



Université de Sherbrooke

**Acheminement et chimiorésistance, deux grandes limitations dans le traitement des tumeurs cérébrales**

Par  
Marie Blanchette  
Programmes de Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)  
en Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Sherbrooke, Québec, Canada  
Juin, 2014

Membres du jury d'évaluation  
Pr David Fortin, programme de Chirurgie  
Pr Martin Lepage, programme de Sciences des radiations et imagerie biomédicale  
Pr Roger Lecomte, programme de Sciences des radiations et imagerie biomédicale  
Pr Kevin Whittingstall, programme de Sciences des radiations et imagerie biomédicale  
Pre Nathalie Rivard, programme d'anatomie et biologie cellulaire  
Pr Frédéric Calon, Faculté de Pharmacie, Université Laval

© Marie Blanchette, 2014

*« Les faits ne cessent pas d'exister parce qu'ils sont ignorés. »  
- Aldous Huxley*

## RÉSUMÉ

### Acheminement et chimiorésistance, les deux grandes limitations dans le traitement des tumeurs cérébrales

Par

Marie Blanchette

Programmes de Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en Sciences des radiations et imagerie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les gliomes malins constituent les tumeurs cérébrales primaires les plus agressives et le glioblastome (GBM) est la plus fréquente et agressive d'entre elles. La survie médiane associée n'est que de 14,6 mois. Dû au caractère hautement invasif de ces tumeurs, la résection maximale de la tumeur doit impérativement être suivie de traitement de radio-et/ou chimiothérapie. Cependant, la présence de la barrière hématoencéphalique et des mécanismes de chimiorésistance, tel que les pompes à efflux, limitent l'acheminement et l'efficacité des composés aux cellules tumorales. L'ouverture osmotique de la barrière hématoencéphalique (OBHE) a été développée afin d'améliorer l'acheminement d'agents anti-néoplasiques au cerveau et à la tumeur. Bien que plusieurs études aient été effectuées afin de caractériser son processus, beaucoup d'informations restent à découvrir afin d'approfondir nos connaissances sur l'OBHE et améliorer son application en clinique. Avec l'objectif ultime de contourner ces deux obstacles, j'ai caractérisé le processus dynamique de l'OBHE pour deux molécules de tailles différentes par imagerie par résonance magnétique dynamique, ainsi que pour une molécule étant un substrat des pompes à efflux par tomographie d'émission par positron dans le modèle murin Fischer-F98. J'ai également étudié l'expression et la localisation de différentes pompes à efflux par PCR quantitative et immunohistochimie dans des spécimens de gliomes malins. Les résultats obtenus démontrent que la barrière hémato-tumorale limite l'acheminement à la tumeur de composés de différent poids moléculaire. L'acheminement au parenchyme cérébral et à la tumeur suite à une procédure d'OBHE est aussi dépendant du poids moléculaire et de la taille de la molécule à acheminer. L'OBHE à moins d'être de qualité excellente, ne semble pas suffisante pour acheminer au parenchyme cérébral des substrats des pompes à efflux. Les GBM expriment la MRP1, MRP3 et BCRP à différents niveaux. La PGP, MRP1 et BCRP sont exprimées par les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux. L'ensemble de ces résultats suggère que l'administration d'agents thérapeutiques suite à la procédure d'OBHE doit être optimisée selon l'agent administré et que l'inhibition de pompes à efflux ou une autre stratégie rendant les agents de chimiothérapie invisibles aux pompes à efflux sera bénéfique pour améliorer leur acheminement au système nerveux central et aux cellules tumorales.

**Mots clés :** barrière hématoencéphalique, barrière hémato-tumorale, ouverture de la barrière hématoencéphalique, pompes à efflux, glioblastome multiforme

## TABLE DES MATIERES

<b>Résumé .....</b>	<b>iii</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>iv</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>x</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Les tumeurs cérébrales .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Le traitement du glioblastome multiforme et survie associée .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 La limitation de l'efficacité des traitements.....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Le caractère invasif.....	5
1.3.2 Le radiorésistance.....	6
1.3.3 La chimiorésistance.....	7
1.3.3.1 Les transporteurs ABC.....	7
1.3.3.2 Les inhibiteurs de PGP.....	10
1.3.4 La barrière hémato-encéphalique.....	11
1.3.5 La barrière hémato-tumorale .....	14
1.3.5.1 La perfusion tumorale .....	15
<b>1.4 Acheminement au système nerveux central .....</b>	<b>18</b>
1.4.1 Injection intracérébroventriculaire.....	18
1.4.2 Injection intracérébrale.....	18
1.4.3 Chevaux de Troie .....	19
1.4.4 Formulations liposomales .....	20
1.4.5 Perméabilisation de la BHE par ultrasons.....	21
1.4.6 Perméabilisation pharmacologique de la BHE .....	22
1.4.7 Perméabilisation osmotique de la BHE.....	23
1.4.7.1 Perméabilisation osmotique de la BHE chez l'humain .....	26
1.4.7.2 Perméabilisation osmotique de la BHE chez l'animal.....	29
<b>1.5 Acheminement aux cellules tumorales gliales infiltratives.....</b>	<b>31</b>
<b>Problématique.....</b>	<b>33</b>
Objectifs.....	33
<b>Objectif 1 .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Article 1.....</b>	<b>31</b>

<b>Objectif 2</b> .....	<b>68</b>
<b>3.1 Introduction</b> .....	<b>68</b>
<b>3.2 Matériels et méthodes</b> .....	<b>68</b>
3.2.1 Provenance des tissus .....	69
3.2.2 Extraction d'ARN, mesure de la qualité de l'ARN et synthèse d'ADNc .....	70
3.2.3 qPCR .....	71
3.2.3 Préparation des tissus pour immunohistochimie .....	74
3.2.4 Immunohistochimie .....	74
3.2.5 Analyse .....	76
3.2.6 Analyse statistique .....	76
<b>3.3 Résultats</b> .....	<b>77</b>
3.3.1 Détermination des gènes de références à utiliser dans les gliomes malins .....	77
3.3.2 Quantification de leur expression dans les échantillons de cerveaux sains et de GBM .....	80
3.3.3 Quantification de la modulation de leur expression associée à la progression tumorale .....	82
3.3.4 Localisation des pompes à efflux dans les échantillons de GBM .....	83
<b>Objectif 3</b> .....	<b>85</b>
<b>4.1 Introduction</b> .....	<b>85</b>
<b>4.2 Matériels et méthodes</b> .....	<b>85</b>
4.2.1 Animaux .....	85
4.2.2 Groupes à l'étude .....	86
4.2.3 Modèle animal .....	86
4.2.4 Imagerie par résonance magnétique dynamique .....	87
4.2.5 Procédure d'OBHE .....	88
4.2.6 <sup>11</sup> C-carvedilol .....	88
4.2.7 Radiochimie .....	89
4.2.8 Tomographie d'émission par positrons .....	90
4.2.9 Compteur sanguin .....	91
4.2.10 Analyse .....	91
4.2.11 Analyse statistique .....	92
<b>4.3 Résultats</b> .....	<b>92</b>
4.3.1 Quantification de l'accumulation du <sup>11</sup> C-carvedilol à la tumeur .....	92
4.3.2 Quantification de l'accumulation du <sup>11</sup> C-carvedilol dans le parenchyme cérébral suite à l'OBHE .....	96

<b>Discussion.....</b>	<b>102</b>
<b>5.1 Objectif 1 : Comparaison de l'acheminement de deux composés de taille et poids moléculaire différents.....</b>	<b>102</b>
5.1.1 Durée de la perméabilité de la BHE suite à la procédure d'OBHE .....	102
5.1.2 Distribution des agents dans le parenchyme cérébral suite à l'OBHE .....	103
5.1.3 Acheminement d'agents à la tumeur et au SNC sans moduler la perméabilité de la BHE.....	104
5.1.4 Acheminement d'agents à la tumeur et au SNC suite à une procédure d'OBHE.....	104
<b>5.2 Objectif 2 : Expression et localisation de différentes pompes à efflux dans des échantillons de GBM.....</b>	<b>105</b>
5.2.1 Quantification de l'expression des pompes à efflux .....	105
5.2.2 Localisation de l'expression des pompes à efflux.....	108
<b>5.3 Objectif 3 : Évaluation de l'accumulation au parenchyme et à la tumeur d'un substrat des pompes à efflux suite à une procédure d'OBHE.....</b>	<b>109</b>
<b>5.4 Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>114</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>119</b>
<b>Liste des références.....</b>	<b>120</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>148</b>
Annexe 1 .....	149
Annexe 2 .....	150
Annexe 3 .....	151
Annexe 4 .....	152
Annexe 5 .....	154

## LISTE DES TABLEAUX

### INTRODUCTION

Tableau 1.1 Classification simplifiée des tumeurs gliales malignes .....	1
Tableau 1.2 Membres de la superfamille des transporteurs ABC .....	8
Tableau 1.3 Exemples d'agents anti-néoplasiques substrats de pompes à efflux.....	9

### OBJECTIF 1

Tableau 2.1 Maximal Gadomer concentration (mM) within the whole treated hemisphere. (mean $\pm$ S.E.M.).....	46
---	----

### OBJECTIF 2

Tableau 3.1 Nom du gène et de la protéine associée des différentes pompes à efflux étudiées. ....	69
Tableau 3.2 Séquences des amorces et sondes utilisées lors des réactions de qPCR.....	73
Tableau 3.3 Liste des anticorps et de leurs conditions d'utilisation. ....	75
Tableau 3.4 Rang global de variabilité des huit gènes étudiés .....	80

**Note :** Les tableaux sont numérotés selon le chapitre auquel ils appartiennent ainsi que leur ordre d'apparition dans ledit chapitre.

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

Figure 1.1 Évolution des gliomes malins et voies moléculaires impliquées. ....	2
Figure 1.2 Caractéristiques phénotypiques de la BHE .....	13
Figure 1.3 Perméabilisation de la BHE par choc osmotique .....	26
Figure 1.4 Biodistribution de composés au SNC et accumulation aux cellules tumorales ..	32

### OBJECTIF 1

Figure 2.1 The blood-brain barrier permeability to Gadomer is enhanced immediately after a BBBD procedure.....	45
Figure 2.2 BBBD therapeutic window for Gadomer in healthy Wistar rats.....	47
Figure 2.3 Representative T1-weighted axial MRI image 15 min post-contrast (A). ....	49
Figure 2.4 BTB and BBB delivery impediment demonstrated by tumor and parenchyma exposure to Magnevist and Gadomer for 30 minutes post-contrast agent injection on the initial scan. ....	50
Figure 2.5 (A) Magnevist and (B) Gadomer exposure for the 30 minutes following the CA injection after a BBBD procedure performed in glioma-bearing rats for different brain regions (mean $\pm$ S.E.M.).....	52
Supplementary Figure 2.S1. (A) Magnevist concentration determined by ICP-MS and MRI signal calculations.....	63
Supplementary Figure 2.S1. (B) Gadomer concentration determined by ICP-MS and MRI signal calculations.....	64
Supplementary Figure 2.S2. Diagram of the rat brain section corresponding to Figure 3A.	65
Supplementary Figure 2.S3. Signal enhancement over time in selected ROIs.....	66
Supplementary Figure 2.S4. Signal enhancement pattern for the whole dynamic for four different ROIs: tumor, muscle, ipsilateral and contralateral hemispheres for (A) Magnevist BBBD, (B) Magnevist control, (C) Gadomer BBBD and (D) Gadomer control groups. ....	67

**OBJECTIF 2**

Figure 3.1 Corrélation entre la qualité de l'ARN et la quantification de son expression par qPCR.....	78
Figure 3.2 Variabilité de l'expression de différents gènes de référence selon le type d'échantillons. ....	79
Figure 3.3 Niveau d'expression de l'ARNm de pompes à efflux dans du tissu issu de cerveaux sains et de GBM. ....	81
Figure 3.4 Modulation de l'expression des pompes à efflux dans les échantillons tumoraux à travers leur évolution. ....	82
Figure 3.5 Localisation des pompes à efflux étudiées. ....	84

**OBJECTIF 3**

Figure 4.1 Protocole d'imagerie TEP. ....	91
Figure 4.2 Courbes temps-activité du <sup>11</sup> C-carvedilol en % DI/g de tissus pour la tumeur et le volume équivalent dans l'hémisphère controlatéral. ....	94
Figure 4.3 Courbes temps-activité sanguines du <sup>11</sup> C-carvedilol (moyenne % DI/g).....	95
Figure 4.4 Ratio de l'accumulation du traceur dans le volume tumoral sur le volume controlatéral ....	96
Figure 4.5 Recalage des images TEP et IRM. ....	97
Figure 4.6 Courbes temps-activité pour le <sup>11</sup> C-carvedilol dans le parenchyme ipsilatéral et controlatéral. ....	100
Figure 4.7 Ratio de l'accumulation du <sup>11</sup> C-carvedilol dans le parenchyme ipsilatéral sur le parenchyme contralatéral.....	101

**Note :** Les figures sont numérotées selon le chapitre auquel elles appartiennent ainsi que leur ordre d'apparition dans ledit chapitre.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<i>ABCB1</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
<i>ABCCs</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), members
<i>ABCG2</i>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
AC	agent de contraste
<i>ACTB</i>	actin, beta
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	acide désoxyribonucléique génomique
AET	transport actif / <i>active efflux transport</i>
a. r.	avec rehaussement
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
<i>B2M</i>	beta-2-microglobuline
BBB	barrière hématoencéphaliques / <i>blood-brain barrier</i>
BBBD	ouverture de la barrière hématoencéphalique / <i>blood-brain barrier disruption</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
BHE	barrière hémato-encéphalique / <i>blood-brain barrier</i>
BHT	barrière hémato-tumorale / <i>blood-tumor barrier</i>
BSA	albumin sérique bovine / <i>bovine serum albumin</i>
BTB	barrière hémato-tumorale / <i>blood-tumor barrier</i>
CA	agent de contraste / <i>contrast agent</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cm	centimètre
CMT	transport médié par un transporteur / <i>carrier-mediated transport</i>
Da	dalton
DCE-MRI	<i>dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging</i>

EC	extracellulaire
EPR	perméabilité et rétention tissulaire / <i>enhanced permeability and retention</i>
eq	équivalent
FOXO	Forkhead box O
<i>GAPDH</i>	glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GBM	glioblastome
<i>GUSB</i>	glucuronidase, beta
<i>HPRT</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1
h	heure
IA	intra-artérielle
IDH	isocitrate déshydrogénase
IC	intracellulaire
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICV	intracérébroventriculaire
IgG	immunoglobuline G
IRM	imagerie par résonance magnétique
IP	intrapéritonéale
IV	intraveineuse
kg	kilogramme
km	kilomètre
L	litre
LCR	liquide céphalo-rachidien / <i>cerebrospinal fluid</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mg	milligramme
MGMT	O (6) Méthylguanine-DNA méthyltransférase
min	minute
mL	millilitre
MLEM	<i>Maximum-Likelihood Expectation-Maximization</i>
mM	millimolaire
mOsm	milliosmole

MRI	imagerie par resonance magnétique / <i>magnetic resonance imaging</i>
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
OATP	<i>organic anion-transporting polypeptide</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
NF1	neurofibromin 1
PBS	tampon phosphate saline / phosphate buffered saline
PEG	polyéthylène glycol
PFA	paraformaldéhyde
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PGP	Glycoprotéine P / <i>P-glycoprotein</i>
<i>PTEN</i>	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	réaction en chaîne par polymérase quantitative
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RMT	transport médié par récepteur / <i>receptor-mediated transport</i>
RPLP0	protéine ribosomale large P0 / <i>ribosomal protein, large, P0</i>
ROI	région d'intérêt / <i>region of interest</i>
s	seconde
SEM	erreur standard de la moyenne / <i>standard error of the mean</i>
SFRS9	<i>serine/arginine-rich splicing factor 9</i>
SNC	système nerveux central / <i>central nervous system</i>
SNP	polymorphisme nucléotidique / <i>single-nucleotide polymorphism</i>
s. r.	sans rehaussement
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TDM/CT	tomodensitométrie / <i>computed tomography</i>
TE	Tampon Tris-EDTA
TEP	tomographie d'émission par positron

# INTRODUCTION

## 1.1 Les tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales comprennent les tumeurs cérébrales primaires ainsi que les tumeurs cérébrales secondaires. Les tumeurs cérébrales primaires sont celles qui prennent naissance dans le cerveau. Les tumeurs cérébrales secondaires sont donc les métastases, des tumeurs ayant pris naissance dans un autre organe, ayant ensuite migré et colonisé le système nerveux central (SNC).

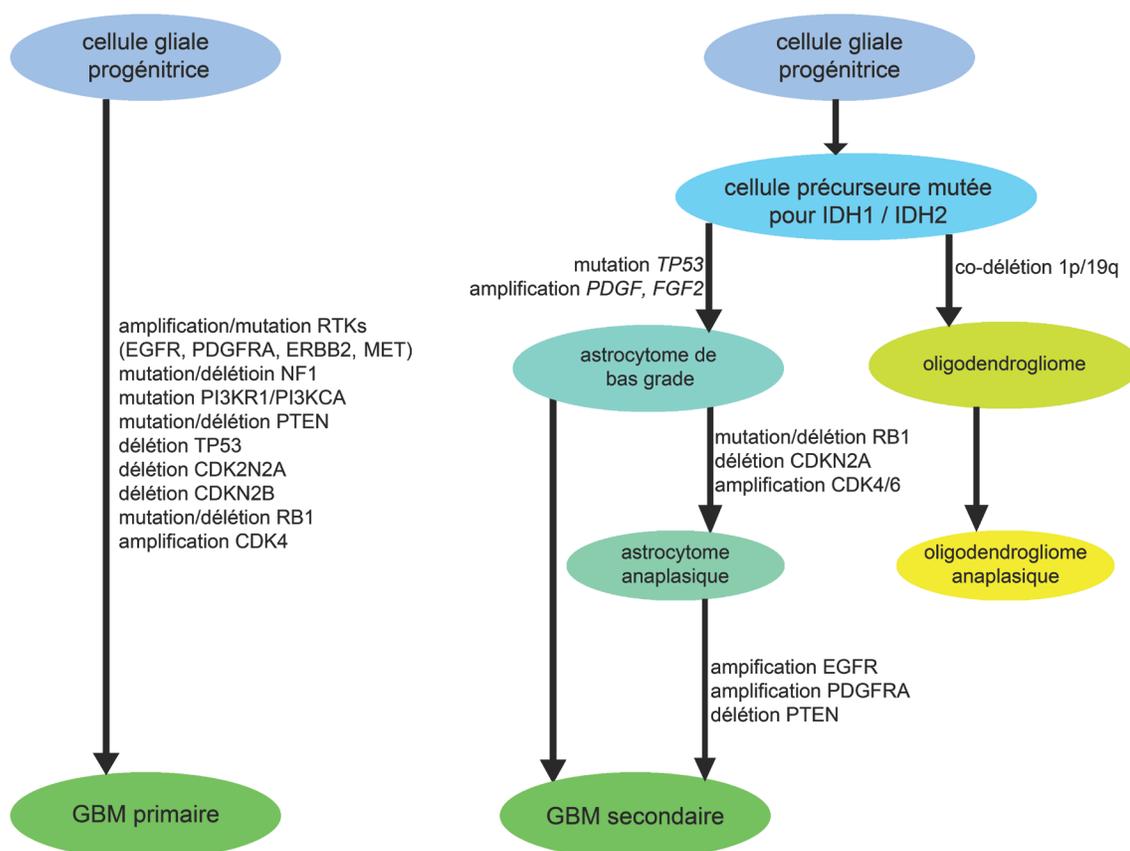
Les gliomes malins sont les tumeurs primaires malignes les plus fréquentes et ont une incidence d'environ 5 nouveaux cas par 100 000 habitants (Ostrom et al., 2013). La classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour ces tumeurs les divise principalement selon leur type cellulaire et le grade correspondant à leur agressivité (Tableau 1.1).

