

# Microscopie Biphotonique Intravitale et Neurosciences

## Applications à l'Etude des Effets des Radiothérapies Synchrotron

Clément Ricard<sup>1</sup>, Raphaël Serduc<sup>1</sup>, Pascale Verant<sup>2</sup>, Jean-Claude Vial<sup>2</sup>,  
Christoph Segebarth<sup>1</sup> & Boudewijn van der Sanden<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>INSERM U594 « Neuroimagerie Fonctionnelle et Métabolique » – CHU de Grenoble – Pavillon B – BP 217 – 38043 Grenoble Cedex 9.

<sup>2</sup>Laboratoire de Spectrométrie Physique – CNRS UMR 5588 – Grenoble.

## La Microscopie Biphotonique Intravitale

La microscopie biphotonique permet grâce à l'utilisation d'un laser femtoseconde émettant dans l'infrarouge d'observer les tissus jusqu'à des profondeurs de 1000µm. Contrairement à un microscope confocal et grâce à l'absorption biphotonique, la fluorescence collectée va être limitée au point focal d'excitation.

En réalisant un balayage selon le plan x,y grâce à des miroirs de scan il est possible d'obtenir des coupes virtuelles à différents niveaux. Une reconstitution informatique permet par la suite de réaliser des z projections ainsi que des représentations tridimensionnelles.

Suite à l'injection de colorants fluorescents par voie intraveineuse il est ainsi possible d'observer l'arbre vasculaire dans le cortex de la souris in vivo. Cette application est alors appelée microscopie biphotonique intravitale.

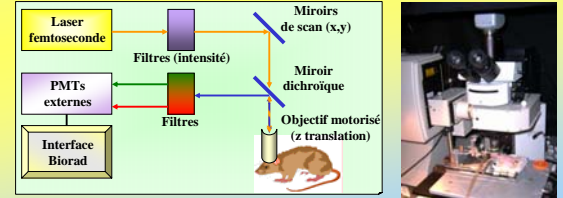


Fig 1 : Schéma de principe de la microscopie biphotonique intravitale.

## Radiothérapies Synchrotron et Tumeurs Intracrâniennes

Les tumeurs intracrâniennes représentent une pathologie fréquente en neurologie dont l'incidence suit celle des accidents vasculaires cérébraux et des démences. On estime que 10 nouveaux cas apparaissent chaque année pour 100 000 habitants. Leur traitement est essentiellement palliatif et passe lorsque le volume tumoral n'est pas localisé dans une zone fonctionnelle vitale par une exérèse chirurgicale complétée par une radiothérapie conventionnelle.

Le pronostic vital des tumeurs intracrâniennes demeure très pessimiste (médiane de survie à 10 mois pour les glioblastomes multifforme), cependant de nouveaux types de radiothérapies utilisant le rayonnement synchrotron ont donné des résultats significatifs en terme de survie chez l'animal.

### Photoactivation Therapy (PAT)

La photoactivation therapy consiste à l'injection au cœur du volume tumoral d'une molécule contenant un élément lourd (cis-Platine par exemple). L'injection est suivie par une irradiation 24h plus tard de ce même volume par rayonnement synchrotron dont l'énergie est légèrement supérieure au K-Edge de l'élément. Un électron de la couche K de l'élément va être arraché et va pouvoir induire des dégâts cellulaires irréversibles au niveau tumoral de façon directe (photoélectron) et indirecte (cascade d'électrons Auger). L'irradiation se fait en mode tomographique, centré sur le volume tumoral, afin de minimiser la dose déposée dans les tissus sains.

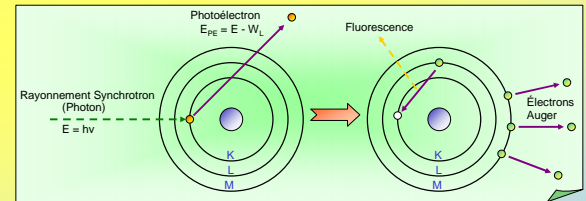


Fig 2 : Schéma de principe de la Photoactivation Therapy.

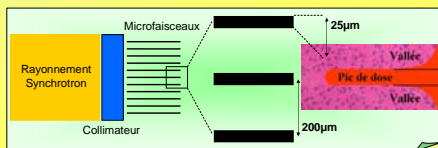


Fig 3 : Schéma de principe de la Radiothérapie par Microfaisceaux.

