

Université de Sherbrooke

**CARACTÉRISATION DU PROCESSUS DYNAMIQUE DE
L'OUVERTURE OSMOTIQUE DE LA BARRIÈRE HÉMATO-
ENCÉPHALIQUE À L'AIDE DE L'IMAGERIE PAR RÉSONANCE
MAGNÉTIQUE ET DE LA TOMOGRAPHIE D'ÉMISSION PAR
POSITRONS**

par

Marie Blanchette

Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.) en radiobiologie

Sherbrooke

Mai 2009

Évaluateurs :

Dr. David Fortin & Dr. Martin Lepage (Directeurs)

Dr. Benoit Paquette, médecine nucléaire et radiobiologie (Juge interne)

Dr. Christian Beaulieu, Biomedical Engineering, University of Alberta (Juge externe)



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-61402-0
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-61402-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

RÉSUMÉ

Caractérisation du processus dynamique de l'ouverture osmotique de la barrière hémato-encéphalique à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique et de la tomographie d'émission par positrons

par

Marie Blanchette

Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.) en sciences des radiations et imagerie biomédicale

Le pronostic pour les patients atteints d'astrocytomes malins est très sombre. Le glioblastome multiforme est la plus fréquente et la plus agressive de ces tumeurs. La survie des patients suite au diagnostic de leur maladie se situe entre 12 et 15 mois. Le traitement classique consiste en une résection chirurgicale de la tumeur, suivi de traitements de radiothérapie et/ou chimiothérapie. L'efficacité des traitements de chimiothérapie est principalement limitée par la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette dernière limite le passage d'agents de la circulation sanguine au système nerveux central (SNC).

La BHE exclut du SNC, 100% des grosses molécules thérapeutiques et plus de 98% des petites ne peuvent atteindre le parenchyme cérébral suite à une administration systémique. Plusieurs stratégies ont été développées afin de contourner la BHE, dont

l'ouverture osmotique de la barrière hémato-encéphalique (OBHE). Cette technique consiste à infuser à haut débit une solution hyperosmolaire dans un réseau artériel cérébral donné. Il est intéressant de constater que même si cette approche est utilisée en clinique, peu de données sont disponibles sur le processus de l'OBHE ainsi que sur son mécanisme de base. De plus, la technique d'OBHE possède un haut taux de variabilité inter-individus. Sa caractérisation nous permettrait donc d'acquérir de plus amples connaissances sur son processus. En comprenant mieux les différentes déterminantes menant à la perméabilisation de la BHE dans le temps et dans l'espace, nous serons plus à même d'en améliorer l'application. Ultiment, ces données permettront d'optimiser l'efficacité des traitements de chimiothérapie combinés à la procédure d'OBHE pour les patients atteints de gliomes malins.

Différentes techniques ont été développées afin de caractériser le processus d'OBHE, mais elles sont toutes basées sur l'analyse du cerveau de l'animal *ex vivo*. Par conséquent, le processus dynamique de l'OBHE ne peut être étudié sans utiliser un grand nombre d'animaux. De plus, il est impossible de faire le suivi d'un même animal puisqu'il doit être euthanasié, limitant donc la portée d'une étude longitudinale. Il apparaît clairement que l'objectif de notre groupe consistant à caractériser le processus dynamique de l'OBHE ne pourra pas être atteint en utilisant les techniques conventionnelles.

Cette étude a été conçue et divisée en 3 volets :

- 1) Le premier volet consiste à développer une technique afin de visualiser et caractériser le processus dynamique de l'OBHE à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de la tomographie d'émission par positrons (TEP).
- 2) Le deuxième volet de l'étude porte sur la caractérisation des distributions spatiale et temporelle du processus d'OBHE, la durée de sa fenêtre thérapeutique, l'augmentation de concentration et le temps d'élimination pour des molécules de différentes tailles et poids moléculaire au sein du SNC. Tous ces paramètres seront étudiés à l'aide de l'IRM.
- 3) La dernière partie de l'étude porte sur l'évaluation par TEP de l'effet de la procédure d'OBHE sur le métabolisme cérébral.

La méthodologie que nous avons développée nous permet d'obtenir beaucoup plus d'informations sur le processus dynamique de l'OBHE que les autres techniques couramment utilisées. En étudiant un modèle animal sain, nous avons pu déterminer que la BHE se referme 10 min post-OBHE pour des grosses molécules telles que le Gadomer. Elle est toujours perméable 30 min post-OBHE pour des petites molécules qui, suite à leur accumulation au SNC due à l'OBHE, peuvent diffuser dans le parenchyme cérébral et atteindre l'hémisphère controlatéral. La perméabilité maximale de la BHE est observée 3 min post-OBHE.

Mots clés : Astrocytomes malins, barrière hémato-encéphalique, ouverture de la
barrière hémato-encéphalique, imagerie par résonance magnétique,
tomographie d'émission par positrons

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	II
LISTE DES FIGURES	V
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
RÉSUMÉ	XII
I. INTRODUCTION	1
1.1 Les gliomes malins.....	1
1.2 Traitements standards.....	4
1.3 Barrière hémato-encéphalique.....	7
1.3.1 Physiologie.....	7
1.3.2 Jonctions serrées.....	10
1.3.3 Transporteurs.....	12
1.3.4 Rôle dans le traitement du cancer.....	15
1.4 Stratégies permettant de contourner la barrière hémato-encéphalique.....	16
1.5 Ouverture osmotique de la barrière hémato-encéphalique.....	20
1.5.1 Description	20
1.5.2 Modèles permettant l'étude de l'OBHE.....	25
1.5.3 Méthodes développées afin d'étudier l'efficacité de l'OBHE.....	26
1.6 Imagerie par résonance magnétique.....	31
1.6.1 Principes de base	31

1.6.2 Temps de relaxation.....	32
1.6.3 Pondération en T1.....	33
1.6.4 Agents de contraste.....	35
1.6.5 Concentration tissulaire de l'agent de contraste.....	37
1.7 Tomographie d'émission par positrons	40
1.8 Hypothèse et objectifs de l'étude	41
II. ÉTUDE DU PROCESSUS DYNAMIQUE DE L'OUVERTURE	
OSMOTIQUE DE LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE	
POUR UN COMPOSÉ DE FAIBLE POIDS MOLÉCULAIRE.....	
2.1 Avant-propos de l'article	43
2.2 Résumé en français de l'article	43
2.3 Précisions sur l'article	44
2.4 Article.....	46
III. ÉTUDE DU PROCESSUS DYNAMIQUE DE L'OUVERTURE	
OSMOTIQUE DE LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE	
POUR UN COMPOSÉ DE HAUT POIDS MOLÉCULAIRE.....	
3.1 Méthodes	71
3.2 Résultats	73
IV. ÉTUDE DE L'EFFET DE L'OUVERTURE OSMOTIQUE DE	
LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE SUR LE	
MÉTABOLISME CÉRÉBRAL	
4.1 Méthodes	78

4.2 Résultats	80
V. DISCUSSION GÉNÉRALE	84
VI. CONCLUSION	94
VII. REMERCIEMENTS	97
VIII. RÉFÉRENCES	98

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. Illustration schématique de la BHE	10
FIGURE 2. Schéma représentant les protéines composant les jonctions serrées entre les cellules endothéliales constituant la BHE	12
FIGURE 3. Les trois types de transports présents au niveau de la BHE	14
FIGURE 4. Processus d'OBHE	22
FIGURE 5. Cerveaux prélevés chez des rats ayant subi une OBHE à différents débits d'infusion du mannitol	29
FIGURE 6. Images pondérées- T_1 provenant d'une séquence de pulse avec différents angles de bascule de la magnétisation longitudinale et carte T_1	38
FIGURE 7. Lissage des données d'un pixel des images à la Fig. 6 (A-E)	39
FIGURE A1. Schematic of the imaging protocol used for the experiments in group 1 to study the window in barrier modification after BBBB	52
FIGURE A2. Representative axial MR brain images of a rat lying prone in a 7 T MRI scanner	54
FIGURE A3. Analysis of the signal intensities in a slice of the treated hemisphere 15 min after Gd-DTPA injection	55
FIGURE A4. Comparison of the concentration of Gd-DTPA in the treated (right) and the untreated (left) hemisphere as	

a function of time	57
FIGURE A5. Exposure (in mM × min) to Gd-DTPA for the first 17 min calculated from a series of T ₁ -weighted axial images	58
FIGURE A6. Enhancement pattern for different ROIs indicated in Fig. 5	59
FIGURE 8. Schéma illustrant le protocole d'expérimentation IRM lors des expériences effectuées avec le Gadomer	72
FIGURE 9. Images axiales IRM pondérées-T ₁ d'un animal ayant reçu une administration de Gadomer 3 minutes post-OBHE	74
FIGURE 10. Accumulation du Gadomer dans les hémisphères cérébraux en fonction du temps suite à la procédure d'OBHE	75
FIGURE 11. Fenêtre thérapeutique du l'OBHE pour le Gadomer	76
FIGURE 12. Temps d'élimination du Gadomer	77
FIGURE 13. Schéma illustrant le protocole d'expérimentation pour l'évaluation de l'effet de la procédure d'OBHE sur le métabolisme cérébral	79
FIGURE 14. Images TEP d'un animal contrôle (A) et d'un animal ayant subit une OBHE (B)	81
FIGURE 15. Courbes d'accumulation du ¹⁸ FDG dans les hémisphères des animaux contrôles (lignes pointillées) et traités (lignes continues) corrigées pour la décroissance du Fluor-18	82

*** Les figures nommées «FIGURE A#» sont les figures présentées dans l'article.

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. Classification des tumeurs gliales selon leur grade histologique déterminé par l'Organisation Mondiale de la Santé	2
TABLEAU 2. Échelle permettant l'évaluation qualitative de l'OBHE.....	28
TABLEAU 3. Pentés calculées pour chaque hémisphère pour les trois phases de l'acquisition	83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

µm	Micromètre
¹⁸ FDG	¹⁸ F-désoxyglucose
ABCB1	Adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) transporter, subfamily B, member 1 (P-gp)
ABCC	ABC transporter, subfamily C
ABCG2	ABC transporter, subfamily G member 2
ADN	Acide désoxyribonucléique
AET	Active efflux transport
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CAT1	Cationic amino acid transporter, member 1
CHTX	Choline transporter
CMT	Carrier-mediated transport
CNT2	Concentrative nucleoside transporter, member 2
Da	Dalton
EAAT	Glutamic acid amino acid transporter
Fig.	Figure
FCGRT	Fc fragment of IgG receptor transporter
GBM	Glioblastome multiforme
GLUT1	Glucose transporter, member 1

H	Hydrogène
h	Heure
i.c.	Intracérébrale
i.c.v.	Intracérébroventriculaire
IGFR	Insulin-like growth factor receptor
INSR	Insulin receptor
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JAM	Junctional adhesion molecules
kDa	Kilodalton
keV	Kiloélectronvolt
kg	Kilogramme
km	Kilomètre
LAT1	Large neutral amino acid transporter, member 1
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LEPR	Leptin receptor
m ²	Mètre carré
MBq	Méga Becquerel
MCT1	Monocarboxylic acid transporter, member 1
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre

MRP	Multidrug Resistance Protein
NBTX	Nucleobase transporter
NO	Nitric oxide
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion-transporting polypeptide
OBHE	Ouverture de la barrière hémato-encéphalique
PFA	Paraformaldéhyde
P-gp	Glycoprotéine P
ROI	Region of interest
RMT	Receptor-mediated transport
SCARB1	Scavenger receptor, classB, member 1
s	Seconde
SNC	Système nerveux central
TAUT	Taurine transporter
TEP	Tomographie d'émission par positrons
TFR	Transferrin receptor
TJ	Tight junction
TR	Temps de répétition
ZO	Zona occludens

I. INTRODUCTION

1.1 Les astrocytomes malins

Selon Statistiques Canada, le nombre estimé de nouveaux cas de cancer cérébral primaire pour 2008 serait de 2600 cas. De ce nombre, 1450 hommes et 1100 femmes seraient frappés de cette terrible maladie, sur un total de 166 400 cas pour tout cancers confondus (SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER ET INSTITUT NATIONAL DU CANCER DU CANADA, 2008). Les tumeurs cérébrales peuvent être divisées en deux catégories, soit les tumeurs primaires et secondaires. Les tumeurs cérébrales primaires sont définies comme étant les cancers prenant naissance à partir de cellules constituant le parenchyme cérébral même, alors que les tumeurs cérébrales secondaires correspondent aux néoplasies systémiques ayant migré au SNC. Ces lésions sont communément appelées métastases. Les tumeurs primaires les plus fréquentes sont les gliomes représentant 52% des nouveaux cas. Les tumeurs gliales peuvent être divisées en quatre types histologiques, soit les astrocytomes, oligodendrogliomes, oligo-astrocytomes et épendymomes, et sont grossièrement classées par sous-types et grade histologique (DEANGELIS, 2001, KLEIHUES et al., 2002) (Tableau 1). En clinique, cette classification permet de poser un pronostic et de planifier le traitement à administrer au patient.

Grade	Astrocytomes	Oligodendrogliomes	Oligo-astrocytomes	Épendymomes
I	Astrocytome pilocytique,	-	-	Épendymome
II	Astrocytome fibrillaire de bas grade	Oligodendrogliome	Oligo-astrocytome	
III	Astrocytome anaplasique	Oligodendrogliome anaplasique	Oligo-astrocytome anaplasique	Épendymome anaplasique
IV	Glioblastome multiforme	-	-	-

Tableau. 1 Classification des tumeurs gliales selon leur grade histologique déterminé par l'Organisation Mondiale de la Santé.

L'astrocytome de grade 1, curable par chirurgie, est une tumeur retrouvée le plus souvent chez l'enfant. Les astrocytomes de grade 2 et 3, aussi affublés du vocable fibrillaire, ou infiltratif, risquent fortement de devenir des astrocytomes de grade 4 secondaire dans un continuum évolutif. Le glioblastome multiforme (GBM) peut être primaire, dans ce cas il ne provient pas de l'évolution d'un astrocytome de grade 2 et/ ou de grade 3 vers un grade plus malin, mais, de mécanismes moléculaires différents menant à son émergence immédiate (WECHSLER-REYASCOTT et SCOTT, 2001). Le GBM est le gliome le plus fréquent et le plus agressif. Bien que l'incidence de ces tumeurs soit faible dans la population générale, le pronostic des patients qui en sont

atteints est très sombre. Pour les patients ne recevant pas de traitement, le pronostic est de 1 à 3 mois, et il est de 12 mois pour ceux ne recevant que de la radiothérapie; l'ajout de chimiothérapie, le nouveau traitement standard de première ligne (radiothérapie fractionnée avec administration de témozolomide) offre un léger avantage avec une survie médiane de 15 mois (STUPP et al., 2005). Différentes raisons expliquent l'inefficacité des traitements contre ce phénotype agressif de la cellule gliale tumorale. Parmi celles-ci, nous en retiendrons essentiellement 3: la chimiorésistance intrinsèque/acquise, le caractère hautement infiltratif de ces cellules ainsi que la présence de la BHE.

La chimiorésistance des cellules tumorales envers les divers agents antinéoplasiques s'effectue par différents mécanismes. L'augmentation de l'expression des enzymes effectuant la réparation de l'ADN, la mutation des topoisomérase I et II afin de diminuer l'affinité des agents de chimiothérapie envers ces mêmes enzymes, ainsi que l'expression de pompe à efflux expulsant à l'extérieur de la cellule les agents antinéoplasiques, ne sont quelques exemples des mécanismes de chimiorésistance développés ou natifs des cellules cancéreuses (BREDEL, 2001).

Les astrocytomes malins possèdent un caractère hautement infiltratif. En effet, les cellules tumorales migrent à travers le parenchyme sain à partir du nodule principal de la tumeur en envahissant la matière blanche. Elles peuvent donc se disperser dans l'hémisphère où la tumeur a pris naissance ou envahir l'hémisphère controlatéral en

suivant les fibres de la matière blanche composant le corps calleux (CLAES et al., 2007).

La BHE limite l'acheminement adéquat des molécules thérapeutiques au sein du SNC. La néovascularisation autour du nodule principal est hétérogène et ne permet donc pas d'y acheminer en concentration suffisante des agents thérapeutiques. De plus, les cellules ayant envahi la matière blanche se retrouvent à distance du nodule principal où la BHE possède toute son intégrité et son imperméabilité (MULDOON et al., 2007).

De nouvelles hypothèses émergent présentement dans la littérature concernant l'origine des astrocytomes malins et qui expliquerait, du moins en partie, leur agressivité. Plusieurs groupes tentent de démontrer que ces tumeurs seraient issues de cellules souches neuronales cancéreuses et que ces dernières constitueraient la population cellulaire radio-/chimio-résistantes et infiltratives de ces tumeurs (WANG et al., 2008). À ce même titre, ce sont ces cellules qui produiraient la récurrence après un traitement de première ligne.

1.2 Traitements standards

Le traitement est initié par la résection de la majeure partie de la tumeur, lorsque la localisation de la tumeur s'y prête. Dû au caractère hautement infiltratif de la tumeur,

la résection totale est impossible. De fait, ceci a été démontré de manière convaincante par un des pères fondateurs de la neurochirurgie moderne, Walter Dandy, en 1928. Ce dernier a en effet pratiqué une série d'hémisphérectomies chez 12 patients consécutifs atteints d'un GBM dans l'hémisphère non-dominant (droit), pour constater que toutes les tumeurs récidivaient dans l'hémisphère controlatéral des patients (DANDY, 1928). Ces tumeurs hautement envahissantes infiltrent le parenchyme cérébral de telle sorte que la différenciation entre les tissus sains et néoplasiques devient brouillée, voire impossible. Ces lésions ne comportent donc pour ainsi dire pas de plan de clivage orientant le chirurgien vers une résection oncologiquement complète (HÖSLI et al., 1998). Bien qu'une étendue de résection maximisée améliore la qualité de vie des patients, ainsi que leur survie, la procédure chirurgicale doit invariablement être suivie de traitements de radiothérapie et/ou chimiothérapie adjuvants afin d'atteindre le plus de cellules infiltratives possible n'ayant pu être retirées par chirurgie (ALBERT et al., 1994, LACROIX et al., 2001).

Un survol de la littérature sur le sujet nous permet de constater que dans les dernières décennies, il y a eu peu d'amélioration dans le traitement des gliomes malins. La radiothérapie est présentement le traitement standard de ces tumeurs. La plupart des travaux portant sur l'efficacité des traitements de radiothérapie locaux démontrent que cette modalité a un impact modeste sur la survie des patients. Cela s'explique par la résistance de ces tumeurs à cette modalité de traitement ainsi que la faible tolérance du tissu cérébral sain aux radiations (CROSSEN et al., 1994). Cet index thérapeutique

limité constitue un frein important à toute amélioration dans le traitement des gliomes malins qui serait basé sur cette modalité de traitement. De récentes études démontrent que la radiothérapie avec fractionnement de dose en concomitance avec l'administration de témozolomide augmenterait de façon significative la survie des patients (STUPP et al., 2005). De fait, cette combinaison de radio et chimiothérapie constitue maintenant le traitement de première ligne pour les astrocytomes de grade IV (GBM).

La chimiothérapie dans le traitement des astrocytomes malins démontre un historique assez chaotique, avec à l'avant-plan une difficulté à démontrer de manière convaincante une augmentation de la survie des patients à l'ajout de tous régimes de chimiothérapies (à l'exception de l'étude citée ci-haut, et combinant chimiothérapie et radiothérapie). Il y a lieu de se questionner sur cette incapacité de produire des résultats cliniques alors que certains agents de chimiothérapies se montrent efficaces *in vitro* contre différentes lignées cellulaires de gliomes. Paul Ehrlich, bactériologiste de formation qui a gagné le prix Nobel de médecine ou physiologie en 1908, a stipulé que pour produire son effet, une molécule devait atteindre sa cible. L'inefficacité de la chimiothérapie dans le traitement des gliomes malins est en grande partie attribuable à son incapacité à atteindre sa cible (les cellules gliales tumorales infiltrantes) principalement en raison de la BHE.

1.3 Barrière hémato-encéphalique

1.3.1 Description

Dr. Paul Ehrlich réalisa, en 1885, une expérience maintenant célèbre : il procéda à l'administration d'agents colorants chez le rongeur et fit l'observation que tous les organes se coloraient à l'exception du cerveau et de la moelle épinière. Ses travaux sont les premiers portants sur la mise en évidence de l'existence de la barrière hémato-encéphalique. En 1913, Edwin Goldmann, un de ses étudiants, administra le même colorant directement dans le liquide céphalo-rachidien de l'animal et fit le constat que seulement le cerveau et la moelle épinière se coloraient, alors que le reste de l'organisme demeurait exempt de toute trace de colorant. Il démontra ainsi la compartimentalisation du SNC du reste du corps (GRANT et al., 1998, KROLL et NEUWELT, 1998). Ce n'est qu'en 1921 que le concept et le nom de barrière hémato-encéphalique furent proposés par Lina Stern (VEIN, 2008). Depuis, la BHE est sous étude, et plusieurs équipes travaillent à en caractériser les propriétés.

La BHE a pour rôle principal de protéger le SNC. Elle limite l'accès aux virus, microorganismes, bactéries et composés pouvant être neurotoxiques. Elle régule également l'apport en nutriments et la pression artérielle cérébrale. Pour en comprendre l'étendue et l'importance, il suffit de résumer en ces termes : elle possède

une superficie de 12 m² par gramme de tissu, 644 km de vaisseaux et procure à chaque neurone son propre capillaire. La distance entre les microvaisseaux est de 40 à 50 µm (BICKEL et al., 2001). Les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux, les péricytes, les podocytes astrocytaires ainsi que les neurones forment un complexe nommé unité neurovasculaire conférant à l'endothélium cérébral la perméabilité sélective de la BHE.