**Tableau 1.1 Classification simplifiée des tumeurs gliales malignes**

	<b>Astrocytomes</b>	<b>Oligodendrogliomes</b>	<b>Tumeurs mixtes</b>
<b>Grade 2</b>	astrocytome de bas grade	oligodendrogliome de bas grade	oligoastrocytome de bas grade
<b>Grade 3</b>	astrocytome anaplasique	oligodendrogliome anaplasique	oligoastrocytome anaplasique
<b>Grade 4</b>	glioblastome	-	-

La fréquence du glioblastome compte pour 60 à 70 % des gliomes malins (Wen et Kesari, 2008). Ainsi son incidence est d'environ 2-3 cas par 100 000 habitants et il touche plus fréquemment les hommes. Il peut apparaître *de novo*, il est ainsi nommé glioblastome

(GBM) primaire et secondaire lorsqu'il provient de l'évolution d'un astrocytome de grade II ou de grade III. Le GBM primaire se développe entre 3 à 6 mois, tandis que l'évolution d'un astrocytome de bas grade vers un GBM secondaire peut s'étendre sur une période de 5 à 10 ans. Le GBM primaire est la plus fréquente des deux formes (~ 90 %) et touche une population plus âgée, d'environ 65 ans comparativement à 45 ans pour les GBM secondaires.



**Figure 1.1. Évolution des gliomes malins et voies moléculaires impliquées.** Plusieurs voies et mutations sont impliquées dans l'ontogenèse des gliomes malins.

Plusieurs mutations ou altérations des voies de signalisation sont observées dans les deux sous-types de GBM : la délétion de *CDKN2A*, la mutation de *PTEN* et *TP53*, l'amplification de *CDK4*, la dérégulation des voies de signalisation des récepteurs tyrosines kinases incluant NF1-RAS-RAF-MAPK et PTEN-PI3K-AKT-mTOR-FOXO. Les GBM primaire et secondaire se comportent de la même façon cliniquement, cependant il a été

démontré que différentes mutations et voies de signalisation seraient impliquées dans l'oncogenèse du GBM primaire et du GBM secondaire. Les mutations propres au développement d'un type de tumeur sont illustrées à la Figure 1.1 (Germano *et al.*, 2010; Idbaih, 2011).

Suite au diagnostic d'un GBM, le pronostic peut varier selon plusieurs données cliniques, premièrement l'âge du patient, son état fonctionnel évalué en utilisant l'échelle de Karnofsky, l'étendue de la tumeur ainsi que le pourcentage de la résection de la tumeur (Lamborn *et al.*, 2004; Dea *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2012). Toutefois, ces tumeurs sont très hétérogènes et par conséquent la réponse des patients est également très variable. Ainsi, plusieurs études passées et en cours travaillent à découvrir de nouveaux biomarqueurs afin d'augmenter la précision du pronostic, mais également pour prodiguer des soins personnalisés. Parmi ceux-ci, la co-délétion des bras chromosomiques 1p/19q chez l'oligodendrogliome correspond à une chimiosensibilité de la tumeur et un bon facteur pronostique; l'hyperméthylation du promoteur du gène dont est issue la protéine MGMT ainsi que la mutation d'IDH1 et d'IDH2 seraient également de bons facteurs pronostiques (Cairncross et Jenkins, 2008; Figarella-Branger *et al.*, 2011; Ohgaki et Kleihues, 2011; Wick *et al.*, 2013). Il est à noter que la mutation d'IDH1 et IDH2 comme indiquée à la Figure 1.1 ne serait associée qu'aux GBM secondaires. Dans une importante étude publiée en 2010, les auteurs ont fait l'analyse des mutations génomiques présentes dans 202 cas de GBM de la Banque TCGA (The Cancer Genome Atlas). Leurs résultats leur ont permis d'effectuer une sous-classification moléculaire des GBM : classique, mésenchymal, neural et proneural (Verhaak *et al.*, 2010). Cette nouvelle classification pourrait dans le futur être utilisée comme outil pronostique ou à des fins de médecine personnalisée. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de valider son utilisation.

## **1.2 Le traitement du glioblastome multiforme et survie associée**

La résection maximale de la masse tumorale constitue la première étape de traitement. Puisque les gliomes malins sont des tumeurs hautement infiltratives, elles

envahissent le parenchyme cérébral sain et rendent impossible la complète résection de la lésion. Après quelques mois ou années, il y aura récurrence de la lésion en périphérie de la marge de résection ou à distance, incluant l'atteinte de l'hémisphère controlatéral (Giese et Westphal, 1996).

Dr Walter Dandy, un des pères de la neurochirurgie, a fait une étude de 7 cas au début du 20<sup>e</sup> siècle où il retirait complètement l'hémisphère porteur de la tumeur afin d'augmenter la survie de ses patients. Cependant, ses patients sont tous décédés en moins de deux ans dû à la récurrence de leur tumeur dans l'hémisphère controlatéral (Dandy, 1928). Il faut donc retenir de cette étude que la résection complète de ce type de tumeur est impossible. Cependant, il a été démontré que plus grande est l'étendue de la résection meilleure sera la survie des patients (Albert *et al.*, 1994; Dea *et al.*, 2012; Lacroix *et al.*, 2001; Sanai et Berger, 2011). Une résection d'une étendue de 65 % comparativement à une résection de plus de 90 % de la tumeur est associée à une survie médiane globale de 271 et 519 jours respectivement (Dea *et al.*, 2012). Une résection sécuritaire et extensive de la majeure partie de la tumeur est donc essentielle afin de maximiser autant la qualité de vie que la survie des patients. L'exérèse extensive de la tumeur doit impérativement être suivie par des traitements de radio- et/ou chimiothérapie.

Les traitements de radiothérapie ont été les premiers à être identifiés comme pouvant améliorer la survie des patients atteints de gliomes malins en faisant passer la survie de 3-4 mois suite à une chirurgie à 7-12 mois lorsque la chirurgie est combinée à un traitement de radiothérapie (Walker *et al.*, 1978). Plusieurs combinaisons de traitements adjuvants ont été testées afin d'améliorer la survie des patients. Ce n'est qu'en 2005 que le premier traitement considéré comme efficace a été identifié. Le protocole Stupp est ainsi devenu le traitement standard de première ligne pour le traitement des GBM. Ce dernier combine la radiothérapie fractionnée en concomitance avec la prise orale quotidienne de témozolomide pendant 6 semaines, suivi d'un traitement adjuvant de témozolomide d'une durée de six mois. Ce traitement est devenu le standard à offrir comme première ligne de traitement puisqu'il a été démontré qu'il permettait d'augmenter la survie et la survie sans progression

tumorale comparativement à la radiothérapie seule. La survie médiane associée à ce traitement est de 14,6 mois et le taux de survie à 5 ans de 9,8 % (Stupp *et al.*, 2005).

Malgré cette avancée, la majorité des tumeurs récidiveront dans un temps médian de 6,9 mois suite au traitement standard (Stupp *et al.*, 2005). À ce moment, il existe une grande diversité de traitements pouvant être offerts aux patients. Il n'y a cependant pas de consensus ou de ligne directrice à suivre pour les traitements subséquents. Par conséquent, les traitements administrés varieront principalement selon les protocoles de recherche cliniques offerts dans l'établissement où les patients recevront leurs soins.

### **1.3 La limitation de l'efficacité des traitements**

Le sombre pronostic associé à cette maladie s'explique par trois principaux facteurs : 1) le caractère hautement invasif de ce type de tumeur, rendant impossible la résection complète des cellules tumorales gliales, 2) la radio- et/ou chimiorésistance intrinsèque ou acquise des cellules tumorales, ainsi que 3) la présence de la barrière hématoencéphalique et de la barrière hémato-tumorale qui limitent l'acheminement des agents anti-néoplasiques.

#### ***1.3.1 Caractère invasif***

Comme discuté plus tôt, ces tumeurs sont hautement invasives et vont envahir le parenchyme cérébral sain à distance de la lésion tumorale principale. Ce qui n'est pas observé avec les méningiomes, une tumeur cérébrale primaire circonscrite qui est curable par chirurgie. L'invasion des cellules cancéreuses des gliomes malins est multifactorielle et implique l'interaction entre les cellules tumorales avec la matrice extracellulaire et le tissu cérébral sain (Bellail *et al.*, 2004). Plusieurs études effectuées *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les cellules tumorales gliales migrent préférentiellement en suivant les fibres de la matière blanche et dans la matrice extracellulaire (Albert *et al.*, 1994; Giese *et al.*, 1994; Giese *et al.*, 1995; Giese *et al.*, 1996). Les cellules tumorales gliales auraient une

préférence d'adhérence pour la myéline, composante importante des fibres de la matière blanche qui pourrait en partie expliquer l'invasion préférentielle des GBM suivant ces voies et pour la merosine, une protéine de la matrice extracellulaire (Gieise *et al.*, 1996; Pedersen *et al.*, 1993). Les métalloprotéinases matricielles sont également hautement exprimées par plusieurs types de cancer, dont les gliomes malins (Fillmore, VanMeter et Broaddus, 2001). Ces enzymes en dégradant les composantes de la matrice extracellulaire participent au processus d'invasion des cellules tumorales.

Le caractère hautement invasif de ces tumeurs a également été observé suite à l'autopsie de patients atteints de GBM. Selon ces études, dans 45 % des cas la tumeur s'étendait sur plus d'un lobe, dans 25 % sur tout l'hémisphère et dans 25 à 30 % atteignait l'hémisphère contralatéral (Scherer, 1940; Salazar et Rubin; 1976). Dans une étude publiée au début des années 60, les auteurs ont observé que dans 47 % des cas étudiés, il y avait invasion des cellules tumorales gliales dans l'hémisphère contralatéral (Matsukado, MacCarty et Kernohan, 1961). Ainsi en migrant le long du corps calleux ou de la capsule interne, les cellules tumorales gliales atteignent l'hémisphère contralatéral. Ces cellules ayant envahi le parenchyme sain à distance du nodule principal se retrouvent à l'abri des agents anti-néoplasiques, car la BHE y est toujours saine et intacte (Giese et Westphal, 1996; Mcmillan *et al.*, 2009).

### ***1.3.2 La radiorésistance***

Les principaux mécanismes de résistance associés à la radiothérapie sont les mécanismes de réparation de l'ADN. Il est à noter que les GBMs deviendront tous radio-résistants et par conséquent, les différents agents de chimiothérapie existants constitueront la dernière modalité de traitement. Il est également non négligeable de noter que les traitements de radiothérapie induisent des déficits cognitifs à long terme et que la distinction entre la progression tumorale et la radionécrose est difficile à effectuer et complexifie l'évaluation de l'efficacité du traitement prescrit aux patients (Brandes *et al.*, 2008; Mathieu et Fortin, 2006; Rogers, 2012). Ainsi, l'utilisation de traitements de chimiothérapie lors de la récurrence est davantage encouragée.

### ***1.3.3 La chimiorésistance***

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la chimiorésistance intrinsèque ou acquise par les cellules tumorales. Les mécanismes de réparation de l'ADN, l'expression de la O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), les mécanismes permettant l'inhibition de l'apoptose, ainsi que l'augmentation de l'expression des membres de la superfamille des transporteurs ATP-binding cassette (transporteurs ABC, également nommés pompes à efflux).

#### *1.3.3.1 Les transporteurs ABC*

La superfamille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) est sous-divisée en 7 sous-familles (A, B, C, D, E, F et G) et comprend un total de 48 membres (Tableau 1.2) (Dean, Hamon et Chimini, 2001; Vasiliou, Vasiliou et Nebert, 2009). Ces transporteurs, nommés également pompes à efflux, possèdent un très large spectre de substrats et plusieurs substrats leur sont communs en raison de la grande homologie de structure de ces transporteurs.

**Tableau 1.2 Membres de la superfamille des transporteurs ABC**

<b>Sous-famille</b>	<b>Membres (nom du gène)</b>
<b>A</b>	<i>ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA5, ABCA6, ABCA7, ABCA8, ABCA9, ABCA10, ABCA12, ABCA13</i>
<b>B</b>	<i>ABCB1, ABCB2, ABCB3, ABCB4, ABCB5, ABCB6, ABCB7, ABCB8, ABCB9, ABCB10, ABCB11</i>
<b>C</b>	<i>ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC7, ABCC8, ABCC9, ABCC10, ABCC11, ABCC12</i>
<b>D</b>	<i>ABCD1, ABCD2, ABCD3, ABCD4</i>
<b>E</b>	<i>ABCE1</i>
<b>F</b>	<i>ABCF1, ABCF2, ABCF3</i>
<b>G</b>	<i>ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8</i>

La première pompe à efflux découverte fut la glycoprotéine P (PGP), qui n'a été identifiée qu'en 1976 (Juliano et Ling, 1976). Celles qui ont été les plus étudiées jusqu'à aujourd'hui sont la PGP, la « multidrug resistance-associated protein » (MRP1) et la « breast cancer resistance protein » (BCRP). À ce jour, la PGP est toujours la plus caractérisée d'entre elles. À trois, elles expulsent à l'extérieur des cellules cancéreuses un grand nombre de molécules endogènes et exogènes, parmi ces dernières des analgésiques, antibiotiques, antiépileptiques, bloqueurs des canaux calciques, corticoïdes, inhibiteurs de protéase du VIH, immunosuppresseurs, psychotropes ainsi que des agents de chimiothérapie. Encore une fois, un très large spectre d'agents anti-néoplasiques comprenant plusieurs familles d'agents sont substrats de ces pompes à efflux. Quelques exemples ont été listés dans le Tableau 1.3 (Löscher et Potschka, 2005; Szakács *et al.*, 2006).

**Tableau 1.3 Exemples d'agents anti-néoplasiques substrats de pompes à efflux**

<b>Familles d'agents anti-néoplasiques</b>	<b>Exemples</b>
<b>Anthracyclines</b>	doxorubine, daunorubicine, epirubicine, mitoxantrone
<b>Inhibiteurs des topoisomérases</b>	étoposide, topotecan, irinotecan
<b>Vinca alkaloïdes</b>	vincristine, vinblastine
<b>Taxanes</b>	paclitaxel, docetaxel
<b>Anti-métabolites</b>	methotrexate, cytarabine
<b>Inhibiteurs des récepteurs tyrosines kinases</b>	erlotinib, gefitinib, dasatinib, sorafenib
<b>Sels de platines</b>	cisplatine, oxaliplatine

Certaines de ces pompes se retrouvent à la membrane cellulaire, nucléaire ou encore à la membrane de vésicules cytoplasmiques. Selon leur localisation, ces dernières expulsent, soit de la cellule ou du noyau, les agents anti-néoplasiques ou encore les piègent à l'intérieur de vésicules pour détoxifier la cellule. Jusqu'à ce jour, 15 pompes à efflux ont été associées à la résistance aux agents thérapeutiques et de récentes études suggèrent qu'elles seraient plutôt 25 à être impliquées dans la chimiorésistance (Gillet *et al.*, 2004; Szakacs *et al.*, 2004). Plusieurs études ont tenté d'identifier différents variants génétiques provenant du polymorphisme nucléotidique (ou single-nucleotide polymorphism, SNP) de ces pompes, ce qui pourrait leur conférer une activité plus accrue et par conséquent corrélérer avec une plus courte survie des patients qui en seraient porteurs. Plus de 50 SNPs ont été identifiés pour la PGP, 10 pour la MRP1, et 80 pour la BCRP (Hoffmeyer *et al.*, 2000; Horinouchi *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001; Létourneau *et al.*, 2005; Tanabe *et al.*, 2001). Cependant, jusqu'à aujourd'hui il n'y a aucune évidence convaincante que l'un de ces variants serait relié à la réponse des patients atteints de GBM. D'autres études à ce sujet seraient très intéressantes.

### *1.3.3.2 Les inhibiteurs de PGP*

Depuis que ces pompes ont été associées à la chimiorésistance, différents groupes ont cherché à les inhiber pour chimiosensibiliser les cellules cancéreuses. Plusieurs inhibiteurs contre la PGP ont été testés en études précliniques et cliniques. La première génération d'inhibiteurs s'avérait être des molécules qui étaient déjà utilisées en clinique et qui étaient des substrats de ces pompes. Elles ont donc été utilisées comme inhibiteur non spécifique en faisant compétition aux agents de chimiothérapie. Les plus connus et utilisés sont la cyclosporine A (immunosuppresseur) et le verapamil (bloqueur des canaux calciques) (Coley, 2010). Cependant, les doses administrées aux patients étaient très importantes afin d'atteindre la saturation des pompes pour resensibiliser les cellules tumorales aux agents de chimiothérapie, induisant d'importants effets secondaires. Les études cliniques ont donc dû être interrompues. Des inhibiteurs de deuxième génération ont donc été développés avec l'objectif d'obtenir des dérivés des inhibiteurs de première génération possédant une meilleure efficacité et moins d'effets secondaires. Parmi ces composés, nous retrouvons le valspodar (dérivé de la cyclosporine D, inhibiteur de la PGP) et l'elacridar (inhibiteur de la PGP et BCRP). Cependant, il a été constaté que ces nouveaux inhibiteurs sont métabolisés par l'isoforme CYP3A4 du cytochrome P450 et par conséquent ils compétitionnent avec les agents de chimiothérapie pour leur métabolisation. La pharmacocinétique des agents anti-néoplasiques en est donc grandement affectée. Ces derniers sont non seulement moins rapidement métabolisés, mais également moins rapidement éliminés causant une exposition beaucoup trop grande des agents cytotoxiques dans l'organisme. Les inhibiteurs de troisième génération ont ensuite été développés afin d'éliminer l'interaction avec le cytochrome P450. Les trois inhibiteurs les plus étudiés sont le zosuquidar, laniquidar et tariquidar, tous des inhibiteurs de la PGP. (Lee, 2010) Ces inhibiteurs sont toujours en études cliniques.

### ***1.3.4 La barrière hématoencéphalique***

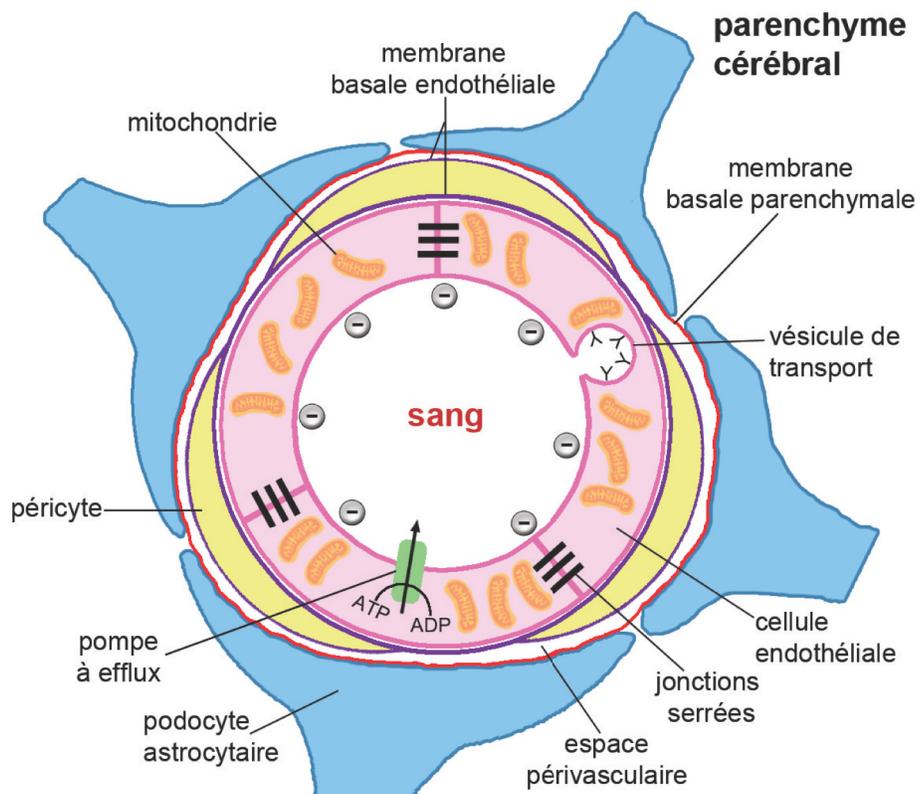
La présence de la barrière hématoencéphalique (BHE) a été mise en évidence pour la première fois par l'équipe du Dr Paul Ehrlich, co-lauréat du prix Nobel de médecine en 1908 pour ses travaux sur l'immunité. En 1885, Dr Ehrlich, également considéré père de la chimiothérapie, constata que tous les organes à l'exception du cerveau et de la moelle épinière étaient colorés suite à l'administration intraveineuse de colorants vitaux chez le rongeur. En 1913, son étudiant, Edwin Goldmann, injecta du Tryptan bleu dans la moelle épinière d'un rongeur et observa alors que seulement le cerveau et la moelle épinière étaient colorés. En 1921, Dre Lina Stern émit le nom « barrière hématoencéphalique » afin de désigner cette entité séparant le compartiment vasculaire du compartiment cérébral. Grâce à l'avènement de la microscopie électronique à la fin des années 1960, Reese, Brightman et Karnovsky ont pu étudier pour la première fois la structure et certaines propriétés de la barrière hématoencéphalique. Plus précisément, ils ont pu observer les jonctions serrées entre les cellules endothéliales, l'absence d'endocytose et le très faible nombre de vésicules pinocytiques (Brightman et Reese, 1969; Reese et Karnovsky, 1967).

