

CNRS – INSERM - CEA
Programme Interdisciplinaire “ Imagerie du Petit Animal ”

Synthèse et utilisation de nouveaux marqueurs bifonctionnels détectables en microscopie biphotonique et en IRM pour l'étude des pathologies de la perfusion sanguine dans le cerveau.

Coordonnateur : VIAL, Jean-Claude
CNRS UMR 5588, Laboratoire de Spectrométrie Physique (Spectro), B.P. 87,
38402 St Martin d'Hères

Résumé (15 lignes maximum):

Les mesures non invasives des paramètres hémodynamiques et morphométriques de la microvascularisation cérébrale sont importantes dans le diagnostic et le suivi du traitement des tumeurs malignes et des accidents vasculaires cérébraux. Les images obtenues par résonance magnétique du proton (IRM), après injection d'un agent de contraste paramagnétique, sont à résolution millimétrique et dépendent de la perfusion sanguine, du volume et de la perméabilité des vaisseaux. Ainsi, une interprétation unique de l'image n'est pas possible sans suppositions préalables. Nous nous proposons de mesurer des paramètres hémodynamiques à l'échelle du micron au moyen de la microscopie biphotonique *in vivo*, dans des tumeurs implantées chez la souris ou le rat. Afin de pouvoir incorporer des données microscopiques directement dans des modèles d'interprétation d'images IRM, nous développerons des molécules marqueurs bifonctionnels possédant des groupements fluorescents et un dipôle paramagnétique. Dans un premier temps, nous utilisons des polymères de grande masse moléculaire qui reste dans les vaisseaux (non-diffusibles ; un polymère constitué d'un chélateur, du gadolinium et de la rhodamine sur une chaîne dextrine s'est montré efficace en biologie cellulaire). En même temps, nous développerons des molécules plus petites (diffusibles).

Non-invasive measurements of hemodynamic and morphometric parameters of the brain microvasculature are important in diagnosis and monitoring of malignant brain tumors and stroke. ¹H magnetic resonance imaging (MRI) after injection of a paramagnetic contrast agent, gives images at millimeter resolution which depend on blood perfusion, and the volume and permeability of the vessels. To validate the interpretation, we will make in vivo microscopic analyses on a capillary level using two-photon microscopy of animal models. To relate optical and MRI data we will use bifunctional marker molecules that both fluoresce and are paramagnetic. Bifunctional markers containing gadolinium, manganese or iron and covalently attached fluorophores will be synthesized and tested in vitro and in vivo

Responsables scientifiques des autres équipes :

VAN DER SANDEN, Boudewijn. INSERM U438 RMN Bioclinique, Grenoble

GADELLE, Andrée, UMR 5046, Laboratoire de Reconnaissance Ionique et des Matériaux Moléculaires
Service de Chimie Inorganique et Biologique
CEA - Grenoble

LEPRETRE, Jean-Claude. CNRS UMR 5630, laboratoire d'électrochimie organique et de photochimie redox (LEOPR) Université Joseph Fourier, GRENOBLE

3.1. Situation actuelle du sujet proposé dans le contexte international, hypothèses de travail et objectifs

Introduction

3.1.1. Exposé du problème. En général, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants (angiogénèse ou néovascularisation) sont nécessaires pour la croissance tumorale et pour la dissémination métastatique (Folkman, 1995). Ainsi, la caractérisation des paramètres hémodynamiques et morphométriques de la microvascularisation d'une tumeur joue un rôle important dans le diagnostic, la planification d'une thérapie anti-tumorale et le suivi du traitement des tumeurs malignes. On sait que l'efficacité de la radiothérapie, de la chimiothérapie ou de thérapies spécifiquement anti-angiogéniques, est conditionnée à la fois par le degré d'oxygénation (Moulder and Rockwell, 1984; Lehnert, 2000) et par la nature de la vascularisation des tumeurs (Scappaticci, 2002). Actuellement, le développement de nouvelles thérapies anti-tumorales, surtout anti-angiogéniques, est en plein essor (Kuo et al., 2001) et les méthodes d'imagerie non-invasives sont plus que jamais nécessaires.