Plusieurs facteurs distinguent la cellule endothéliale cérébrale des cellules endothéliales périphériques. Comparativement aux autres vaisseaux de l'organisme, la couche cellulaire endothéliale cérébrale ne possède pas de fenestration (Fig. 1) (SAUNDERS et al., 1999A, SAUNDERS et al., 1999B SAUNDERS et al., 2000).

L'imperméabilité de la BHE lui est principalement conférée par la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales rendant la diffusion passive pratiquement nulle (BRIGHTMAN et REESE, 1969). Le transport transcellulaire et les vésicules pynocytiques fonctionnelles sont pratiquement inexistantes au niveau des cellules endothéliales (REESE et KARNOVSKY, 1967, STEWART, 2000).

La présence de plusieurs pompes à efflux situées à la surface luminale des cellules limitent grandement la pénétration d'agents xénobiotiques au sein du SNC (P-gp, MRP1, MRP2, MRP4, MRP5 et BCRP) (Fig. 1). Ces pompes possèdent un large

spectre de substrats et rejettent dans le sang les agents xénobiotiques tentant de pénétrer au niveau du SNC.

La résistance électrique des jonctions serrées des vaisseaux cérébraux est de 1000-2000 Ohm/cm² comparativement à 10 Ohm/cm² pour les capillaires en périphérie (HUBER et al., 2001, BERNACKI et al., 2008). Par conséquent, la surface luminale et abluminale des cellules endothéliales cérébrales sont toutes deux chargées négativement, ce qui diminue la diffusion transcellulaire d'ions et de molécules polaires.

Les podocytes astrocytaires recouvrent plus de 90% de la surface externe des microvaisseaux, et bien qu'il n'ait pas été démontré précisément de quelle façon ils participent au maintien de la BHE, leur présence est nécessaire pour la stabilisation du complexe (Fig. 1) (BICKEL et al., 2001, JANZERRAFF, 1987, ABBOTT, 2002). Une plus grande présence de mitochondries est aussi retrouvée au niveau des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux afin de subvenir à la demande énergétique élevée pour le maintien de l'intégrité de la BHE (Fig. 2) (COOMBER et STEWART, 1985).

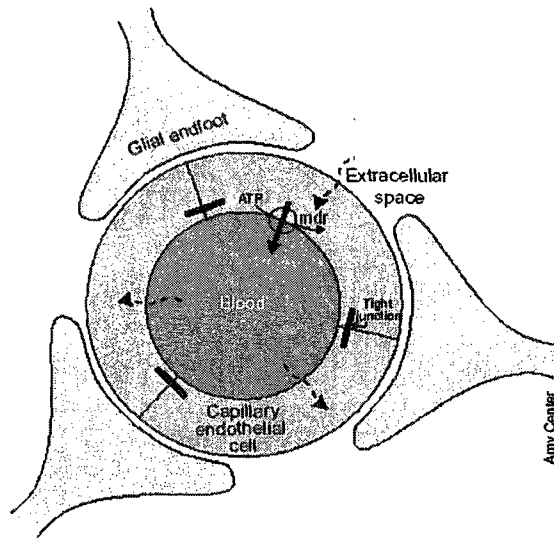


Figure 1. Illustration schématique de la BHE. L'absence de fenestration et la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales sont les caractéristiques principales lui conférant son imperméabilité. La présence importante de pompe à efflux xénobiotiques, telle que la P-gp, est également un important facteur limitant l'acheminement de molécules thérapeutiques au sein du SNC.

1.3.2 Jonctions serrées

La jonction serrée représente le principal élément responsable de l'imperméabilité de la BHE. Les jonctions serrées sont constituées de diverses protéines assurant l'intégrité de la BHE (Fig. 2). Les claudines et ocludines sont des protéines à 4 domaines transmembranaires et 2 boucles extracellulaires et sont les plus importantes

composantes membranaires. Les molécules constituant les jonctions adhérentes (JAMs) sont des membres de la superfamille des immunoglobulines. Les claudines, occludines et JAMs permettent le rapprochement des deux membranes plasmiques. La claudine formerait un dimère dans chaque membrane cytoplasmique et leur liaison homologue serait à la base de la formation des jonctions serrées. L'occludine serait une protéine régulatrice impliquée dans la résistance électrique au niveau de la jonction serrée. Le rôle des JAMs serait la modulation de la perméabilité de la BHE pour permettre la migration des leucocytes au SNC. Les protéines adaptatrices de premier ordre se retrouvent dans le cytoplasme. Parmi ces protéines nous retrouvons ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Ces dernières sont ensuite liées par les protéines adaptatrices de deuxième ordre, dont la cinguline. Les différentes protéines régulatrices et de signalisation contrôlent l'interaction entre le compartiment membranaire et le cytosquelette de la cellule via l'actine et la vinculine (HUBER et al., 2001, ABBOTT et al., 2006).

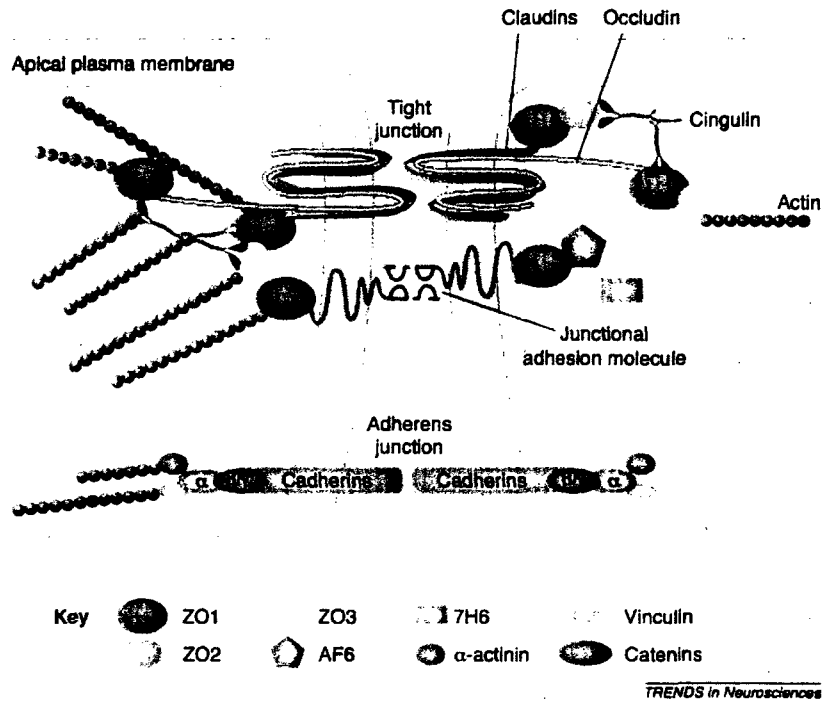


Figure 2. Schéma représentant les protéines composant les jonctions serrées entre les cellules endothéliales constituant la BHE. (adapté de HUBER et al., 2001)

1.3.3 Transporteurs

La présence de transporteurs spécifiques assure le transport de nutriments ou d'amines nécessaires à la synthèse des neurotransmetteurs. Les mécanismes de transport au niveau de la BHE peuvent être divisés en 3 catégories : le transport médié par un transporteur (CMT : « carrier-mediated transport »), par un transporteur actif (AET : « active efflux transport ») et par un récepteur (RMT: « receptor-mediated transport »)

(Fig. 3). Le CMT et l'AET servent au transport des petites molécules. Le CMT comprend plusieurs transporteurs dont le transporteur du glucose GLUT-1, de l'acide monocarboxylique MCT1, des acides aminés LAT1 et CAT1 et des purines CNT2. Les transporteurs CMT sont généralement des transporteurs de nutriments du compartiment sanguin vers le cerveau (BART et al., 2000, PARDRIDGE, 2005, PARDRIDGE, 2007A, PARDRIDGE, 2007B).



Figure 3. Les trois types de transports présents au niveau de la BHE. Sept exemples sont inscrits sous chaque catégorie de transporteurs (adapté de PARDRIDGE, 2007A, PARDRIDGE, 2007B).

Le transport par AET s'effectue surtout en direction du cerveau vers le sang. Ces transporteurs énergie-dépendant comprennent la famille des transporteurs ABC et sont plus souvent retrouvés du côté luminal des cellules endothéliales. Le transporteur

AET le plus étudié au niveau de la BHE est la glycoprotéine P, produit du gène ABCB1, qui est également exprimée dans la majorité des tumeurs, dont les gliomes, et augmente la résistance à la chimiothérapie en excluant du SNC les agents antinéoplasiques. Pour le moment, nous ne connaissons que quelques transporteurs des CMT et AET; plusieurs travaux sont à effectuer afin d'approfondir nos connaissances sur ces transporteurs.

Le transport RMT sert à faire passer au SNC différentes molécules de plus grande taille, telles que certaines protéines. Le transport est effectué par endocytose médiée par récepteurs. Le récepteur à l'insuline (INSR), le récepteur transferrine (TFR), le récepteur des facteurs de croissance à l'insuline (IFGR) et le récepteur de la leptine (LEPR) en sont quelques-uns impliqués dans le transport par RMT au niveau de la BHE (MISRA et al., 2003).

1.3.4 Rôle dans le traitement du cancer

Pardridge affirme que 100% des grosses et plus de 98% des petites molécules thérapeutiques sont exclues du SNC, donc confinées au système sanguin (PARDRIDGE, 2007A). La majorité des agents ayant la capacité de traverser la BHE sont impliqués dans le traitement de désordres affectifs. Par toutes les propriétés qui lui sont conférées, la BHE limite donc le passage du sang vers le SNC aux molécules polaires ayant un poids moléculaire supérieur à 180 Da (KROLL et NEUWELT,

1998). En tenant compte de leur lipophilicité, les composés ayant la capacité de former moins de 8 à 10 ponts H avec l'eau et ayant un poids moléculaire inférieur à 400 Da auraient la capacité de traverser la BHE. La plupart des agents de chimiothérapie possèdent un poids moléculaire de 200 à 1200 Da (KROLL et NEUWELT, 1998). Leurs propriétés physico-chimiques les empêchent donc de traverser la BHE et d'atteindre les cellules cancéreuses gliales infiltrant le parenchyme cérébral.

1.4 Stratégies permettant de contourner la barrière hémato-encéphalique

Afin d'augmenter l'efficacité des traitements de chimiothérapie, différentes façons de perméabiliser, contourner ou manipuler la BHE ont été développées. L'acheminement de molécules par voie trans-cranienne comprend 3 procédures : l'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.), l'injection intracérébrale (i.c.) au niveau de la cavité de résection tumorale, ainsi que la clyse. L'administration i.c.v. d'un agent thérapeutique n'augmente que très peu la concentration du composé au niveau du parenchyme puisque les courants de convection du LCR sont plus rapides que la diffusion de la molécule dans le parenchyme cérébral à partir de la surface épendymaire (PARDRIDGE, 2007A). En effet, la surface épendymaire représente une barrière relativement imperméable, bloquant la diffusion de l'agent vers le parenchyme. Par ailleurs, les courants naturels du liquide céphalo-rachidien circulent des espaces péri-vasculaires du parenchyme cérébral vers les ventricules, allant à

contre courant. Par conséquent, les molécules ne peuvent pénétrer dans le tissu cérébral et atteindre leur cible thérapeutique avec une concentration efficace (PARDRIDGE, 2005). L'administration dans la cavité chirurgicale d'agents antinéoplasique (i.c.) suite à la résection de la tumeur permet de cibler les cellules cancéreuses en bordure du lit chirurgical. Cependant, les agents ne diffusent pas de façon assez importante dans le parenchyme cérébral pour atteindre les cellules à distance. La pénétration des agents thérapeutiques ainsi instillés n'est donc que de quelques millimètres (KROLL et NEUWELT, 1998, DE BOER et GAILLARD, 2007). La clyse représente une technique récemment décrite et impliquant une infusion intracérébrale en générant un courant de convection en continu permettant la diffusion interstitielle des macro-molécules. Cette méthode est présentement sous étude clinique. Cependant, le volume de distribution produit par ce type d'approche semble insuffisant pour transposer cette application chez l'être humain (HUYNH et al., 2006).

Il faut en effet se rappeler que dû au caractère hautement infiltratif des gliomes, leur traitement optimal nécessite une méthode permettant d'acheminer l'agent antinéoplasique sur un grand volume de distribution.

Outre les voies intracrâniennes, l'administration par voie trans-nasale permet d'augmenter la concentration de molécules lipophiles dans le LCR (PARDRIDGE, 2007A). Cependant, de façon similaire à l'injection intracérébrovasculaire, les

courants de convection trop rapides du LCR mèneront les molécules vers le sinus sagittal pour élimination du SNC vers la circulation sanguine avant que ces dernières puissent diffuser en concentration suffisante dans le parenchyme cérébral (PARDRIDGE, 2005).

L'acheminement de molécules peut également se faire par l'utilisation de transporteurs situés au niveau de la BHE. Par l'utilisation du système de transport RMT décrit plus haut, plusieurs équipes tentent de développer des « chevaux de Troie » mettant à profit la présence de ces transporteurs. Un exemple concret de cette application est l'utilisation de liposomes présentant la transferrine à leur surface (CARDOSO et al., 2007). Les liposomes peuvent donc traverser la BHE à l'aide du transport médié par le récepteur de la transferrine et libérer leur contenu une fois leur site d'action atteint. Les systèmes de transport CMT peuvent également être utilisés pour acheminer des agents thérapeutiques au sein du SNC, tel que le L-DOPA qui traverse la BHE par l'entremise de LAT1 pour être ensuite converti en dopamine par une décarboxylase une fois le cerveau atteint (WOLBURG et al., 2009). Plusieurs molécules peuvent donc atteindre le SNC en utilisant différents systèmes de transport endogènes présents au niveau de la BHE. Ce secteur de la recherche dans le domaine de l'acheminement de composés au SNC est présentement foisonnant. En effet, ces stratégies sont plus physiologiques que les procédures discutées plus haut, et donc moins invasives. Cependant, beaucoup de travaux restent à effectuer afin de développer des vecteurs pouvant acheminer en quantité suffisante au SNC différents

agents thérapeutiques. Ces vecteurs doivent être préalablement testés chez les petits animaux avant de pouvoir être utilisés en clinique, et les transporteurs au niveau de la BHE chez l'animal et chez l'humain comportent certaines différences non négligeables pour un ciblage efficace de la BHE (PARDRIDGE, 2007A).

L'acheminement d'agents thérapeutiques au sein du SNC peut également être réalisé en perméabilisant de façon réversible la BHE. Différentes stratégies ont été développées afin de produire cette perméabilisation. Les ultrasons font partie des différentes stratégies pouvant être utilisées pour manipuler la BHE. L'administration de microbulles par voie intraveineuse suivie d'une période de sonication permet de perméabiliser localement la BHE sans induire de variation de température qui serait potentiellement dommageable pour le tissu cérébral (HYNENEN, 2008, JOLESZ et MCDANNOLD, 2008).

La BHE peut également être perméabilisée de façon réversible par l'utilisation d'agonistes pharmacologiques tel que les peptides synthétiques spécifiques pour les récepteurs de la bradykinine, ou des donneurs de NO. Il a été démontré en étude préclinique que le RMP-7, un analogue de la bradykinine, augmentait la perméabilité des microvaisseaux cérébraux péri-tumoraux sans affecter les microvaisseaux cérébraux normaux. Dans ces études, le RMP-7 permettait une augmentation de 30 à 80% de la concentration d'agents de chimiothérapie au sein d'une tumeur gliale (INAMURA et al., 1994, ELLIOTT et al., 1996). Une étude clinique phase II pour le

RMP-7 n'a démontré aucun bienfait lors de la combinaison RMP-7 i.v. avec administration de carboplatin (PRADOS et al., 2003).

L'ouverture osmotique de la BHE est une autre stratégie permettant d'acheminer des agents de chimiothérapie en perméabilisant de façon réversible la BHE. Cette technique permet d'augmenter jusqu'à 100 fois l'accumulation d'agents antinéoplasiques au sein du SNC et ce sur un grand volume de distribution, faisant d'elle une stratégie de choix dans le traitement des gliomes malins (KROLL et NEUWELT, 1998). L'intérêt envers cette technique repose essentiellement dans la globalité de cette stratégie permettant d'augmenter la perméabilité de la BHE de manière diffuse dans un territoire vasculaire donné.

1.5 Ouverture osmotique de la barrière hémato-encéphalique

1.5.1 Description

Au début des années 1970, le Dr Stanley I. Rapoport et son équipe publient leurs premiers travaux portant sur la perméabilisation réversible de la BHE à l'aide de différentes solutions hyperosmolaires telles le mannitol, l'arabinose, le lactamide, la solution saline, l'urée ainsi que différents agents de contraste radiographiques (RAPOPORT et al., 1971). Par la suite, Neuwelt et al. ont adapté la méthodologie de

ce concept chez l'être vivant et ont décrit le premier modèle animal (NEUWELT et al., 1979).

La technique d'OBHE consiste à administrer une solution hyperosmolaire (mannitol 25%) par voie artérielle dans un réseau vasculaire donné provoquant un effondrement structural des cellules endothéliales, et conséquemment, un bris des jonctions serrées (Fig. 4) (DOROVINI-ZIS et al., 1984). Chez le rongeur le mannitol est administré dans la carotide interne via la carotide externe, chez l'homme selon l'emplacement de la tumeur, le mannitol sera administré via la carotide interne ou l'artère vertébrale (BELLAVANCE et al., 2008). Le mécanisme par lequel se perméabiliserait la BHE est toujours hypothétique. Il a été suggéré que le mécanisme de base de l'OBHE s'accomplissait par une plasmolyse des cellules endothéliales et une dénaturation protéique suite au choc osmotique, ainsi qu'une augmentation de calcium intracellulaire et diminution extracellulaire causant une contraction du cytosquelette endothélial et le bris des jonctions serrées (BRIGHTMAN et al., 1973, RAPOPORT, 2000, BROWN et DAVIS, 2002, HUBER et al., 2001).

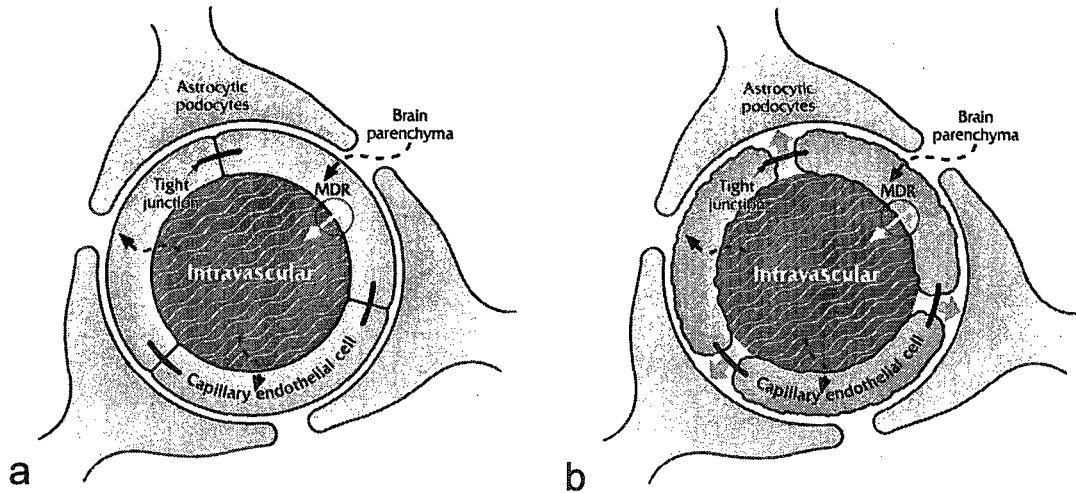


Figure 4. Processus d'OBHE. A) Microvaisseau cérébral normal, B) Effondrement structural et bris des jonctions serrées suite à l'administration d'une solution de mannitol 25 % à débit élevé durant 30 s (adapté de FORTIN, 2003).

Le processus de l'OBHE semble se produire selon une dynamique dichotomique « tout ou rien ». L'infusion du mannitol doit se faire à un débit très élevé (4 à 12 ml/s chez l'humain, 0.09 à 0.14 ml/s chez le rat) afin de s'assurer d'un remplissage du réseau artériel traité complet et d'éviter une dilution de la solution hyperosmolaire, ce qui ferait chuter l'osmolarité et rendrait la procédure inefficace (FORTIN, 2003). En effet, une osmolarité de 1.6 molal est nécessaire afin de produire l'effet recherché (FORTIN, 2003). Par ailleurs, il a été démontré que la solution hyperosmolaire doit

être infusée pendant 30 s afin d'atteindre un pallier hyperosmolaire et que la BHE se perméabilise (RAPOPORT et al., 1980, FORTIN, 2003). L'espace ainsi produit entre les cellules endothéliales serait évalué à 20 nm à 6 min post-OBHE (RAPOPORT et al., 1980, ROBINSON et RAPOPORT, 1987). De plus, la dynamique de l'OBHE serait différente selon la taille et poids des agents administrés (ROBINSON et RAPOPORT, 1987). Chez les animaux implantés l'OBHE serait plus importante au niveau du cortex, corps calleux, parenchyme autour de la tumeur (2.5 mm autour de la tumeur) et parenchyme sain de l'hémisphère traité (au-delà de 2.5 mm autour de la tumeur). La procédure d'OBHE ne modifie pas significativement la constante de transfert sang-cerveau au niveau du centre de la tumeur, de sa périphérie ou de la tumeur entière (WARNKE et al., 1987, GROOTHUIS et al., 1990). Il a été démontré chez l'homme, que cette technique permet d'accumuler une plus grande concentration d'agents thérapeutiques au niveau de la tumeur et du parenchyme environnant comparativement à une administration intraveineuse d'agents équivalents, tout en diminuant la toxicité systémique (DOOLITTLE et al., 2000). Plusieurs équipes ont tenté de caractériser la fenêtre thérapeutique de l'OBHE par différentes approches; cependant, il n'y a toujours pas de consensus sur ce paramètre. Différentes équipes estiment à 10 min (RAPOPORT et al., 1980, KESSLER et al., 1984) l'intervalle entre la procédure d'OBHE et le retour à l'intégrité fonctionnelle de la BHE. D'autres auteurs ont estimé que la moitié du temps nécessaire au retour à la perméabilisation normale de la BHE suivant une OBHE serait de 24.0 +/- 14.3 min, à la suite d'expériences chez le singe (ZÜNKELER et al., 1996). Les résultats d'un autre

groupe semblent indiquer que la BHE serait perméable pour les 40 premières minutes suite à la procédure d'OBHE et qu'elle retrouverait la perméabilité basale 6 à 8 h plus tard chez l'être humain (SIEGAL et al., 2000). Selon Robinson et Rapoport, la perméabilité de la BHE pour différentes molécules serait sélective dans le temps, mais également selon leur taille (ROBINSON et RAPOPORT, 1987). L'œdème vasogénique cérébral créé suite à la procédure d'OBHE correspondrait à une augmentation liquidienne de 1 à 1,5 % dans les espaces interstitiels cérébraux (RAPOPORT et al., 1980). Cependant, la procédure d'OBHE n'engendre pas de déficits neurologiques permanents. (RAPOPORT et THOMPSON, 1973, DOOLITTLE et al., 2000, MCALLISTER et al., 2000). Pappius et ses collaborateurs ont observés par autoradiographie suite à l'OBHE, une augmentation de la consommation locale de glucose au niveau de l'hémisphère ipsilatéral ainsi qu'une diminution au niveau de l'hémisphère controlatéral. Ces modifications du métabolisme cérébral n'ont cependant pas été rapportées par d'autres auteurs (PAPPIUS et al., 1979).