La BHE a pour rôle de protéger le SNC de tout intrus incluant les microorganismes, bactéries et molécules pouvant être toxiques. Elle permet le maintien de l'homéostasie cérébrale, la régulation de la pression sanguine artérielle cérébrale, l'apport de nutriments, l'élimination des déchets et la surveillance immunitaire en empêchant l'entrée des cellules immunitaires provenant de la périphérie. Elle est également la plus importante route d'accès au SNC. Elle représente 600 km de vaisseaux sanguins, chaque cm<sup>3</sup> de cortex contiendrait 1 km de vaisseaux et virtuellement chaque neurone serait approvisionné par son propre capillaire (de Boer et Gaillard, 2007). Le complexe constitué des cellules endothéliales, péricytes, astrocytes, neurones et cellules gliales est également nommé unité neurovasculaire. C'est grâce à l'interaction de ces différents types cellulaires que les cellules endothéliales cérébrales acquièrent le phénotype qui les distingue des vaisseaux sanguins de la périphérie. Il a été démontré que durant l'embryogenèse, le rôle des péricytes dans le développement de la BHE serait très important puisqu'ils induisent au niveau des cellules endothéliales :

- une diminution du transport par pinocytose / endocytose,
- une diminution de l'expression de molécules d'adhésion,
- une diminution de l'expression de molécules impliquées dans la perméabilité vasculaire,
- l'expression des jonctions serrées.

Ainsi les péricytes participent à l'établissement du phénotype de la BHE avant même que les astrocytes ne soient présents (Armulik *et al.*, 2010; Daneman *et al.*, 2010). Les astrocytes sont également très importants pour le maintien de l'intégrité de la BHE. Les podocytes astrocytaires recouvrent plus de 95 % de la BHE et participent à l'induction des jonctions serrées, à l'expression de protéines et transporteurs ainsi qu'à la polarisation des cellules endothéliales (expression de transporteur du côté luminal ou adluminal) (Abbott, 2002; Hayashi *et al.*, 1997; Janzer et Raff, 1987; Nakagawa *et al.*, 2009; Roux *et al.*, 1994).

L'absence de fenestration et la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales empêchent la diffusion de molécules entre les cellules endothéliales. Ces deux caractéristiques fondamentales représentent la base de la structure des microvaisseaux cérébraux conférant à la BHE son imperméabilité. La résistance électrique créée par l'étanchéité de la BHE grâce aux jonctions serrées est de 1500-2000 Ohm/cm<sup>2</sup> comparativement à 10 Ohm/cm<sup>2</sup> pour les capillaires périphériques (Butt *et al.*, 1990). La charge négative ainsi créée au côté luminal de la BHE repousse dans la circulation sanguine les petites molécules négatives polaires tentant d'atteindre le SNC. Il n'y a pas de transport par endocytose et peu par pinocytose (Figure 1.2). Il y a également un plus grand nombre de mitochondries dans les cellules endothéliales cérébrales afin de remplir la demande énergétique nécessaire au maintien de la BHE. Des canaux ioniques et des systèmes de transport permettent l'acheminement d'ions, de nutriments, d'amines pour la synthèse des neurotransmetteurs, d'insuline et autres vers le SNC.



### Figure 1.2. Caractéristiques phénotypiques de la BHE

Plusieurs caractéristiques des microvaisseaux cérébraux donnent à la BHE son phénotype unique. L'absence de fenestrations et la présence de jonctions serrées limitent la diffusion paracellulaire. La présence des jonctions serrées induit une charge négative à la surface luminale des cellules endothéliales qui repousse les petites molécules chargées négativement. Le transport par endocytose est inexistant et peu de transport par pinocytose est effectué. De plus, les pompes à efflux dépendantes de l'ATP présentes à la surface luminale des cellules endothéliales rejettent dans la circulation sanguine un large spectre de substrats. Un nombre élevé de mitochondries est nécessaire afin de subvenir à la demande énergétique pour le maintien de l'intégrité de la BHE. Le phénotype propre aux microvaisseaux sanguins cérébraux est induit et maintenu entre autres par les deux membranes basales (MB) soit la MB endothéliale et la MB parenchymateuse, les péricytes et les astrocytes recouvrant les cellules endothéliales cérébrales.

Ces mêmes systèmes de transport sont également nécessaires pour l'exclusion des déchets et des molécules exogènes ou endogènes potentiellement dangereux pour le SNC. Ces transporteurs peuvent être classés en trois catégories : le transport médié par un transporteur (« carrier-mediated transport », CMT), par un transporteur actif (« active

efflux transport », AET) et par un récepteur (« receptor-mediated transport », RMT). Le CMT sert principalement pour l'acheminement de nutriments incluant le glucose, les petits acides aminés et la choline. L'AET comprend les pompes à efflux dont *ABCBI*, la famille des *ABCCs* et *ABCG2*, mais également le transporteur de la taurine, la famille des transporteurs d'anions organiques (OATPs) et le transporteur de l'acide aminé acide glutamique (glutamate) pour ne nommer que ceux-là. Enfin, le RMT comprend les récepteurs à l'insuline, à la transferrine ainsi que du fragment Fc des IgG (« neonatal Fc receptor »).

Ainsi, selon Dr William Pardridge, 100 % des grosses molécules sont confinées à la circulation sanguine et moins de 2 % des petites molécules ont la capacité de traverser la BHE (Pardridge, 2007a). Les caractéristiques que doit posséder une molécule afin de traverser la BHE sont : 1) avoir un poids moléculaire inférieur à 400 Daltons, 2) former moins de 8 à 10 ponts hydrogène avec l'eau (coefficient huile/eau ~ 2,0) et 3) ne pas être un substrat des pompes à efflux. En effet, comme discuté dans la section précédente les pompes à efflux possèdent un très large spectre de substrats, la plupart d'entre eux étant des molécules organiques ayant un poids de 200 à 1000 Da (Staud *et al.*, 2009). La présence de ces pompes à la BHE est un facteur limitant important pour l'acheminement d'agents thérapeutiques au SNC.

Le poids moléculaire des agents anti-néoplasiques varie environ de 200 à 1200 Da, la grande majorité de ceux-ci seront donc confinés à la circulation sanguine. Le rôle protecteur de la BHE est donc l'une des raisons majeures expliquant l'échec des traitements administrés aux patients puisqu'elle limite l'acheminement d'agents anti-néoplasiques aux cellules tumorales gliales ayant infiltré le parenchyme sain.

### ***1.3.5 La barrière hémato-tumorale***

La BHT est composée des vaisseaux irriguant la lésion néoplasique et de la néovascularisation tumorale. Ces vaisseaux sont plus perméables que la BHE. Ils possèdent

une architecture très anormale caractérisée par des vaisseaux tortueux, de plus large diamètre et espacés de façon irrégulière laissant du tissu non vascularisé (Deane et Lantos, 1981a; Long, 1970). Les vaisseaux présentent également une fenestration entre les cellules endothéliales, une altération des jonctions serrées ainsi qu'une augmentation des vésicules pinocytiques (Deane et Lantos, 1981b; Hirano et Matsui, 1975; Wolburg *et al.*, 2012). Plusieurs études ont démontré que la perméabilité de la BHT varie entre autres selon le type de la tumeur et sa taille (Kroll et Neuwelt, 1998; Percy *et al.*, 2011). Elle peut également être très hétérogène pour une même tumeur (Blasberg et Groothuis, 1986; Goldbrunner *et al.*, 2000; Groothuis *et al.*, 1981; Hallani *et al.*, 2010). Quelques groupes ont caractérisé la perméabilité de la BHT ainsi que l'accumulation pour certains agents anti-néoplasiques. Certains agents s'accumulent à la tumeur selon différents ordres de grandeur, mais l'accumulation dans la région péri-tumorale n'est jamais significative (Groothuis *et al.*, 1983; Straathof *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 1981; Neuwelt *et al.*, 1984; Yamashima *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 1994). Le groupe de Dr Quentin Smith a observé dans deux modèles murins de métastases cérébrales de cancer du sein que l'accumulation d'agents anti-néoplasiques substrats de pompes à efflux était souvent faible et même nulle alors qu'un agent de contraste (AC) IRM s'accumulait dans les lésions et permettait leur détection par IRM (Lockman *et al.*, 2010).

#### *1.3.5.1 La perfusion tumorale*

La perfusion des tumeurs cérébrales est également affectée par la BHT. En effet, la néoangiogénèse correspondant à la BHT est constituée de vaisseaux sanguins incomplets et anormaux. Ainsi, ces vaisseaux défectueux au pourtour de la tumeur mèneront à l'hypoperfusion du tissu tumoral et à l'induction d'hypoxie. De plus, la tumeur n'est plus perfusée en son centre, ceci mènera à la mort par nécrose des cellules se trouvant au centre de la lésion néoplasique. La diminution de la perfusion serait même un indice du grade de la tumeur (Law *et al.*, 2003). Dans les dernières années, une nouvelle stratégie dans le traitement des gliomes malins a été exploitée et consiste à normaliser la vascularisation tumorale. Les cellules gliales sécrètent le VEGF pour induire la formation de nouveaux

vaisseaux sanguins. La normalisation de la vascularisation s'effectue en captant le VEGF, ainsi on l'empêche d'atteindre les cellules endothéliales et d'induire la néo-angiogenèse. Le bevacizumab (Avastin®), un anticorps ciblant le VEGF-A, a été utilisé dans plusieurs études cliniques pour des patients atteints de GBM (Soda *et al.*, 2013). Les premières études cliniques qui ont été effectuées avec les patients atteints de GBM utilisaient les mêmes critères qu'auparavant pour mesurer la réponse au traitement, c'est-à-dire la réponse radiologique. En effet, l'utilisation d'images IRM pondérées  $T_1$  pré- et post- contraste permet habituellement de déterminer s'il y a régression, stabilisation ou progression de la masse tumorale. Les vaisseaux de la BHT ne fuient plus suite au traitement à l'Avastin®, puisque la normalisation des vaisseaux est réussie. Cependant, il est faux de conclure que la masse tumorale a diminuée, puisque les cellules néoplasiques sont toujours présentes au-delà de la BHT normalisée (Narayana *et al.*, 2012). L'Avastin® est donné parfois seul, sinon en combinaison avec d'autres traitements (irinotécan, etoposide, temozolomide, elortinib, irradiation). Cependant, aucune étude n'a pu démontrer un réel effet bénéfique du traitement au bevacizumab sur la survie des patients atteints de gliomes malins (Chinot *et al.*, 2014; Desjardins et Vredenburgh 2010; Gilbert *et al.*, 2014). Il est important de noter que l'Avastin en normalisant la BHT empêche également l'acheminement de composés. Ainsi, une augmentation de la perfusion selon une autre stratégie que la thérapie antiangiogénique pourrait possiblement être bénéfique dans le traitement des tumeurs cérébrales, mais il faudrait toutefois utiliser une stratégie augmentant l'acheminement au-delà de la barrière.

Il faut également noter que les GBMs utiliseraient cinq mécanismes de néovascularisation : la co-option vasculaire, l'angiogenèse, la vasculogénèse, le mimétisme vasculaire et la transdifférentiation des cellules de glioblastome en cellule ayant un phénotype endothélial (Hardee *et al.*, 2012). Bien que ces observations ont été effectuées chez la souris, il semblerait même que le mimétisme vasculaire serait utilisé par les GBMs et contribuerait à l'induction de la radiorésistance (Shaifer, Huang et Lin, 2010). Il ne serait pas impossible que suite à un traitement à l'Avastin, les cellules tumorales priorisent le mimétisme vasculaire et la transdifférentiation de cellules GBM-endothéliales pour augmenter leur résistance au traitement de radio et/ou chimiothérapie et leur apport vasculaire. Il n'est cependant pas impossible de croire qu'une autre stratégie permettant

l'augmentation de la perfusion de la tumeur combinée à un traitement de radiothérapie ou de chimiothérapie avec acheminement au-delà de la BHE chez des patients nouvellement diagnostiqués de GBM aurait des résultats prometteurs.

La présence de la BHE et de la BHT est limitante à un point tel que dans plusieurs études précliniques *in vivo* les auteurs implantent les tumeurs gliales en sous-cutané afin de démontrer l'effet anti-néoplasique de leur nouveau composé (Bai *et al.*, 2013; Bota *et al.*, 2013; Mayas *et al.*, 2012). De plus, plusieurs molécules ayant démontré un fort potentiel thérapeutique lors d'études *in vitro* n'ont pas démontré d'effet sur la survie en étude clinique (Chang *et al.*, 2005; Reardon *et al.*, 2010; Thiessen *et al.*, 2010; Uhm *et al.*, 2011). Cependant, très peu d'études ont été effectuées pour valider l'acheminement de ces molécules au SNC avant l'initiation des essais cliniques. Puisqu'il n'a pas été démontré que ces agents puissent atteindre le SNC, il est légitime de croire que ces agents n'atteignent pas ou du moins pas en concentration suffisante les cellules tumorales afin d'avoir un effet thérapeutique.

Le rôle de la BHT et celui de la BHE sont très controversés en neuro-oncologie. Les groupes ne leur donnant pas d'importance ont pour argument que les agents de contraste IRM et de tomodensitométrie (TDM) qui permettent la détection des lésions néoplasiques cérébrales, s'accumulent à la tumeur due à la plus grande perméabilité de la BHT. Bien que ce fait soit exact pour certains agents de chimiothérapie, ces groupes infèrent que la BHT permet l'acheminement de toute molécule à la lésion tumorale, et ce, en concentration suffisante pour obtenir un effet thérapeutique.

Dans le contexte où les gliomes malins sont des tumeurs très invasives et récidivantes à distance de la lésion principale, la perméabilité sélective de la BHT seule n'est pas suffisante pour acheminer les agents de chimiothérapie aux cellules tumorales ayant envahi le parenchyme sain.

## **1.4 Acheminement au système nerveux central**

Différentes stratégies ont été développées afin d'augmenter l'acheminement d'agents thérapeutiques aux cellules tumorales : l'injection intracérébroventriculaire, l'injection intracérébrale au niveau du lit tumoral, la clyse, les anticorps et peptides pouvant servir de chevaux de Troie en ciblant les mécanismes de transport par récepteur à la BHE, les formulations liposomales, ainsi que la perméabilisation de la BHE soit par ultrasons, par intervention pharmacologique ou osmotique.

### ***1.4.1 Injection intracérébroventriculaire***

L'injection intracérébroventriculaire (ICV) n'augmente que très peu l'acheminement au SNC puisque les courants de convection du liquide céphalo-rachidien (LCR) sont plus rapides que la diffusion de la molécule dans le parenchyme cérébral à partir de la surface des cellules épendymaires tapissant les ventricules. Les cellules épendymaires représentent également une barrière à l'acheminement des agents administrés en ICV. Il a été démontré chez le primate dans les années 1970 que la concentration de la molécule dans le parenchyme diminue de façon logarithmique avec la distance de la surface épendymaire, limitant l'application de cette méthode d'acheminement pour les néoplasies du SNC (Blasberg *et al.*, 1975).

### ***1.4.2 Injection intracérébrale***

L'injection intracérébrale dans le site de résection est une voie d'administration intéressante, car elle permet d'atteindre les cellules tumorales tapissant le lit chirurgical. Cependant, les agents antinéoplasiques ne diffusent pas suffisamment dans le parenchyme cérébral afin de permettre d'atteindre les cellules ayant migré à distance. La clyse est une autre forme d'injection intracérébrale et consiste en l'implantation de cathéters dans le

parenchyme cérébral au pourtour de la tumeur. Lors de la clyse, l'administration de la chimiothérapie se fait en continu créant ainsi un courant de convection positif permettant la diffusion des composés administrés. Des études précliniques et cliniques utilisant cette stratégie sont présentement en cours. Cependant, l'élaboration de cathéters optimaux est nécessaire et malheureusement cette méthode d'acheminement est locale puisque les molécules administrées ne diffusent que sur quelques millimètres.

### ***1.4.3 Chevaux de Troie***

Le concept des chevaux de Troie consiste en l'utilisation d'un peptide ou anticorps ciblant un des récepteurs des RMT de la BHE. Le peptide ou anticorps est couplé à la molécule/liposome/nanoparticule à être acheminé. Peu sont disponibles pour la recherche clinique, car plusieurs difficultés sont reliées à cette stratégie. Premièrement, ils doivent être conçus pour cibler un récepteur hautement exprimé à la BHE, la spécificité pour leur récepteur doit être assez bonne pour permettre un acheminement à travers la BHE, mais l'affinité ne doit pas être trop forte, afin de permettre le relargage vers le parenchyme cérébral et ne pas rester emprisonné et dégradé dans les cellules endothéliales (Alata *et al.*, 2014; Bien-Ly *et al.*, 2014). Jusqu'à présent plusieurs équipes se sont intéressées à ce mode d'acheminement pour traiter diverses pathologies puisqu'il permet une large distribution du composé à travers le SNC.

Un peptide nommé ANG1005 ou GRN1005 (3 molécules de paclitaxel combinées à une molécule Angiopep-2 ciblant LRP1) est toujours en étude clinique. Les résultats préliminaires ne semblent pas démontrer un réel impact sur la survie des patients (Drappatz *et al.*, 2013; Kurzrock *et al.*, 2012; Regina *et al.*, 2008). De plus, LRP1 est très faiblement exprimé à la BHE chez l'humain, ce qui pourrait expliquer les résultats de leurs études (Urich *et al.*, 2012; Ohtsuki *et al.*, 2013). Selon ces études, le récepteur de la transferrine est le RMT le plus exprimé au niveau de la BHE chez l'humain. Plusieurs groupes de recherche, tel que celui du Dr Ryan Watts à Genetech travaillent à mettre au point des anticorps ciblant le récepteur à la transferrine. Le groupe de Dr Watts a réussi à développer

un anticorps reconnaissant le récepteur de la transferrine permettant d'augmenter l'acheminement de BACE1 au SNC de souris (Bien-Ly *et al.*, 2014).

Le groupe de Dr Danica Stanimirovic a récemment publié des travaux sur la pharmacocinétique de peptides (FC5 et FC44) qu'ils ont identifiés par la technique de « phage display » ciblant le « neonatal Fc receptor ». Leurs résultats démontrent autant *in vitro* qu'*in vivo* la capacité des peptides à être internalisés du côté luminal des cellules endothéliales et d'être relâchés du côté abluminal (Haqqani *et al.*, 2013). Leurs premières études précliniques sont toujours en cours et sont effectuées dans un modèle de douleur chronique.

Il est important de noter qu'il s'agit d'une excellente stratégie pour l'acheminement à large distribution dans le SNC de façon non invasive. Il est impératif que les équipes de recherche dans ce domaine persévèrent afin d'optimiser cette stratégie.