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) de perfusion, effectuée à l'aide d'agents de contraste infusés dans le sang, occupe déjà une place importante en cancérologie; cette technique est non-invasive et, à la différence d'une biopsie, donne des renseignements sur tout le volume d'une tumeur. La limitation majeure de l'IRM de perfusion est que sa résolution spatiale est faible : les dimensions d'un voxel ($\sim 400 \mu\text{m}^3$) dépassent largement celles d'un capillaire. L'exploitation ou l'analyse des données repose sur l'utilisation de modèles basés sur des suppositions concernant la cinétique des traceurs à l'échelle du capillaire et de leur extravasation (Barbier et al., 2001).

3.1.2. Hypothèse de travail.

Notre projet comporte deux volets. Nous allons analyser la microcirculation dans les tumeurs cérébrales chez la souris *in vivo* à l'échelle du capillaire; la technique de choix est la microscopie biphotonique de marqueurs fluorescents (voir 3.1.6). Cette imagerie optique à haute résolution permettra d'établir de meilleures bases pour le traitement des données et l'interprétation de l'IRM de perfusion. Cependant, la perfusion, l'extravasation et la diffusion dans le milieu extracellulaire d'une molécule varient en fonction de ses caractéristiques (taille, charge.....). Ainsi sera-t-il très avantageux d'utiliser la même molécule marqueur pour les deux imageries : optique et par résonance magnétique. Nous allons donc chercher à synthétiser et tester des marqueurs bifonctionnels, c'est-à-dire, des molécules comportant des groupes fluorescents et possédant également un dipôle paramagnétique.

3.1.3. Objectifs pour 12 mois.

Nous nous proposons d'étudier par microscopie biphotonique *in vivo* la microvascularisation de tumeurs implantées dans le cerveau de la souris. En même temps, nous synthétiserons et testerons *in vitro* des marqueurs bifonctionnels, qui seront utilisés *in vivo* ultérieurement.

3.1.4. La perfusion des tumeurs cérébrales : marqueurs diffusibles et non-diffusibles

La néovascularisation dans les tumeurs a des caractéristiques particulières au niveau de la morphologie (densité des capillaires; Wesseling et al., 1997) et de la physiologie (perfusion et perméabilité des capillaires; Vaupel et al., 1989). Notamment, l'endothélium capillaire ne constitue plus une barrière hématoencéphalique. Pour mesurer ces paramètres par IRM, des agents de contraste exogènes sont souvent utilisés. Il en existe deux classes : les agents **diffusibles** qui passent facilement à travers l'endothélium vasculaire des tumeurs (van der Sanden et al., 2000) et des agents **non diffusibles** (c'est-à-dire ceux qui, à court terme, restent dans le compartiment vasculaire d'un tissu, même une tumeur (Tropres et al., 2001). La captation d'un marqueur diffusible dans le volume extravasculaire d'une tumeur dépend de la perfusion sanguine, de la perméabilité des capillaires et de leur surface dans le volume examiné (Larsson et al., 1990; Tofts and Kermode, 1991). En utilisant un marqueur exogène et non diffusible, le débit sanguin relatif (Rosen et al., 1991), le volume sanguin et la taille des vaisseaux tumoraux peuvent être mesurés (Tropres et al., 2001).

Les marqueurs non-diffusibles agissant via une perturbation locale du champ magnétique (ce qui est équivalent à une modification du temps de relaxation T_2^* du spin nucléaire des protons de l'eau) nécessitent des nanoparticules magnétiques (essentiellement du fer). Les marqueurs diffusibles entrant directement en interaction avec les protons via

l'interaction superhyperfine et conduisant à une modification du temps de relaxation T_1 . Une telle fonction est généralement assurée par un ion paramagnétique du groupe du fer ou un ion lanthanide.

3.1.5. L'interprétation de l'IRM dynamique de la captation d'un marqueur diffusible

Pour lier les paramètres morphométriques et physiologiques de la néovascularisation tumorale avec la vitesse de la captation d'un marqueur diffusible mesuré par IRM, des modèles pharmacocinétiques ont été développés (Larsson et al., 1990; Tofts and Kermode, 1991). Ces modèles sont basés sur des hypothèses simples de la néovascularisation, qui ne tiennent pas compte de l'hétérogénéité, au sein d'un voxel d'IRM ($\sim 300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$), de la perfusion sanguine, de la perméabilité et de la morphologie. Le microscope biphotonique permettra d'étudier cette hétérogénéité et de distinguer sans ambiguïté la part de l'extravasation. (voir figure 1A). Cette information est importante puisqu'une radiothérapie ou une thérapie anti-angiogénèse efficace semble être suivie par une diminution du nombre de capillaires fonctionnels et une augmentation de leur perméabilité (Bussink et al., 2000; Xiao et al., 2002).