Depuis le début des années 1990, l'OBHE est en étude clinique pour le traitement de tumeurs cérébrales. En 2000, une étude clinique a démontré que bien que la technique d'OBHE soit invasive, elle était sécuritaire et efficace en contexte standardisé et multicentrique (DOOLITTLE et al., 2000). La procédure d'OBHE est également utilisée en clinique dans le traitement de métastases cérébrales (FORTIN et al., 2007). La survie des patients atteints de GBM est triplée lorsqu'ils sont traités suite à leur

diagnostic par administration de chimiothérapie précédée d'une procédure d'OBHE (FORTIN et al., 2005).

1.5.2 Modèles permettant l'étude de l'OBHE

Bien que plusieurs modèles *in vitro* aient été développés, l'étude de la BHE *in vivo* demeure incontournable, compte tenu de la nature physiologique de la procédure, et de l'influence inhérente de certains facteurs systémiques tels le rythme cardiaque et la pression artérielle. Par ailleurs, l'étude *in vitro* est compliquée par la difficulté de mettre sur pied un modèle adéquat de BHE. En effet, les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux nécessitent plusieurs facteurs environnants afin d'exprimer un phénotype de BHE similaire à celui retrouvé *in vivo*. La mise en culture des cellules endothéliales en co-culture avec des cellules astrocytaires, ou avec des compléments, est nécessaire pour rendre le modèle *in vitro* plus près de la réalité. Cependant, les différents modèles de BHE *in vitro* démontrent toujours une étanchéité moindre que celle retrouvée dans la situation *in vivo*. Des animaux de différentes espèces ont été utilisés afin d'étudier le processus d'OBHE dont le singe, le chien, le lapin et le rat (RAPOPORT et al., 1971, RAPOPORT et al, 1972, NEUWELT et al., 1979, NEUWELT et al., 1982). L'étude de l'OBHE chez l'animal sain permet de caractériser le processus au niveau des microvaisseaux cérébraux sans le facteur confondant de la néovascularisation et de l'augmentation de pression oncotique produits par la présence d'une lésion tumorale. Puisque nous nous intéressons à

l'OBHE pour des fins neuro-oncologiques, les études impliquant des animaux sains doivent également être complétées avec des études chez des animaux porteurs de tumeur. La plupart des études actuelles sont effectuées chez le rat. Le modèle Fisher-F98, développé et caractérisé par notre laboratoire apparaît un excellent modèle pour mener à terme ce type d'études. Ce modèle possède plusieurs caractéristiques retrouvées chez les gliomes humains. Le modèle Fisher-F98, est un des rares modèles syngéniques dans lequel les cellules cancéreuses possèdent le même patron d'infiltration que les gliomes humains (BLANCHARD et al., 2006, MATHIEU et al., 2007). D'autres modèles ont été développés chez le rat avec différentes lignées cellulaires de gliomes telles que la C6, 9L, T9, RG2, RT-2 et CNS-1. Les lignées les plus utilisées dans les études précliniques sont les C6 et 9L. Les modèles utilisant ces lignées cellulaires ne sont pas aussi reproductibles et/ou représentatifs que le Fischer-F98 comparativement à ce qui est observé en clinique. Dans les modèles utilisant la lignée C6, par exemple, nous n'observons pas le patron invasif des gliomes (BARTH, 1998). Des modèles de gliomes ont également été développés chez la souris; cependant, la taille de ce modèle animal rend la procédure chirurgicale de l'OBHE impraticable.

1.5.3 Méthodes développées afin d'étudier l'efficacité de l'OBHE

Plusieurs techniques ont été développées afin d'étudier l'OBHE, parmi lesquelles : la microdialyse, le dosage de substances in situ, l'évaluation qualitative d'une coloration

au Bleu d'Evans, l'autoradiographie et le marquage spécifique de l'albumine. Les trois dernières techniques citées sont les plus fréquemment utilisées.

L'évaluation qualitative d'une coloration au Bleu d'Evans consiste à administrer à l'animal par voie intraveineuse une solution 2 % de Bleu d'Evans/saline (2 mg/kg) 10 min avant la procédure d'OBHE (FORTIN, 2003). Le Bleu d'Evans se lie très fortement à l'albumine plasmatique, mais de façon réversible. Le complexe formé possède un poids moléculaire de 68,5 kDa et ne traverse pas la BHE normale. Vingt minutes après l'OBHE, l'animal est euthanasié par une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde (PFA). Le cerveau est ensuite prélevé et à l'aide d'une échelle qualitative de marquage de la surface corticale, le degré de l'OBHE peut être estimé (Tableau 2, Fig. 5).

Grade de l'OBHE	Description du grade
0	Aucune coloration
1	Légère coloration bleutée du parenchyme cérébral au niveau du territoire desservi par l'artère principale infusée au mannitol
2	Coloration bleue bien définie du parenchyme cérébral au niveau du territoire desservi par l'artère principale infusée au mannitol
3	Coloration bleue du parenchyme cérébral qui tend à s'étendre dans l'hémisphère controlatéral par une artère principale infusée au mannitol par le polygone de Willis
4	Coloration bleue extrême du parenchyme cérébral qui dépasse le territoire vasculaire de l'artère principale infusée au mannitol

Tableau 2. Échelle permettant l'évaluation qualitative de l'OBHE.

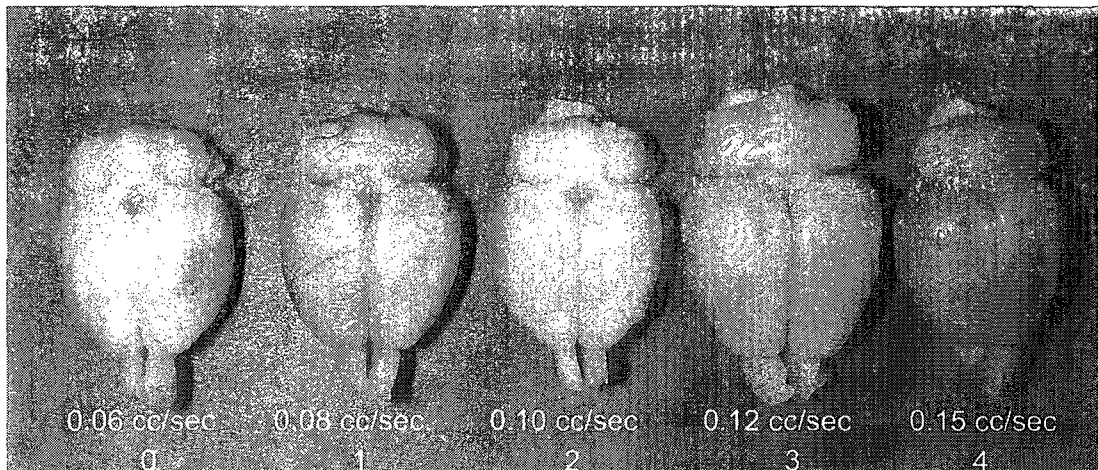


Figure 5. Cerveaux prélevés chez des rats ayant subi une OBHE à différents débits d'infusion du mannitol. Dix minutes précédant l'OBHE, une solution de Bleu d'Evans 2% a été administrée à l'animal par voie veineuse (2 ml/kg). Pour chaque cerveau prélevé, le débit d'infusion du mannitol et le grade de la coloration correspondant est indiqué sous le spécimen.

La technique d'autoradiographie consiste à administrer un radiotraceur à l'animal suite à l'OBHE et à l'euthanasier lorsque la cinétique plasmatique du radiotraceur est terminée. L'euthanasie est effectuée sous anesthésie par perfusion intracardiaque de l'animal avec une solution de PFA. Des coupes de l'encéphale sont faites et déposées sur un film radiographique. Cette méthode permet donc une évaluation *in situ* de la distribution et de l'accumulation du radiotraceur dans le parenchyme cérébral suite à l'OBHE.

La technique d'immunohistochimie contre l'albumine s'effectue en euthanasiant l'animal par perfusion intracardiaque au PFA au temps que l'on désire étudier suite à l'OBHE. Le cerveau de l'animal est ensuite prélevé et coupé en sections qui seront paraffinées. Une immunohistochimie contre l'albumine est effectuée sur les coupes histologiques. Les coupes sont numérisées pour une analyse informatique et le pourcentage de coloration de chaque hémisphère est calculé en prenant soin au préalable de définir un seuil de coloration. La méthode est semblable à la technique du bleu d'Evans. Cependant, cette technique nous permet de quantifier l'albumine dans le parenchyme cérébral.

Bien que ces techniques permettent l'étude du processus d'OBHE, elles sont très limitantes puisqu'elles ne s'effectuent qu'en contexte ex vivo, limitant donc la possibilité d'une étude transversale. Pour étudier la dynamique de l'OBHE en utilisant l'une de ces approches, nous devons donc effectuer la même expérience à différents temps chez différents animaux et euthanasier tous les animaux. Par conséquent, il est impossible de faire le suivi d'un même animal.

Plusieurs techniques d'imagerie peuvent être utilisées afin d'étudier le processus d'OBHE. En clinique, une étude de tomographie par émission de positons avec administration d'agents radiographiques est effectué afin de déterminer le grade de l'OBHE. La TEP peut également être utilisé malgré qu'il offre une moins bonne résolution. L'IRM, la

méthode d'imagerie ayant la meilleure résolution pour le cerveau et les autres tissus mous serait une méthode de choix et il a été démontré dans une étude statique chez le rongeur que le Gd-DTPA n'était pas neurotoxique lorsqu'administré suite à une procédure d'OBHE (ROMAN-GOLDSTEIN et al., 1994).

Ces différentes techniques d'imagerie pourraient donc être utiles pour l'étude dynamique de la perméabilisation de la BHE. Cependant, ces techniques n'ont jamais été utilisées pour caractériser la dynamique du processus d'OBHE et cette technique nécessite une procédure chirurgicale relativement complexe, rendant l'utilisation de ces modalités d'imagerie à cette fin difficile, mais possiblement applicable.

1.6 Imagerie par résonance magnétique

1.6.1 Principes de base

Le concept de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est basé sur la détection de la manipulation de la magnétisation des protons des atomes d'hydrogène dans un champ magnétique intense. L'organisme étant principalement composé d'eau, l'IRM est une très bonne technique pour faire de l'imagerie anatomique de haute résolution pour les tissus mous. L'IRM est la méthode d'imagerie de prédilection pour l'étude du cerveau. Elle permet d'avoir un bon contraste entre la matière blanche, grise et le LCR. Cette technique n'est pas invasive et n'implique pas de radiations ionisantes

comparativement à la tomographie par densité. L'organisme placé à l'intérieur du scanner est donc soumis à un champ magnétique intense. Les moments magnétiques des protons d'hydrogène s'alignent de façon parallèle et antiparallèle au champ magnétique. Une très faible majorité de ceux-ci seront alignés dans le sens parallèle. Ces protons seront assez nombreux pour être à l'origine d'une magnétisation macroscopique. La manipulation de la magnétisation des protons à l'aide d'un champ de radiofréquence permettra de basculer la magnétisation dans le plan transverse afin de la détecter. En fin de compte, une image de l'organisme étudié est obtenue où l'intensité du signal est rapportée en niveau de gris. Les différents agents de contraste pouvant être utilisés ont pour effet d'augmenter ou diminuer l'intensité de signal à l'endroit où ils se localisent dans l'organisme. (KASTLER, 2006)

1.6.2. Temps de relaxation

Une fois manipulée par un champ de radiofréquence, la magnétisation reviendra à son état d'équilibre via deux processus de relaxation : la relaxation spin-réseau, caractérisée par la constante de temps de relaxation T_1 , et la relaxation spin-spin, caractérisée par la constante de temps de relaxation T_2 . Chaque tissu possède une constante de temps T_1 et T_2 spécifique.

Les protons en excès dans le sens parallèle (faible en énergie) au champ magnétique basculeront dans le sens anti-parallèle (haut en énergie) au champ magnétique lors de

l'application de l'impulsion RF. Il y aura diminution de la magnétisation longitudinale et augmentation de la magnétisation transversale. Les protons redistribueront leur énergie au réseau afin de retourner dans un état de faible énergie donc, dans le sens parallèle au champ magnétique. La relaxation longitudinale s'effectue donc par un transfert d'énergie spin-réseau. Le temps pour que la magnétisation longitudinale revienne à 63% de sa valeur initiale, correspond au temps de relaxation T1. Puisque la magnétisation longitudinale repousse progressivement selon une courbe exponentielle, 2T1 correspond à 87%, 3T1 à 95% et 4T1 à 98% de la repousse de la magnétisation longitudinale.

Les spins seront en phase dans le plan XY immédiatement suite à l'impulsion RF. Par la suite, les spins se déphaseront et il y aura décroissance de la magnétisation transversale. La constante de temps T2 correspond au temps requis pour que la magnétisation transversale décroisse de 63%. La relaxation transversale est également appelée relaxation spin-spin puisqu'elle s'effectue par la répulsion des spins entre eux.

1.6.3 Pondération en T1

Selon le tissu et l'information recherchée, la pondération du signal IRM en T1, T2 ou en densité de protons permet d'obtenir des images ayant différents contrastes. Le contraste des images provient en majorité des différents temps de relaxation du tissu

étudié. Selon les paramètres d'acquisition, nous pouvons favoriser un type de signal, ce qui correspond à la pondération du signal.

Deux paramètres sont responsables de la pondération T1, le temps de répétition (TR) ainsi que l'angle de bascule de la magnétisation longitudinale. Le TR correspond au temps de répétition, donc le temps entre 2 pulses RF. Lorsque le TR est court la magnétisation longitudinale n'a pas le temps de repousser complètement donc la magnétisation longitudinale «disponible» lors de la 2^{ème} impulsion RF et des suivantes sera alors plus petite. Une séquence IRM peut également être pondérée T1 selon l'angle de bascule de la magnétisation longitudinale. Plus l'angle de bascule est près de 90° plus la composante mesurée dans le plan transverse sera grande, à 90° toute la magnétisation longitudinale est basculée dans le plan transverse, son temps de repousse est donc plus long que lors d'une impulsion RF ayant un angle de bascule de 10°. Donc plus l'angle de bascule de la magnétisation longitudinale est petit plus le temps de relaxation T1 est court. L'intensité du signal obtenu sur les images est déterminée grâce aux paramètres de la séquence de pulse (HASHEMI et al., 2003):

$$SI = M_0 * e^{-TE/T2} * (1 - e^{-TR/T1}) * \sin \alpha / (1 - \cos \alpha * e^{-TR/T1})$$

SI = intensité de signal
 M_0 = magnétisation longitudinale
 TE = temps d'écho
 $T2^*$ = constante de temps de relaxation $T2^*$
 TR = temps de répétition
 $T1$ = constante de temps de relaxation $T1$
 α = angle de bascule de la magnétisation

1.6.4 Agents de contraste

Différents types agents de contraste sont disponibles sur le marché et en voie de développement. Les deux principaux types sont les agents T1 et les agents T2. Ils ont pour effet de modifier le temps de relaxation T1 ou T2 d'un tissu donné selon sa concentration.

Les agents de contraste T1 diminuent le temps de relaxation T1, ce qui a pour effet d'augmenter le signal du tissu où l'agent se retrouve sur des images pondérées T1. Ce sont des agents paramagnétiques, ils aident donc les spins à distribuer leur énergie au réseau, ce qui résulte en un temps de relaxation plus court. Les agents de contraste T1 les plus fréquemment utilisés en clinique sont les chélates de gadolinium.

Les agents de contraste T2 diminuent le temps de relaxation T2, ce qui engendre une diminution du signal du tissu où l'agent est présent. Ces sont des agents superparamagnétiques, qui agissent comme des petits aimants lorsqu'ils sont dans un champ magnétique. Les petits champs magnétiques qu'ils induisent favorise le déphasage de la magnétisation, ce qui diminue le temps de relaxation spin-spin.

L'efficacité des agents de contraste est liée à leur relaxivité, c'est-à-dire à leur capacité à modifier les temps de relaxation des tissus. La relaxivité d'un agent de contraste est une constante et le temps de relaxation d'un tissu change en fonction de la concentration de l'agent de contraste. La relaxivité d'un agent de contraste est exprimée en $(\text{mmol}\cdot\text{s})^{-1}$.

Le Magnevist (Gd-DTPA) est un chélate de gadolinium et sa relaxivité est de 3.6 $(\text{mmol}\cdot\text{s})^{-1}$ dans un champ magnétique de 7 T. Il possède un poids moléculaire de 469 Da. La demi-vie plasmatique du Magnevist est d'environ 15 minutes (MCMURRY, et al., 2002).

Le Gadomer est un dendrimère synthétique de gadolinium et sa relaxivité est de 8.74 $(\text{mmol}\cdot\text{s})^{-1}$ dans un champ magnétique de 7 T. Son poids moléculaire est de 17 kDa, mais selon la littérature son poids moléculaire apparent serait plutôt de 34 kDa (MISSELWITZ et al., 2001). Il posséderait une demi-vie plasmatique d'environ 35 minutes (NAGARAJA et al., 2006).

La relaxivité du Gadomer est environ 3.5 à 4.5 fois plus grande que celle du Gd-DTPA (SU et al., 1999). Ces deux agents de contraste T1 lient très peu les protéines plasmatiques et ne traversent pas la BHE compétente.

1.6.5 Concentration tissulaire de l'agent de contraste

Afin de déterminer la concentration d'agent de contraste s'accumulant dans un tissu, il est nécessaire de connaître le temps de relaxation de ce même tissu avant l'administration de l'agent de contraste. En exécutant plusieurs images du tissu en ne modifiant qu'un paramètre pour changer la pondération de la séquence, nous pourrions déterminer pour chaque pixel de l'image le temps de relaxation T1 ou T2 du tissu (Fig. 6).

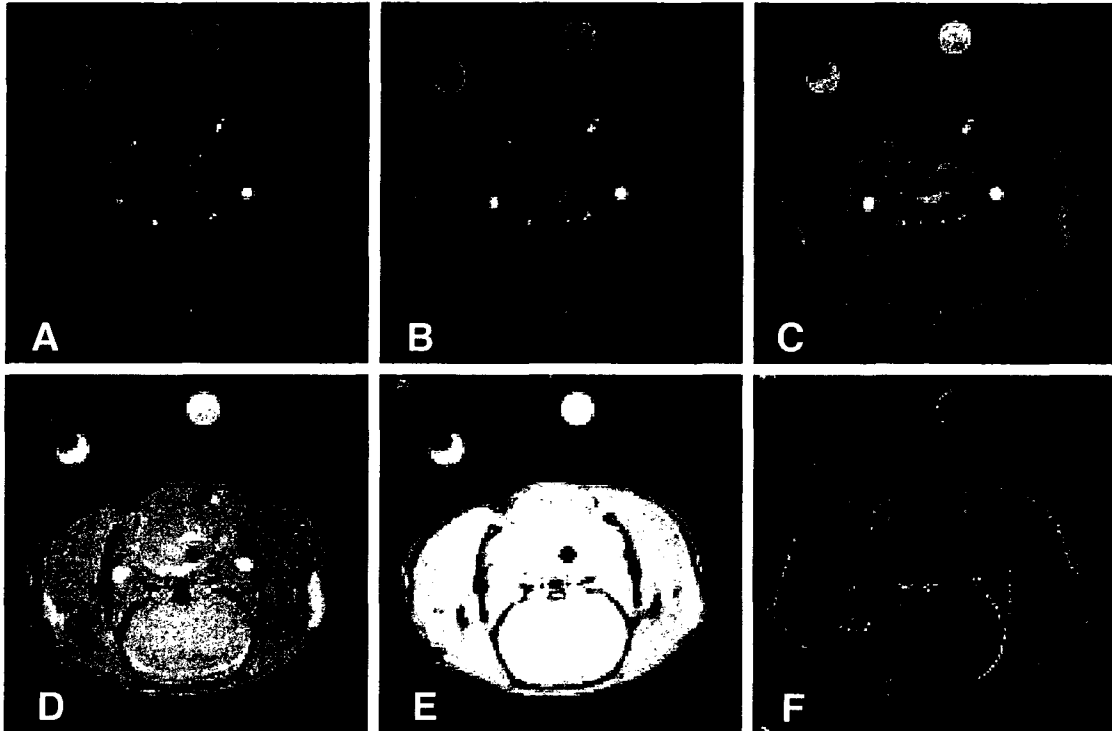


Figure 6. Images pondérées- T_1 provenant d'une séquence de pulse avec différents angles de bascule de la magnétisation longitudinale et carte T_1 . Les images (A, B, C, D, E) ont été produites en utilisant un court TR (100 ms) et l'angle de bascule de la magnétisation longitudinale de 50° , 35° , 25° , 20° , 10° respectivement. L'image sera de faible intensité pour un grand angle de bascule et vice versa. La carte de T_1 (F) a été produite par le lissage pixel par pixel des images A-E.