#### ***1.4.4 Formulations liposomales***

Plusieurs groupes de recherche travaillent au développement de formulations liposomales afin de diminuer la toxicité systémique des agents anti-néoplasiques et pour augmenter leur demi-vie plasmatique pour tout type de cancer. Le liposome est constitué d'une double membrane lipidique, d'autres ont du polyéthylène glycol lié à la surface externe du liposome (« stealth » ou « PEG-coated » liposomes). Ces liposomes sont plus stables et par conséquent demeurent en circulation plus longtemps dans l'organisme. Les liposomes peuvent également être fonctionnalisés, dans ce cas un anticorps ou ligand est lié à la membrane des liposomes afin qu'ils reconnaissent spécifiquement un transporteur pour traverser la BHE et/ou un récepteur exprimé par les cellules tumorales (Abu Lila *et al.*, 2009; Boado et Pardridge, 2011; Brasnjevic *et al.*, 2009; Pardridge, 2007b; Rivest *et al.*, 2007; Shi et Pardridge, 2000; Tian *et al.*, 2010; Visser *et al.*, 2005). Cette stratégie permet donc une accumulation spécifique. Les liposomes non fonctionnalisés s'accumuleraient aux tumeurs par l'effet EPR (« enhanced permeability and retention »). L'explication de l'effet EPR repose sur la diminution du flot sanguin local et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins à la tumeur permettant l'accumulation non spécifique des liposomes

aux tumeurs (Fang *et al.*, 2011). Certains liposomes sont conçus pour être thermosensibles; ainsi suite à leur administration IV, la température à la tumeur est augmentée par IRM et cette augmentation de température induit la perméabilisation des liposomes. Ainsi ces derniers libèrent leur contenu à l'endroit précis où la température a été augmentée (Gong *et al.*, 2011; Lindner *et al.*, 2005). Plusieurs formulations commerciales sont disponibles et/ou en étude clinique. Certaines formulations sont testées en étude clinique sur les gliomes malins, cependant ce sont tous des « PEG-coated » liposomes non fonctionnalisés. Les résultats des études cliniques en cours sont principalement que les liposomes sont bien tolérés, mais qu'ils ne semblent pas avoir d'effet significatif sur la survie des patients (Hau *et al.*, 2004). Une étude phase I vient d'être commencée en décembre 2013 à l'Université de Californie à San Francisco. Dans cette étude, des nanoliposomes contenant de l'irinotécan sont administrés par clyse chez des patients ayant une récurrence d'un gliome de grade 3 et 4. D'autres études sont en cours et nécessaires afin de compléter l'évaluation de cette stratégie.

#### ***1.4.5 Perméabilisation de la BHE par ultrasons***

Cette technique permet de perméabiliser la BHE de façon contrôlée, réversible et précise (locorégionale). Elle doit être effectuée dans un scanner IRM afin de guider la procédure qui consiste en l'injection de microbulles dans la circulation sanguine et la focalisation d'ultrasons de basse fréquence à un endroit déterminé (Hynynen *et al.*, 2001; Hynynen *et al.*, 1997). L'interaction mécanique entre les vaisseaux sanguins, les microbulles et les ultrasons provoquerait un désassemblage réversible des jonctions serrées menant à une augmentation de la perméabilité de la BHE (Sheikov *et al.*, 2008; Shang *et al.*, 2011). Cette procédure est toujours en développement afin qu'elle puisse être effectuée avec précision sans avoir à retirer un volet de la boîte crânienne et sans induire d'effets thermiques indésirables (Hynynen *et al.*, 1997; Hynynen *et al.*, 2005; Marquet *et al.*, 2014; Treat *et al.*, 2012). Bien que cette technique soit fort intéressante, cette stratégie vise un acheminement ciblé ce qui comme discuté précédemment n'est pas optimal pour le traitement des gliomes malins.

#### ***1.4.6 Perméabilisation pharmacologique de la BHE***

L'ouverture pharmacologique de la BHE est une autre stratégie intéressante qui met à profit les protéines des jonctions serrées ou les récepteurs de la bradykinine. Il a été démontré que la répression de l'expression de la claudine 5 permet d'induire une perméabilisation de la BHE chez la souris (Deli, 2009; Nitta *et al.*, 2003). Cependant, cette stratégie n'a pas été développée davantage avec l'objectif d'acheminer des composés au SNC.

L'expression du récepteur B1R de la bradykinine est induite en présence d'inflammation et le récepteur B2R est exprimé de façon constitutive au niveau des cellules endothéliales. L'activation des récepteurs de la bradykinine mène à une augmentation de la perméabilité des capillaires. Ainsi l'administration d'un puissant agoniste de ces récepteurs induira une augmentation de la perméabilité de la BHE due à la présence de B1R induite par l'inflammation et de la BHE induite par la présence de B2R exprimé de façon constitutive. Puisque la bradykinine a court temps de demi-vie plasmatique, plusieurs équipes ont travaillé à développer des agonistes plus stables et de très haute affinité et spécificité que ce soit pour le récepteur B1R ou B2R (Bélanger *et al.*, 2009; Côté *et al.*, 2009; Inamura *et al.*, 1994). Le plus connu est le Cereport (RMP-7). Sa liaison spécifique au récepteur B2R induit une augmentation de calcium intracellulaire qui module les jonctions serrées menant à la perméabilisation de la BHE (Sanovich *et al.*, 1995). Une étude phase II, randomisée, à double-aveugle, chez des patients atteints de gliomes malins a été effectuée en combinant le RMP-7 IV avec du carboplatin. Cependant, cette étude n'a pu démontrer d'effet significatif sur la survie et la compagnie responsable de l'étude clinique a interrompu la phase III de ce composé chez des patients nouvellement diagnostiqués pour un GBM (Prados *et al.*, 2003). De nouveaux agonistes contre le récepteur B1R et B2R ont été développés par l'équipe du Dr Fernand Gobeil à l'Université de Sherbrooke. Leurs études précliniques sont toujours en cours (Bélanger *et al.*, 2009; Côté *et al.*, 2009; 2012; 2010; 2013).

#### **1.4.7 Perméabilisation osmotique de la BHE**

L'ouverture osmotique de la BHE (OBHE) a été développée au début des années 1970 par Dr Stanley I. Rapoport (Rapoport *et al.*, 1971). Vers la fin des années 1970, Dr Edward A. Neuwelt s'est ensuite intéressé à la procédure dans le but de l'appliquer chez l'humain afin d'augmenter l'acheminement d'agents anti-néoplasiques au SNC dans le traitement des tumeurs cérébrales (Neuwelt *et al.*, 1979a). Les études cliniques utilisant l'OBHE comme procédure d'acheminement d'agents anti-néoplasiques sont en cours depuis 1983 (Neuwelt *et al.*, 1983a). La procédure d'OBHE consiste en l'administration à haut débit d'une solution hyperosmolaire de mannitol 25 % dans un réseau artériel cérébral donné. Ce haut débit d'infusion est nécessaire afin de s'assurer de bien remplir le réseau vasculaire et que le sang ne diluera pas la solution osmolaire puisqu'une osmolarité de 1.6 mOsm/L est nécessaire pour perméabiliser la BHE (Rapoport *et al.*, 1980a). La solution doit être administrée à haut débit pendant 30 secondes afin d'exposer les cellules endothéliales cérébrales suffisamment longtemps à la solution hyperosmolaire pour induire un choc osmotique (Rapoport *et al.*, 1980a). Le choc osmotique amènera une perméabilisation réversible de la BHE qui sera induite par une déshydratation des cellules endothéliales menant à la création de pores entre celles-ci et corollairement à un bris des jonctions serrées (Figure 1.3) (Rapoport et Robinson, 1986). Les pores ainsi créés entre les cellules endothéliales permettront aux agents administrés dans le réseau vasculaire d'atteindre le parenchyme cérébral par diffusion ainsi que par son transport via le flot du plasma s'écoulant du sang vers le cerveau (Robinson et Rapoport, 1987). Le débit du plasma permet à l'agent administré d'être distribué dans le parenchyme cérébral et ne pas s'accumuler dans l'espace périvasculaire. La perméabilisation sera également accompagnée d'une augmentation de 1 à 1,5 % du volume cérébral due à l'extravasation du plasma sanguin induite par la pression osmotique et du gradient de la pression hydrostatique créés dans le capillaire sanguin (Rapoport, 1985). Le surplus liquidien induit par la procédure d'OBHE est éliminé du SNC avec le LCR en quelques heures (Rapoport *et al.*, 1980a). La molécule acheminée dans l'espace périvasculaire cérébral diffusera ensuite à travers le parenchyme cérébral, ce constat est facilement

effectué par étude immunohistochimique contre l'albumine sur des coupes de cerveau ayant subi une OBHE. En effet, l'albumine se retrouve dans le parenchyme cérébral et non accumulé dans les espaces périvasculaires.

L'acheminement d'une molécule au SNC suite à l'OBHE pourrait être estimé en utilisant l'équation suivante établie par Ziylan, Robinson et Rapoport en 1984 :

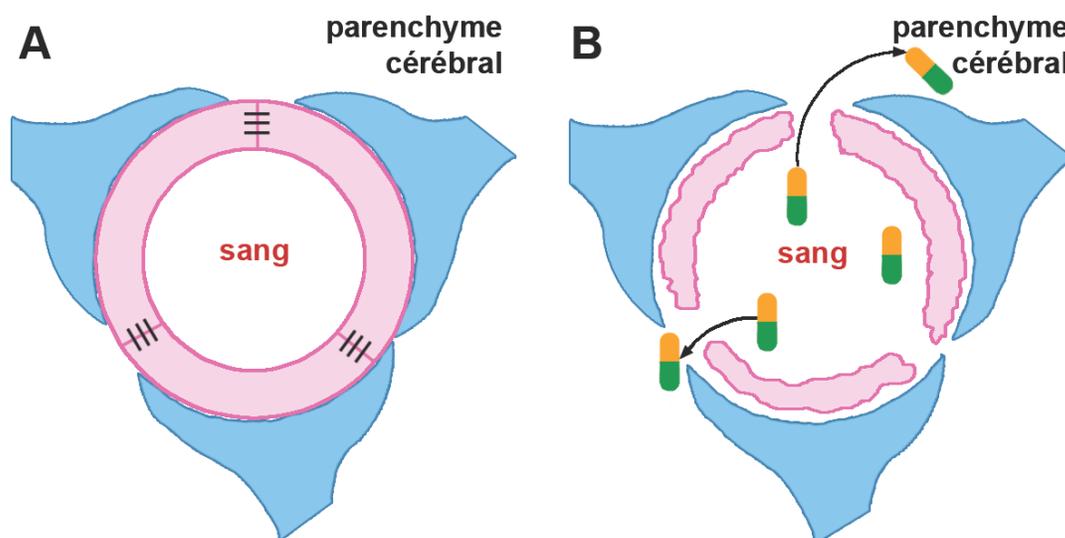
$$\frac{dC_{br}}{dt} = PA_{eff} C_{pl} = [PA + f(1 - \sigma)]C_{pl}$$

Dans cette équation, le changement de la concentration dans le cerveau ( $C_{br}$ ) d'une molécule dans le temps  $t$  est proportionnel à sa concentration dans le plasma ( $C_{pl}$ ) et le produit d'aire de surface-perméabilité « permeability-surface area product » ( $PA_{eff}$ ). Le  $PA_{eff}$  comprend la composante reliée à la diffusion ( $PA$ ), le débit du plasma ( $f=16 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g de cerveau}^{-1}$ ) et le coefficient de réflexion ( $\sigma$ ) qui se situe entre 0 et 1 selon la taille de la molécule et le rayon des pores créés entre les cellules endothéliales (Ziylan, Robinson et Rapoport, 1984). Cependant, plusieurs biais sont induits lors de l'utilisation de cette formule. Premièrement, le débit du plasma a été calculé pour les dix premières minutes suite à l'infusion du mannitol chez le rat, la taille moyenne des pores a été estimée à 200 Armstrong lorsque la BHE est perméabilisée et à 8 Armstrong pour une BHE normale. Il a cependant été démontré que l'OBHE permet l'acheminement de virus d'une taille au-delà de 600 Armstrong et que cette estimation repose encore une fois sur un modèle mathématique et non sur des observations physiologiques. De plus, les jonctions serrées ouvertes suite à l'OBHE seraient chargées négativement et la formule ne tient pas compte de la charge des jonctions serrées, ni de la charge de la molécule à acheminer. L'administration de composés « pégylés » pouvant adhérer aux pores entre les cellules endothéliales non plus. Cette formule a également été développée en tenant compte que l'OBHE permettait l'accumulation de substrat des pompes à efflux, alors que cette assumption ne reposait sur aucune étude. De plus, la très grande variabilité interprocédure chez un même individu ou interindividu rend difficile l'application d'un modèle robuste pour l'étude de l'OBHE. Il faut également considérer que le processus d'OBHE est

réversible et qu'ainsi la perméabilité de la BHE varie dans le temps. Les estimations effectuées à l'aide de cette équation doivent donc être utilisées avec précaution.

La variabilité de l'OBHE intersujet et interprocédure chez un même sujet reste jusqu'à aujourd'hui un problème irrésolu (Joshi *et al.*, 2010). Même si la mesure d'une molécule dans le LCR n'est pas représentative d'un acheminement parenchymateux, une étude effectuée chez des patients où le methotrexate était quantifié dans le LCR suite à une OBHE montre des variations des concentrations obtenues de 10 à 25 fois lors de procédure où le degré de perméabilisation de la BHE déterminé par TDM variait de degré de 10 fois (Zylber-Katz *et al.*, 2000). Malgré les efforts de plusieurs groupes de recherche afin d'identifier les paramètres affectant ces variations afin de les contrôler, la variabilité du processus reste inchangée (Joshi *et al.*, 2010). Plusieurs facteurs ont été déterminés pouvant affecter le degré de perméabilisation de la BHE. Nous pouvons les diviser en quatre classes : physiologiques, pharmacologique, statut pathologique, évaluation de la perméabilité. Les facteurs physiologiques incluent l'anatomie vasculaire régionale, l'hypercapnie, la pression sanguine, la température et le débit sanguin (Ueno, 2007; Baumchach, Mayhan et Heistad, 1986; Al-Sarraf, Ghaaedi et Redzic, 2007; Chi, Lui et Weiss, 2001; Wang, Etu et Joshi, 2007). Les facteurs pharmacologiques comprennent : le type d'agent perméabilisant, l'utilisation de stéroïdes, la concentration de  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ , l'anesthésiant et la concentration de NO (Bullard, Bourdon et Bigner, 1984; Neuwelt *et al.*, 1993; Euser, Bullinger et Cipolla, 2008; Bhattacharjee *et al.*, 2001; Remsen *et al.*, 1999; Gumerlock et Neuwelt, 1990; Boje et Lakhman, 2000; Boje, 1996). En nous rapportant à cette liste, nous pouvons également hypothétiser que d'autres molécules vasoactives endogènes tel que la bradykinine, l'adrénaline, la noradrénaline et l'endothéline pourraient également avoir un effet sur le degré de perméabilisation de la BHE lors d'une OBHE. Le statut du pathologique du patient inclurait différents facteurs tels que l'inflammation, les convulsions, l'ischémie, d'autres maladies du CNS (ex : sclérose en plaques) (Ballabh, Braun et Nedergaard, 2004; van Horssen *et al.*, 2007; Soon *et al.*, 2007; Rudà, Trevisan et Soffiatti, 2010; Kalayci *et al.*, 2006; Brown et Davis, 2002). L'évaluation de la perméabilisation induit évidemment une autre source de variation : les outils pour mesurer l'état de la perméabilisation, le temps entre la fin de l'infusion du mannitol et la mesure de

du degré de perméabilisation, les critères établis (objectivité, quantitative, reproductible) (Bellavance, Blanchette et Fortin, 2008; Siegal *et al.*, 2000; Brown, Egleton et Davis, 2004). Les différences interspèces ainsi que l'effet de la profondeur de l'anesthésie n'ont pas été étudiés, mais selon la nature de ces facteurs, il serait juste de croire qu'ils affecteraient également le degré de perméabilisation de la BHE.



**Figure 1.3. Perméabilisation de la BHE par choc osmotique**

A) Structure de la BHE normale, (B) structure de la BHE suite à l'administration du mannitol 25% pendant 30 secondes; les cellules endothéliales ayant subi un choc osmotique se sont vidées de leur eau et contractées sur elles-mêmes menant à un bris des jonctions serrées. Les agents de chimiothérapie administrés peuvent maintenant atteindre l'espace périvasculaire.

#### 1.4.7.1 Perméabilisation osmotique de la BHE chez l'humain

En clinique, les patients qui subissent une OBHE sont admis en salle d'angiographie où ils sont mis sous anesthésie générale. Le traitement combine la procédure d'OBHE à l'administration d'un régime d'agents antinéoplasiques. Certains de ces agents ont besoin d'être préalablement métabolisés pour être sous leur forme active lorsqu'ils seront acheminés à la tumeur suite à la perméabilisation de la BHE. Leur administration IV est donc effectuée avant l'OBHE et dure 10 minutes. Pendant leur infusion, un cathéter est

installé dans l'artère fémorale par un radiologiste et par cette voie ce dernier cannule l'artère cérébrale appropriée. Le choix de l'artère est effectué selon la position de la lésion néoplasique à traiter donc au niveau de la vertèbre cervicale C2-C3 dans la carotide si la tumeur est antérieure, ou au niveau de C5-C6 de l'artère vertébrale si la lésion est postérieure. Le mannitol (25 %) est ensuite infusé à haut débit (4 à 10 mL/sec). Le débit d'infusion du mannitol est déterminé par fluoroscopie avec l'administration de contraste iodé. Le débit d'infusion du mannitol est fixé en déterminant le plus faible débit à partir duquel un débit rétrograde est observé à partir de la canule. Ainsi, le débit d'infusion du mannitol est assurément plus rapide que le débit sanguin et permet de complètement remplir de mannitol l'arbre vasculaire durant les 30 secondes de l'infusion. Cinq minutes suite à la procédure d'OBHE, les agents de chimiothérapie ne nécessitant pas de bioactivation sont administrés IA via la même canule que le mannitol et leur infusion dure 10 minutes. Les patients sont ensuite extubés et ramenés à leur chambre pour le réveil. Les patients reçoivent un traitement par mois. Si le patient est atteint d'un GBM multifocal, il y aura alternation du territoire cérébral traité à chaque cycle. Dans 6 à 7 % des cas, l'OBHE est accompagnée de convulsions, afin de les éviter, préalablement à la procédure d'OBHE des anticonvulsivants sont administrés aux patients ainsi qu'une dose d'atropine, afin de prévenir la bradycardie induite par la procédure d'OBHE. Les patients sont également tous traités aux glucocorticoïdes, afin de contrôler l'œdème cérébral causé par la procédure d'OBHE. Pour évaluer la qualité de la perméabilisation de la BHE en clinique, un agent de contraste radiographique non ionique peut être administré et un scan par TDM effectué pour documenter le degré de perméabilisation. À l'aide d'une échelle visuelle, ce dernier sera qualifié de nul, modéré, bon ou excellent (Roman-Goldstein *et al.*, 1994; Haluska et Anthony, 2004; Fortin *et al.*, 2005; Fortin *et al.*, 2007).

En clinique, l'utilisation de la fluoroscopie permet de déterminer le débit d'infusion du mannitol optimal et permet de mieux contrôler la qualité de la procédure en lien avec l'hémodynamie. La procédure reste cependant très variable d'un individu à l'autre et interprocédure chez le même individu. Il faut considérer que l'anatomie cérébrovasculaire bien qu'au niveau macroscopique est généralement la même, est propre à chaque individu à une échelle réduite; la taille de la tumeur ainsi que la pression partielle du CO<sub>2</sub> sanguin

peuvent affecter la pression intracrânienne ainsi que la pression du fluide interstitiel qui auront également un impact sur l'étendue de l'OBHE (Remsen *et al.*, 1999).