L'étude suivante par van der Sanden et coll. (Equipe 22000) a clairement montré qu'une analyse microscopique à haute résolution peut être corrélée avec les données d'IRM dont la résolution spatiale est plus faible. En utilisant l'IRM dynamique de la captation du marqueur diffusible Gadolinium-DTPA et les analyses quantitatives des coupes (immuno) histochimiques en microscopie par fluorescence, nous avons montré que la vitesse de la captation de ce marqueur dans un modèle de gliome chez le rat est directement liée à la densité des capillaires fonctionnels et à leur surface (van der Sanden et al., 2000). Ensuite, nous avons trouvé que la distribution spatiale du Gadolinium-DTPA dans la tumeur intracérébrale chez le rat (voir figure 1A) est comparable à celle du marqueur fluorescent Hoechst (voir figure 1B, les structures bleues). Pour les analyses quantitatives par immunohistochimie de ces capillaires fonctionnels et perméables, nous avons injecté le marqueur fluorescent Hoechst 1 minute avant le sacrifice du rat. Ce marqueur a un poids moléculaire comparable à celui du Gadolinium-DTPA. Il diffuse à travers l'endothélium des capillaires perméables où il colore l'ADN des cellules adjacentes à ces capillaires.

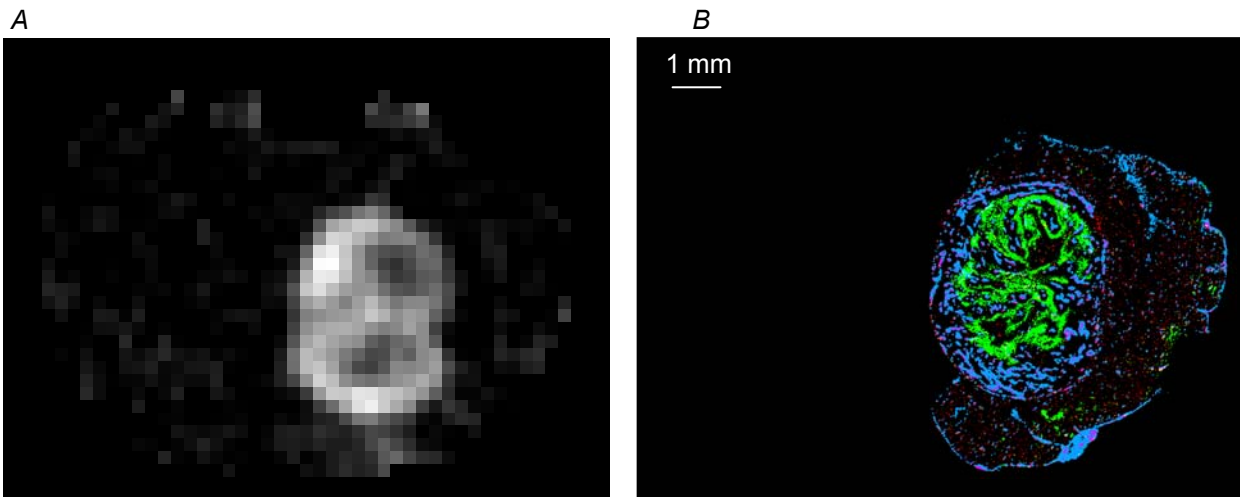


Figure 1A : Une image par résonance magnétique de la distribution hétérogène du Gadolinium-DTPA, 1 minute après injection, dans une coupe transversale d'une tumeur intracérébrale chez le rat. Figure 1B : La distribution spatiale du marqueur Hoechst (les structures bleues) dans une coupe histologique à une hauteur comparable à celle de la figure 1A (voir le texte pour les explications).

Avec les marqueurs bi-fonctionnels et le microscope biphotonique, nous aurons la possibilité d'étudier *in vivo* par IRM et par microscopie biphotonique, la captation de ces marqueurs

diffusibles dans le tissu tumoral avec une haute résolution temporelle et spatiale. Ceci est une amélioration importante par rapport à l'étude immunohistochimique quantitative mentionnée ci-dessus. Les analyses histochimiques des capillaires fonctionnels et perméables dans la Figure 1 correspondent à un état de la perfusion d'un seul point dans le temps après injection.