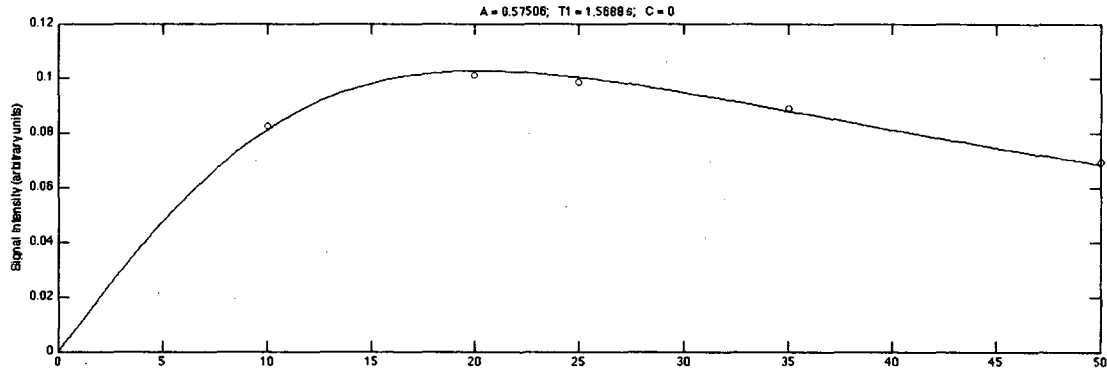


Figure 7. Lissage des données d'un pixel des images à la Fig. 6 (A-E). La constante de temps de relaxation T1 résultant de ce lissage est ensuite utilisée pour produire la carte de T1 (Fig. 6F).

Un lissage des données est effectué pour déterminer la constante de temps de relaxation T1 (ou T2) de chaque pixel (Fig. 7). Une image, nommée carte T1 ou carte T2, sera ensuite créée où chaque pixel aura sa propre valeur du temps de relaxation T1 ou T2 (Fig. 6F).

Puisqu'un agent de contraste modifie le temps de relaxation du tissu en fonction de sa concentration, nous pourrions à l'aide de la carte de T1 du tissu étudié et de cette équation transformer le signal IRM en concentration de l'agent de contraste (LANDIS et al., 2000):

$$R1_{\max} = \frac{1}{TR} * \frac{\log((S0 * \sin(\alpha * \pi / 180) - I_{\max} * \cos(\alpha * \pi / 180))}{S0 * \sin(\alpha * \pi / 180) - I_{\max}}$$

$$C_{\max} = \frac{R1_{\max} - (1 / T1)}{r1}$$

$$R1 = \frac{1}{T1}$$

α = angle de bascule de la magnétisation

TR = temps de répétition

$T1$ = constante de temps de relaxation $T1$ du tissu étudié

$r1$ = relaxivité de l'agent de contraste $T1$

$I0$ = intensité de signal du tissu étudié avant l'administration de l'agent de contraste

I_{\max} = intensité de signal maximal du tissu étudié suite à l'administration de l'agent de contraste

$R1_{\max}$ = relaxivité du tissu étudié lorsque son intensité de signal est maximal

C_{\max} = concentration maximale obtenue de l'agent de contraste dans le tissu étudié

1.7 Tomographie d'émission par positrons

La tomographie d'émission par positrons (TEP) consiste à administrer une molécule radiomarquée ayant une cible biologique spécifique. Suite à son administration, cette dernière s'accumule donc dans l'organe cible. L'atome radioactif se désintègrera en émettant un positron qui se déplacera sur une distance de ± 1 mm dans les tissus. Cette distance dépend de l'énergie du positron et donc de la nature de l'atome

radioactif. À la fin de sa trajectoire, il s'annihilera avec un électron de la matière. L'annihilation des 2 particules de matière et d'antimatière donnera 2 photons possédant chacun une énergie de 511 keV. Les photons produits voyageront à environ 180° l'un de l'autre et seront captés en coïncidence par les détecteurs formant l'anneau de détection. Les signaux seront enregistrés et une image sera reconstruite en trois dimensions pour visualiser l'accumulation du traceur dans l'organisme. Cette technique d'imagerie permet de faire l'étude quantitative de processus biologiques à l'aide de marqueurs spécifiques (JOHNSTRÖM et al., 2005).

1.8 Hypothèse et objectifs de l'étude

Peu de données sont disponibles sur le processus dynamique de l'OBHE, effectué par administration intra-artérielle de mannitol. De plus, le processus d'OBHE est très variable inter-individu et inter-procédure chez un même individu (ROMAN-GOLDSTEIN et al., 1994). La caractérisation du processus dynamique de l'OBHE permettrait d'améliorer l'efficacité des traitements de chimiothérapie. Les objectifs de cette étude sont les suivants :

- mettre au point une technique afin d'étudier le processus dynamique de l'OBHE par IRM et TEP.
- étudier par l'IRM la cinétique de l'accumulation, distribution, la fenêtre thérapeutique et la persistance au SNC de molécules de différents poids et tailles

moléculaires suite à une procédure d'OBHE. Les deux agents de contraste utilisés seront le Magnevist et le Gadomer .

- étudier l'effet de l'OBHE sur le métabolisme cérébral par TEP à l'aide du ¹⁸Fluoro-désoxyglucose.

Tous ces paramètres seront étudiés dans un modèle animal sain (rat Wistar) afin d'éliminer un biais pouvant provenir de la présence d'une tumeur.

II. ÉTUDE DU PROCESSUS DYNAMIQUE DE L'OUVERTURE OSMOTIQUE DE LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE POUR UN COMPOSÉ DE FAIBLE POIDS MOLÉCULAIRE

2.1 Avant-propos de l'article

L'article présenté a été écrit par Marie Blanchette, Dr. Martin Lepage et Dr. David Fortin. La méthodologie développée et décrite dans l'article a été mise au point par Marie Blanchette, à l'aide de M. Martin Pellerin et Dr. Luc Tremblay. Toutes les expériences ont été effectuées par Marie Blanchette.

2.2 Résumé en français de l'article

OBJECTIF: Le traitement des gliomes malins est limité par plusieurs facteurs, l'un des plus important est la barrière hémato-encéphalique (BHE). De nouvelles techniques innovatrices ont été développées afin de la contourner. L'une de ces stratégies, l'ouverture osmotique de la barrière hémato-encéphalique (OBHE) possède plusieurs avantages comparativement aux autres procédures. Même si l'OBHE a été très étudiée, plusieurs données sur la physiologie du processus n'ont toujours pas été décrits. Cette étude a pour but de caractériser le processus dynamique de l'OBHE.

MÉTHODES: 40 rats mâles de race Wistar ont été imagés dans un scanner IRM 7 T pour petits animaux. Des acquisitions dynamiques ont été effectuées de façon à

imager l'animal avant, pendant et après la procédure d'OBHE. Le Magnevist (Gd-DTPA) a été administré à différents délais post-OBHE afin de visualiser et caractériser la perméabilisation de la BHE dans le temps suite à l'OBHE. La concentration de Magnevist dans le parenchyme cérébral a été déterminé en fonction du temps suite à son administration.

RÉSULTATS: Suite à l'OBHE, nous observons un changement de signal dans l'hémisphère traité chez tout les animaux. Immédiatement suite à l'infusion du mannitol, il y a une diminution de signal observé sur les images pondérées T_1 suivi d'un fort rehaussement de signal correspondant à l'administration du Magnevist. Deux mécanismes semblent responsable de la distribution du Magnevist dans le parenchyme cérébral : 1) la diffusion directe dans tout le parenchyme immédiatement suite à l'OBHE, et 2) un processus de diffusion dans le compartiment interstitiel qui se ferait selon un gradient de concentration. Selon les résultats obtenus, la BHE serait perméable au Magnevist immédiatement suite à l'OBHE et le serait toujours 30 minutes post-OBHE.

CONCLUSION: La méthodologie décrite dans cet article permet de faire le suivi en temps réel du processus dynamique et physiologique de l'OBHE in vivo et possède un grand avantage comparativement aux études ex vivo couramment utilisées.

2.3 Précisions sur l'article

La séquence de pulse IRM utilisée est un écho de gradient, les détails spécifiques sur la séquence de pulse sont inscrits dans la section Matériels et méthodes de l'article. L'étude de la diffusion de l'agent de contraste dans le parenchyme cérébral (Fig. A5 et A6) a été faite sur une coupe postérieure au niveau du tronc cérébral. C'est en utilisant cette coupe du cerveau que la démonstration de la diffusion du Gd-DTPA dans le parenchyme cérébral est la plus claire. Les 5 régions d'intérêt utilisées dans les Fig. A5 et A6 sont 1: espace entre le tronc cérébral et l'hémisphère droit près d'une artère, 2: colliculus supérieur, 3: aire cunéiforme, 4: noyau mésencéphalique profond, 5: noyau mésencéphalique profond et partie ventrale du cortex extérieur du colliculus inférieur. Les 4 premières régions se retrouvent dans l'hémisphère ipsilatéral et la ROI 5 dans l'hémisphère controlatéral. À la figure A3, la valeur pour le groupe contrôle est de 0.004 ± 0.003 .

2.4 Article

Real time monitoring of Gd-DTPA during osmotic blood-brain barrier disruption using MRI in normal Wistar rats.

¹Marie Blanchette (M.Sc.), ¹Martin Pellerin (M.Sc.), ¹Luc Tremblay (Ph.D.), ¹Martin Lepage (Ph.D.), ²David Fortin (M.D.)

¹Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada

²Department of Neurosurgery and Neuro-Oncology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada

Abstract

OBJECTIVE: Treatment of malignant gliomas has been hampered by different factors, one of which is the blood-brain barrier (BBB). Innovative strategies to cross the BBB have thus been developed, such as the blood brain barrier disruption (BBBD) procedure. Although it has been extensively studied, details regarding the physiology of the procedure remain obscure. This study was undertaken to clarify these issues.

METHODS: Forty Wistar rats were imaged with a 7 T animal MRI scanner in dynamic acquisitions during BBBD. Gd-DTPA was injected to visualize and characterize the permeability of the BBB at different times post disruption. The concentration of Gd-DTPA in the brain parenchyma was determined as a function of time post injection.

RESULTS: A typical pattern of signal change as a function of time was observed in the treated hemisphere of all animals. Initially, a slight signal drop was observed in T₁-weighted images followed by a strong increase corresponding to the injection of Gd-DTPA. Two different mechanisms appeared responsible for the distribution of Gd-

DTPA within the parenchyma: 1) a direct diffuse increase in capillary permeability, and 2) a diffusion process in the interstitial compartment. Initial results showed that the barrier opens immediately after the procedure and for at least 30 minutes.

CONCLUSION: The methodology described in this paper allows monitoring of the dynamics of BBBD process and characterization of its physiology in vivo, and represents a marked advantage over post mortem static studies.

Running title

Dynamic BBBD monitoring using MRI

Keywords : brain tumors, blood-brain barrier, blood-brain barrier disruption, MRI

Total number of words: 4 080

Introduction

Despite more than three decades of pre-clinical and clinical research, the care of patients bearing malignant astrocytomas has only been marginally impacted (13). The median survival of glioblastoma patients remains around 9 to 14 months. A recent clinical study reporting a 2 months extension in survival when compared to the control group has been considered a major breakthrough, thus emphasizing the aggressiveness of this disease (28). Two reasons are frequently cited to explain this clinical conundrum: 1) the intrinsic chemoresistance of astrocytic tumor cells and 2) the presence of the blood-brain barrier (BBB), a physiological entity impeding the delivery of therapeutic molecules to the central nervous system (8, 16). Thus, the most potent therapeutic molecules identified from in vitro experiments may not be useful if they cannot reach cancer cells lying beyond the BBB.

Because of its physiologic and anatomical properties, the BBB blocks molecules with a molecular weight higher than 180 Daltons (17, 19). Even small molecules are not easily transported across the BBB. According to Pardridge, 98% of small molecules

do not cross the BBB, unless their molecular weight is less than 400 Da and they form less than 8-10 hydrogen bonds with solvent water (22).

A significant number of chemotherapeutic agents that have been shown effective against glioma cell lines do not meet these criteria and therefore do not cross the barrier, thus emphasizing the relevance of the delivery issue (2, 3, 19, 21). The aspect of delivery has become an active research field in neuro-oncology, and is widely oriented towards bypassing the BBB (5, 14, 23). Different approaches have been described and are in use to improve penetration of therapeutics in the brain parenchyma (16).

The intra-arterial infusion of an hyperosmolar solution, or blood-brain barrier disruption (BBBD) procedure has been studied and characterized, both in the clinic and in the laboratory (6, 25). The BBBD produces a transient increase in the permeability of the BBB through a direct effect on the tight junctions (4, 7). This effect is transitory, allowing for a window of opportunity during which the chemotherapy must be administered to maximize delivery to the CNS. We have recently reported clinical results using this procedure in patients bearing different types of brain tumors. Results obtained were favorable in all tumor types included in the series (10, 17). Briefly, the survival of patients with glioblastoma reached 33 months in our study, whereas historical series report median survival in the order of 9 to 14 months (10). We concluded that the procedure was effective in prolonging survival and eliciting tumor response with chemotherapy agents that normally do not readily cross the BBB (carboplatin and etoposide). We recently reported our results in the treatment of brain metastasis of different origins with similar conclusions (11).

Although the procedure has been clinically standardized, the detailed physiology and the dynamics of the BBBD are still poorly characterized. Typically, albumin has been used as a marker of BBB permeability (24). The most commonly reported method for

the detection of albumin is the Evans blue staining, which irreversibly binds to albumin (8, 17). Another approach is the immunocytochemical staining of albumin (8). These conventional techniques require euthanasia of the animal, therefore providing a snapshot static evaluation of the barrier permeability. Longitudinal studies are not possible, and few data are available on the dynamics of the procedure. It has been suggested that the potency of the BBBD approach is in relation to the density of the capillary structures and is thus more prominent in the human cortex, but a detailed profiling in terms of distribution volume and retention of a molecule administered after the procedure is lacking. More so, there is some debate in the literature concerning the time window during which the BBB is permeabilized. The time course of cerebrovascular reversibility has been studied by different research teams with variable results; it has been estimated to be as short as 10 min (1), and as long as 8 hours (27).

This study was undertaken with the aim of improving our understanding of the BBBD procedure. We used magnetic resonance imaging (MRI) and monitored the distribution of a low molecular weight paramagnetic contrast agent (gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic acid, Gd-DTPA) in real-time, in normal Wistar rats after BBBD. More specifically, three different variables were studied: the time window during which the BBB is permeable, the spatial distribution of the molecule in the disrupted hemisphere and the retention of the molecule in the brain parenchyma.

Materials and methods

Animal preparation

All animal experiments were approved by the institutional animal experiment review board. The murine BBB procedure that we have already reported (9) was modified

and adapted for this study. The experimental setup required the animals to be instrumented for the BBB procedure in the MR scanner. Briefly, the animals were first anesthetized with 5% isoflurane (Abbott laboratories, Montreal, Canada) in oxygen and maintained at 2% isoflurane in oxygen (2 L / min). The animals were then intubated using a 14 gauge, 2.25-inch Insyte catheter (BD Insyte, USA) while perfused iv with propofol (Novopharm, Toronto, Canada) via the tail vein. Ten minutes after the initiation of the iv propofol infusion, isoflurane was discontinued. Using aseptic techniques, the right carotid complex was surgically exposed and the external carotid artery was catheterized in a retrograde fashion using a PE-50 intramedic tubing (Clay Adams, USA) so that the tip of the catheter lied just above the bifurcation. The catheter was filled with a solution of 25% mannitol (Hospira, Lake Forest, USA) and connected to a syringe subsequently placed on a constant flow syringe pump (kd Scientific model 100, Holliston, MA, USA). A second tail vein catheter was installed and connected to a syringe containing a 1:3.5 solution of Gd-DTPA (Magnevist™, Berlex canada Inc., Montreal, QC, Canada). The animal was then inserted prone into the bore of a 7 T animal scanner. Animal temperature and respiration rate were constantly monitored using a small animal monitoring system (SA Instruments, Stony Brook, NY, USA). Animals were heated with warm air via a plastic tube into which the mannitol-filled PE-50 catheter was inserted to avoid crystallization at room temperature. A rectal thermometer was connected to a feedback-controlled heating system, such that the body temperature was maintained at 37°C.

Study groups

Forty normal Wistar rats weighing 200 - 250 g were randomly distributed in two study groups. Group 1 consisted of 30 animals and was used to assess the window of opening of the barrier (Fig. 1). Specifically, animals were infused Gd-DTPA 1 (n=4), 3 (n=4), 5 (n=3), 10 (n=5), 15 (n=4) 20 (n=3) and 30 min (n=4) post BBBD. Three

animals were used as controls (Gd-DTPA administered 3 min post sham BBBD). Group 2, comprising 10 animals, was used to study the spatial distribution of Gd-DTPA and allowed the acquisition of data on the retention of that molecule in the brain parenchyma after the procedure.

Experimental procedure

A 7 T MRI scanner (Varian Inc. Palo Alto, CA, USA) with a 210 mm bore and equipped with a 63 mm volume RF coil was used. Typically, 10 axial T₁-weighted slices of 1.5 mm, with a field of view of 4 x 4 cm², a matrix size of 128 x 128, a repetition time of 100 ms, an echo time of 2.5 ms, 4 averages, were acquired from the root of the olfactory bulb to the occipital lobe. A pre-procedure T₁ map was acquired using a multi-flip angle approach and flip angle values of {10°, 20°, 25°, 35°, 50°} to enable quantitation of the data. Then, sets of T₁-weighted images were acquired dynamically using the above parameters and the flip angle fixed at 30°. Thus, a set of 10 slices was imaged every ~51 s (~0.85 min). After the third set of images, the hyperosmolar solution of 25% mannitol was administered at an infusion rate of 0.12 mL/s for an infusion time of 30 s. After a pre-determined delay, a bolus of 500 µL of Gd-DTPA (0.143 M) solution was injected over 60 s. The delay before the injection of Gd-DTPA varied depending on the group under study. For group 1, the goal was to determine the time window during which the BBB is open, so the contrast agent was administered after a delay varying from 1 min up to 30 min after BBBD (1, 3, 5, 10, 15, 20 and 30 min) (Fig. 1).

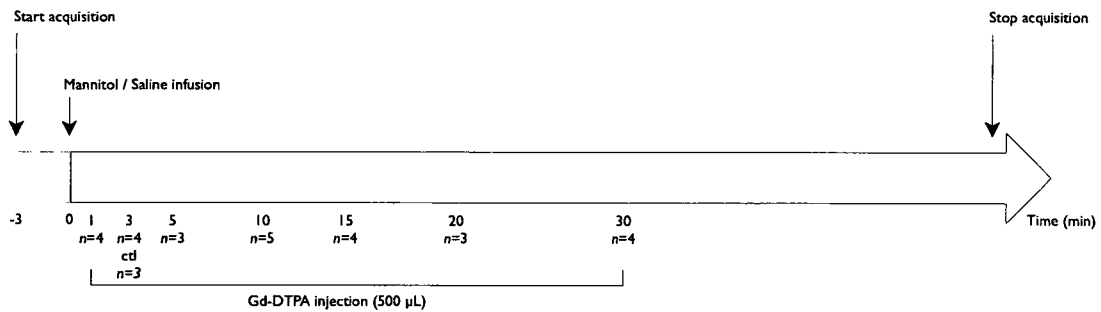


Figure 1. Schematic of the imaging protocol used for the experiments in group 1 to study the window in barrier modification after BBBB. The number of animals per sub-group is indicated.

For every animal, the signal intensity was normalized with respect to the signal prior to the procedure. This accounts for possible inter-session variations in signal intensity resulting from different shims and signal gain adjustments. The signal intensity measured 15 min after injection of Gd-DTPA was subsequently averaged over the complete hemispheres for each animal. For group 2, Gd-DTPA was administered after a fixed delay of 3 min after BBBB. As a control, a sham BBBB experiment was conducted on 3 animals where a saline solution was infused instead of mannitol under the same conditions. Sets of images were acquired continuously during the above procedures and for at least 50 min following the injection of Gd-DTPA.

For group 2, the MR signal was calibrated in terms of the concentration of Gd-DTPA, determined using the pre-contrast T_1 map and the relaxivity of Gd-DTPA at 7 T ($3.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) (18). The resulting concentration-time curve of every voxel was integrated over the first 17 min after injection. We defined this integrated value ($\text{mM} \times \text{min}$) as the exposure of the brain to Gd-DTPA.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA coupled with Dunnett's post-test comparisons. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Fig. 2 shows representative axial MR images before (a) and 17 min after (b) injection of Gd-DTPA. In this illustrative experiment, Gd-DTPA was injected 3 min following BBBD. Signal enhancement caused by Gd-DTPA was apparent in the normal muscles, the skin, but also in certain areas of the brain. In particular, the signal enhancement in the treated hemisphere was diffusely much stronger than in the contralateral hemisphere. Substantial signal enhancement was observed in basal ganglia and the cortical regions in the disrupted hemisphere, as compared with the contralateral untreated hemisphere. Only a weak and transient signal enhancement was observed during sham BBBD experiments.