Bien que la procédure d'OBHE soit une technique invasive, le groupe de Dr Neuwelt a démontré que son utilisation en contexte standardisé est sécuritaire et efficace (Doolittle *et al.*, 2000; Roman-Goldstein *et al.*, 1995). De plus, il ne semble pas y avoir de déficit neurologique relié à la procédure d'OBHE (Rapoport et Thompson, 1973; Roman-Goldstein *et al.*, 1995; McAllister *et al.*, 2000). Le plus important est évidemment qu'elle permet d'augmenter de façon significative la survie des patients atteints de tumeurs primaires, de métastases et de lymphomes cérébraux (Neuwelt *et al.*, 1983a; Shapiro *et al.*, 1992; Watne *et al.*, 1992; Fortin *et al.*, 2005; Fortin *et al.*, 2007; Macnealy *et al.*, 2008). La survie médiane des patients atteints de GBM traités en première ligne avec l'OBHE et le régime d'agents anti-néoplasiques comprenant le carboplatin, l'etoposide et le cyclophosphamide est de 32,2 mois (Fortin *et al.*, 2005). Cette stratégie d'acheminement combinée à l'administration intra-artérielle de chimiothérapie permet donc de doubler la survie médiane des patients, lorsque comparée au traitement standard associé à une survie médiane de 14,6 mois (Stupp *et al.*, 2005). Malgré l'efficacité de cette procédure, il est impératif de détailler davantage son processus dynamique afin de savoir comment l'adapter à de nouveaux agents antinéoplasiques. Premièrement, en caractérisant la durée de la perméabilisation de la BHE pour différentes molécules. Ainsi nous pourrions déterminer s'il serait approprié d'ajuster le temps où l'administration des agents de chimiothérapie est initiée suite à l'OBHE. Cette étude serait d'autant plus valide puisqu'il semblerait que la durée de la perméabilisation semble être différentes selon la molécule à être acheminée (Robinson et Rapoport, 1987). Afin de clarifier ce point, il faudrait construire une étude dans laquelle l'acheminement au SNC et à la tumeur d'au moins deux agents ayant des propriétés chimiques différentes est comparé suite à leur administration à la même dose après une procédure d'OBHE.

La seule étude ayant mesuré l'acheminement d'un agent de chimiothérapie chez l'humain a été effectuée lors des premiers essais cliniques de l'OBHE avec le methotrexate (Neuwelt *et al.*, 1981). Le methotrexate avait alors été sélectionné pour sa faible toxicité, le fait qu'une étude de 8 patients avait rapporté une réponse chez 7 des 8 patients et que

l'accès au  $^{125}\text{I}$ -methotrexate permettait sa quantification dans le sérum et le LCR des patients. Les auteurs ont observé que la concentration de methotrexate dans le LCR ne corrèle pas avec le degré de perméabilité de la BHE observé par TDM. Cependant une étude similaire effectuée chez le chien a démontré que les niveaux de methotrexate dans le cerveau et le LCR ne corrèlent pas (Neuwelt *et al.*, 1980). La seule autre étude effectuée chez l'humain ayant pour objectif de caractériser le processus d'OBHE a été effectuée par tomographie d'émission monophotonique avec du  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glucoheptonate. L'objectif de l'étude était de caractériser la durée de la perméabilisation de la BHE. Les résultats de l'étude suggèrent que la durée de l'OBHE est plus longue qu'elle avait préalablement été estimée. La BHE serait très perméable aux petits composés dans les 40 minutes suivant l'infusion du mannitol et reviendrait normale après 6 à 8 heures lorsque la perméabilisation de la BHE était qualifiée de bonne à excellente (Siegal *et al.*, 2000). Dans le cas d'OBHE d'intensité faible à modérée, la BHE semblait avoir retrouvé la perméabilité normale après 90 minutes pour le même composé. La durée de la perméabilisation semble donc varier selon son intensité et la molécule à acheminer au SNC.

#### *1.4.7.2 Perméabilisation osmotique de la BHE chez l'animal*

Parmi les autres études qui ont été effectuées afin de caractériser le processus d'OBHE, différents modèles animaux tels que le chien, le rat, le lapin et le primate ont été utilisés. Les premières études ont été effectuées chez le primate et le chien. L'utilisation d'animaux plus évolués a permis de commencer les études cliniques plus rapidement. De plus, ces premières études ont été effectuées en même temps que la faisabilité d'augmenter l'acheminement au SNC par l'ouverture osmotique de la BHE. À l'époque, différentes solutions hyperosmolaires ont été testées telles que l'urée, l'arabinose, le mannitol, lactamide (Rapoport, Hori et Klatzo, 1971; Rapoport, Bachman et Thompson, 1972; Rapoport et Thompson, 1973; Hicks, Albrecht et Rapoport, 1976). Ensuite, la procédure d'OBHE majoritairement étudiée chez le rat. Quelques études ont été effectuées chez le lapin puisque l'anatomie de l'arbre vasculaire cérébral est moins variable interindividu pour cette espèce. Cependant, la grande majorité des études ont été effectuées chez le rat. La

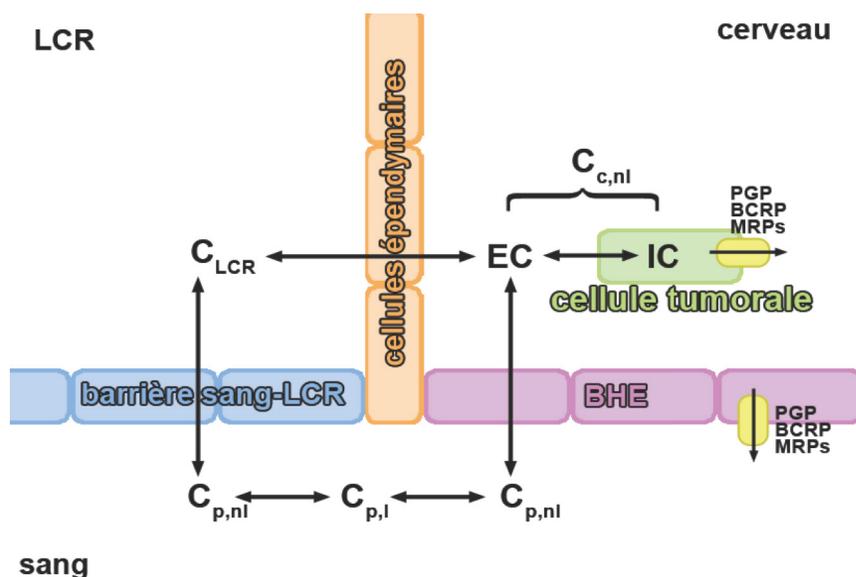
plupart des groupes de recherche utilisent un débit d'infusion du mannitol de 0,12 mL/s bien que certains utilisent des débits de 0,08 et de 0,10 mL/s (Beck *et al.*, 1984; Neuwelt *et al.*, 1988; Chi *et al.*, 1998; Remsen *et al.*, 1999; Chi *et al.*, 2000; Muldoon LL *et al.*, 1995; Blanchette *et al.*, 2009). Il a été démontré à plusieurs reprises que le débit d'infusion de la solution hyperosmolaire a un impact sur le degré de perméabilisation de la BHE (Remsen *et al.*, 1999; Fortin *et al.*, 2004; Blanchette *et al.*, 2012). Il a été déterminé qu'à 0,12 mL/s la plupart des OBHE sont de qualité modérée avec un faible taux de mortalité. Le choix de l'anesthésiant a également un impact sur la qualité de l'OBHE puisqu'il a un effet sur les paramètres hémodynamiques qui affectera l'acheminement au SNC suite à l'OBHE (Gumerlock *et al.*, 1990; Chi *et al.*, 1998; Remsen *et al.*, 1999; Fortin *et al.*, 2004). Les animaux anesthésiés au propofol auront une meilleure OBHE que les animaux anesthésiés au phénobarbital, à l'isoflurane ou à la kétamine/xylazine. L'anesthésie au méthoxyflurane ou fentanyl droperidol nuit davantage à la qualité de l'OBHE. Afin d'obtenir une bonne perméabilisation de la BHE, avec un faible taux de mortalité la combinaison optimale consiste en un débit d'infusion du mannitol à 0,12 mL/s, sous anesthésie générale au propofol pour un rat d'un poids d'environ 250 g.

Ces études précliniques ont été entreprises afin de peaufiner le protocole et de caractériser les différents paramètres de l'OBHE, tels que : l'acheminement de différents composés, la toxicité reliée à leur acheminement, la durée de la perméabilité de la BHE ainsi que la distribution des composés dans la tumeur et à travers le SNC (Bhattacharjee *et al.*, 2001a; 2001b; Blanchette *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2004; Fortin *et al.*, 2004; Fortin *et al.*, 2000; Hsieh *et al.*, 2005; Kaya *et al.*, 2004; Morikawa *et al.*, 1999; Muldoon *et al.*, 1995; Siegal *et al.*, 2000; Zünkeler *et al.*, 1996b). Le plus utilisé de ces modèles est le rat, puisqu'il constitue le modèle le moins évolué dans lequel on peut étudier le processus d'OBHE. Comme que discuté précédemment la durée de la perméabilisation chez l'humain n'a pas été étudiée de façon extensive et les données sont très variables. La durée de perméabilisation déterminée dans les différentes études effectuées chez les animaux varie de 10 min à 2 heures (Rapoport *et al.*, 1980a; Kessler *et al.*, 1984; Zünkeler *et al.*, 1996). La variabilité des modèles, des molécules utilisées et des doses d'injection donne toutefois lieu à une grande variabilité dans les résultats. Il est donc difficile d'établir un comparatif d'acheminement pour deux molécules ayant différentes propriétés et d'estimer la valeur des

précédentes études. De plus, le processus d'OBHE est très variable d'un individu à l'autre et même interprocédure chez un même individu (Siegal *et al.*, 2000; Zylber-Katz *et al.*, 2000). Il serait donc bénéfique de comparer l'acheminement de deux molécules de poids moléculaire différent administrées à la même dose dans le même modèle animal.

### **1.5 Acheminement aux cellules tumorales gliales infiltratives**

Même si un composé est acheminé au SNC, il doit atteindre les cellules tumorales en concentration suffisante et être en leur présence pour une durée assez longue afin de pénétrer la cellule et avoir son effet anti-néoplasique. Selon la Figure 1.4, une augmentation de l'acheminement au cerveau dans l'espace interstitiel (EC, extracellulaire) n'est pas garante d'un acheminement dans la cellule tumorale et par conséquent d'un effet thérapeutique. La molécule peut être redistribuée dans le LCR ou être rejetée dans la circulation sanguine. De plus, l'expression de pompe à efflux par les cellules tumorales permet de croire que malgré l'acheminement au SNC de substrats de pompes à efflux par une technique permettant de contourner la BHE, ces derniers ne pourraient pénétrer les cellules néoplasiques et mènerait simplement à leur accumulation dans l'espace extracellulaire. La molécule serait ensuite redistribuée dans le sang et/ou le LCR jusqu'à son élimination.



**Figure 1.4. Biodistribution de composés au SNC et accumulation aux cellules tumorales (adapté avec permission de Di, Rong et Feng. 2013)**

La concentration d'une molécule au niveau de la cellule tumorale est influencée par quatre compartiments et les échanges entre ces derniers. Les compartiments à considérer sont : 1) le sang, 2) le liquide céphalo-rachidien (LCR), 3) le parenchyme cérébral (ou cerveau) et 4) la cellule tumorale. Le composé administré dans le sang sera libre ou lié à des protéines plasmatiques. Le composé doit dans la plupart des cas être libre afin d'atteindre sa cible et d'avoir son effet thérapeutique.

Abréviations : concentration de la molécule plasmatique sous sa forme liée ( $C_{p,l}$ ), concentration de la molécule plasmatique sous sa forme libre, non liée ( $C_{p,ni}$ ), concentration de la molécule dans le liquide céphalo-rachidien ( $C_{LCR}$ ), concentration de la molécule dans le cerveau sous sa forme libre ( $C_{c,ni}$ ), milieu interstitiel ou extracellulaire (EC), milieu intracellulaire (IC).

## **Problématique**

L'ouverture osmotique de la barrière hématoencéphalique permet d'augmenter de façon significative la survie médiane des patients atteints de GBM. Plusieurs études ont été effectuées pour améliorer la compréhension du processus d'OBHE. Cependant, nous ne savons pas si l'acheminement au parenchyme cérébral suite à l'OBHE est différent pour des molécules de différents poids moléculaires ou pour un substrat des pompes à efflux. En clinique, il n'y a pas de différents protocoles d'administration selon l'agent de chimiothérapie administré suite à l'OBHE, à l'exception des agents nécessitant d'être métabolisé pour devenir actif et sont par conséquent administrés IV pré-OBHE. De plus, la présence des pompes à efflux non seulement au niveau de la BHE et de la BHT, mais au niveau des cellules tumorales gliales, ne nous permet pas de savoir si les agents de chimiothérapie, substrats de ces pompes, s'accumuleront au parenchyme cérébral et à la tumeur suite à une procédure d'OBHE.

Afin d'augmenter l'efficacité des traitements de chimiothérapie pour les patients atteints de gliomes malins, il est essentiel de mieux comprendre le processus dynamique de l'OBHE et de connaître les mécanismes de chimiorésistance limitant l'acheminement au parenchyme et à la tumeur.

## ***Objectifs***

### **Objectif #1**

Caractériser le processus dynamique de l'OBHE pour deux molécules de tailles et poids moléculaires différents afin de déterminer s'il y a lieu d'adapter le protocole d'administration des agents antinéoplasiques selon leurs propriétés chimiques pour améliorer l'efficacité de l'acheminement suite à une procédure d'OBHE.

### **Objectif #2**

Quantifier l'expression et déterminer la localisation de différentes pompes à efflux dans des échantillons de GBM comparativement aux tissus sains dans le but de déterminer parmi les pompes à efflux étudiées lesquelles seraient responsables de la limitation de

l'acheminement à travers la BHE et BHT ainsi que de la chimiorésistance des cellules tumorales gliales.

### **Objectif #3**

Déterminer si l'OBHE permet l'accumulation au parenchyme et à la tumeur de substrats des pompes à efflux afin de déterminer si la procédure d'OBHE permettrait d'acheminer des agents antinéoplasiques substrats des pompes à efflux malgré la présence des pompes à efflux à la BHE, BHT et aux cellules tumorales.

# OBJECTIF #1

## 2.1 Article 1

### **Impact of drug size on brain tumor and brain parenchyma delivery after a blood-brain barrier disruption**

**Auteurs de l'article:** Marie Blanchette, Luc Tremblay, Martin Lepage, David Fortin

**Statut de l'article:** Accepté dans Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism le 2 janvier 2014, en epub depuis le 12 février 2014

**Avant-propos:** J'ai participé à la conception de l'étude avec Dr David Fortin et Dr Martin Lepage. J'ai effectué toutes les expériences ainsi que les analyses des résultats. J'ai rédigé la première ébauche du manuscrit et participé à son amélioration jusqu'à sa version finale. Dr Luc Tremblay a participé à la mise au point des séquences de pulse IRM et m'a aidée à effectuer les expériences.

**Résumé :** La limitation de l'acheminement d'agents au système nerveux central par la présence de la barrière hématoencéphalique (BHE) et de la barrière hémato-tumorale (BHT) est toujours un sujet de controverses en neuro-oncologie. Dans cette étude, nous avons quantifié l'acheminement de deux composés de tailles et poids moléculaire différents au niveau de la BHE et BHT chez des rats sains et des rats porteurs d'une tumeur cérébrale. Nous avons utilisé l'imagerie par résonance magnétique dynamique afin de mesurer l'acheminement en condition basale et suite à une procédure d'ouverture osmotique de la barrière hématoencéphalique (OBHE) grâce à deux agents de contraste  $T_1$ , le Magnevist (743 Da) et le Gadomer (17 000 Da). Plus précisément, nous avons mesuré la durée de la perméabilisation de la BHE, la distribution et l'exposition du tissu cérébral aux agents de contraste. L'accumulation et la distribution des deux agents de contraste étaient différentes et autant lors de l'acheminement en condition basale que suite à la procédure d'OBHE. L'exposition en condition basale est trois fois plus élevée pour le Magnevist que pour le Gadomer et est deux fois plus élevée pour le Magnevist suite à l'OBHE. Notre étude démontre clairement que la durée de perméabilité de la BHE suite à l'OBHE et que l'étendue de l'acheminement à travers le SNC sont influencées par la taille du composé acheminé.

## **Impact of Drug Size on Brain Tumor and Brain Parenchyma Delivery after a Blood-Brain Barrier Disruption**

Authors:

Marie Blanchette M.sc.<sup>1</sup>, Luc Tremblay Ph.D.<sup>1</sup>, Martin Lepage Ph.D.<sup>1</sup>, David Fortin M.D.<sup>2</sup>

Affiliations:

<sup>1</sup> Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke, Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

<sup>2</sup> Département de chirurgie, service de neurochirurgie et de neuro-oncologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

Corresponding author:

Professor David Fortin

Département de chirurgie, service de neurochirurgie et de neuro-oncologie

CHUS, Université de Sherbrooke,

3001, 12e avenue Nord, Sherbrooke,

Qc, Canada, J1H 5N4

Phone

Fax

Email address:

Grant Support:

This work was supported by the National Bank of Canada Research Chair on Brain Tumor Treatment and the Canadian Institutes of Health Research (grant # MOP 160075) both held by David Fortin. Martin Lepage is the Canada Research Chair in Magnetic Resonance Imaging. Marie Blanchette was the recipient of a doctoral training award from the FRQ-S. Martin Lepage and David Fortin are members of the FRQ-S funded Centre de recherche clinique Étienne – Le Bel.

Word count (including abstract, excluding references): 4,463

Total number of figures: 5

Total number of tables: 1

Keywords: BBB (blood-brain barrier), BTB (blood-tumor barrier), BBBB (blood-brain barrier disruption), DCE-MRI (dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging), malignant gliomas

Running title: Breached BTB and BBB impact of the drug size

## **Abstract**

Drug delivery to the brain is influenced by the blood-brain barrier (BBB) and blood-tumor barrier (BTB) to an extent that is still debated in neuro-oncology. In this paper, we studied the delivery across the BTB and the BBB of compounds with different molecular sizes in normal and glioma bearing rats. Studies were performed at baseline as well as after an osmotic BBB disruption (BBBD) using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging and two  $T_1$  contrast agents (CAs), Magnevist (743 Da) and Gadomer (17 000 Da). More specifically, we determined the time window for the BBB permeability, the distribution and we calculated the brain exposure to the contrast agents. A different pattern of accumulation and distribution at baseline as well as after a BBBD procedure was observed for both agents, which is consistent with their different molecular size and weight. Baseline tumor exposure was 3-fold higher for Magnevist compared to Gadomer, whereas post BBBD tumor exposure was 2-fold higher for Magnevist. Our study clearly demonstrated that the time window and extent of delivery across the intact, as well as permeabilized BTB and BBB is influenced by drug size.

## Introduction

Grade 4 astrocytomas, or glioblastoma (GBM), are the most frequent and aggressive primary brain tumors. In the last decades, the outcome of glioblastoma patients has been only slightly improved, from 12.1 to 14.6 months, with the current standard of care.<sup>1</sup> Since the report by Stupp et al. detailing this increase in median survival, every attempt at improving on these results with new drugs administered systemically via standard routes has failed. Invasion of surrounding brain parenchyma by glioma cells eliminates the possibility of complete surgical resection such that adjuvant therapies are required. Unfortunately, glioma cells become resistant to such that recurrence is inevitable. Thus, other lines of treatment need to be developed, but few of these second and third lines of treatment have been effective.<sup>2</sup> An additional limiting factor is the presence of the blood-brain barrier (BBB) that prevents chemotherapeutics from reaching infiltrated glioma cells, especially those that have migrated away from the brain-tumor barrier (BTB). Only small lipid-soluble cationic molecules with a molecular weight lower than 400 Daltons that are not substrates of the ABC transporters can cross the normal BBB.