### Radiothérapie par Microfaisceaux (MRT)

La radiothérapie par microfaisceaux consiste en un fractionnement spatial de l'irradiation. Le rayonnement synchrotron, utilisé pour sa faible divergence, va traverser un collimateur multifentes pour donner des microfaisceaux de largeur et de distance pic à pic réglables. Les doses utilisées peuvent aller jusqu'à 1000Gy en zone pic sans laisser de lourds dommages dans les tissus sains. L'irradiation se fait sous plusieurs angles afin de croiser les microfaisceaux au cœur du volume tumoral.

## Travaux en Cours

### Imagerie de la Vascularisation Cérébrale

En réalisant une craniotomie de quelques millimètres de diamètre chez la souris et en utilisant un objectif à immersion approprié, il est possible d'observer l'arbre vasculaire dans le cortex cérébral de l'animal jusqu'à des profondeurs de 600µm. La vascularisation est détectable grâce à des colorants injectés en intra veineuse.

Actuellement cette méthode est utilisée pour observer les effets des irradiations sur la microvascularisation cérébrale de la souris saine (mesure du volume vasculaire grâce au FITC Dextran et de la perméabilité vasculaire grâce à la Sulforhodamine B). Cependant la technique est en train d'être développée pour les souris porteuses de tumeurs gliales.

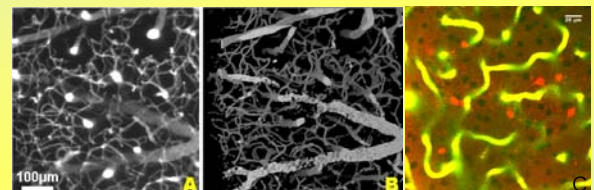


Fig 4 : Z-projection (A) et modélisation en 3D (B) d'un stack (51 images ; pas de 4µm ; de 50 à 250µm sous la dure mère) d'une souris saine obtenues suite à une injection intraveineuse de FITC-dextran. C : Passage d'un microfaisceau à 1000Gy (suite à une injection de Sulforhodamine B et FITC Dextran).

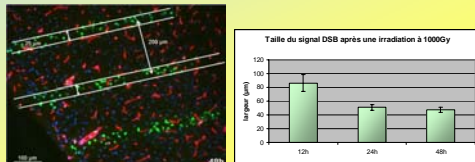


Fig 5 : A : Marquages des Cassures Double Brin (DSBs) et des capillaires à 48h post irradiation MRT 1000Gy (rouge : Collagène IV ; vert : Histone H2AX (DSBs) ; bleu : DAPI (noyaux cellulaires)). B : Evolution de la largeur du signal DSB après irradiation à 1000Gy (n=3 souris par temps).

### Etude des Effets des Radiothérapies Synchrotron

Outre les études menées en microscopie biphotonique intravitale, l'histologie et l'immunohistochimie sont couramment utilisées afin de mesurer certains paramètres vasculaires (marquages Collagène IV, PeCAM, Hoechst).

Les cassures double brin de l'ADN (DSBs) générées par les radiations ionisantes peuvent également être détectées grâce à un anticorps anti histone H2AX phosphorylée.

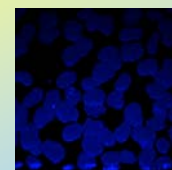


Fig 6 : Reconstitution tridimensionnelle de noyaux de cellules tumorales F98 marqués au Hoechst 33342. Observation en immersion dans le milieu de culture en microscopie confocale à 2 photons.

### Comportement des Colorants et Viabilité

Afin de tester le comportement de nombreux colorants qui pourraient être utilisés en microscopie biphotonique intravitale, un screening est en train d'être réalisé sur des cultures cellulaires.

En parallèle, un test permettant de déterminer la mortalité cellulaire in vivo chez l'animal est en train d'être développé sur des cultures cellulaires irradiées et non irradiées.

### Collaborations

- INSERM U647 « Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale » (Dr Nicolas Foray, Jérôme Gastaldo, Zuzana Bencokova).

### Contacts

Clément Ricard ([Clement.Ricard@ujf-grenoble.fr](mailto:Clement.Ricard@ujf-grenoble.fr)).

Boudewijn van der Sanden ([Boudewijn.vanderSanden@ujf-grenoble.fr](mailto:Boudewijn.vanderSanden@ujf-grenoble.fr)).