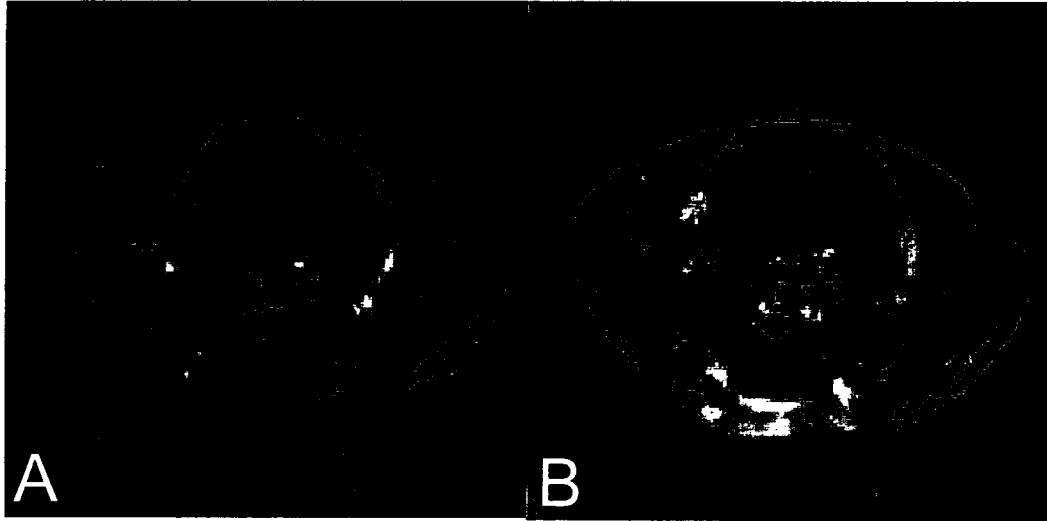


Figure 2. Representative axial MR brain images of a rat lying prone in a 7 T MRI scanner. Pre-contrast (A) and 17 min post contrast T₁-weighted image (B) showing the permeabilization of the BBB in the treated hemisphere. A diffuse increase in signal is noticeable, in deep basal ganglia, as well as in the cortex. The delay between the infusion of mannitol and the injection of Gd-DTPA was 3 min.

Group 1 (Time window of the BBBD)

In this test group, we assessed the period of time during which the BBB is permeable following BBBD. To achieve this, Gd-DTPA was injected after a variable delay post BBBD and the signal intensities 15 min after injection were compared. Based on the data we acquired, the BBB is permeable to Gd-DTPA 1 min after the procedure, and this effect is maintained for at least 30 min. A significant increase in signal intensity was observed between the control and Gd-DTPA administered at 3 ($p < 0.0001$), 15 ($p < 0.01$), 20 ($p < 0.0001$) and 30 ($p < 0.05$) min. Gd-DTPA injections at 1, 5 and 10 minutes did not reach statistical significance, probably because of the small number of test subjects in each groups, although a trend towards signal intensities larger than for the control is certainly observed at these time points.

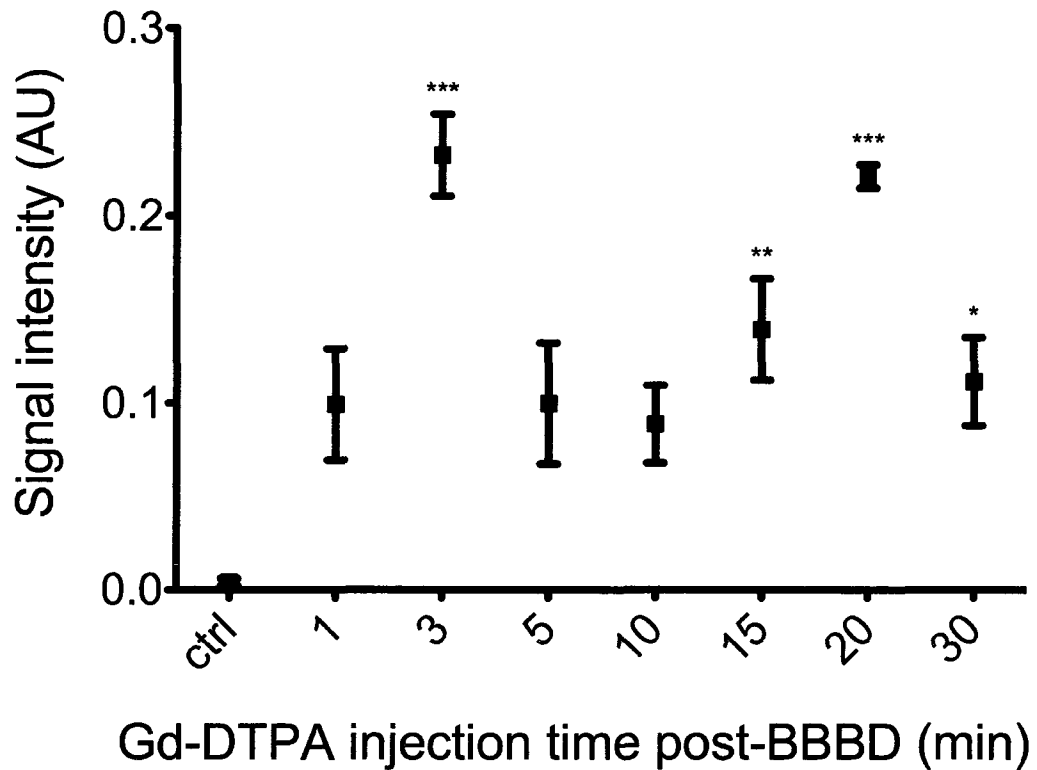


Figure 3. Analysis of the signal intensities in a slice of the treated hemisphere 15 min after Gd-DTPA injection (mean + S.E.M.). The contrast agent was injected 1, 3, 5, 10, 15, 20 or 30 min after the BBBD procedure. In the sham BBBD experiment, saline was infused instead of mannitol; Gd-DTPA was injected 3 min later.

The increase in intensity observed for a 3-min delay between the BBBD and the injection of Gd-DTPA was significantly larger than for delays of 1, 5, 10 and 30 min. Based on these data, the 3-min delay was chosen for Group 2, as well as for further experiments.

Sham BBBD procedures performed using saline instead of mannitol did not result in permeabilization of the BBB, the exposure obtained remaining at baseline value (Fig. 3).

Group 2 (Exposure of the parenchyma to Gd-DTPA)

In this test group, Gd-DTPA was injected at a fixed delay of 3 min following the infusion of mannitol (BBBD). A typical pattern of signal change was observed in the treated hemisphere of every animal (Figs. 4 and 6). A slight signal drop in the T₁-weighted images was observed immediately following the BBBD.

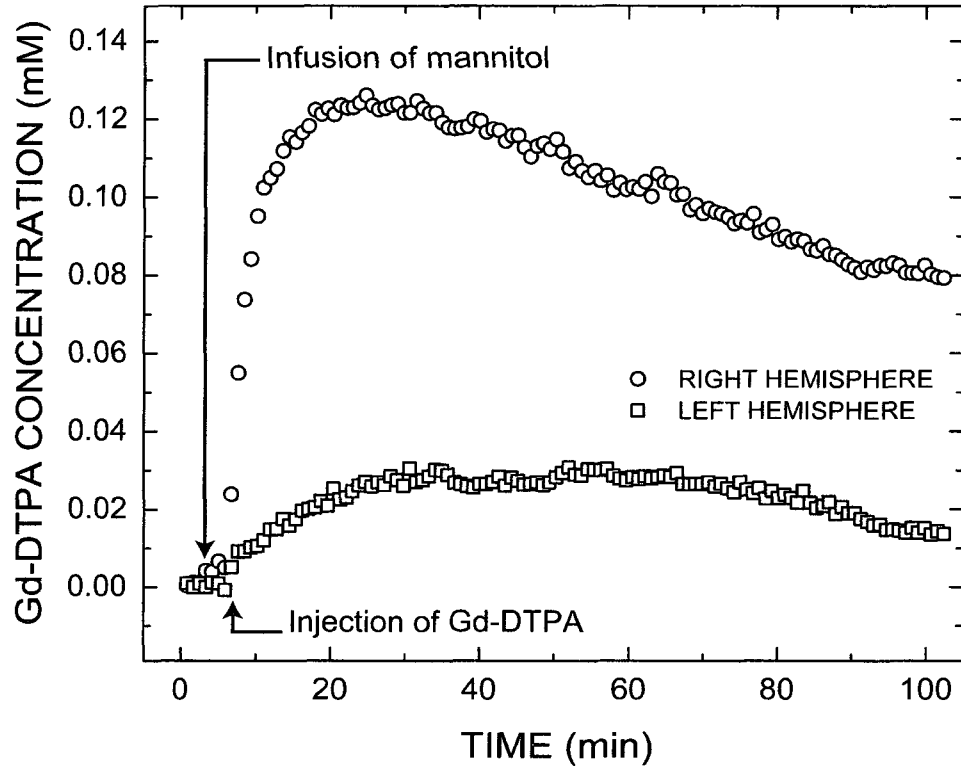


Figure 4. Comparison of the concentration of Gd-DTPA in the treated (right) and the untreated (left) hemisphere as a function of time. Gd-DTPA was injected 3 min after infusion of mannitol (BBBD). The prominent signal increase in the treated hemisphere is at least two-fold larger than in the contralateral hemisphere. Open symbols represent the mean concentration in the frontal region in each hemisphere at a given time point.

This drop was attributed to an increase in fluid content in the brain parenchyma related to the immediate permeabilization of the BBB, as the capillary bed, lacking a functional BBB, leaked plasma. This was followed by a quick and strong signal increase in the disrupted hemisphere corresponding to the injection of Gd-DTPA. Although the increase in signal varied somehow between animals, the pattern in signal modification was similar. The maximum intensity was rapidly reached, at an average

time of 9.2 ± 5.6 min. after injection. The signal increase also persisted much longer than in muscles and in the vasculature. Whereas the maximum intensity was reached at 3.3 ± 1.1 min in the muscle, a $21.1 \pm 6.5\%$ decrease in signal intensity was observed 45 minutes after Gd-DTPA infusion; during this interval, the average signal remained unchanged in the disrupted hemisphere of the brain.

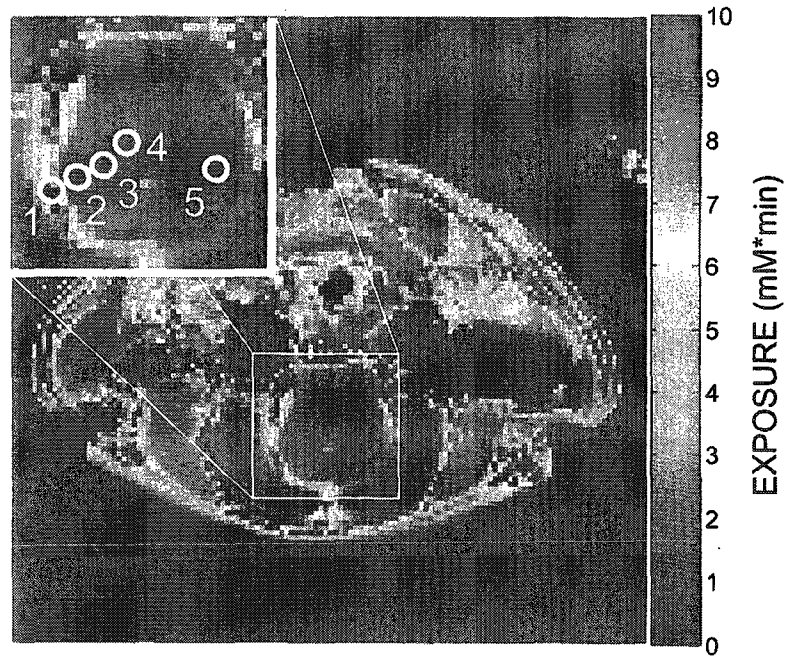


Figure 5. Exposure (in $\text{mM} \times \text{min}$) to Gd-DTPA for the first 17 min calculated from a series of T_1 -weighted axial images. The enhancement patterns for each region of interest (ROI) are plotted in Fig. 6. Each open circle represents an individual data point. The delay between the infusion of mannitol and the injection of Gd-DTPA was 3 min.

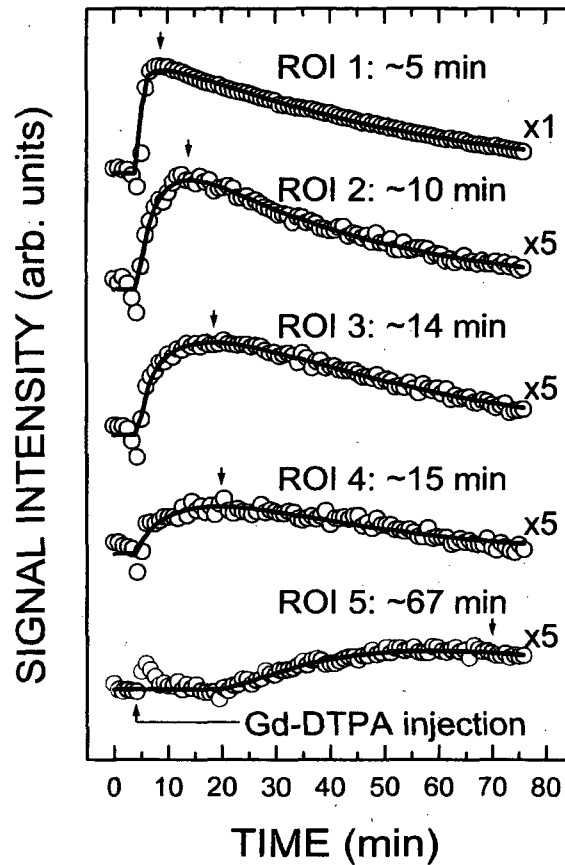


Figure 6. Enhancement pattern for different ROIs indicated in Fig. 5. Each open circle represents an individual data point. The time to reach the maximum concentration (indicated by arrows pointing downwards) increases as the distance from the vascularized region increases. Solid lines are fitted curves that determined the time to reach the maximum exposure as indicated for each dataset. The bottom four curves were multiplied by 5 so they can be plotted on the same scale as the more intense pattern of ROI 1. The delay between the infusion of mannitol and the injection of Gd-DTPA was 3 min. The moment of Gd-DTPA injection is indicated by an arrow pointing upwards.

The exposure of the brain parenchyma to Gd-DTPA was calculated for the first 17 min after injection, and is shown in Fig. 5. The colorbar in mM \times min indicates the integrated value of the concentration-time curve for every voxel in the image. Individual time courses for the five regions of interest shown on the inset of Fig. 5 are reported in Fig. 6. A vascularized area representing the cleft between the brainstem and the cerebral hemisphere was identified as consistently presenting the largest exposure to Gd-DTPA after BBBB (see ROI 1 in Fig. 5). The exposure gradually decreases as a function of the distance from this region. It can be observed that the overall intensity decreases from ROI 1 to ROI 5 in Fig. 6, which leads to the corresponding decrease in exposure in Fig. 5. The time courses were fitted with a pulse function (solid lines in Fig. 6) in order to determine the time at which the maximum intensity was reached. Interestingly in ROI 1, the highest exposure is accompanied by a rapid signal increase after the procedure (\sim 5 min to reach maximum intensity). Moving away from this region, the time to reach maximum concentration gradually increases, and reaches about 15 min at the edge of the treated hemisphere. In comparison, the concentration in the contralateral hemisphere (ROI 5) reaches a maximum intensity only at about 66 min after the BBBB. Fitting the log-log plot of the time to reach the maximum as a function of the distance away from ROI 1, we obtained a slope of \sim 3. Typically, a slope higher than 0.5 indicates there is a net flow moving away from ROI 1, as opposed to a simple Brownian motion. This diffusion process occurs independently of the immediate permeabilization, and seems to represent a second mechanism by which the compound can be transported in the brain parenchyma, suggesting dual mechanisms of exposition of the brain tissue to molecules administered following the BBBB.

Discussion

For decades now, researchers have developed different approaches to circumvent the BBB. One such approach, the osmotic BBBD procedure, has been studied extensively, and is in active use in the clinic (6, 10, 11, 12). Interestingly, even if the procedure has been convincingly shown to increase the delivery of different classes of molecules, from standard chemotherapy to viral particles and monoclonal antibodies, a thorough understanding of its physiology is still lacking (17). The time during which the BBB is permeable after BBBD has not been accurately defined, and it was considered that the earliest increase in permeability was observed at 5 min after the osmotic stress (1). Our data instead suggest an immediate effect on the BBB permeability, as an increase in permeability is already seen in the first set of acquisitions (temporal resolution of ~51 s) after the infusion of mannitol. Traditionally, the increase in permeability was essentially considered reversed 10 min after the osmotic shock (26). Data presented in this study suggest a longer window of opening, with a barrier still permeable 30 min after BBBD (Fig. 3). These findings, should they be confirmed in the human, have clinical implications in terms of maximizing the chemotherapy delivery. When performing the procedure in humans, one of the limitations is the infusion rate of chemotherapy (10), which is kept low to decrease risks of neurotoxicity. Thus, depending on the protocols, chemotherapy infusion can take up to 20 min after BBBD.

The washout of Gd-DTPA was much slower from the brain tissue than from muscles and the vasculature. This observation suggests that Gd-DTPA remained trapped in the brain parenchyma until it was slowly cleared by mechanisms such as the sink effect (17). This retention increases the exposure of the brain tissue (and of cancer cells) to a pharmaceutical agent, and thus, the area under the curve; an increase in this parameter

would therefore be beneficial whenever the procedure is used in concomitance with chemotherapy administration.

In terms of physiology, the suggestion that two different mechanisms are at play is provocative. The first mechanism involves a direct breach of the barrier, and is diffusely observed in the treated hemisphere. This process occurs rapidly after mannitol infusion, as observed with the decrease in signal intensity in T_1 -weighted images (increase in water content (Fig. 4). This is followed by a rapid increase in signal when Gd-DTPA is administered (Fig. 4). Even though this initial increase in signal was widespread and briefly observed in the contralateral hemisphere, regional differences in the intensity could be highlighted suggesting heterogeneity in the barrier permeability. These differences challenge the accepted pattern of permeabilization. In human studies, the permeabilization process is monitored using contrast-enhanced CT scans (20). These studies typically show an accumulation of contrast material that predominates in cortical areas, as well as in the basal ganglia. The pattern observed in our study is different, as the concentration of contrast material is higher in the basal ganglia regions than in the cortex. This discrepancy in the pattern of permeabilization probably stems from anatomic differences in the vascular supply of the rat brain. In the human brain, the vascular density is higher in cortical areas than in the white matter and basal ganglia. As the rat brain depicts a more restricted gyration pattern, the vascular density is less pronounced in the murine cerebral cortex, possibly accounting for this difference.

The second mechanism accounting for the distribution of the contrast material involves a diffusion process in the interstitial compartment from a cleft between the cerebral hemisphere and the brainstem (from ROI 1 to ROIs 2-4, Fig. 6), that eventually reaches the contralateral hemisphere 60 min after the BBB procedure (ROI 5, Fig. 6), hinting at a forced diffusion process. According to Rapoport, this wave

represents bulk fluid flow, a process secondary to procedural brain dehydration and consecutive rehydration from the vascular compartment (26). However, rehydration of the brain tissue would lead to a signal decrease on T₁-weighted images, which was not observed in our study. Fig. 6 indicates the concentration of Gd-DTPA is rather inhomogenous in the brain parenchyma. We suggest that Gd-DTPA will then diffuse along the concentration gradient in the brain tissue. Such transport by diffusion of small molecules within normal and tumor tissues has been previously reported (15). Another possibility is a delayed disruption of the BBB which would manifest at ~20 minutes in the contralateral hemisphere, but not in the ipsilateral hemisphere. In that case however, we could not explain why the pattern observed for ROI 5 in Fig. 6 is not seen for the other ROIs. We therefore suggest this possibility as unlikely although we cannot formally rule it out.

The concentration of the agent and the time of exposition are surrogates of paramount importance when considering the use of BBBD with phase specific chemotherapy agent in the treatment of brain tumors. Since chemotherapy agents are not detectable by MRI, we have instead visualized the distribution of a contrast agent. By calculating the exposure, (i.e., the integral of concentration time-curves on a voxelwise basis), we quantified the efficiency of the delivery of a small molecular weight compound. We suggest that these data could be extrapolated as predictive of the delivery pattern of a chemotherapy agent that would have a similar molecular weight and diameter as Gd-DTPA, but additional studies are required to confirm this contention. An important observation is the non-homogenous distribution of Gd-DTPA within the brain parenchyma. If extrapolated to the clinical situation, this would mean that the exposure of cancer cells to a chemotherapy agent may depend greatly on its location in the brain. If this observation should remain valid for the human, then perhaps the dose of the agent should be modulated to account for the location of the tumor and this topographical variability of the exposure.

As most chemotherapy agents have a higher molecular weight, and slower pharmacokinetics, these results must be interpreted with caution. We have initiated experiments using a contrast agent with a higher molecular weight (Gadomer, 20 kDa, Bayer Schering Pharma, Berlin, Germany). Although the temporal distribution is slower, similar enhancement patterns are observed, suggesting that the mechanisms described in this study for Gd-DTPA also apply to this compound, although the importance of diffusion appears lower (these findings will be published separately).

Prior studies performed with albumin (60 kDa) as a marker of permeability support the entry of molecules of higher molecular weight with the BBBD procedure. Extensive data were gathered using Evans blue as a marker of albumin in BBBD studies. When looking at the topography of staining on coronal sections of murine brain samples, the same regional predominance in the basal ganglia area is noticed, thus supporting that this observation obtained with Gd-DTPA could be applicable to larger molecules (17).