The situation is different within the tumor itself, as newly formed blood vessels are characterized by an incompetent BBB and elevated BTB permeability that enable the detection of tumors by contrast-enhanced CT and MRI. The BTB is highly heterogeneous and its permeability depends on the tumor type and size.<sup>3,4</sup> Permeability of the BTB to contrast agents (CAs) should not be considered as a free access to the brain for all drugs, as was so clearly demonstrated by Lockman et al.<sup>5</sup>

Many approaches have been developed to deliver drugs across the BBB in order to maximize drug concentration to the tumor cells. One such strategy is the osmotic blood-brain barrier disruption (BBBD) consisting in an intra-arterial infusion of a hyperosmolar solution (mannitol 25%) that produces a transient increase in BBB permeability via the shrinkage of the endothelial cells leading to the reversible opening of the tight junctions. The BBBD process has been largely characterized in pre-clinical and clinical studies.<sup>6-11</sup> It is now used in the clinic regularly in some clinical centers with a demonstrated safety profile, and clear evidence of a therapeutic value.<sup>12</sup> The procedure has been shown to increase the survival of newly diagnosed glioblastoma patients, with a median survival of 32.2 months.<sup>10</sup> One major weakness of this therapeutic strategy remains the inter-subject

variability in the BBB permeability; this is accompanied by an inherent difficulty in predicting and evaluating the extent of this permeability.<sup>13</sup> The extent of BBBD in preclinical studies has traditionally been studied with *ex vivo* brain samples using an Evan's blue staining technique, and consequently do not allow the follow-up of the animals.<sup>13-17</sup> Few studies have looked at the dynamic process of the BBBD, and the methodology used in these experiments typically required harvesting brain specimens at each time point, thereby preventing a longitudinal observation in a single subject.<sup>18,19</sup> We have recently developed a new technique allowing the longitudinal *in vivo* study of the BBBD process by dynamic MRI.<sup>11</sup> In that report, we characterized the BBBD dynamic process for a small molecular weight MRI CA, (Magnevist, 743 Da), in a healthy rat model. We demonstrated that the BBB is permeable to Magnevist from the first minute up to 30 minutes after the mannitol infusion. Moreover, the Magnevist distribution through brain after BBBD seems to be mediated by two mechanisms: extravasation in the extravascular space immediately after the BBBD followed by diffusion in the interstitial compartment. The size of the injected drug determines the extent of its delivery across the permeabilized BBB.<sup>8,19</sup> Prior studies applied different methodologies and drug dosing, making a quantitative comparison of the gain afforded by the BBBD strategy difficult. Dynamic contrast enhanced-magnetic resonance imaging (DCE-MRI) allows for a non-invasive and quantitative characterization of drug delivery, accumulation and distribution in the brain. Using DCE-MRI, we undertook the current study with two complementary goals: 1) to characterize the dynamic BBBD process (therapeutic permeability window and distribution) in healthy Wistar rats for a larger molecule, Gadomer (17,000 Da) and 2) to quantitate the increase in exposure to these 2 CAs following a BBBD procedure in the tumor and surrounding brain parenchyma in Fischer-F98 glioma-bearing animals.

## **Materials and Methods**

All animal experiments were approved by the Université de Sherbrooke ethical committee for animal research and performed in accordance with institutional and Canadian council on Animal Care in Science guidelines. Those guidelines are based on the three R's principle of Russel and Burch and with the addition of a fourth R: respect (physical and psychological animal welfare). Eighty-three healthy Wistar male rats weighing 225-75 g, and 15 male

Fischer rats (225-50 g) were obtained from Charles River, QC, Canada. The animals were housed in pathogen free room, with one to three companions per cage, 12-h/12-h dark/light cycle, food (rodent #5075, Charles River, Qc, Canada) and water ad libidum. Animals were observed twice every day to ensure animal welfare. At the end of the experiments, animals were euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation under general anaesthesia.

### **Dynamic Contrast Enhanced-Magnetic Resonance Imaging**

Dynamic contrast enhanced-magnetic resonance imaging (DCE-MRI) experiments were performed at the Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS) with a 7T small animal MRI scanner (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) as previously described.<sup>11</sup>

A single intra-venous bolus injection of the  $T_1$  CA, mimicking antineoplastic agents, Magnevist (< 1 nm, 743 Da, charge -2 in solution) or Gadomer (5-6 nm, 17 kDa, apparent molecular weight 30 – 35 kDa, charge -2 in solution) was administered (143 mmol/L, 500  $\mu$ L over 50 s) 3 min after the beginning of the dynamic acquisition in BTB baseline measurement scans, 3 min after the BBBD procedure in the experimental scans, except for the characterization of the permeability window experiments where the delay between BBBD and CA injection was varied.<sup>20-24</sup>

The BBBD procedure was performed at day 10 post-implantation for tumor-bearing animals (F98-Fischer rats). To evaluate CA delivery related to baseline BTB permeability in the analysis of the BBBD efficacy in glioma-bearing rats, an initial scan was performed using the same MRI parameters previously described, and the clearance interval of the CAs was determined. Based on these findings, the interval between successive imaging sessions differed for each CA: the interval was 12 hours for Gadomer experiments, and 4 hours for Magnevist. Comparison of the initial scan to the post BBBD scan allowed a strict evaluation of the change in concentration that can be attributed to the BBBD procedure. The MRI signal was calibrated in terms of the concentration expressed in mM of the CA and determined using a pre-procedure  $T_1$  map.<sup>25,26</sup> We had previously determined the relaxivity of the CAs in a saline solution using the 7T small animal MRI scanner, which were 3.6 and 8.74 (mM.s)<sup>-1</sup> for Magnevist and Gadomer, respectively. The contrast agent concentration calculations were validated by supplementary experiments. Inductively coupled plasma mass spectrometry was used to quantify post mortem the gadolinium

content in each brain hemisphere of animals subjected to a BBBD procedure and DCE-MRI scan (Supplementary data).

### **Cell culture**

F98 malignant astrocytoma cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) and 1% penicillin/streptomycin (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). The cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, grown in 75 cm<sup>2</sup> flasks (Sarstedt, Montreal, QC, Canada) and passaged every 2 days.

### **Animal implantation technique**

Fifteen male Fischer rats (225-250 g) were acquired from Charles-River laboratories (St-Constant, QC, Canada) and kept under standard conditions (12 h day-night rhythm, unlimited access to water and food). The implantation technique of the F98-Fischer model was performed as described previously.<sup>12,27</sup> Briefly, animals were put under general anesthesia by an intra-peritoneal injection of a mixture of ketamine (83 mg/mL) and xylazine (17 mg/mL) at a dose of 100 mg/kg and were adequately positioned on a stereotaxic frame. Injection of 5 µL of a solution containing the F98 cell suspension ( $2 \times 10^6$  cells /mL) in DMEM with 1% penicillin/streptomycin was performed in the right caudate nucleus at the following coordinates: 1 mm anterior to the bregma, 3 mm lateral to the right of the midline, and a depth of 6 mm from the outer table of the skull. The cell suspension was infused at 1 µL/min. Bone wax was then applied to the burr hole and the scalp was closed.

### **Blood-Brain Barrier Disruption procedure**

The procedures were standardized as described in Blanchette et al.<sup>11,28</sup> Briefly, animals were put under general anesthesia with 5% isoflurane in oxygen and maintained at 2% isoflurane in oxygen (2 L/min) and then perfused intravenously (IV) with a propofol infusion (3.9 mg/kg/h) via the tail vein. Another caudal IV catheter was installed to allow the CA injection. Isoflurane was discontinued 10 minutes after the initiation of the propofol infusion. Animals were then intubated and the right carotid complex was surgically

exposed using aseptic technique. The right external carotid was isolated and catheterized in a retrograde fashion with PE50 polypropylene tubing filled with mannitol. All surgical procedures were performed on a warm pad to prevent hypothermia. Once the catheter was secured in place, a sub-cutaneous injection of atropine (0.04 mg/kg) was performed to prevent bradycardia induced by the BBBD procedure. The animals were then inserted in the 7T MRI scanner. The MRI dynamic acquisition was started and the propofol infusion was stopped three minutes later. One minute after discontinuation of propofol, 4.2 mL of a 25 % mannitol solution was infused at a rate of 0.14 cc/s. Propofol infusion was resumed 30 sec after the end of the mannitol infusion.

### **Study groups**

#### **Characterization of the BBBD permeability window for Gadomer in healthy animals**

Eighty-three healthy Wistar male rats weighing 225-275 g were randomly distributed in 2 groups to study the Gadomer permeability window following a BBBD procedure. Animals in group 1 were sorted in sub-groups corresponding to the delay between BBBD and the injection of Gadomer: at 1 (n=8), 2 (n=7), 3 (n=27), 5 (n=4), 7 (n=3), 10 (n=6), 15 (n=6), 20 (n=4) and 30 (n=2) minutes. Group 2 (control group) was divided in six sub-groups in which Gadomer was administered at 1 (n=3), 3 (n=3), 5 (n=3), 7 (n=4), 10 (n=1) and 20 (n=2) min post sham BBBD, where mannitol was replaced by saline.

#### **Gadomer distribution within the brain parenchyma**

Seven healthy Wistar rats from the permeability window group that were injected with Gadomer at the 3 min delay time-point were studied to assess the extent of the CA penetration after BBBD.

#### **Role of the baseline BBB and BTB in impeding drug delivery in F98 glioma-bearing rats**

We studied the initial pre-BBBD scans in the fifteen F98-Fischer glioma-bearing animals. The MRI signal was calibrated in terms of the concentration expressed in mM. Exposure of the tumor, ipsilateral (ipsi) and contralateral (contra) hemispheres to the CAs was computed for the first 30 minutes after their administration and expressed in mM.min.

### **Quantitation of tumor, peritumoral and contralateral brain exposure to Magnevist and Gadomer, in glioma-bearing rats after BBBD**

Fifteen F98-Fischer male rats weighing 225-250 g were randomly distributed in 4 groups (2 experimental and two control groups). Group 1 represented BBBD followed by an IV Magnevist injection (n=4) whereas group 2 represented BBBD followed by an IV Gadomer injection (n=5). The control groups were as follows: in group 3, animals received a saline infusion instead of mannitol (sham BBBD) followed by an IV Magnevist injection (n=3) whereas the same substitution was effected for group 4 (sham BBBD) which was followed by an IV Gadomer injection (n=3).

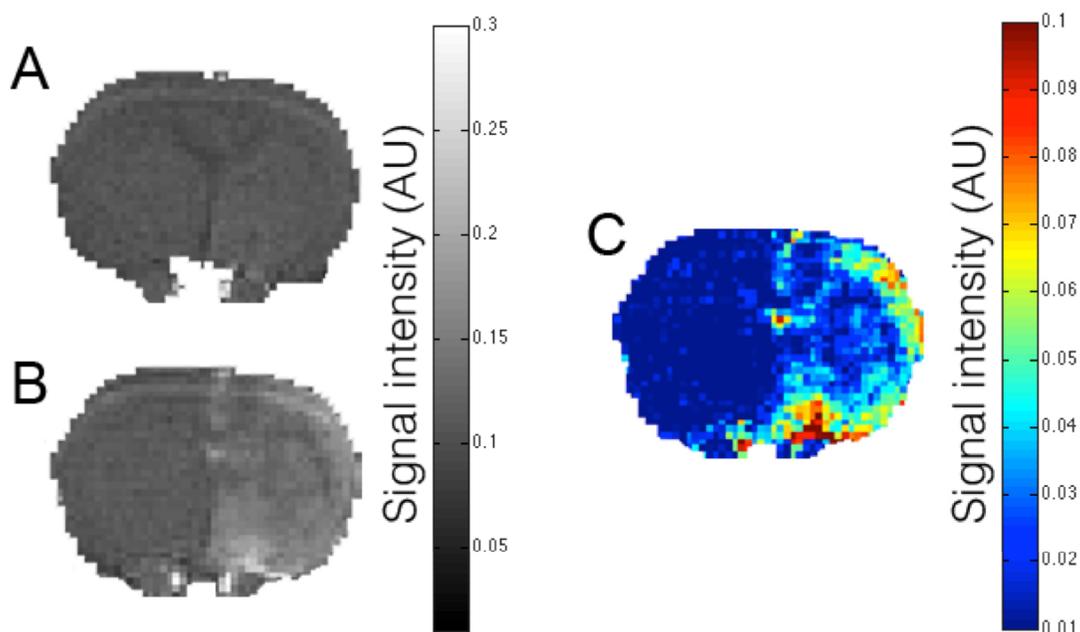
### **Statistical analysis**

Prism 5 software (GraphPad Software Inc., CA, USA) was used to perform statistical analysis. The results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). Inter-individual differences in the extent of BBBD are high; consequently statistical differences were evaluated using the Mann Whitney test with  $P \leq 0.05$ .

## **Results**

### **Characterization of the dynamic BBBD process in healthy animals with Gadomer**

Figure 1 A and B displays representative  $T_1$ -weighed MRI images prior (A), and 17 minutes after (B) a BBBD procedure and Gadomer infusion. Gadomer was infused three minutes post-BBBD and its accumulation over 15 minutes was analyzed. Gadomer accumulation in the extravascular space produced a signal enhancement that can be observed within the brain parenchyma of the treated hemisphere in the subtraction, color-coded image (Fig. 1C). Higher signal intensity is systematically observed within the cortex and the basal ganglia, paralleling the higher vascularisation density in these anatomical areas.



**Figure 1. The blood-brain barrier permeability to Gadomer is enhanced immediately after a BBBD procedure.**

Representative axial magnetic resonance imaging (MRI) brain scans of a healthy rat lying supine in a 7T MRI scanner before (A) and after (B) a BBBD procedure with a Gadomer infusion 3 min post-BBBD. Precontrast (A) and 17 min post-contrast T1-weighted (B) images showing the signal enhancement in the treated hemisphere reflecting the opening of the BBB. Color-coded image (C) representing differential signal intensity between (B) and (A). The signal enhancement is diffuse through the hemisphere, but is slightly more important in the cortex and basal ganglia.

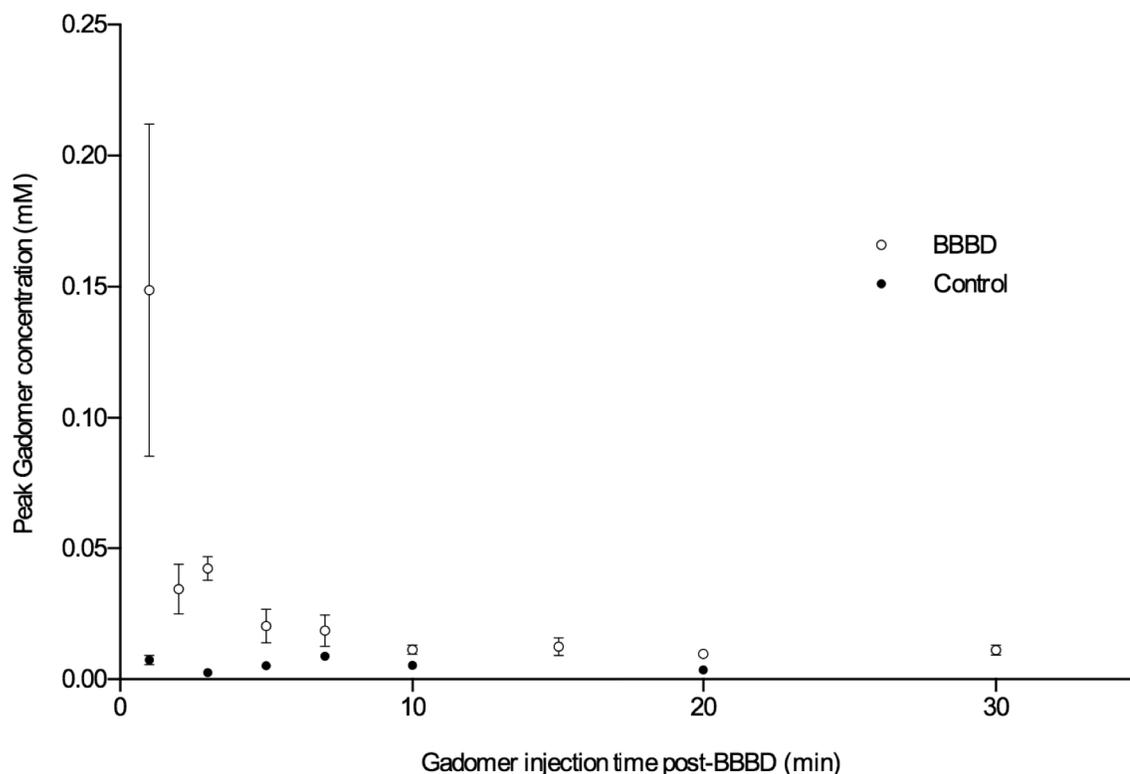
### **BBBD permeability window for Gadomer**

Two groups of animals were studied to determine the time window of the BBB permeability to Gadomer: an experimental group (n=67) in which the animals were injected with Gadomer at different time points post-BBBD (injection delays: 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, and 30 min) and a control group (n=16) with sham BBBDs (injection delays: 1, 3, 5, 7, 10, and 20 min). As the BBBD process can be highly variable between animals (for discussion on this topic, see Joshi et al. 2010), a large number of animals had to be included in each sub-group for this experiment. The data shown in Fig. 2 represent the peak Gadomer concentration (mM) in the treated hemisphere of animals injected at a specific delay after the BBBD procedure (Table 1).

**Table 1 Maximal Gadomer concentration (mM) within the whole treated hemisphere. (mean  $\pm$  S.E.M.).**

Gadomer time of injection (min)	Experiments	Controls
1	0.1487 $\pm$ 0.1794 (n=8)	0.0074 $\pm$ 0.0032 (n=3)
2	0.0344 $\pm$ 0.0253 (n=7)	-
3	0.0423 $\pm$ 0.0235 (n=27)	0.0026 $\pm$ 0.0002 (n=3)
5	0.0203 $\pm$ 0.0129 (n=4)	0.0051 $\pm$ 0.0019 (n=3)
7	0.0185 $\pm$ 0.0104 (n=3)	0.0088 $\pm$ 0.0031 (n=4)
10	0.0113 $\pm$ 0.0045 (n=6)	0.0053 (n=1)
15	0.0124 $\pm$ 0.0084 (n=6)	-
20	0.0097 $\pm$ 0.0033 (n=4)	0.0035 $\pm$ 0.0017 (n=2)
30	0.0112 $\pm$ 0.0026 (n=2)	-

We observed that the maximal accumulation of Gadomer in the treated hemisphere took place when the CA was injected 1 min after the BBBD procedure, the earliest time point studied. The BBB permeability to Gadomer rapidly decreased thereafter. BBB permeability to Gadomer returned to baseline approximately 30 minutes after the mannitol infusion (Fig. 2).



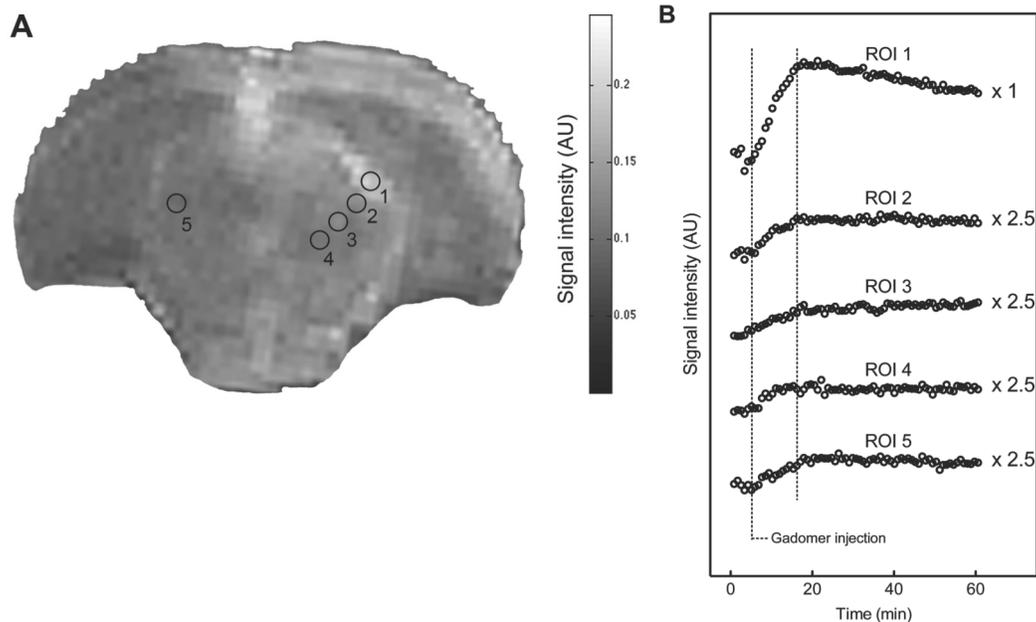
**Figure 2. BBBD therapeutic window for Gadomer in healthy Wistar rats.**

The empty circles correspond to the average (mean  $\pm$  S.E.M.) concentration of Gadomer (mM) at the peak of the concentration over time curve, within the treated hemisphere of animals, filled circles for control animals. Animals were injected at a specific delay post-BBBD.