3.1.6. Mesure *in vivo* des paramètres hémodynamiques et morphométriques de la microvascularisation cérébrale par microscopie optique.

La mesure *in vivo* des paramètres hémodynamiques dans le SNC à l'aide de sondes fluorescentes a commencé par la rétine (Hickam and Frayser, 1965). L'introduction de la microscopie confocale conjuguée à un traitement numérique de l'image a permis ensuite l'observation, à travers d'une petite fenêtre crânienne, des capillaires jusqu'à 250 μm en dessous de la surface piale (Dirnagl et al., 1992; Seylaz et al., 1999). La microscopie biphotonique apporte une avancée considérable en permettant une plus grande profondeur d'observation (Charpak et al., 2001). Dans leur travail pionnier, Kleinfeld et coll. [\ 1998 #5] ont injecté, dans la circulation du rat, du dextran marqué par de la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Ils montrent des images en 3D du réseau capillaire jusqu'à une profondeur de 530 μm . Ils ont pu également suivre en détail (en mode "line scan") le déplacement d'érythrocytes individuels le long d'un capillaire, chaque érythrocyte apparaissant comme une absence de fluorescence.

3.1.7. Marqueurs bifonctionnels.

Des molécules détectables par leur fluorescence et aussi, en IRM, par leur paramagnétisme, ont été synthétisées par le groupe de T.J. Meade à Caltech. Il décrit deux approches (Huber et al., 1998). Dans le but d'obtenir un marqueur bifonctionnel de petite taille (diffusible), ils ont utilisé le chélateur DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane) couplé à la rhodamine pour faire un marqueur bifonctionnel qui possède une forte fluorescence et une grande relaxivité *in vitro*. Cependant, ces chercheurs n'ont pas détecté de signal RMN après injection dans une cellule. Hüber *et coll.* (1998) ont également synthétisé des marqueurs de taille "non-diffusible"; la tetraméthylrhodamine et le gadolinium-DTPA sont liés avec une chaîne dextran et forment un polymère. Les marqueurs de cette deuxième classe ont donné de bons signaux en IRM après injection intracellulaire. Le Dr Meade nous a dit qu'il pourrait nous fournir des marqueurs bifonctionnels, mais dans des quantités 'faibles', probablement juste assez pour des injections intracellulaires et insuffisantes pour infusion dans le sang.

3.1.8. Agents de contraste pour la RMN susceptibles d'être rendus fluorescents.

3.1.8.1. Agents de contraste non-diffusibles.

Un agent de contraste commercialisé, le Sinerem (Guerbet), qui est composé de nanoparticules de fer enrobés de dextran, a été utilisé par l'Equipe 2 (Tropres et al., 2001). En principe, on pourrait ajouté des fluorophores, comme le FITC.

3.1.8.2. Agents de contraste diffusibles.

L'Equipe 3 de notre projet possède une longue expérience des cyclodextrines de synthèse [Fauvelle, 2000 #20 \; 6 brevets]. La per-3,6-anhydro-2-O-carboxyméthyle-cyclodextrine complexée par du gadolinium a été développé comme agent de contraste potentiel (Brevet en dépôt, inventeurs Fries, P. et Gabelle, A.). Les tests montrent une absence de toxicité et la relaxivité RMN *in vitro* est supérieure à celle des agents de contraste actuellement utilisés.

3.1.9. Originalité. Nous ne connaissons pas de publications décrivant la microcirculation dans des tumeurs cérébrales observées par microscopie biphotonique. Les marqueurs bifonctionnels, à notre connaissance, ont été utilisés uniquement pour injection intracellulaire, jamais pour étudier la perfusion. Notre projet à long terme, la validation de l'IRM de perfusion dans les tumeurs par utilisation de marqueurs bifonctionnels, nous semble également être original.