The translation of these results in a neuro-oncology context needs to be addressed with reserve. An important limitation of this study stems from the fact that healthy Wistar rats were used. The presence of a sizeable lesion would significantly modify the permeability of the surrounding barrier and increase the regional interstitial pressure, thereby influencing the exposure of the surrounding tissue to a chemotherapy agent. More so, the effect of other treatment modalities such as surgery and radiation therapy has not been emulated in the present study model. These treatment modalities, especially radiation therapy, have an obvious impact on the barrier integrity that cannot be considered in the present model. The experimental design described in this study will be applied to tumor bearing animals to better emulate the clinical context of a brain tumor patient. We will also apply the same experimental setting in irradiated implanted animals. It is also important to remember

that these results might be limited to the specie under study, namely the Wistar rat. Nonetheless, it is our opinion that the results presented in this study form the basis for these subsequent studies and help understand how a molecule is distributed in the brain tissue after BBBB.

Conclusion

This work reports the initial results obtained in the study of the physiology and the dynamics of the BBBB process in an animal model using Gd-DTPA as a surrogate to a chemotherapy agent. More specifically, data were acquired to assess the time window (between 1 and 30 min post BBBB) during which the BBB is breached, to visualize the distribution of Gd-DTPA as a function of time in the brain parenchyma when administered up to 30 min after BBBB, and to map the spatial distribution of that molecule in the brain. The window in the barrier opening was longer than what was currently thought, and the retention of the molecule, once it gained access to the CNS compartment, was surprisingly long. The exposure of the brain parenchyma to Gd-DTPA appeared to be very inhomogeneous, which may suggest a treatment may not be as efficient for every region of the brain. Also of interest was the suggestion that two different mechanisms are at play in the BBBB process. First, a direct permeabilization of the BBB allows Gd-DTPA to enter the brain parenchyma. Second, Gd-DTPA in the brain parenchyma diffuses to regions of lower Gd-DTPA concentration. Studies using a larger molecular weight compound are underway and the same methodology will be applied to study the BBBB process in the brain tumor-bearing rats. Conventional staining approaches such as albumin staining provide a static evaluation of the BBBB process and are performed in an *ex vivo* setting. Thus, the methodology described in this paper allowing monitoring the BBBB process *in vivo* represents a marked advantage in that a better understanding of the mechanisms involved in the delivery of an agent may be studied.

References

1. Bhattacharjee AK, Nagashima T, Kondoh T, Tamaki N: The effects of the Na(+)/Ca(++) exchange blocker on osmotic blood-brain barrier disruption. *Brain Res* 900: 157-62, 2001.
2. Boyle F, Eller S, Grossman S. Penetration of intra-arterially administered vincristine in experimental brain tumor. *Neuro-oncology* 6: 300-5, 2004.
3. Bradford R, Koppel H, Pilkington GJ, Thomas DG, Darling JL. Heterogeneity of chemosensitivity in six clonal cell lines derived from a spontaneous murine astrocytoma and its relationship to genotypic and phenotypic characteristics. *J Neurooncol* 34: 247-61, 1997.
4. Brightman MW, Hori M, Rapoport SI, Reese TS, Westergaard E. Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium. *J Comp Neurol* 152: 317-25, 1973.
5. de Boer A, Gaillard P. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 323-55, 2007.
6. Doolittle ND, Miner ME, Hall WA, Siegal T, Jerome E, Osztie E, McAllister LD, Bubalo JS, Kramer DF, Fortin D, Nixon R, Muldoon LL, Neuwelt EA. Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer* 88: 637-47, 2000.
7. Dorovini-Zis K, Bowman PD, Betz AL, Goldstein GW. Hyperosmotic

- arabinose solutions open the tight junctions between brain capillary endothelial cells in tissue culture. *Brain Res* 302: 383-6, 1984.
8. Fortin D. Altering the properties of the blood-brain barrier: disruption and permeabilization. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progrès des recherches pharmaceutiques* 61: 125-54, 2003.
 9. Fortin D, Adams R, Gallez A. A blood-brain barrier disruption model eliminating the hemodynamic effect of ketamine. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques* 31: 248-53, 2004.
 10. Fortin D, Desjardins A, Benko A, Niyonsega T, Boudrias M. Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in malignant brain tumors: the Sherbrooke experience. *Cancer* 103: 2606-15, 2005.
 11. Fortin D, Gendron C, Boudrias M, Garant MP. Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in the treatment of cerebral metastasis. *Cancer* 109: 751-60, 2007.
 12. Hall WA, Doolittle ND, Daman M, Bruns PK, Muldoon LL, Fortin D, Neuwelt EA. Osmotic blood-brain barrier disruption chemotherapy for diffuse pontine gliomas. *J Neurooncol* 77: 279-84, 2006.
 13. Hösli P, Sappino A, de Tribolet N, Dietrich P. Malignant glioma: should chemotherapy be overthrown by experimental treatments? *Ann Oncol* 9:

589-600, 1998.

14. Hsieh C, Chen Y, Chen F, Hwang J, Chen J, Liu R, Kai J, Chang C, Wang H. Evaluation of pharmacokinetics of 4-borono-2-(18)F-fluoro-L-phenylalanine for boron neutron capture therapy in a glioma-bearing rat model with hyperosmolar blood-brain barrier disruption. *J Nucl Med* 46: 1858-65, 2005.
15. Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* 47: 3039-51, 1987.
16. Kraemer D, Fortin D, Neuwelt E. Chemotherapeutic dose intensification for treatment of malignant brain tumors: recent developments and future directions. *Current neurology and neuroscience reports* 2: 216-24, 2002.
17. Kroll RA, Neuwelt EA. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery* 42: 1083-99; discussion 1099-100, 1998.
18. Landis CS, Li X, Telang FW, Coderre JA, Micca PL, Rooney WD, Latour LL, Véték G, Pályka I, Springer CS. Determination of the MRI contrast agent concentration time course in vivo following bolus injection: Effect of equilibrium transcytolemmal water exchange. *Magn Reson Med* 44: 563-74, 2000.
19. Neuwelt EA, Abbott NJ, Drewes L, Smith QR, Couraud PO, Chiocca EA, Greig NH, Doolittle ND. Cerebrovascular Biology and the various neural barriers: challenges and future directions. *Neurosurgery* 44: 604-8; discussion 608-9, 1999.

20. Neuwelt EA, Specht HD, Howieson J, Haines JE, Bennett MJ, Hill SA, Frenkel EP. Osmotic blood-brain barrier modification: clinical documentation by enhanced CT scanning and/or radionuclide brain scanning. *Am J Roentgenol* 141: 829-35, 1983.
21. Pardridge W. Drug delivery to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 713-31, 1997.
22. Pardridge W. The blood-brain barrier and neurotherapeutics. *NeuroRx : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 1: 1-2, 2005.
23. Pardridge W. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2: 3-14, 2005.
24. Rapoport S, Hori M, Klatzo I. Reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Science* 173: 1026-8, 1971.
25. Rapoport S, Hori M, Klatzo I. Testing of a hypothesis for osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am J Physiol* 223: 323-31, 1972.
26. Rapoport S, Robinson P. Tight-junctional modification as the basis of osmotic opening of the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci* 481: 250-67, 1986.
27. Siegal T, Rubinstein R, Bokstein F, Schwartz A, Lossos A, Shalom E, et al. In vivo assessment of the window of barrier opening after osmotic blood-brain barrier disruption in humans. *J Neurosurg* 92: 599-605, 2000.
28. Stupp R, Mason W, van den Bent M, Weller M, Fisher B, Taphoorn M, et al.

Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.
N Engl J Med 352: 987-96 2000. Stupp R, Mason W, van den Bent M, Weller
M, Fisher B, Taphoorn M, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant
temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 352: 987-96 2000.

III. ÉTUDE DU PROCESSUS DYNAMIQUE DE L'OUVERTURE OSMOTIQUE DE LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE POUR UN COMPOSÉ DE HAUT POIDS MOLÉCULAIRE

3.1 Méthodes

Les paramètres d'acquisition par IRM pour l'étude du Gadomer ont été les mêmes que ceux utilisés lors de l'étude du Magnevist. Il en a été également de même pour la procédure chirurgicale chez l'animal. Chaque animal n'a été imagé une seule fois sauf pour les 5 animaux où nous avons étudié l'élimination du Gadomer 12 heures suite à la procédure d'OBHE. Le protocole d'expérimentation et la méthode d'analyse utilisés pour la caractérisation de la fenêtre thérapeutique du Gadomer à l'aide de l'IRM diffèrent de ceux utilisés pour l'étude du Magnevist (Fig. 8 et Fig. A1). Pour le Gadomer, il n'y a pas eu de groupe à 1 min post-OBHE, l'étude de la fenêtre thérapeutique a donc débuté à 2 min post-OBHE. De plus, les groupes ont été comparés selon la concentration moyenne maximale pour le Gadomer comparativement à l'analyse effectuée en comparant l'intensité de signal moyen maximal pour le Magnevist. La transformation mathématique de l'intensité de signal en concentration d'agent de contraste s'est avérée un net avantage puisqu'elle nous a permis d'effectuer une analyse plus quantitative des résultats obtenus. Dans les deux cas, les analyses ont été effectuées avec les valeurs obtenues pour l'hémisphère traité.

Les tests statistiques qui ont été effectués sont l'analyse de variance (ANOVA) et le post-test de comparaison multiple Bonferroni.

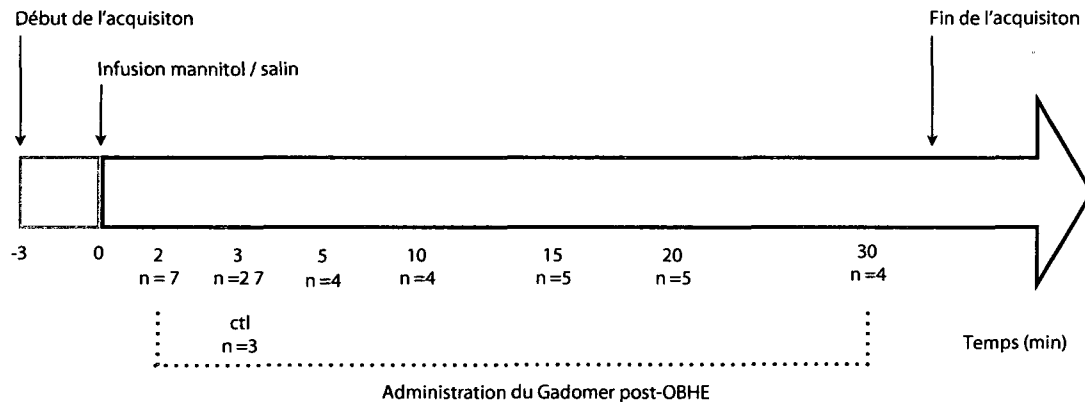


Figure 8. Schéma illustrant le protocole d'expérimentation IRM lors des expériences effectuées avec le Gadomer. Le nombre d'animaux pour chaque groupe est indiqué sous les temps d'infusion du Gadomer. L'agent de contraste a été administré à 3 min post-OBHE chez les animaux contrôles.

Afin de déterminer le temps d'élimination du Gadomer dans le parenchyme cérébral, quatre animaux ayant subi une OBHE et reçu une administration d'agent de contraste 3 min post-OBHE ont été imagés de nouveau 12 h plus tard. L'agent de contraste

étudié n'a pas été administré à nouveau lors de la deuxième acquisition. Le rapport de l'intensité de signal moyen de l'hémisphère droit sur celui de l'hémisphère gauche de l'animal a été effectué, avant toute manipulation de l'animal et 12 h post-OBHE. Les ratios ainsi obtenus ont ensuite été comparés et un test statistique Student unilatéral pairé a été effectué.

3.2. Résultats

La procédure d'OBHE permet d'augmenter la concentration de Gadomer au sein du SNC (Fig. 9). Suite à l'administration de l'agent de contraste 3 min post-OBHE, un rehaussement de signal est observé au niveau des ganglions de la base et du cortex de l'hémisphère droit (Fig. 9 B). Quinze minutes après l'administration de l'agent de contraste, la concentration maximale moyenne est atteinte dans le parenchyme de l'hémisphère traité (Fig. 10). La perméabilité de l'hémisphère traité pour le Gadomer à différents temps post-OBHE est illustrée à la Fig. 11. Il n'y a qu'à 3 min post-OBHE que la BHE est significativement perméable au Gadomer avec un $p = 0.05$. La BHE semble perméable pour le Gadomer de la deuxième à la cinquième minute suite à la procédure d'OBHE; tandis que de la dixième à la trentième minute, la concentration maximale moyenne atteinte est semblable à celle du contrôle. Selon ces données, la barrière se serait donc refermée après 10 minutes pour le Gadomer.

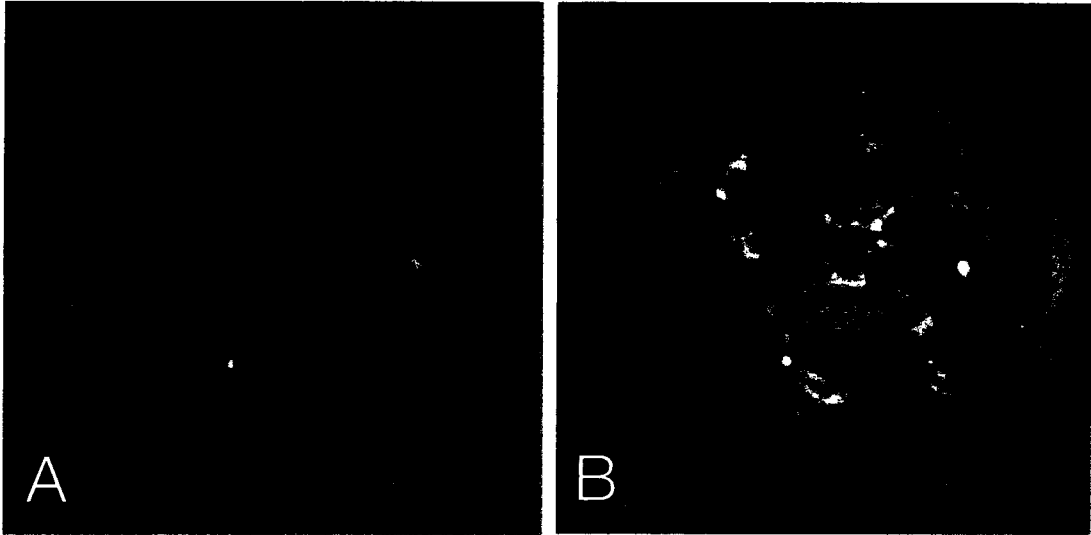


Figure 9. Images axiales IRM pondérées T1 d'un animal ayant reçu une administration de Gadomer 3 minutes post-OBHE. Les hémisphères sont de même intensité avant la perméabilisation de la BHE (A). Image obtenue 15 minutes suite à l'administration de Gadomer (infusé 3 min post-OBHE), un rehaussement de signal est observable dans l'hémisphère traité surtout localisé au niveau du cortex et du striatum (B).

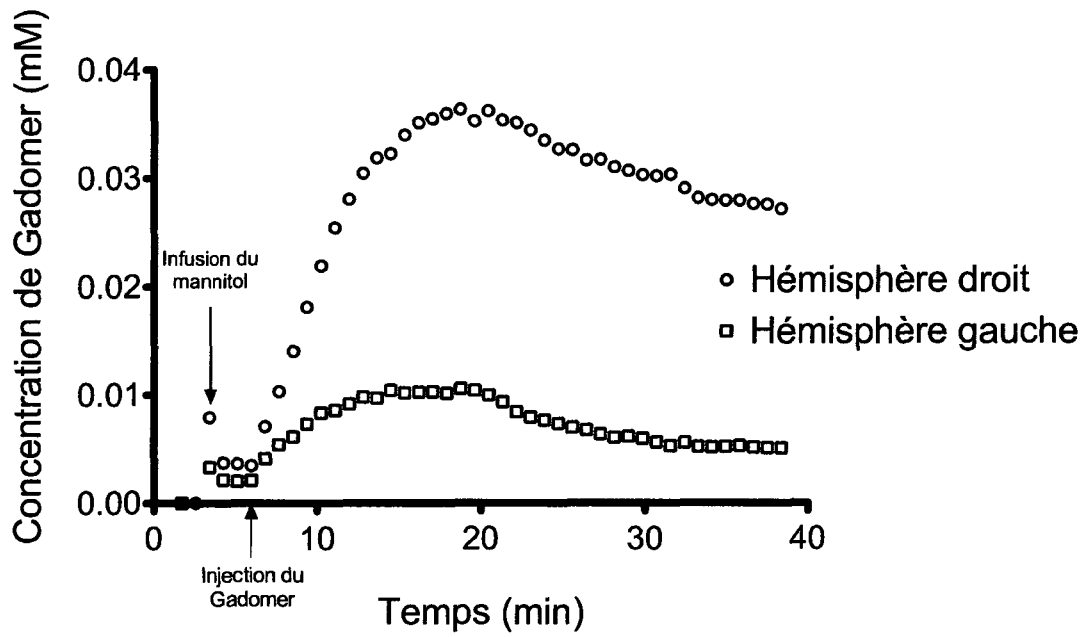


Figure 10. Accumulation du Gadomer dans les hémisphères cérébraux en fonction du temps suite à la procédure d'OBHE. L'administration du Gadomer a été effectuée 3 min post-OBHE.

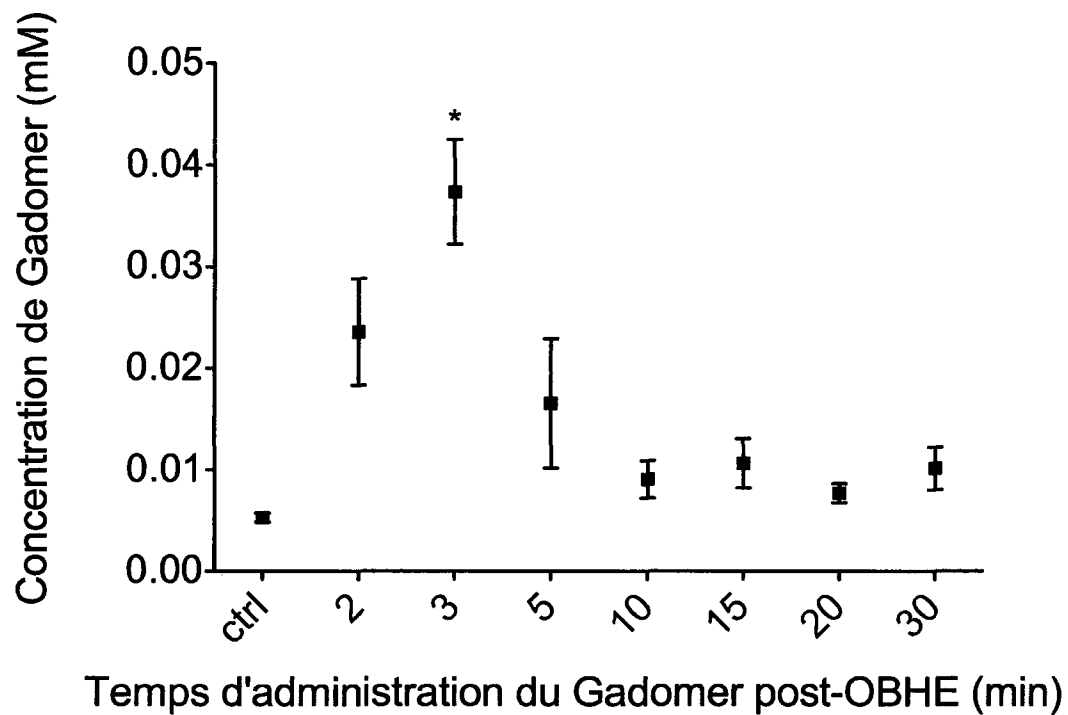


Figure 11. Fenêtre thérapeutique de l'OBHE pour le Gadomer. Chaque point représente la concentration moyenne maximale atteinte dans l'hémisphère traité pour différents délais d'administration du Gadomer post-OBHE.

Les ratios de l'intensité de signal de l'hémisphère droit sur l'hémisphère gauche effectué avant OBHE et 12 h post-OBHE afin d'étudier le temps d'élimination du Gadomer sont illustrés à la Fig. 12. Le ratio pré-OBHE est de $0,99 \pm 0,01$, et 12 heures post-OBHE de $1,07 \pm 0,02$. Cette différence entre les ratios est statistiquement significative ($p = 0.0058$).

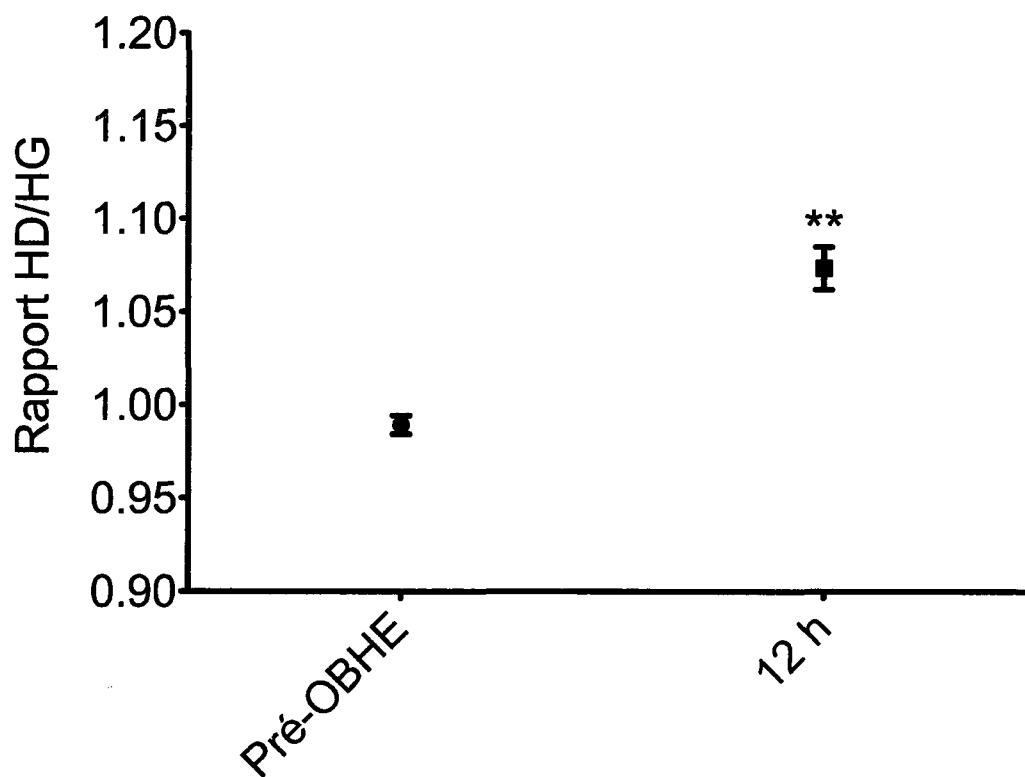


Figure 12. Temps d'élimination du Gadomer. Le Gadomer a été administré 3 min post-OBHE et le ratio de l'intensité de signal de l'hémisphère droit (HD) sur l'hémisphère gauche (HG) a été calculé pré-OBHE et 12 h post-OBHE.