### Gadomer distribution in the brain after BBBD

Seven representative animals from the permeability window experimental sub-group, injected with Gadomer 3 min post-BBBD were studied. This specific time point was chosen based on our earlier study on Magnevist to allow an adequate comparison between both CAs.<sup>11</sup> Figure 3A shows a 15 min post-contrast  $T_1$ -weighted image where 5 regions of interest (ROIs) have been selected as per our earlier report.<sup>11</sup> ROI 1 was placed in a highly-vascularized sub-arachnoid region between the brainstem and telencephalic structures. In this area, we noticed that the signal intensity decreased immediately after mannitol infusion as the BBBD process induces a plasma leakage and edema in the perivascular space. This area subsequently displays the highest  $T_1$ -weighted signal intensity increase when the CA

is infused. ROIs 2 to 4 were located gradually away from ROI 1 marching toward the midline within the ipsilateral hemisphere, whereas ROI 5 transgressed the midline, lying at a distance in the contralateral hemisphere. The time to reach maximal signal intensity was similar for all ROIs, approximately 14 minutes after the Gadomer injection (Fig. 3B). The accumulation of the CA observed at the 14<sup>th</sup> minute in ROIs 1 to 4 corresponds to the extravasation of Gadomer within the extravascular space following the BBB permeabilization. The maximum accumulation in ROI 5, observed during the same interval, likely corresponds to the maximal Gadomer concentration in the vascular compartment. Indeed, the observed accumulation was much smaller than in ROIs 1-4 and was equivalent to Gadomer accumulation for this ROI in control animals. Contrary to Magnevist, our data suggest that Gadomer does not diffuse within the brain parenchyma. If it does, the process appears to be exceedingly slower and of a lesser magnitude than what was observed for Magnevist, as expected from its larger size.<sup>11,22</sup>



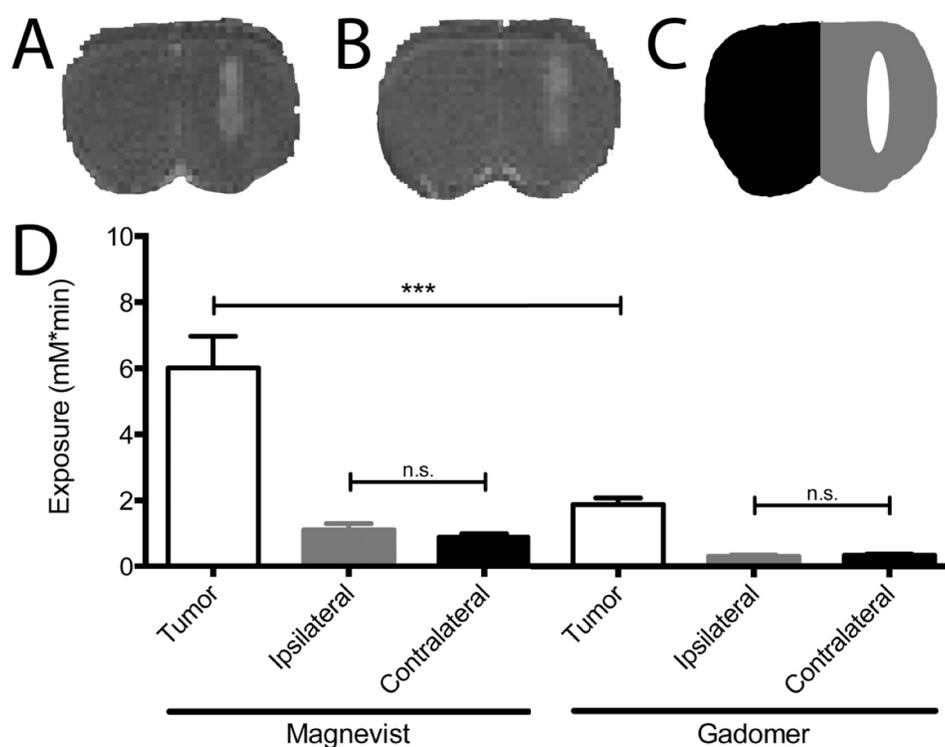
**Figure 3. Representative T1-weighted axial MRI image 15 min post-contrast (A).**

The Gadomer was administered 3 min post-BBBD. The signal enhancement pattern for the whole dynamic of each regions of interest (ROIs) is depicted in (B). Each circle represents the mean of seven animals for the same data point. The time to reach maximum concentration for each ROI is indicated by a dashed line. The enhancement curves of the ROIs 2 to 5 were multiplied by 2.5 in order to plot the curves on the same scale and make their comparison easier. Maximal signal enhancement of the treated hemisphere is observed approximately at 14 minutes after the Gadomer injection for each ROI.

### Baseline BTB and BBB permeability in Fischer-F98 rats

In order to study BTB permeability in the Fischer-F98 model, we measured baseline tumor exposure to Magnevist and Gadomer in glioma-bearing animals. Representative  $T_1$ -weighted MRI images of tumor enhancement for Magnevist and Gadomer injected animals are shown in Fig. 4A and B. Three ROIs were studied: the tumor area, the ipsilateral distant parenchyma, and the contralateral hemisphere (Fig. 4C). For each ROI, the exposure to the CAs was estimated for the first 30 minutes following the CAs injection (Fig. 4D). Tumor exposure was significantly different for each CA, with values of 6.15 and 1.81 mM.min for Magnevist and Gadomer injected at the same dose, respectively (Mann Whitney test, two-tailed,  $P = 0.0003$ , Magnevist  $n=7$ , Gadomer  $n=8$ ). We did not observe a significant difference between the ipsilateral distant parenchyma and the contralateral hemisphere

exposure either to Magnevist (1.05 mM.min ipsi vs 0.85 mM.min contra, Mann Whitney test, two-tailed,  $P = 0.3176$ ) or Gadomer (0.30 mM.min ipsi vs 0.32 mM.min contra, Mann Whitney test, two-tailed,  $P = 0.7984$ ). Together, these observations highlight the important difference in permeability between BTB and BBB, as well as the inherent capacity of the BBB to limit the extravasation of Magnevist and Gadomer into the brain parenchyma. The data suggest that molecular weight determines the ability of a compound to extravasate through the permeabilized BBB.



**Figure 4. BTB and BBB delivery impediment demonstrated by tumor and parenchyma exposure to Magnevist and Gadomer for 30 minutes post-contrast agent injection on the initial scan.**

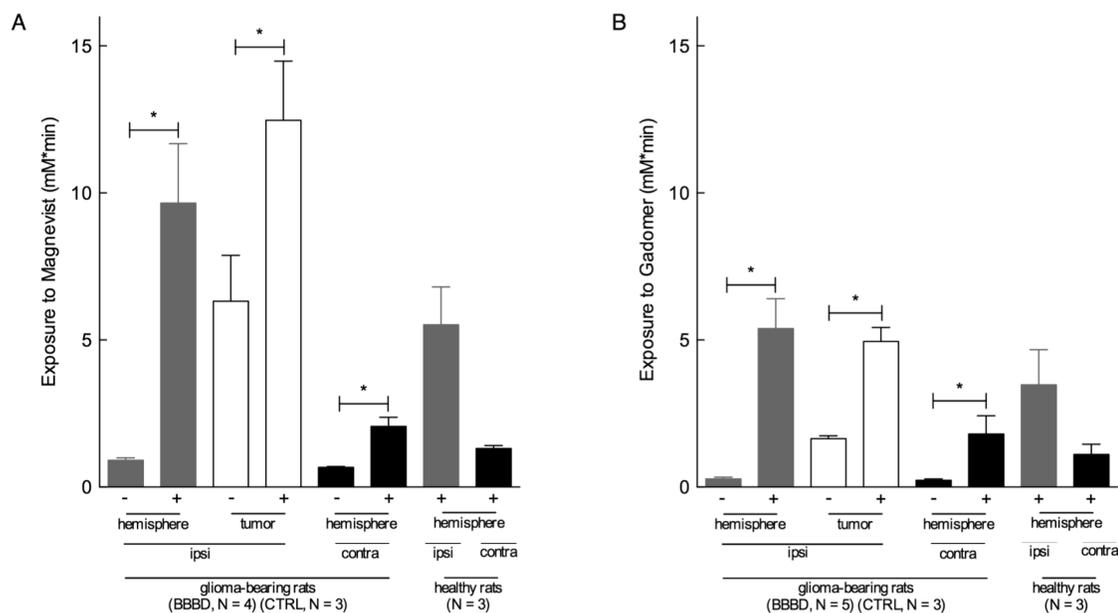
$T_1$ -weighted image of a F98-Fischer rat 15 minutes after (A) Magnevist or (B) Gadomer injection. C) Three regions of interest (ROIs): tumor (white, corresponding to the BTB) and parenchyma of the ipsilateral (grey, BBB ipsi) and of the contralateral (black, BBB contra) hemispheres are depicted on the corresponding  $T_1$ -weighted image. D) The tumor exposure to the two CAs was significantly different (Mann Whitney test, one-tailed,  $P = 0.0002$ , Magnevist:  $n=7$  and Gadomer:  $n=8$ ).

### **Tumor and distant brain parenchyma exposure to CAs after a BBBB procedure in glioma-bearing animals**

The permeable neovasculature of the BTB is expected to result in some level of exposure of the tumor to a CA. We first measured this baseline permeability with a first scan performed 4 hours (Magnevist) or 12 hours (Gadomer) before the BBBB procedure. Segmentation of the ROIs was identical to those in the prior experiment (see Fig. 4C) and consisted of the tumor, ipsilateral distant parenchyma, and contralateral hemisphere. Figure 5 displays the exposure to the CAs for 30 minutes after its injection performed at 3 min post-BBBB. Baseline exposure to Magnevist (Fig. 5A), and Gadomer (Fig. 5B) prior to BBBB was not significantly different from the exposure calculated for the control groups (data not shown). Tumor exposure to Magnevist increased 2-fold after BBBB, from 6.32 to 12.47 mM.min (Mann Whitney test, one-tailed,  $P = 0.0286$ ), whereas it increased 3-fold for Gadomer, from 1.65 to 4.95 mM.min (Mann Whitney test, one-tailed,  $P = 0.0179$ ). Tumor exposure was higher to Magnevist than to Gadomer by a factor of 2, either at baseline or after BBBB.

In these tumor-bearing animals, the BBBB procedure also triggered a  $T_1$ -weighted contrast enhancement in the distant ipsilateral parenchyma as well as in the contralateral hemisphere for the two CAs. This increase in exposure was similar to that observed in normal animals treated with the BBBB procedure.

Interestingly, the BBBB procedure appears to produce an evenly distributed permeability of the BBB in the treated hemisphere, as tumor exposure was not significantly different from that of the ipsilateral distant parenchyma. Moreover, exposure of the permeabilized hemisphere was not significantly different between tumor-bearing animals and healthy animals for both CAs injected (Mann Whitney test, two-tailed,  $P = 0.1143$  and  $0.2500$  for Magnevist and Gadomer, respectively), implying that the presence of the tumor does not alter the BBBB process.



**Figure 5. (A) Magnevist and (B) Gadomer exposure for the 30 minutes following the CA injection after a BBBD procedure performed in glioma-bearing rats for different brain regions (mean  $\pm$  S.E.M.).**

Using the same color code as in Fig. 4, the Gadomer and Magnevist exposure in the right (grey) and left hemisphere (black) and in the tumor (white) were significantly higher in the BBBD groups than in the control groups. (Mann Whitney test, one-tailed,  $*P < 0.03$ , Magnevist BBBD:  $n=4$ , Magnevist control:  $n=3$ , Gadomer BBBD:  $n=5$  and Gadomer control:  $n=3$ )

- = control group (saline instead of mannitol), + = BBBD group

## Discussion

Numerous reports clearly demonstrated that the BTB and the BBB drastically reduced the drug delivery to the brain parenchyma. Surprisingly, this subject is still not widely acknowledged in neuro-oncology. Even when the most efficient BBB permeabilizing technique (BBBD) is used, exposure to the injected drug is still limited. The results obtained in this study clearly demonstrate that delivery across the BTB and BBB depends on the size of the administered compound, even after BBBD.

It was our goal to study the impact of the size and molecular weight contrast agents as surrogates for the CNS delivery of chemotherapy agents. To do this, we determined the permeability of the BBB to Gadomer, a contrast agent larger than Magnevist, which we studied previously.<sup>11</sup> The dynamic distribution of Gadomer was different than that of Magnevist in several aspects. First, BBB permeability to Gadomer rapidly decreased in the

first five minutes after the BBBD procedure (Fig. 2). Approximately 30 minutes after the mannitol infusion, the BBB was permeable to Magnevist but not to Gadomer, thereby suggesting that the period during which a compound can cross the permeabilized BBB is determined by the molecular weight and size. This is in agreement with the hypothesis of Rapoport and Robinson whereby pores are created by the BBBD, and their diameter decreases rapidly as the endothelial cells gradually rehydrate.<sup>18</sup> The reported duration of the BBB permeability window varies considerably.<sup>9,11,14,29-34</sup> These studies were performed in different species and with different reporter molecules. Our study suggests that the permeability window of the BBBD process appears modulated according to the size and molecular weight of the compound. Post-BBBD Gadomer distribution within the brain parenchyma of the treated hemisphere in normal animals appeared homogeneous (Fig. 1B). Slight variations were observed depending of the brain areas surveyed due to a higher vascular density in the cortex and the deep ganglia compared to the white matter (Fig. 1B and 1C). Gadomer distribution within the brain parenchyma appeared to be regulated exclusively by its extravasation immediately after mannitol infusion. As shown in Fig. 3B, Gadomer accumulated in all brain areas to a maximum concentration at 14 minutes post-injection, and was followed by a very low clearance rate. This is in contrast with the post BBBD Magnevist distribution process, which displayed diffusion within the extracellular space in addition to the immediate extravasation.<sup>11</sup> We attribute this difference in behaviour between both CA to their difference in molecular weight and size such that the diffusion of Gadomer within the extracellular space is considerably reduced. This is consistent with prior reports linking diffusion and molecular weight.<sup>35,36</sup>

The second set of experiments consisted in assessing the exposure of the brain of F98 implanted Fischer rats to the two CAs without any manipulation of the BBB. This provided an estimate of the baseline BTB and BBB permeability to these 2 compounds. When studying the brain parenchyma at a distance from the tumor implantation nodule (ipsilateral and contralateral hemisphere), we found no significant baseline accumulation of either Magnevist or Gadomer. This can be appreciated in Figure 4. The exposure values calculated for both CAs in these areas indeed correspond to their presence within the vascular compartment. This is consistent with the absence of BTB away from the tumor

nodule and with an intact BBB that prevented accumulation of the two compounds in the brain parenchyma. In contrast, major differences were observed in the intrinsic tumor exposure to both CAs. Baseline exposure to Magnevist was three fold higher than to Gadomer (Fig. 4D). This finding implies that BTB permeability is drug-dependant and varies according to the different physical characteristics of a given compound, such as molecular weight and size.

Finally, we evaluated the BBB and BTB permeability after BBBD in tumor-bearing animals. The BBBD procedure did indeed increase delivery to the tumor but also to the surrounding brain tissue. Interestingly, the extent in the increase of exposure to the two CAs generated by the BBBD was similar in the tumor bearing animals and in the healthy animals, thereby suggesting that the presence of the lesion does not impact the efficacy of the BBBD process (Fig.5).

Our study clearly suggests a link between molecular weight and size of the administered agent in relation to the apparent size of the pores between the endothelial cells, reducing as a function of time post-BBBD. Methodologies used and compound tested covered a wide array in previous BBB permeability studies. It may therefore not be surprising that results on the BBB permeability window post-BBBD differed from ours.<sup>8,11,29,37-41</sup> In order to eliminate confounding factors, we selected 2 CAs having the same charge, -2, in solution but a different weight and size to perform our study.<sup>20</sup> Since, other than size and molecular weight, molecular charge is also expected to have an impact on drug penetration, since the opened tight junctions are negatively charged.<sup>11,25</sup> Together, these observations support the notion that drug delivery to the brain is modulated in a drug- size dependant manner after a BBBD procedure or at baseline.

Malignant gliomas are very aggressive tumors that remain resistant to treatment for numerous reasons. Not only do they display an aggressive infiltrative phenotype that prevents a complete resection, but they are also sheltered from the antineoplastic drugs by the BBB and BTB. As shown in this study, the BTB is selectively permeable to drugs of different molecular weight. Clearly, the use of the BBBD procedure is potent at increasing delivery of molecules across the BTB and BBB. However, the yield of the procedure is affected by different factors including the size of the molecule. Certain limitations in our experimental design need to be considered before drawing a parallel and extending

conclusions from this work to the clinical use of the BBBD procedure. Due to limitations related to the experimental design, the CAs were administered intravenously, instead of the intra-arterial route normally used for chemotherapeutics. Thereby, our results severely underestimate the delivery potential of this strategy. Moreover, our animal model does not include other treatment modalities such as radiotherapy or surgery, which can further increase the BBB permeability. Next, our experimental approach with a standardized glioma-bearing rat model does not replicate the heterogeneity of the tumor tissue and of the neovascularization observed in the clinical situation. It is also important to keep in mind that the results may depend on the species under study.

Therefore, when considering the treatment of primary brain tumors, a thorough research effort should study the BTB, BBB permeability as well as the outcome of the BBBD process for a complete panel of cytotoxic drugs, including substrates of the efflux pumps, another factor that was not included in the present study. Investigators should also detail the brain penetration potential of drugs and correlate their brain accumulation with clinical outcome. Efforts on the use or the development of strategies for drug delivery across the BBB and the BTB should be promoted in the field of neuro-oncology.

### **Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

No potential conflicts of interest were disclosed.

Supplementary information is available to the reviewers at the JCBFM website.

## References

- 1 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 987–96.
- 2 Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Oncology* 2007; **25**: 4722–9.
- 3 Kroll RA, Neuwelt EA. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery* 1998; **42**: 1083–99; discussion 1099–100.
- 4 Percy DB, Ribot EJ, Chen Y, McFadden C, Simeone C, Steeg PS, *et al.* In vivo characterization of changing blood-tumor barrier permeability in a mouse model of breast cancer metastasis: a complementary magnetic resonance imaging approach. *Invest Radiol* 2011; **46**: 718–25.
- 5 Lockman PR, Mittapalli RK, Taskar KS, Rudraraju V, Gril B, Bohn KA, *et al.* Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 5664–78.
- 6 Neuwelt EA, Maravilla KR, Frenkel EP, Rapoport SI, Hill SA, Barnett PA. Osmotic blood-brain barrier disruption. Computerized tomographic monitoring of chemotherapeutic agent delivery. *J Clin Invest* 1979; **64**: 684–8.
- 7 Neuwelt EA, Hill SA, Frenkel EP, Diehl JT, Maravilla KR, Vu LH, *et al.* Osmotic blood-brain barrier disruption: pharmacodynamic studies in dogs and a clinical phase I trial in patients with malignant brain tumors. *Cancer Treat Rep* 1981; **65 Suppl 2**: 39–43.
- 8 Ziylan YZ, Robinson PJ, Rapoport SI. Blood-brain barrier permeability to sucrose and dextran after osmotic opening. *Am J Physiol* 1984; **247**: R634–8.

