year are observed when GBMs are directly grafted into the brain; and (b) an increased blood-brain barrier permeability to macromolecules allows the issue of drug delivery to malignant brain tumors to be addressed. The superficiality of the sites of tumor implantation, contrasting with the large dimensions of the tumor areas in which the abnormal permeability could be demonstrated, is such that the breakdown of the structural blood-brain barrier may not result from damage to the brain parenchyma and its vascular system caused by the implantation procedures.

MRI evaluation of experimental GBMs in the mouse has not been previously reported. Our findings indicate that this technique is sensitive enough to allow longitudinal evaluation of tumor growth in the same animal. This might spare animals in therapeutic experiments, because the tumor take is assessable before the therapeutic regimen is tested. However, access to instrumentation and the time involved in regularly scanning a large number of animals may be a limiting factor for the use of this approach.

With the exception of their microvascular bed, which differs in several points from that of GBMs in humans, the malignant astrocytomas derived from the orthotopic transplantation of solid fragments of human GBMs previously passaged within the mouse flank constitute a model that closely resembles the human situation, particularly in relation to its growth characteristics and invasive properties. Differences in vascularization must be taken into consideration when this model is used to study therapies in which the tumor microvascular bed is the main target. For the remaining factors, the phylogenetic distance between human and mouse and the recipient immunoincompetence should not impose serious limitations on the use of nude mouse orthotopic models for studying malignant glioma biology or therapy *in vivo*.

Acknowledgments

Supported by grants from l'Association Française de Recherche contre le Cancer and by La Ligue Régionale de Lutte contre le Cancer.

We thank C. Daumas-Duport for helpful discussion, C. Bonnet, S. Pizzagalli, D. Thiébaud, and M.P. Pretagut for excellent technical assistance, and C. Maire for expert help in the preparation of this manuscript.

Literature Cited

- Basler GA, Shapiro WR (1982) Brain tumor research with nude mice. In Fogh J, Giovanella BC, eds. *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research*. New York, Academic Press, 475-490
- Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH (1993) Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 91:153-159
- Bernstein JJ, Goldgerg W, Laws ER (1989) Human malignant astrocytoma xenografts migrate in rat brain: a model for central nervous system cancer research. *J Neurosci Res* 22:134-144
- Bradley NJ, Bloom JC, Dawies AJ, Swift SM (1978) Growth of human gliomas in immune-deficient mice: a possible model for pre-clinical therapy studies. *Br J Cancer* 38:263-272
- Brem S, Cotran R, Folkman J (1972) Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst* 48:347-356
- Bullard DE, Schold SC, Bigner SH, Bigner DD (1981) Growth and chemotherapeutic response in athymic mice of tumors arising from human glioma-derived cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 40:410-427
- Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii K, Oldfield EH, Blaese RM (1992) *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256:1550-1552
- Daumas-Duport C, Scheithauer MD, Kelly PJ (1987) A histologic and cytologic method for the spatial definition of gliomas. *Mayo Clin Proc* 62:435-449
- De Armond SJ, Stowring L, Amar A, Coopersmith P, Dougherty D, Spencer D, Mikkelsen T, Rosenblum M (1994) Development of a non-selecting, non-perturbing method to study human brain tumor cell invasion in murine brain. *J Neurooncol* 20:27-34
- Engelbrechtsen O, Hjortland GO, Hirschbert H, Fodstad O (1999) Growth of precultured human glioma specimens in nude rat brain. *J Neurosurg* 90:125-132
- Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev* 18:4-12
- Fu XY, Besterman JM, Monosov A, Hoffman RM (1991) Models