IV. ÉTUDE DE L'EFFET DE L'OUVERTURE OSMOTIQUE DE LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE SUR LE MÉTABOLISME CÉRÉBRAL

4.1 Méthodes

La procédure chirurgicale qui a été effectuée chez les animaux est la même que pour les animaux étudiés par IRM; seul le protocole d'imagerie a été modifié. Par conséquent, l'hémisphère droit (HD) est toujours l'hémisphère traité et l'hémisphère gauche (HG), le non traité. Suite à la chirurgie, l'animal instrumenté a été inséré dans le scanner TEP. L'acquisition des images et l'administration continue de ^{18}F FDG ont été débutées en même temps. Le ^{18}F FDG (296 MBq/kg) a été infusé sur une période de 30 minutes, pour un volume total de 0.48 ml administré à un débit de 0.016 ml/min par voie i.v. caudale. La durée totale de l'acquisition était de 150 minutes. Le mannitol (n = 5) ou salin (n = 5) pour les animaux contrôles, a été infusé à l'animal à la 20^{ème} minute de l'acquisition et de l'infusion du ^{18}F FDG (Fig. 13). Le temps d'acquisition est donc divisé en trois phases. La première phase correspond à la phase d'entrée du ^{18}F FDG au cerveau avant traitement et représente le métabolisme cérébral basal. La seconde phase débute avec la perméabilisation de la BHE jusqu'à la fin de l'infusion du ^{18}F FDG. Enfin, la dernière phase est définie à partir de l'arrêt de l'infusion du ^{18}F FDG jusqu'à la fin de l'acquisition. La troisième phase correspond donc à l'élimination du ^{18}F FDG extracellulaire au sein du SNC pour l'hémisphère droit de

l'animal traité ou tout simplement la décroissance du radiotracer piégé dans le compartiment intracellulaire cérébral. Les courbes obtenues ont été mathématiquement modifiées pour corriger la décroissance du radiotracer. Pour chaque phase, les régressions linéaires des courbes corrigées ont été effectuées afin de les comparer.

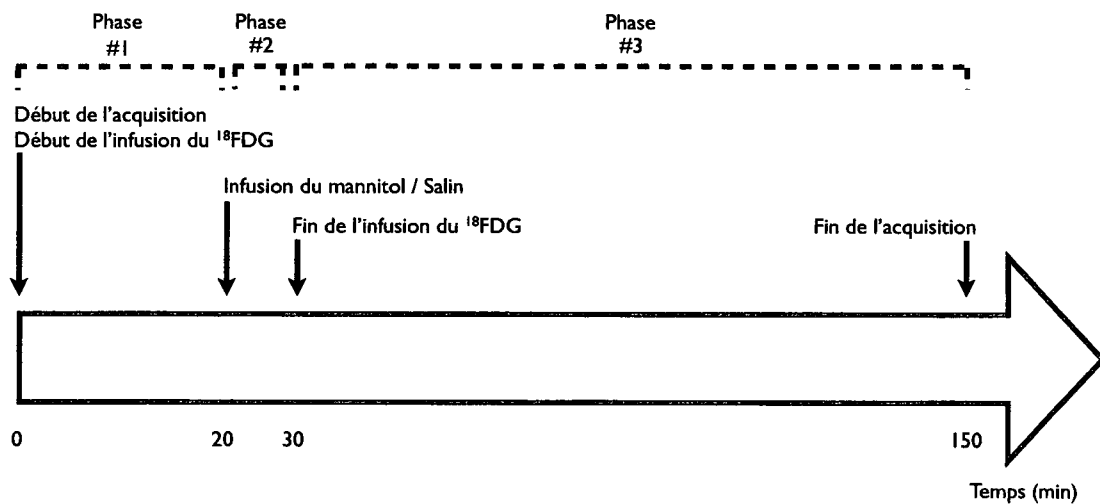


Figure 13. Schéma illustrant le protocole d'expérimentation pour l'évaluation de l'effet de la procédure d'OBHE sur le métabolisme cérébral.

4.2 Résultats

Suite à l'acquisition, les images ont été reconstruites avec une haute résolution spatiale et des données ont été extraites pour chaque hémisphère (Fig. 14). Les courbes représentant l'accumulation du ^{18}F FDG dans les hémisphères cérébraux des animaux traités et contrôles sont exprimées en comptes/s (Fig. 15). Les courbes des hémisphères droits et gauches chez les animaux contrôles se superposent tout au long de la dynamique. Lors de la première phase, il n'y a pas de différence significative entre toutes les pentes des courbes étudiées. Chez les animaux ayant subi l'OBHE, les pentes des courbes de captation du ^{18}F FDG sont comparables pour les 20 premières minutes et divergent statistiquement de la vingtième à la trentième minute ainsi que de la trentième à la cent cinquantième minute pour chaque hémisphère (Tableau 3). Lors de la deuxième phase, la pente est significativement ($p = 0.01$) plus grande dans l'hémisphère droit que gauche. Les pentes des courbes des animaux traités sont significativement différentes dans la troisième phase avec un $p < 0.0001$ (Fig. 15). Durant cette même phase, le taux de captation est plus élevé dans les deux hémisphères cérébraux des animaux traités que ceux des animaux non traités ($p < 0.0001$).

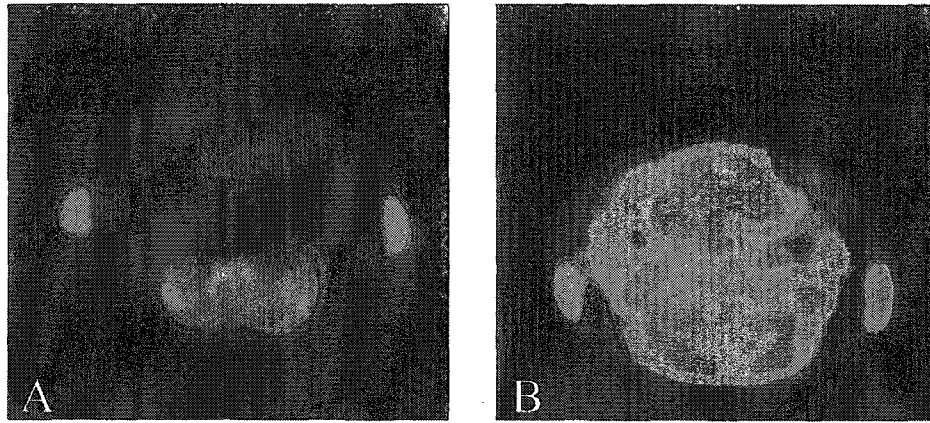


Figure 14. Images TEP d'un animal contrôle (A) et d'un animal ayant subi une OBHE (B). L'hémisphère droit se retrouve à gauche sur ces coupes coronales postérieures provenant d'une reconstruction haute résolution du volume cérébral fait avec la troisième phase de l'acquisition.

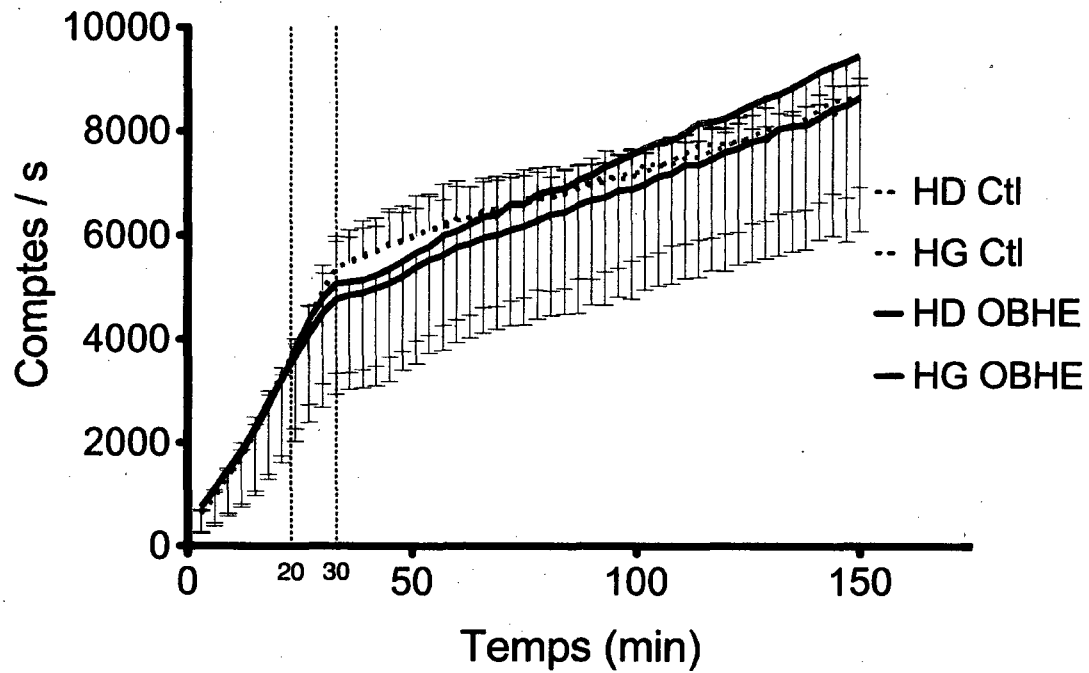


Figure 15. Courbes d'accumulation du ^{18}F FDG dans les hémisphères des animaux contrôles (lignes pointillées) et traités (lignes continues) corrigées pour la décroissance du Fluor-18. Les barres représentant les écarts-types sont au-dessus de la courbe pour les animaux contrôles et en dessous pour les animaux traités.

Phase	HD Ctl	HG Ctl	HD OBHE	HG OBHE
1	140,0 ± 6,6	147,9 ± 6,1	135,6 ± 5,3	130,4 ± 4,5
2	179,7 ± 4,4	175,5 ± 3,6	175,2 ± 7,9	138,0 ± 2,6
3	25,7 ± 0,3	26,5 ± 0,3	38,0 ± 0,3	32,4 ± 0,2

Tableau. 3 Pentes calculées pour chaque hémisphère pour les trois phases de l'acquisition. Il n'y a pas de différences significatives entre les pentes étudiées lors de la première phase. Lors de la deuxième phase, la pente HG OBHE est significativement différente des 3 autres pentes ($p = 0.001$). Lors de la troisième phase, les pentes des hémisphères chez les animaux contrôles ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre. Elles sont significativement différentes des pentes des hémisphères des animaux traités ($p < 0.0001$). Les pentes HD OBHE et HG OBHE lors de la troisième phase sont significativement différentes avec un $p < 0.0001$.

V. DISCUSSION GÉNÉRALE

Afin de traiter diverses pathologies au sein du SNC, plusieurs stratégies ont été développées dans le but de contourner ou manipuler la BHE pour acheminer les molécules à la cible thérapeutique en concentration suffisante. Dans un contexte neuro-oncologique pour le traitement des GBM, l'OBHE, une approche permettant d'augmenter l'acheminement de molécules thérapeutiques au cerveau sur un grand volume de distribution, est une stratégie de choix. Bien qu'il ait été démontré que cette procédure est efficace et sécuritaire en contexte standardisé pour le traitement des GBM, peu de données sont disponibles sur la fenêtre thérapeutique, le temps de rétention des agents dans le parenchyme cérébral, la distribution spatiale et l'accumulation maximale des agents thérapeutiques au sein du SNC, ainsi que le temps de rétention dans le parenchyme cérébral suite au processus dynamique de l'OBHE. Afin d'en augmenter l'efficacité et d'en optimiser les déterminantes, les différents paramètres régulant le processus dynamique de la perméabilisation osmotique de la BHE doivent être caractérisés. Les données que nous avons obtenues démontrent que la perméabilisation de la BHE est un processus dynamique et s'avère différent selon la taille et/ou le poids moléculaire ainsi que la charge de la molécule thérapeutique. Suite à l'administration du mannitol, les cellules endothéliales doivent présument se remplir d'eau à nouveau et enclencher les mécanismes responsables de la réparation et/ou reconstruction des jonctions serrées altérées par le choc osmotique. Le processus de réparation des jonctions serrées est vraisemblablement

plus long que la réabsorption d'eau par les cellules endothéliales puisqu'elle doit s'effectuer par la régulation de l'expression de certains gènes (RAPOPORT et ROBINSON, 1986). L'espace créé entre les cellules endothéliales par le processus osmotique de l'OBHE se referme donc assez rapidement pour les grosses molécules, et seulement les petites molécules peuvent diffuser dans les fenestrations intercellulaires jusqu'à ce que la restructuration des jonctions adhérentes et serrées soit complétée. Pour le moment, aucun consensus n'a été atteint afin de déterminer la fenêtre thérapeutique de l'OBHE. Il importe de préciser que cette fenêtre est variable et probablement unique à chaque molécule. Certaines équipes de recherche l'évaluent globalement à 10 min (RAPOPORT et al., 1980, KESSLER et al., 1984), alors que d'autres concluent plutôt à une quarantaine de minutes (ZÜNKELER et al., 1996, SIEGAL et al., 2000). Ces variations peuvent être uniquement reliées au choix des molécules testées. En effet, pour les petites molécules telles que le Magnevist (0,5 kDa), la BHE est perméable dès la première minute suite à l'administration du mannitol et le demeure 30 min post-OBHE (Fig. A3). Dans un contexte expérimental similaire, la BHE est perméable pour une molécule plus lourde et plus volumineuse comme le Gadomer (17 kDa, 20 nm) dès la deuxième minute post-OBHE et semble s'être refermée 10 min post-OBHE (Fig. 11). Ces données semblent donc supporter que la fenêtre d'ouverture serait spécifique pour chaque molécule et qu'elle varie en fonction des caractéristiques de la molécule testée. Ces données peuvent avoir d'importantes implications cliniques. En effet, lors des procédures d'OBHE pour le traitement des GBM chez l'homme, la chimiothérapie est administrée jusqu'à 30 min

suite à l'OBHE, selon un calcul tenant en compte la concentration de la solution et son volume total afin de déterminer un débit d'infusion permettant d'éviter le phénomène de <streaming>, sans jamais prendre en considération la fenêtre d'ouverture de la BHE (BELLAVANCE et al., 2008). Il est donc essentiel de se questionner à savoir s'il est cliniquement possible d'administrer les agents antinéoplasiques selon un délai post-OBHE correspondant à leur poids et taille moléculaire.

L'accumulation maximale des agents de contraste est observée lorsqu'ils sont administrés 3 min post-OBHE et ce indépendamment de leur poids moléculaire (Fig. A3 et Fig. 11). Leur concentration maximale est obtenue 15 min suite à leur administration et ce phénomène n'est pas dépendant de leur poids et taille, ni du délai d'administration (Fig. A4 et Fig. 10). Lorsqu'administrés à 3 min post-OBHE, la concentration moyenne maximale atteinte dans l'hémisphère traité est d'environ 0,1 mM pour le Magnevist et d'environ 0,037 mM pour le Gadomer (Fig. A4 et Fig. 10) lorsqu'administré à dose équivalente. La taille physiologique apparente du Gadomer aurait été estimée à 34 nm (NAGARAJA et al., 2006), ce qui est congruent avec ces résultats. En effet, la dimension du pore créé entre les cellules endothéliales a été estimée par Robinson et Rapoport à 20 nm, six minutes post-OBHE (ROBINSON et RAPOPORT, 1987).

Suite à leur accumulation au SNC, l'élimination des agents de contraste se fait sur une

plus longue période de temps qu'au niveau plasmatique, et selon une dynamique différente. Les agents de contraste s'accumulent au niveau du parenchyme cérébral et se retrouvent dans le liquide interstitiel. L'élimination de l'agent de contraste se fera donc par les courants de convection du LCR. Le Gadomer, dû à sa taille, demeure emprisonné plus longtemps entre les cellules du parenchyme cérébral. Son temps d'élimination est donc de plus de 12 h (Fig. 12), et est beaucoup plus long que celui des petites molécules (Magnevist) que nous avons estimé à 4 h selon des données préliminaires. Puisque l'efficacité des agents de chimiothérapie phase spécifique se mesure par la concentration atteinte au site multipliée par le temps d'exposition de l'agent aux cellules cancéreuses, l'élimination très lente des agents thérapeutiques selon leur taille peut s'avérer cliniquement très bénéfique.

La distribution des agents acheminés au SNC suite à la perméabilisation de la BHE semble se faire par deux mécanismes distincts. Premièrement, l'OBHE permet d'augmenter la concentration d'agent dans le parenchyme cérébral de façon diffuse, mais hétérogène. Cette distribution au niveau de l'hémisphère traité serait seulement due à l'accumulation de l'agent de contraste au SNC immédiatement suite à l'OBHE tel qu'illustré à la Fig. A2, et Fig. 9. Chez le rat, nos observations démontrent un rehaussement plus important au niveau des ganglions de la base et plus faible dans le cortex. Dans les études cliniques, la perméabilisation de la BHE est typiquement évaluée par une étude de tomодensitométrie. Ainsi, il a été noté que chez l'humain, l'agent de contraste radiographique administré s'accumule davantage au niveau

cortical et plus faiblement dans la matière blanche et les ganglions de la base. Ces différences peuvent s'expliquer par la disparité dans la densité des microvaisseaux cérébraux pour ces deux espèces.

Le deuxième mécanisme expliquant la distribution des agents suite à leur accumulation au SNC du à l'OBHE serait la diffusion dans le liquide interstitiel de la molécule testée. L'accumulation maximale de Magnevist atteinte suite à l'OBHE se situe dans la fissure séparant le tronc cérébral de l'hémisphère cérébral droit (Figure A5, ROI 1). Le Magnevist diffuse ensuite dans le parenchyme cérébral et atteint l'hémisphère controlatéral environ 1 heure suite à l'OBHE (Figures A5 et A6, ROI 1 à 5). Cette diffusion du Magnevist semble donc s'effectuer selon un gradient de concentration permettant de produire une distribution uniforme de l'agent dans le parenchyme de l'hémisphère traité en moins d'une heure suite à la procédure d'OBHE. Cette observation n'a été effectuée que pour le Magnevist; nous supposons donc que le Gadomer est trop volumineux pour diffuser facilement dans le milieu interstitiel, et cette hypothèse correspond également avec la longue durée de son temps d'élimination.

Ces résultats ont été obtenus à l'aide d'agents de contraste se substituant pour des agents de chimiothérapie puisque ces derniers ne sont pas détectables par IRM. Le poids des agents de chimiothérapie varie typiquement de 0,2 à 1,2 kDa. L'utilisation de 2 agents de contraste de poids moléculaire faible et élevé nous permet donc

d'estimer l'accumulation, la distribution et l'élimination des divers agents antinéoplasiques utilisés en concomitance avec la procédure d'OBHE. De plus, les données que nous avons obtenues semblent nous indiquer que suite à leur acheminement dans l'hémisphère traité, les agents de faible poids moléculaire diffusent dans le parenchyme cérébral jusqu'à atteinte de l'hémisphère controlatéral. Nous avons également produit certaines données préliminaires démontrant que pour le Magnevist, même en présence d'une pression oncotique interstitielle, le processus d'OBHE se déroulerait de la même façon chez les animaux porteurs de tumeur cérébrale.

Les différences observées pour le Magnevist et le Gadomer peuvent être utilisées pour améliorer le choix des agents de chimiothérapie. En effet, il existe des agents de chimiothérapie phase spécifique et phase non-spécifique au cycle cellulaire. Les agents phase spécifique agissent sur la cellule cancéreuse durant un stade précis du cycle cellulaire. Ils doivent donc être en présence de la cellule cancéreuse assez longtemps afin que la cellule entre dans le stade du cycle auquel l'agent pourra effectuer son action cytotoxique. Dans ce cas, l'efficacité des agents antinéoplasiques est liée à la concentration maximale atteinte multipliée par le temps d'exposition aux cellules tumorales. Les agents phase non-spécifique agissent à n'importe quel stade du cycle cellulaire, et donc le facteur important est principalement la concentration maximale atteinte au contact des cellules cancéreuses. Puisque, les grosses molécules ont un temps d'élimination plus long, il serait préférable d'utiliser des agents phase

spécifique ayant un haut poids moléculaire pour maximiser le potentiel thérapeutique de ce type d'agent. De plus, il serait peut-être préférable de diminuer l'utilisation d'agent phase non-spécifique de haut poids moléculaire, puisqu'une action cytotoxique sur des neurones et des cellules gliales normales est possible. Ces agents pourraient donc produire une neurotoxicité significative. En utilisant la même logique, puisque les petites molécules diffusent et s'éliminent plus rapidement que les grosses, il serait approprié d'utiliser des agents phase non-spécifique de faible poids moléculaire.