3.2 Programme des travaux

3.2.1. Modèle animal

Comme modèle animal, nous utiliserons principalement des souris porteuses ou non de tumeurs cérébrales gliales, obtenues par implantation de cellules tumorales. L'implantation des cellules tumorales sera située à 300 μm de profondeur environ afin que la tumeur atteigne la surface du cortex. La croissance de la tumeur sera suivie par IRM pondérée T_1 ou T_2 , une technique de routine de l'Equipe 2 (par ex. García-Martín et al., 2001). Après l'imagerie IRM,

pour faire de la microscopie biphotonique, un trou sera effectué dans le crâne au-dessus du cortex moteur gauche et recouvert par une lamelle en quartz (Seylaz et al., 1999). Dans un premier temps, la souris sera sacrifiée après l'imagerie biphotonique; à long terme afin de pouvoir suivre l'évolution de la tumeur il faudra installer à demeure une fenêtre crânienne. Sur le poste IRM les appareils nécessaires existent pour le contrôle physiologique de l'animal. Nous compléterons rapidement, avec les appareils nécessaires, le poste de microscopie biphotonique.

Le choix de la souris comme modèle animal a plusieurs avantages : (1) la dure-mère est quasiment transparente et ne nécessite pas d'être enlevée. Cette opération, nécessaire chez le rat, n'est pas sans risque, car elle peut avoir un effet sur la pression intracrânienne et donc sur la perfusion sanguine. (2) Dans un avenir proche, la souris comme modèle animal, permettra de travailler avec des animaux transgéniques, modifiés, par exemple, au niveau de la perméabilité de la BHE (Kakinuma et al., 1998). (3) Les quantités de marqueurs nécessaires pour l'imagerie seront plus faibles.

Faisabilité. L'implantation de tumeurs cérébrales chez le rat est un travail de routine au sein de l'Equipe 2. B. Van der Sanden (Equipe 2) ayant déjà effectué de l'IRM *in vivo* sur des modèles de tumeurs cérébrales chez la souris (Verhoye et al., 2002), les compétences nécessaires pour maintenir la souris immobile et dans un état physiologique contrôlé existent. J.A. Coles (Equipe 2) a participé à un projet d'électrophysiologie sur le cerveau de rat avec trou crânien à ciel ouvert (Coles and Poulain, 1991). Pour la fenêtre crânienne en demeure, nous sommes en contact avec l'équipe de J. Seylaz qui s'est engagé à nous instruire.

3.2.2. Microscopie biphotonique de la microvascularisation cérébrale à l'aide de marqueurs monofonctionnels.

Nous mettrons en place d'abord l'imagerie biphotonique de la microvascularisation chez la souris saine en utilisant seulement un marqueur non-diffusible le FITC-dextran 10 kD. Le FITC-dextran est disponible sur le marché, mais celui vendu par Sigma (FD 105) n'est que faiblement marqué. Nous essayerons d'en obtenir un meilleur, éventuellement par synthèse. Nous passerons ensuite à la souris porteuse d'une tumeur. Après l'injection dans une veine de la queue du marqueur non-diffusible, une analyse en 3 dimensions de la distribution des capillaires sera effectuée à une profondeur maximale de 500 μm dans différents plans de coupes (série selon l'axe z). Ensuite, nous injecterons un marqueur diffusible, la fluorescéine, une molécule couramment utilisée en ophtalmologie pour détecter la rupture de la barrière hématorétinienne. La diffusion de ce marqueur diffusible dans le tissu adjacent aux capillaires sera analysée dans une région d'intérêt, afin de déterminer la perméabilité des capillaires pour ce marqueur (modèle pharmacocinétique à double compartiment, (van der Sanden et al., 2000)). A l'aide d'une grande platine motorisée X-Y, une mosaïque d'images sera obtenue pour chaque tumeur, afin de pouvoir reconstituer un volume correspondant à au moins un voxel IRM.

L'intérêt de travailler dans un premier temps avec des marqueurs monofonctionnels est : 1) ils sont disponibles actuellement; 2) plusieurs poids moléculaires sont disponibles; 2) ils seront moins chers que les marqueurs bifonctionnels. Évidemment, nous passerons aux marqueurs bifonctionnels dès qu'ils seront disponibles.

Faisabilité.

Kleinfeld et coll. [1998 #5] ont décrit en détail leurs expériences d'imagerie biphotonique de la microcirculation dans le cortex du rat en utilisant le FITC-dextran. La fluorescéine est couramment utilisée en ophtalmologie. Nous avons obtenu, sur notre poste, d'images 3D de la microcirculation dans l'oreille de la souris.