- of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9345-9349
- Horten BC, Basler GA, Shapiro WR (1981) Xenograft of human malignant glial tumors into brains of nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 40:493-511
- Howard RB, Chu H, Zeligman BE, Marcell T, Bunn PA, McLen TL, Mulvin DW, Cowen ME, Johnston MR (1991) Irradiated nude rat model for orthotopic human lung cancers. *Cancer Res* 51:3274-3280
- Jones TR, Bigner SH, Schold SC, Eng LF, Bigner DD (1981) Anaplastic human gliomas grown in athymic mice. Morphology and glial fibrillary acidic protein expression. *Am J Pathol* 105:316-327
- Juhasz I, Albelda SM, Elder DE, Murphy GF, Adachi K, Herlyn D, Valyi-Nagy IT, Herlyn M (1993) Growth and invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. *Am J Pathol* 143:528-537
- Kozlowski JM, Fidler IJ, Campbell D, Xu Z, Kaighn ME, Hart IR (1984) Metastatic behavior of human tumor cell lines growth in the nude mouse. *Cancer Res* 44:3522-3529
- Lampson LA, Lampson MA, Dunne AD (1993) Exploiting the lacZ reporter gene for quantitative analysis of disseminated tumor growth within the brain: use of the lacZ gene product as a tumor antigen, for evaluation of antigenic modulation, and to facilitate image analysis of tumor growth in situ. *Cancer Res* 53:176-182
- Laws ER, Goldberg WJ, Bernstein JJ (1993) Migration of human malignant astrocytoma cells in the mammalian brain: Scherer revisited. *Int J Dev Neurosci* 11:691-697
- Marno K, Neyama Y, Kuwahara Y, Hioki K, Saito M, Nomura T, Tamaski N (1982) Human tumour xenografts in athymic rats and their age dependence. *Br J Cancer* 45:786-789
- McGadley J (1970) A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemistry* 24:180-184
- McLemore TL, Liu MC, Blacker PC, Gregg M, Alley MC, Abbott BJ, Shoemaker RH, Bohlman ME, Litterst CC, Hubbard WC, Brennan RH, McMahon JB, Fine DL, Eggleston JC, Mayo JG, Boyd MR (1987) Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. *Cancer Res* 47:5132-5140
- Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, Pathak S, Jessup JM, Fidler IJ (1988) Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res* 48:6863-6871
- Nagano N, Sasaki H, Asyagi M, Hirakama K (1993) Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 86:117-125
- Naito S, von Eschenbach AC, Fidler IJ (1987) Different growth pattern and biologic behavior of human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *J Natl Cancer Inst* 78:377-385
- Pedersen PH, Edvardsen K, Garcia-Cabrera I, Mahesparan R, Thorsen J, Mathisen B, Rosenblum ML, Bjerkvig R (1995) Migratory patterns of lac-z transfected human glioma cells in the rat brain. *Int J Cancer* 62:767-771
- Pilkington GJ, Bjerkvig R, De Ridder C, Kaaijk P (1997) In vitro and in vivo models for the study of brain tumor invasion. *Anticancer Res* 17:4107-4110
- Plénat F, Duprez A (1990) Chimérisme tissulaire homme-souris nude: caractérisation des populations cellulaires par hybridation in situ. *CR Acad Sci Paris* 310 (Ser III): 53-59
- Plénat F, Martinet Y, Martinet N, Vignaud JM (1994) Immunohistochemical methods for studying mononuclear phagocytes in tissue sections. *J Immunol Methods* 174:133-154
- Plénat F, Vignaud JM, Guerret-Stocker S, Hartmann D, Duprez K, Duprez A (1992) Host-donor interactions in healing of human split-thickness skin grafts onto nude mice: in situ hybridization, immunohistochemical and histochemical studies. *Transplantation* 53:1002-1010
- Rana MW, Pinkerton H, Thornton H, Nagy D (1977) Heterotransplantation of human glioblastoma multiforme and meningioma to nude mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 155:85-88
- Shapiro WR, Basler GA, Chernik NL, Posner JB (1979) Human brain tumor transplantation into nude mice. *J Natl Cancer Inst* 62:447-453
- Vezeridis MP, Doremus CM, Tibbetts LM, Tzanakakis G, Jackson BT (1989) Invasion and metastasis following orthotopic transplantation of human pancreatic cancer in the nude mice. *J Surg Oncol* 40:261-265
- Watanabe K, Ogata N, Von Ammon K (1995) Immunohistochemical assessments of p53 protein accumulation and tumor growth fraction during the progression of astrocytomas. In Nagai M, ed. *Brain Tumour Research and Therapy*. Tokyo, Springer-Verlag, 125-131
- Yamashita T (1989) The drug sensitivity of human gastric cancer implanted into the subcutis and stomach wall of nude mice. *J Jpn Soc Cancer Ther* 24:611-616



Nom : Mr ANTUNES
Prénom : Laurent

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

Spécialité : BIOLOGIE CELLULAIRE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

n° 726

Nancy, le 9 décembre 2002

Le Président de l'Université

C. BURLET

RESUME : La xénogreffe orthotopique chez la souris nude, sous la léptoméninge et sur le cerveau, d'un fragment de glioblastome humain recrée, à l'exception de la cinétique des cellules endothéliales, les caractéristiques d'un gliome évoluant spontanément chez l'homme. Avec un tel modèle, le chimérisme cellulaire comme marqueur d'origine des cellules, étudié par hybridation *in situ* couplée à l'immunohistochimie, permet d'analyser la différenciation, la cinétique et la migration des cellules néoplasiques mais aussi la vascularisation tumorale et la gliose réactionnelle de l'hôte.

En amont de l'analyse histopathologique du gliome xénogreffé, la prise, le développement et la nécrose des greffons tumoraux peuvent être appréciés *in vivo* par des techniques non invasives de résonance magnétique nucléaire morphologique (IRM du proton) et métabolique (spectroscopie du phosphore).

Parmi la multitude des applications possibles de ce modèle, une étude de distribution tissulaire d'oligonucléotides phosphorothioate marqués, injectés à la souris nude porte-greffe, est entreprise dans la perspective de thérapies antisens.

Ainsi, des études expérimentales *in vivo* des gliomes humains n'impliquant pas le malade deviennent possibles tant dans le domaine du diagnostic et de la thérapie que dans celui de la biologie fondamentale.

XENOGRAFTED HUMAN GLIOMA BIOPSIES ONTO NUDE MOUSE BRAIN : A MODEL FOR PRE-CLINICAL STUDIES IN NEURO-ONCOLOGY

SUMMARY: Human glioblastomas grafts onto nude mice brains allow a brain tumor model that closely resemble the human situation with the exception of their microvascular bed. Chimerism studies by *in situ* hybridisation coupled to immunohistochemistry allows unequivocal identification of tumor cells from reactive gliosis and vasculature of the mouse host brain. As such, this method provides a model for the analysis of the tumor cells differentiation, kinetic and migration pattern inside the parenchyma of the mouse host brain. With this model, the ability to measure the characteristics of the tumors noninvasively using NMR technique such as MRI and ³¹P NMR Spectroscopy and to compare with gold standard histological techniques has been validated. Cell distribution studies of phosphorothioate oligonucleotides have demonstrated the usefulness of such a model for antisens therapy strategies in humans.

The results obtained open, without ethical limitations, numerous possibilities for direct *in vivo* study of experimental human gliomas.

DISCIPLINE: Biologie, Santé et Environnement.

MOTS CLES : nude mouse, human glioma, animal model, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, MRI, ³¹P NMR Spectroscopy, antisens oligonucléotides.

ADRESSE : Laboratoire de Microchirurgie et d'Histopathologie Expérimentale de la Faculté de Médecine de Nancy – Université Henri Poincaré
9, Avenue de la Forêt de Haye – 54505 Vandoeuvre lès Nancy Cedex France.