Les expériences menées par TEP ont livrés des résultats plus ambigus. Néanmoins, différentes informations peuvent être extraites des résultats obtenus (Fig. 15 et Tableau 3). Chez les animaux sains, les courbes des 2 hémisphères se superposent tout au long de l'acquisition. Lors de la première phase, les courbes de chaque hémisphère cérébral pour le groupe traité et contrôle sont semblables. Suite à l'administration du mannitol/salin, une augmentation de la pente de captation est observée pour chaque hémisphère sauf pour l'hémisphère controlatéral des animaux traités. Il est intrigant d'observer qu'il y a un changement de captation suite à l'administration du salin. Afin de déterminer si le changement de pente est dû à l'infusion, il sera nécessaire d'effectuer d'autres expériences en créant un nouveau groupe où il n'y aura qu'infusion de ^{18}F FDG durant 30 minutes durant l'acquisition de 150 minutes. La diminution de captation dans l'hémisphère controlatéral chez les animaux traités concorde avec des données de la littérature obtenues par autoradiographie au ^{14}C CDG

(PAPPIUS et al., 1979). Il semblerait donc, que le processus d'OBHE affecte moins le métabolisme de l'hémisphère ipsilatéral, que celui de l'hémisphère controlatéral chez les animaux traités. L'augmentation liquidienne de 1 à 1,5 % au cerveau, induite par l'OBHE déséquilibre la concentration d'électrolytes et de neurotransmetteurs au sein du LCR et pourrait causer une diminution de la conduction axonale (NEUWELT et al., 1980, GUMERLOCK et al., 1994, BELLAVANCE et al., 2008). Le choc osmotique ainsi que l'augmentation liquidienne cérébrale induits par l'OBHE pourraient donc être responsables de la diminution de l'activité des cellules composant la BHE ainsi que des neurones (RAPOPORT et al., 1971). Dans la plupart des études, la TEP est utilisée pour étudier un phénomène biologique précis, où il n'a qu'une population cellulaire ayant subi un changement. Dans, ce cas-ci, d'autres populations cellulaires que les neurones peuvent voir leur métabolisme altéré par l'OBHE. De plus, la perméabilisation de la BHE dans l'hémisphère traité permet probablement d'augmenter l'accumulation du ^{18}FDG de manière non spécifique au SNC. En utilisant la TEP, nous ne pouvons différencier la quantité de ^{18}FDG captée par les différentes populations cellulaires, de celle diffusant librement dans le liquide interstitiel. Ce qui pourrait expliquer que la captation observée dans l'hémisphère ipsilatéral des animaux traités ne semble pas être affectée par le processus d'OBHE.

Lors de la troisième phase, nous observons que le taux d'accumulation du ^{18}FDG au SNC est plus grand chez les animaux traités que non traités ($p < 0.0001$). La perméabilisation de la BHE a permis la pénétration au SNC de ^{18}FDG qui s'est

distribué dans les compartiments intra- et extracellulaire cérébraux. Le taux de captation ainsi observé n'est donc pas nécessairement dû à une augmentation de la captation, mais à l'altération de la BHE. Puisque les cellules du compartiment vasculaire autant que cérébral peuvent être affectées par le processus d'OBHE, les données recueillies lors de ces expériences ne nous permettent pas de faire la différenciation. D'autres études devront donc être effectuées afin d'approfondir la discussion des résultats obtenus par TEP.

Les résultats obtenus ont un potentiel très important pour le traitement des GBM en clinique. Cependant, d'autres études devront être effectuées avant de transposer ces résultats dans les protocoles de chimiothérapie cliniques impliquant l'OBHE. En effet, malgré que nos données préliminaires sur les animaux porteurs de tumeur cérébrale semblent démontrer que le processus d'OBHE s'effectue de la même façon que chez les animaux sains, une étude plus approfondie est nécessaire afin de s'en assurer. De plus, ces données n'ont été produites qu'en utilisant le Magnevist; d'autres expériences devront être effectuées avec le Gadomer. L'effet des traitements de premières lignes telles que la radiothérapie fractionnée, pouvant avoir un impact transitoire et permanent sur la BHE et modifier l'efficacité des traitements de chimiothérapie n'a pas été évalué dans cette étude. Ces données ayant été produites chez le rat ne sont pas nécessairement directement applicables chez l'homme. Cependant, plusieurs données obtenues concordent avec certaines observations obtenues en clinique telles que l'effet des facteurs hémodynamiques et le choix de

l'anesthésiant sur l'efficacité de la procédure d'OBHE (FORTIN et al., 2000, FORTIN et al., 2004).

VI. CONCLUSION

L'apport des résultats obtenus lors de ce projet de maîtrise sur la caractérisation du processus dynamique de l'OBHE est très innovateur. Même s'il reste beaucoup d'informations à obtenir afin de bien comprendre ce processus, l'implication clinique de ces données n'est pas négligeable. Nous sommes le premier groupe ayant fait une étude aussi extensive de la dynamique de l'OBHE par imagerie et à démontrer de façon claire que sa dynamique est différente pour les molécules de divers poids et taille moléculaire, depuis le modèle mathématique développé par Robinson et Rapoport (ROBINSON et RAPOPORT, 1987). Nous avons montré pour la première fois que l'accumulation maximale des agents au SNC est atteinte lorsqu'ils sont administrés 3 min post-OBHE. Aucun consensus n'avait été établi sur la fenêtre thérapeutique de l'OBHE, mais il était considéré que ce temps était de 20 minutes en clinique. Cependant, nous avons démontré que la BHE est toujours perméable 30 minutes post-OBHE aux molécules de faible poids moléculaire et qu'elle se referme 10 minutes post-OBHE pour les molécules de haut poids moléculaire. Le temps d'élimination des molécules accumulées au SNC suite à la procédure d'OBHE est étonnamment long : environ 4 heures pour les petites molécules et plus de 12 heures les grosses molécules. Il serait très intéressant d'effectuer des expériences supplémentaires afin de caractériser l'élimination du Gadomer dans le temps. L'accumulation spatiale des agents au niveau du SNC immédiatement suite à l'OBHE semble se produire principalement dans les ganglions de la base contrairement au

cortex chez l'humain. Afin de comprendre cette différence inter-espèce, nous procédons présentement à la caractérisation de la densité microvasculaire cérébrale chez le rat par immunohistochimie, en détectant un marqueur spécifique de microvaisseaux cérébraux chez le rat soit le « endothelial barrier antigen » (EBA).

La distribution des agents de faible poids moléculaire s'effectue possiblement par 2 mécanismes distincts. Premièrement, leur acheminement au SNC directement lié à la procédure d'OBHE. Deuxièmement, la diffusion de l'agent dans le parenchyme cérébral, suivant le gradient de concentration. Ce mécanisme de diffusion n'est pas observé pour les molécules de haut poids moléculaire. L'effet de l'OBHE sur le métabolisme cérébral devra être étudié davantage afin de permettre la formulation de conclusions de ces expériences. Nous devons effectuer des études TEP selon le même protocole, mais sans administration de salin et/ou mannitol. De plus, nous prévoyons utiliser la technique d'immunofluorescence à l'aide d'un analogue fluorescent du glucose soit le 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-dioxol-4-yl)amino]-2-deoxyglucose (2-NBDG). De cette façon, il sera possible d'identifier parmi les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux, les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes, lesquelles sont le plus affectées par l'OBHE. Ces données permettront de nous éclairer sur l'interprétation à faire des résultats obtenus par TEP.

Les données obtenues grâce à cette nouvelle méthodologie permettant l'étude de l'OBHE par imagerie, ouvrent une voie importante dans la caractérisation de

l'ouverture osmotique de la BHE et mèneront à une meilleure compréhension des paramètres régulant ce processus.

VII. REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier mes directeurs de recherche : les Drs David Fortin et Martin Lepage. Pour leur encadrement, pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires et pour m'avoir permis de travailler sur un projet merveilleux.

Merci également, à Dr. Luc Tremblay qui a eu un rôle important dans le développement de cette méthodologie ainsi que pour ses conseils scientifiques et personnels.

Merci également aux membres du jury; Dr. Benoit Paquette et Dr. Christian Beaulieu, pour le temps accordé et l'apport scientifique, au IRSC pour le financement de mon projet et à la compagnie Bayer pour leur don généreux de Gadomer.

Merci à tous les membres des laboratoires de neurochirurgie/neuro-oncologie et d'IRM et, plus particulièrement à Marie-Belle Poirier et surtout à Marc-André Bellavance.

Enfin, un très grand merci à ma famille et mes amis (es), qui sont très importants pour moi et qui m'ont toujours supportée et encouragée, malgré le fait que je les ai énormément délaissés durant mes études.

VIII. RÉFÉRENCES

- Abbott, N. J. (2002). "Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability." J Anat 200(6): 629-38.
- Abbott, N. J., L. Rönnbäck, et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nat Rev Neurosci 7(1): 41-53.
- Albert, F. K., M. Forsting, et al. (1994). "Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis." Neurosurgery 34(1): 45-60; discussion -1.
- Bart, J., H. J. Groen, et al. (2000). "The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation." Cancer Treat Rev 26(6): 449-62.
- Barth, R. F. (1998). "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas." J Neurooncol 36(1): 91-102.
- Bellavance, M., M. Blanchette, et al. (2008). "Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy." AAPS J 10(1): 166-77.
- Berger MS, Leibel SA, Bruner JM et al (2002) Primary cerebral tumors. In: Levin VA (ed) Cancer in the nervous system, 2nd edn. Oxford, New York
- Bernacki, J., A. Dobrowolska, et al. (2008). "Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier." Pharmacol Rep 60(5): 600-22.

- Bickel, U., T. Yoshikawa, et al. (2001). "Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier." Adv Drug Deliv Rev 46(1-3): 247-79.
- Blanchard, J., D. Mathieu, et al. (2006). "MR-pathological comparison in F98-Fischer glioma model using a human gantry." The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques 33(1): 86-91.
- Bredel, M. (2001). "Anticancer drug resistance in primary human brain tumors." Brain Res Brain Res Rev 35(2): 161-204.
- Brightman, M. W., M. Hori, et al. (1973). "Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium." J Comp Neurol 152(4): 317-25.
- Brightman, M. W. and T. S. Reese (1969). "Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain." J Cell Biol 40(3): 648-77.
- Brown, R. C. and T. P. Davis (2002). "Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke." Stroke 33(6): 1706-11.
- Cardoso, A. L., S. Simões, et al. (2007). "siRNA delivery by a transferrin-associated lipid-based vector: a non-viral strategy to mediate gene silencing." The journal of gene medicine 9(3): 170-83.
- Claes, A., A. Idema, et al. (2007). "Diffuse glioma growth: a guerilla war." Acta Neuropathol 114(5): 443-58.
- Coomber, B. L. and P. A. Stewart (1985). "Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium." Microvasc Res 30(1): 99-115.

- Crossen, J. R., D. Garwood, et al. (1994). "Neurobehavioral sequelae of cranial irradiation in adults: a review of radiation-induced encephalopathy." J Clin Oncol 12(3): 627-42.
- Dandy W.E. (1928). "Removal of the right hemisphere for certain tumors with hemiplegia: preliminary report. " J Am Med Assoc 90:823–825
- de Boer, A. G. and P. J. Gaillard (2007). "Drug targeting to the brain." Annu Rev Pharmacol Toxicol 47: 323-55.
- DeAngelis, L. M. (2001). "Brain tumors." N Engl J Med 344(2): 114-23.
- Doolittle, N. D., M. E. Miner, et al. (2000). "Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors." Cancer 88(3): 637-47.
- Dorovini-Zis, K., P. D. Bowman, et al. (1984). "Hyperosmotic arabinose solutions open the tight junctions between brain capillary endothelial cells in tissue culture." Brain Res 302(2): 383-6.
- Elliott, P. J., N. J. Hayward, et al. (1996). "Intravenous RMP-7 selectively increases uptake of carboplatin into rat brain tumors." Cancer Res 56(17): 3998-4005.
- Fortin, D. (2003). "Altering the properties of the blood-brain barrier: disruption and permeabilization." Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progrès des recherches pharmaceutiques 61: 125-54.
- Fortin, D., R. Adams, et al. (2004). " A blood-brain barrier disruption model eliminating the hemodynamic effect of ketamine." The Canadian journal of

neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques 31(2):
248-53.

Fortin, D., A. Desjardins, et al. (2005). "Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in malignant brain tumors: the Sherbrooke experience." Cancer 103(12): 2606-15.

Fortin, D., C. Gendron, et al. (2007). "Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in the treatment of cerebral metastasis." Cancer 109(4): 751-60.

Fortin, D., C.I. McCormick, et al. (2000). "Unexpected neurotoxicity of etoposide phosphate administered in combination with other chemotherapeutic agents after the blood-brain barrier modification to enhance delivery, using propofol for general anesthesia, in a rat model." Neurosurgery 47(1): 199-207.

Grant, G. A., N. J. Abbott, et al. (1998). "Understanding the Physiology of the Blood-Brain Barrier: In Vitro Models." News Physiol Sci 13: 287-93.

Gumerlock, M.K., York, D, Durkis D,(1994). Visual evoked responses as a Monitor of Intracranial Pressure during hyperosmolar blood-brain barrier disruption. Acta Neurochir [Suppl] 60:132-35.

Groothuis, D.R., Warkne P.C., et al.(1990). "Effect of hyperosmotic blood-brain disruption on transcapillary transport in canine brain tumors" J Neurosurg 72(3): 441-9.

Hashemi, R.H., Bradley W.G., et al. (2003). *Mri: The basics*, 2^{ème} édition, Lippincott Williams & Wilkins, 353 p.

- Hösli, P., A. P. Sappino, et al. (1998). "Malignant glioma: should chemotherapy be overthrown by experimental treatments?" Ann Oncol 9(6): 589-600.
- Huber, J. D., R. D. Egleton, et al. (2001). "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier." Trends Neurosci 24(12): 719-25.
- Huynh, G., D. Deen, et al. (2006). "Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors." Journal of Controlled Release 110(2): 236-59.
- Hynynen, K. (2008). "Ultrasound for drug and gene delivery to the brain." Adv Drug Deliv Rev 60(10): 1209-17.
- Inamura, T., T. Nomura, et al. (1994). "Intracarotid infusion of RMP-7, a bradykinin analog: a method for selective drug delivery to brain tumors." J Neurosurg 81(5): 752-8.
- Janzer, R. C. and M. C. Raff (1987). "Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells." Nature 325(6101): 253-7.
- Johnström P., T.D. Fryer et al. (2005). "Dynamic in vivo imaging of receptors in small animals using positron emission tomography." Methods Mol Biol 306: 217-32
- Jolesz, F. A. and N. McDannold (2008). "Current status and future potential of MRI-guided focused ultrasound surgery." Journal of magnetic resonance imaging : JMRI 27(2): 391-9.
- Kastler B, Vetter D. et al. (2006) Comprendre l'IRM : Manuel d'auto-apprentissage. 6^{ème} édition. Masson. 382 p.

- Kessler, R. M., J. C. Goble, et al. (1984). "Measurement of blood-brain barrier permeability with positron emission tomography and [68Ga]EDTA." J Cereb Blood Flow Metab 4(3): 323-8.
- Kleihues P, Burger PC, et al. (1995). " Histological typing of tumors of the central nervous system. International Histological Classification of Tumours ". Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- Kleihues, P., D. N. Louis, et al. (2002). "The WHO classification of tumors of the nervous system." J Neuropathol Exp Neurol 61(3): 215-25; discussion 26-9.
- Kroll, R. A. and E. A. Neuwelt (1998). "Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means." Neurosurgery 42(5): 1083-99; discussion 99-100.
- Lacroix, M., D. Abi-Said, et al. (2001). "A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival." J Neurosurg 95(2): 190-8.
- Landis, C.S., X. Li, et al. (2000). "Determination of the MRI contrast agent concentration time course in vivo following bolus injection: Effect of equilibrium transcytolemmal water exchange." Magnetic resonance in medicine 44(4): 563-74.
- Mathieu, D., R. Lecomte, et al. (2007). "Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model." The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques 34(3): 296-306.

- McMurry, T. J., D. J. Parmelee, et al. (2002). "The effect of phosphodiester linking group on albumin binding, blood half-life, and relaxivity of intravascular diethylenetriaminepentaacetato aquo gadolinium(III) MRI contrast agents." Journal of Medicinal Chemistry 45(16): 3465-74.
- Misra, A., S. Ganesh, et al. (2003). "Drug delivery to the central nervous system: a review." Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques 6(2): 252-73.
- Misselwitz, B., H. Schmitt-Willich et al. (2001). "Pharmacokinetics of Gadomer-17, a new dendritic magnetic resonance contrast agent." Magma 12(2-3): 128-34.
- Muldoon, L. L., C. Soussain, et al. (2007). "Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check." J Clin Oncol 25(16): 2295-305.
- Nagaraja, T. N., R. L. Croxen, et al. (2006). "Application of arsenazo III in the preparation and characterization of an albumin-linked, gadolinium-based macromolecular magnetic resonance contrast agent." J Neurosci Methods 157(2): 238-45.
- Neuwelt, E.A., P.A. Barnett, et al. (1982). "Effects of adrenal cortical steroids and osmotic blood-brain barrier opening on methotrexate delivery to gliomas in the rodent: the factor of the blood-brain barrier." Proc Natl Acad Sci USA 79(14): 4420-3.

- Neuwelt, E. A., K. R. Maravilla, et al. (1979). "Osmotic blood-brain barrier disruption. Computerized tomographic monitoring of chemotherapeutic agent delivery." J Clin Invest 64(2): 684-8.
- Neuwelt, E.A., Frenkel E.P. et al. (1980). "Effect of osmotic blood-brain barrier disruption on methotrexate pharmacokinetics in the dog. Neurosurg 7:36-42.
- Pappius, H. M., H. E. Savaki, et al. (1979). "Osmotic opening of the blood-brain barrier and local cerebral glucose utilization." Ann Neurol 5(3): 211-9.
- Pardridge, W. M. (2005). "The blood-brain barrier and neurotherapeutics." NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics 2(1): 1-2.
- Pardridge, W. M. (2005). "The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development." NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics 2(1): 3-14.
- Pardridge, W. M. (2007)A. "Blood-brain barrier delivery." Drug Discov Today 12(1-2): 54-61.
- Pardridge, W. M. (2007)B. "Drug Targeting to the Brain." Pharm Res 24(9): 1733-44.
- Prados, M.D., S.C. Schold SC JR, S. C., et al. (2003) " A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma." Neuro-Oncology 5(2): 96-103.
- Rapoport, S. I. (2000). "Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications." Cell Mol Neurobiol 20(2): 217-30.

- Rapoport, S.I., D.S. Bachman, et al. (1972). "Chronic effects of osmotic opening of the blood-brain barrier in the monkey." *Science* 176(40): 1243-5.
- Rapoport, S. I., W. R. Fredericks, et al. (1980). "Quantitative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier." *Am J Physiol* 238(5): R421-31.
- Rapoport, S. I., M. Hori, et al. (1971). "Reversible osmotic opening of the blood-brain barrier." *Science* 173(4001): 1026-8.
- Rapoport, S. I. and P. J. Robinson (1986). "Tight-junctional modification as the basis of osmotic opening of the blood-brain barrier." *Ann N Y Acad Sci* 481: 250-67.
- Rapoport, S. I. and H. K. Thompson (1973). "Osmotic opening of the blood-brain barrier in the monkey without associated neurological deficits." *Science* 180(89): 971.
- Reese, T. S. and M. J. Karnovsky (1967). "Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase." *J Cell Biol* 34(1): 207-17.
- Robinson, P. J. and S. I. Rapoport (1987). "Size selectivity of blood-brain barrier permeability at various times after osmotic opening." *Am J Physiol* 253(3 Pt 2): R459-66.
- Roman-Goldstein, S., D. A. Clunie, et al. (1994). "Osmotic blood-brain barrier disruption: CT and radionuclide imaging." *AJNR American journal of neuroradiology* 15(3): 581-90.
- Saunders, N. R., M. D. Habgood, et al. (1999). "Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(1): 11-9.

- Saunders, N. R., M. D. Habgood, et al. (1999). "Barrier mechanisms in the brain, II. Immature brain." Clin Exp Pharmacol Physiol 26(2): 85-91.
- Saunders, N. R., G. W. Knott, et al. (2000). "Barriers in the immature brain." Cell Mol Neurobiol 20(1): 29-40.
- Siegal, T., R. Rubinstein, et al. (2000). "In vivo assessment of the window of barrier opening after osmotic blood-brain barrier disruption in humans." J Neurosurg 92(4): 599-605.
- Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada : Statistiques canadiennes sur le cancer 2008, Toronto, Canada, 2008
- Stewart, P. A. (2000). "Endothelial vesicles in the blood-brain barrier: are they related to permeability?" Cell Mol Neurobiol 20(2): 149-63.
- Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med 352(10): 987-96.
- Su M.Y., Wang Z. et al. (1999) "Investigation of longitudinal vascular changes in control and chemotherapy-treated tumors to serve as therapeutic efficacy predictors." Journal of magnetic resonance imaging 9(1): 128-37.
- Vein, A. A. (2008). "Science and fate: Lina Stern (1878-1968), a neurophysiologist and biochemist." Journal of the history of the neurosciences 17(2): 195-206.
- Wang, J., X. Wang, et al. (2008). "Partial biological characterization of cancer stem-like cell line (WJ(2)) of human glioblastoma multiforme." Cell Mol Neurobiol 28(7): 991-1003.

- Warnke, P.C., R.G. Blasberg et al. (1987). "The effect of hyperosmotic blood-brain barrier disruption on blood-to-tissue transport in ENU-induced gliomas." Ann Neurol 22: 300-5.
- Wechsler-Reya, R. and M. P. Scott (2001). "The developmental biology of brain tumors." Annu Rev Neurosci 24: 385-428.
- Wolburg, H., S. Noell, et al. (2009). "Brain endothelial cells and the glio-vascular complex." Cell Tissue Res 335(1): 75-96.
- Zünkeler, B., R. E. Carson, et al. (1996). "Hyperosmolar blood-brain barrier disruption in baboons: an in vivo study using positron emission tomography and rubidium-82." J Neurosurg 84(3): 494-502.