3.2.3. Synthèse de marqueurs bifonctionnels.

Les chimistes de trois équipes (1,3,4) travaillent sur la synthèse de marqueurs bifonctionnels.

3.2.3.1. Les qualités physico-chimiques requises pour un agent de contraste bifonctionnel idéal

- 1) L'organisation moléculaire doit posséder une fonction paramagnétique et une fonction optique. La fonction optique doit elle-même assurer deux fonctions : un bon rendement quantique de luminescence et une bonne section efficace d'absorption à 2 photons.
- 2) L'excitation par laser titane-safir exige que la section efficace d'absorption à 2 photons soit maximale pour la zone spectrale 700-900 nm.
- 3) Le microscope biphotonique exige que la luminescence soit dans le visible et

- à des longueurs d'onde inférieures à 700 nm.
- 4) Le marqueur doit avoir un degré de solubilité suffisamment élevé dans le sérum physiologique afin de pouvoir autoriser de l'imagerie optique à un rythme élevé (plusieurs images par seconde) et également de l'IRM.
 - 5) Il ne doit pas être toxique (même aux concentrations maximales).
 - 6) La stabilité chimique doit être assurée pour les deux conditions expérimentales : biochimique (*in vivo*) et optique (absence de blanchiment ou de dégradation thermique sous flux infrarouge élevé).

3.2.3.2. Marqueurs bifonctionnels non-diffusibles

Les marqueurs non diffusibles agissant via une perturbation locale du champ magnétique (ce qui équivaut une modification du temps de relaxation T_2^* du spin nucléaire des protons de l'eau) nécessitent des nanoparticules magnétiques (essentiellement du fer). Il existe les nano-particules d'oxyde de fer qui sont disponibles sur le marché (**Sinerem®**, Guerbet). Pour rendre ce marqueur bifonctionnels, nous pouvons greffer des fluorophores de la famille des rhodamines ou fluoescéines à la surface extérieure qui est constituée par des dextrans. L'Equipe 1 va entreprendre cette approche.

Faisabilité. La démonstration d'une synthèse de ce type est faite pour un autre marqueur bifonctionnel et non-diffusible le GRIPc (Huber et al., 1998). GRIPc est un polymère des dextrans, qui est complexé avec GdDTPA et TRITC. La chimie de conjugaison est maîtrisée par O. Stéphan de l'Equipe 1 (Morel et al., 2001).

3.2.3.3. Marqueurs bifonctionnels diffusibles

Les marqueurs diffusibles entrent directement en interaction avec les protons via l'interaction superhyperfine et conduisent à une modification du temps de relaxation T_1 . Une telle fonction est généralement assurée par un ion paramagnétique du groupe du fer ou un ion lanthanide. De tels ions libres sont tous toxiques. Ce n'est que « l'encapsulation » qui les rendra utilisables. Les complexes et chélates organométalliques constituent la solution généralement acceptée.

Nous essayerons deux approches. (1) *Les cyclodextrines modifiées (Equipe 3)*. Une cyclodextrine modifiée, la per-3,6-anhydro-2-O-carboxyméthyle-cyclodextrine complexée par du gadolinium (dépôt de brevet Fries et Gadelle, Equipe 3) a donné de bons résultats *in vitro* et sera testée comme agent de contraste IRM *in vivo*. Par ailleurs, une cyclodextrine fluorescente est connue : la heptakis-6-(5-méthylène-ureido-5'-méthyl-2,2'-bithiazolyl)-cyclomaltoheptaose est décrite par Wagner et coll. [2001 #27]. Les caractéristiques de la fluorescence de ce composé ne conviennent pas à une utilisation dans un tissu, λ_{em} étant trop court (400 nm). Néanmoins, ces acquis laissent penser que la synthèse d'une cyclodextrine bifonctionnelle est faisable.

(2) *Les complexes de coordination (Equipe 4)*. Dans une autre approche, nous essayerons de synthétiser un complexe de coordination manganèse- bipyridine-rhodamine soluble dans le plasma (Equipe 4). Des bras espaceurs seront utilisés (plus ou moins longue chaîne alkyle par exemple), (O. Stéphan, M. Armand, J.-C. Vial., Brevet N° 9911702 (15/09/99) extension Etats-Unis en 2002).

Faisabilité. Hüber et coll. (1998) ont synthétisé un marqueur bifonctionnel diffusible qui possède une forte fluorescence et une grande relaxivité *in vitro* (voir 3.1.6.2.). Pour les synthèses proposées, nos chimistes possèdent de solides expériences, J.C. Leprêtre (Equipe 4) pour les complexes de la famille des bipyridines (et phénantrolines), et O. Stéphan (Equipe 1) pour les conjugaisons (Morel et al., 2001). Néanmoins, les composés que nous synthétiserons sont originaux et probablement il va falloir en essayer quelques-uns avant d'en trouver un possédant les caractéristiques nécessaires.

3.2.4. Validation *in vitro*

La validation doit se tenir au plus près des conditions du vivant aussi les caractérisations physicochimiques RMN et optiques se feront sur des échantillons de plasma sanguin solubilisant le marqueur. Le contrôle de la parfaite solubilisation des marqueurs se fera par diffusion de la lumière (susceptible de visualiser les microprécipitations). Le photo blanchiment étant très dépendant de la convection sous flux laser nous essayerons de nous tenir au plus près des tailles des néovaisseaux en travaillant à l'intérieur de micropipettes (section interne de quelques microns). Le branchement des chromophores sur les complexes métalliques

pouvant induire d'importants glissements spectraux nous rechercherons systématiquement les maxima d'efficacité de pompage à 2 photons dans la zone 700-900 nm, de même pour les spectres d'émission dans le visible.

Les méthodes d'IRM pour la validation *in vitro* des marqueurs non diffusibles sont décrites en détail dans les articles de l'unité INSERM 438 relatifs à l'imagerie de la taille et du volume des vaisseaux (Tropres et al., 2001). Les tests *in vitro* pour les marqueurs non diffusibles sont simplement des mesures de la relaxivité sur les solutions du marqueur dans le sérum physiologique.

3.2.5. Validation *in vivo* et imagerie. Dans un premier temps, on observera les effets des marqueurs candidats sur la survie à court terme de la souris pendant le temps nécessaire pour une expérience; une étude approfondie de la toxicité suivra si le marqueur s'avère efficace pour l'imagerie. L'imagerie optique est décrite dans la section 3.2.2. L'IRM sera effectuée en suivant les protocoles existants de l'Equipe 2.

3.2. Analyses et intégration des données obtenus en imagerie optique en en IRM.

Les deux points de départ de l'application de données de l'imagerie optique à l'interprétation de l'IRM sont les travaux précédents de l'Equipe 2: l'intégration d'images IRM et histologiques (B. Van der Sanden; section 3.1.5) et le développement de modèles de la perfusion (Barbier et al., 2001; Barbier et al., 2002). Ce travail long ne sera abordé qu'à la fin des 12 premiers mois.

Références

- Barbier, E. L., Lamalle, L. and Decorps, M. (2001). Methodology of brain perfusion imaging. *J Magn Reson Imaging* 13, 496-520.
- Barbier, E. L., St Lawrence, K. S., Grillon, E., Koretsky, A. P. and Decorps, M. (2002). A model of blood-brain barrier permeability to water: accounting for blood inflow and longitudinal relaxation effects. *Magn Reson Med* 47, 1100-9.
- Bussink, J., Kaanders, J. H., Rijken, P. F., Raleigh, J. A. and Van der Kogel, A. J. (2000). Changes in blood perfusion and hypoxia after irradiation of a human squamous cell carcinoma xenograft tumor line. *Radiat Res* 153, 398-404.
- Charpak, S., Mertz, J., Beaurepaire, E., Moreaux, L. and Delaney, K. (2001). Odor-evoked calcium signals in dendrites of rat mitral cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1230-4.
- Coles, J. A. and Poulain, D. A. (1991). Extracellular K⁺ in the supraoptic nucleus of the rat during reflex bursting activity by oxytocin neurones. *J Physiol* 439, 383-409.
- Dirnagl, U., Villringer, A. and Einhaupl, K. M. (1992). In-vivo confocal scanning laser microscopy of the cerebral microcirculation. *J Microsc* 165, 147-57.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.
- García-Martín, M. L., Hérigault, G., Rémy, C., Farion, R., Ballesteros, P., Coles, J. A., Cerdán, S. and Ziegler, A. (2001). Mapping extracellular pH in rat brain gliomas *in vivo* by ¹H magnetic resonance spectroscopic imaging: comparison with maps of metabolites. *Cancer Research* 61, 6524-6531.
- Hickam, J. B. and Frayser, R. (1965). Aphotographic method for measuring the mean retinal circulation time using fluorescein. *Invest Ophthalmol* 4, 876-84.
- Huber, M. M., Staubli, A. B., Kustedjo, K., Gray, M. H., Shih, J., Fraser, S. E., Jacobs, R. E. and Meade, T. J. (1998). Fluorescently detectable magnetic resonance imaging agents. *Bioconjug Chem* 9, 242-9.
- Kakinuma, Y., Hama, H., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Murakami, K. and Fukamizu, A. (1998). Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice. *Nat Med* 4, 1078-80.
- Kuo, C. J., Farnebo, F., Yu, E. Y., Christofferson, R., Swearingen, R. A., Carter, R., von Recum, H. A., Yuan, J., Kamihara, J., Flynn, E. et al. (2001). Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4605-10.

- Larsson, H. B., Stubgaard, M., Frederiksen, J. L., Jensen, M., Henriksen, O. and Paulson, O. B. (1990). Quantitation of blood-brain barrier defect by magnetic resonance imaging and gadolinium-DTPA in patients with multiple sclerosis and brain tumors. *Magn Reson Med* 16, 117-31.
- Lehnert, S. (2000). Prediction of tumor response to therapy: molecular markers and the microenvironment. Apoptosis and chips: an overview of the proceedings. *Radiat Res* 154, 121-4.
- Morel, Y., Stéphan, O., Andraud, C. and P.L., B. (2001). Enhanced two-photon absorption with dimers of pi-conjugated molecules. *Synthetic Metals* 124, 237-239.
- Moulder, J. E. and Rockwell, S. (1984). Hypoxic fractions of solid tumors: experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10, 695-712.
- Rosen, B. R., Belliveau, J. W., Aronen, H. J., Kennedy, D., Buchbinder, B. R., Fischman, A., Gruber, M., Glas, J., Weisskoff, R. M., Cohen, M. S. et al. (1991). Susceptibility contrast imaging of cerebral blood volume: human experience. *Magn Reson Med* 22, 293-9; discussion 300-3.
- Scappaticci, F. A. (2002). Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *J Clin Oncol* 20, 3906-27.
- Seylaz, J., Charbonne, R., Nanri, K., Von Euw, D., Borredon, J., Kacem, K., Meric, P. and Pinard, E. (1999). Dynamic in vivo measurement of erythrocyte velocity and flow in capillaries and of microvessel diameter in the rat brain by confocal laser microscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 863-70.
- Tofts, P. S. and Kermode, A. G. (1991). Measurement of the blood-brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging. 1. Fundamental concepts. *Magn Reson Med* 17, 357-67.
- Tropres, I., Grimault, S., Vaeth, A., Grillon, E., Julien, C., Payen, J. F., Lamalle, L. and Decorps, M. (2001). Vessel size imaging. *Magn Reson Med* 45, 397-408.
- van der Sanden, B. P., Rozijn, T. H., Rijken, P. F., Peters, H. P., Heerschap, A., van der Kogel, A. J. and Bovee, W. M. (2000). Noninvasive assessment of the functional neovasculature in 9L-glioma growing in rat brain by dynamic 1H magnetic resonance imaging of gadolinium uptake. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 861-70.
- Vaupel, P., Kallinowski, F. and Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49, 6449-65.
- Verhoye, M., van der Sanden, B. P., Rijken, P. F., Peters, H. P., Van der Kogel, A. J., Pee, G., Vanhoutte, G., Heerschap, A. and Van der Linden, A. (2002). Assessment of the neovascular permeability in glioma xenografts by dynamic T(1) MRI with Gadomer-17. *Magn Reson Med* 47, 305-13.
- Wesseling, P., Ruitter, D. J. and Burger, P. C. (1997). Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects. *J Neurooncol* 32, 253-65.
- Xiao, F., Wei, Y., Yang, L., Zhao, X., Tian, L., Ding, Z., Yuan, S., Lou, Y., Liu, F., Wen, Y. et al. (2002). A gene therapy for cancer based on the angiogenesis inhibitor, vasostatin. *Gene Ther* 9, 1207-13.