- 9 Neuwelt EA, Minna J, Frenkel E, Barnett PA, McCormick CI. Osmotic blood-brain barrier opening to IgM monoclonal antibody in the rat. *Am J Physiol* 1986; **250**: R875–83.
- 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* 2005; **103**: 2606–15.
- 11 Blanchette M, Pellerin M, Tremblay L, Lepage M, Fortin D. Real-time monitoring of gadolinium diethylenetriamine penta-acetic acid during osmotic blood-brain barrier disruption using magnetic resonance imaging in normal wistar rats. *Neurosurgery* 2009; **65**: 344–50; discussion350–1.
- 12 Doolittle ND, Miner ME, Hall WA, Siegal T, Jerome E, Osztie E, *et al.* 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* 2000; **88**: 637–47.
- 13 Joshi S, Ergin A, Wang M, Reif R, Zhang J, Bruce JN, *et al.* Inconsistent blood brain barrier disruption by intraarterial mannitol in rabbits: implications for chemotherapy. *J Neurooncol* 2010; **104**: 11–9.
- 14 Rapoport SI, Fredericks WR, Ohno K, Pettigrew KD. Quantitative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am J Physiol* 1980; **238**: R421–31.
- 15 Ohata M, Fredericks WR, Neuwelt EA, Sundaram U, Rapoport SI. [3H]Methotrexate loss from the rat brain following enhanced uptake by osmotic opening of the blood-brain barrier. *Cancer Res* 1985; **45**: 1092–6.
- 16 Kroll RA, Pagel MA, Muldoon LL, Roman-Goldstein S, Fiamengo SA, Neuwelt EA. Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: a comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood-tumor barriers. *Neurosurgery* 1998; **43**: 879–86; discussion886–9.

- 17 Fortin D, McCormick CI, Remsen LG, Nixon R, Neuwelt EA. Unexpected neurotoxicity of etoposide phosphate administered in combination with other chemotherapeutic agents after blood-brain barrier modification to enhance delivery, using propofol for general anesthesia, in a rat model. *Neurosurgery* 2000; **47**: 199–207.
- 18 Rapoport SI, Robinson PJ. Tight-junctional modification as the basis of osmotic opening of the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci* 1986; **481**: 250–67.
- 19 Robinson PJ, Rapoport SI. Size selectivity of blood-brain barrier permeability at various times after osmotic opening. *Am J Physiol* 1987; **253**: R459–66.
- 20 Nguyen-minh C, Haughton VM, An HS, You JW, Wook S, Ho KC. Contrast media of high and low molecular weights in the detection of recurrent herniated disks. *AJNR Am J Neuroradiol* 1998; **19**: 889–93.
- 21 Su MY, Wang Z, Nalcioglu O. Investigation of longitudinal vascular changes in control and chemotherapy-treated tumors to serve as therapeutic efficacy predictors. *J Magn Reson Imaging* 1999; **9**: 128–37.
- 22 Misselwitz B, Schmitt-Willich H, Ebert W, Frenzel T, Weinmann HJ. Pharmacokinetics of Gadomer-17, a new dendritic magnetic resonance contrast agent. *MAGMA* 2001; **12**: 128–34.
- 23 Verhoye M, van der Sanden BPJ, Rijken PFJW, Peters HPW, Van der Kogel AJ, Pée G, *et al.* Assessment of the neovascular permeability in glioma xenografts by dynamic T(1) MRI with Gadomer-17. *Magn Reson Med* 2002; **47**: 305–13.
- 24 Artemov D. Molecular magnetic resonance imaging with targeted contrast agents. *J Cell Biochem* 2003; **90**: 518–24.
- 25 Armstrong BK, Smith Q, Rapoport SI, Strohaln J, Kopeček J, Duncan R. Osmotic opening of the blood-brain barrier permeability to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. Effect of polymer -Mw charge and hydrophobicity. *Journal of Controlled Release* 1989; **10**: 27–35.

- 26 Landis CS, Li X, Telang FW, Coderre JA, Micca PL, Rooney WD, *et al.* Determination of the MRI contrast agent concentration time course in vivo following bolus injection: effect of equilibrium transcytolemmal water exchange. *Magn Reson Med* 2000; **44**: 563–74.
- 27 Mathieu D, Lecomte R, Tsanaclis AM, Larouche A, Fortin D. Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can J Neurol Sci* 2007; **34**: 296–306.
- 28 Blanchette M, Fortin D. Blood-brain barrier disruption in the treatment of brain tumors. *Methods Mol Biol* 2011; **686**: 447–63.
- 29 Kessler RM, Goble JC, Bird JH, Girton ME, Doppman JL, Rapoport SI, *et al.* Measurement of blood-brain barrier permeability with positron emission tomography and [68Ga]EDTA. *J Cereb Blood Flow Metab* 1984; **4**: 323–8.
- 30 Neuwelt EA, Barnett PA, Hellström I, Hellström KE, Beaumier P, McCormick CI, *et al.* Delivery of melanoma-associated immunoglobulin monoclonal antibody and Fab fragments to normal brain utilizing osmotic blood-brain barrier disruption. *Cancer Res* 1988; **48**: 4725–9.
- 31 Neuwelt EA, Pagel MA, Dix RD. Delivery of ultraviolet-inactivated 35S-herpesvirus across an osmotically modified blood-brain barrier. *J Neurosurg* 1991; **74**: 475–9.
- 32 Zünkeler B, Carson RE, Olson J, Blasberg RG, Girton M, Bacher J, *et al.* Hyperosmolar blood-brain barrier disruption in baboons: an in vivo study using positron emission tomography and rubidium-82. *J Neurosurg* 1996; **84**: 494–502.
- 33 Zünkeler B, Carson RE, Olson J, Blasberg RG, DeVroom H, Lutz RJ, *et al.* Quantification and pharmacokinetics of blood-brain barrier disruption in humans. *J Neurosurg* 1996; **85**: 1056–65.
- 34 Bhattacharjee AK, Nagashima T, Kondoh T, Tamaki N. Quantification of early blood-brain barrier disruption by in situ brain perfusion technique. *Brain Res Brain Res Protoc* 2001; **8**: 126–31.

- 35 Syková E, Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev* 2008; **88**: 1277–340.
- 36 Thorne RG, Nicholson C. In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 5567–72.
- 37 Zhang W, Mojsilovic-Petrovic J, Andrade MF, Zhang H, Ball M, Stanimirovic DB. The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *FASEB J* 2003; **17**: 2085–7.
- 38 Barranger JA, Rapoport SI, Fredericks WR, Pentchev PG, MacDermot KD, Steusing JK, *et al.* Modification of the blood-brain barrier: increased concentration and fate of enzymes entering the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 481–5.
- 39 Neuwelt EA, Frenkel EP, Rapoport S, Barnett P. Effect of osmotic blood-brain barrier disruption on methotrexate pharmacokinetics in the dog. *Neurosurgery* 1980; **7**: 36–43.
- 40 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* 2000; **92**: 599–605.
- 41 Bhattacharjee AK, Nagashima T, Kondoh T, Tamaki N. The effects of the Na(+)/Ca(++) exchange blocker on osmotic blood-brain barrier disruption. *Brain Res* 2001; **900**: 157–62.

## **Supplementary information**

We wanted to evaluate the robustness of the MRI-derived concentrations. First, we confirmed that the signal enhancement was not related to the clearance of vasogenic oedema induced by the BBBD. This was achieved by measuring the signal drop following the BBBD disruption procedure in normal animals not injected with CA. We found that the signal drop triggered by BBBD remained constant for the 30 minutes acquisition period following mannitol infusion (data not shown). These data suggest that the CA concentration calculated from the MRI signal could be slightly underestimated, as we used the first 3 sets of images, acquired prior to the BBBD procedure, to establish  $I_0$ . Second, it has been demonstrated that Gd-DTPA relaxivity changes with the concentration of the macromolecular contents (Stanisz GJ, Henkelman RM. Gd-DTPA relaxivity depends on macromolecular content. *Magn Reson Med.* 2000Nov.;44(5): 665–7.). Since we have calculated the relaxivity of the CAs in a saline solution, it is highly probable that the relaxivity of both CAs has been underestimated. This underestimation could have led to a slight underestimation in the calculated concentration of the CAs. In order to verify this issue, we carried out a set of experiments where we compared the image-derived concentration with the concentration measured by ICP-MS. We did not find significant differences (Supp. Fig.1). We thereby conclude that these unavoidable biases did not significantly affect the validity of our results.

## **Materials and Methods**

### **Evaluation of the reliability of the Magnevist and Gadomer computed quantitation**

Eleven normal Wistar rats were submitted to a BBBD procedure during a dynamic MRI acquisition (Magnevist n=5, Gadomer n=6). At the conclusion of the acquisition, the animals were euthanized and their brain harvested. The animals were not perfused in order to preserve CA present in the vessel lumen. The brains were sectioned in a way to match the corresponding MRI slices at study. Brain sections were solubilized in an aqueous solution of nitric acid (20%), and hydrogen peroxide (6%). Gadolinium atoms were quantified in brain section suspensions using inductively coupled plasma mass

spectrometry (ICP-MS). ICP-MS results were reported in mM and compared to the CA concentration calculated using the MRI signal of the last 3 sets of images of the dynamic acquisition to validate our methodology.

### **Statistical analysis**

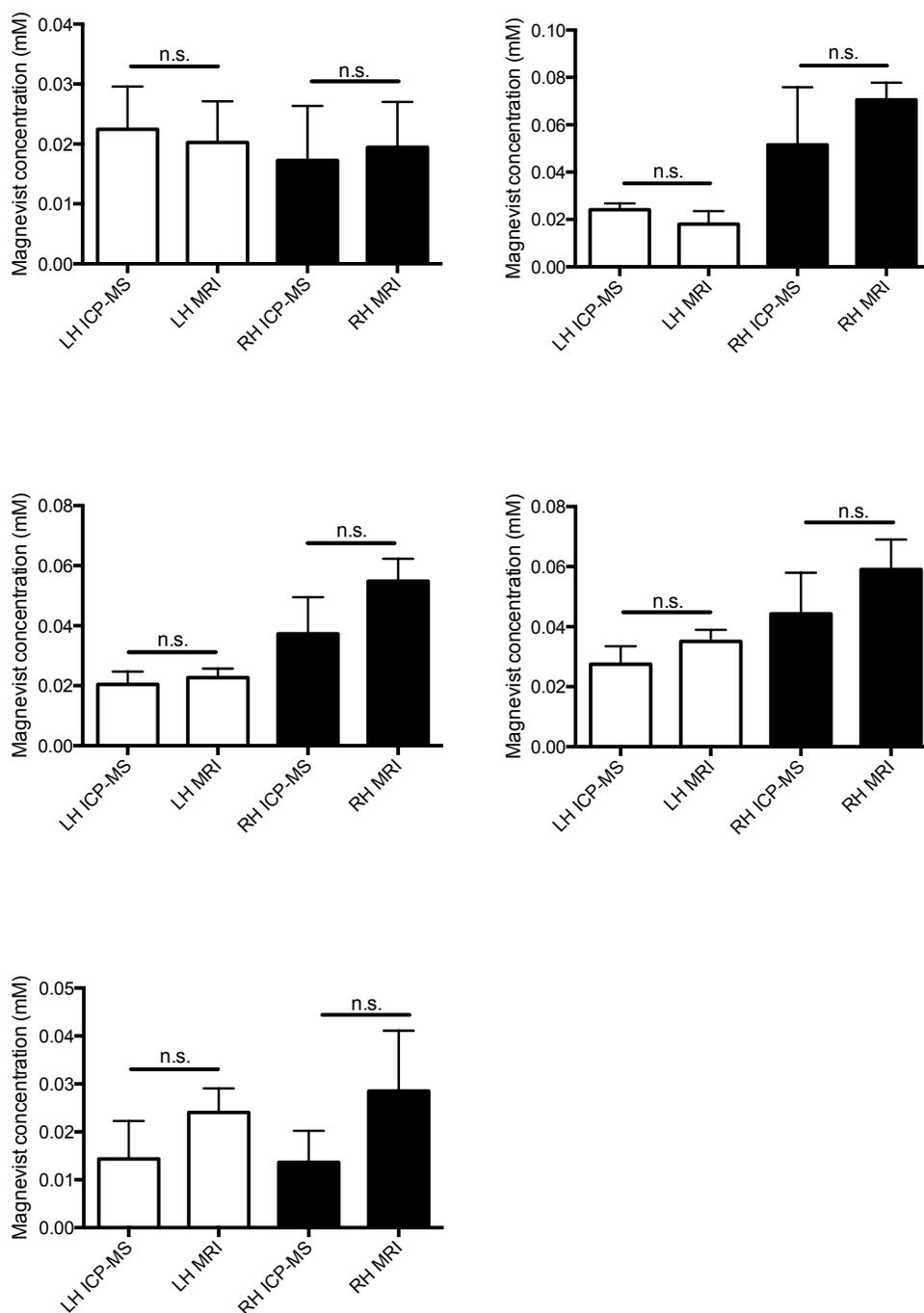
The results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.) A paired t-test, ( $P < 0.05$ ) was performed to determine any significant difference between the Gd concentration computed by MRI signal calculations and the ICP-MS measurements.

## **Results**

### **Evaluation of the accuracy of the Magnevist and Gadomer image-derived quantitation**

Supplementary Figure 1 represents the Magnevist A) and Gadomer B) mean concentration for both hemispheres at the end of the dynamic acquisition calculated from MRI and measured by ICP-MS. The concentrations determined by the two methods were not significantly different; this was true for both CAs.

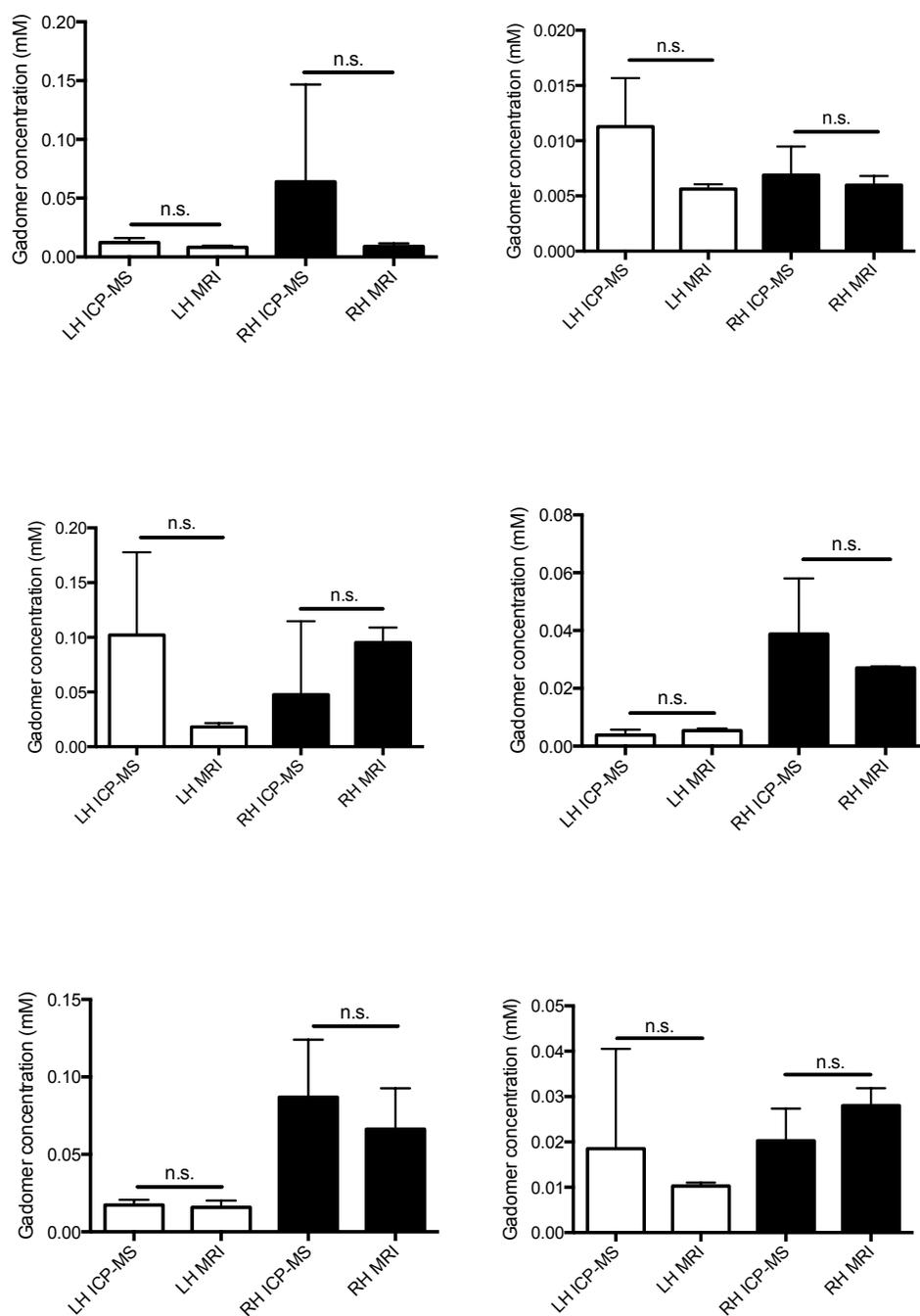
## Supplementary Figure S1A



**Figure Supplementary Fig. S1. (A) Magnevist concentration determined by ICP-MS and MRI signal calculations.**

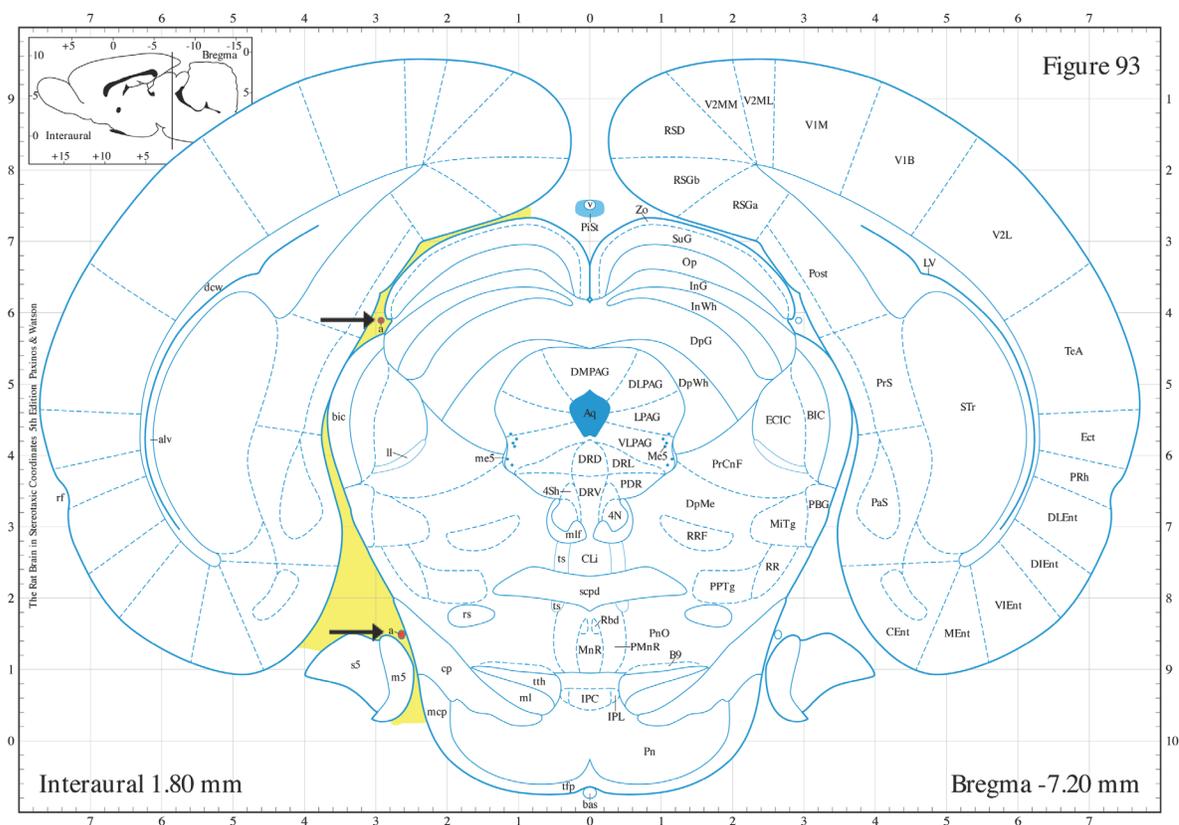
Each graph represents an animal CA concentration in the untreated (left hemisphere, LH) and treated (right hemisphere, RH) hemisphere (mean  $\pm$  SD) for each measurement method. No statistical difference was found.

## Supplementary Figure S1B



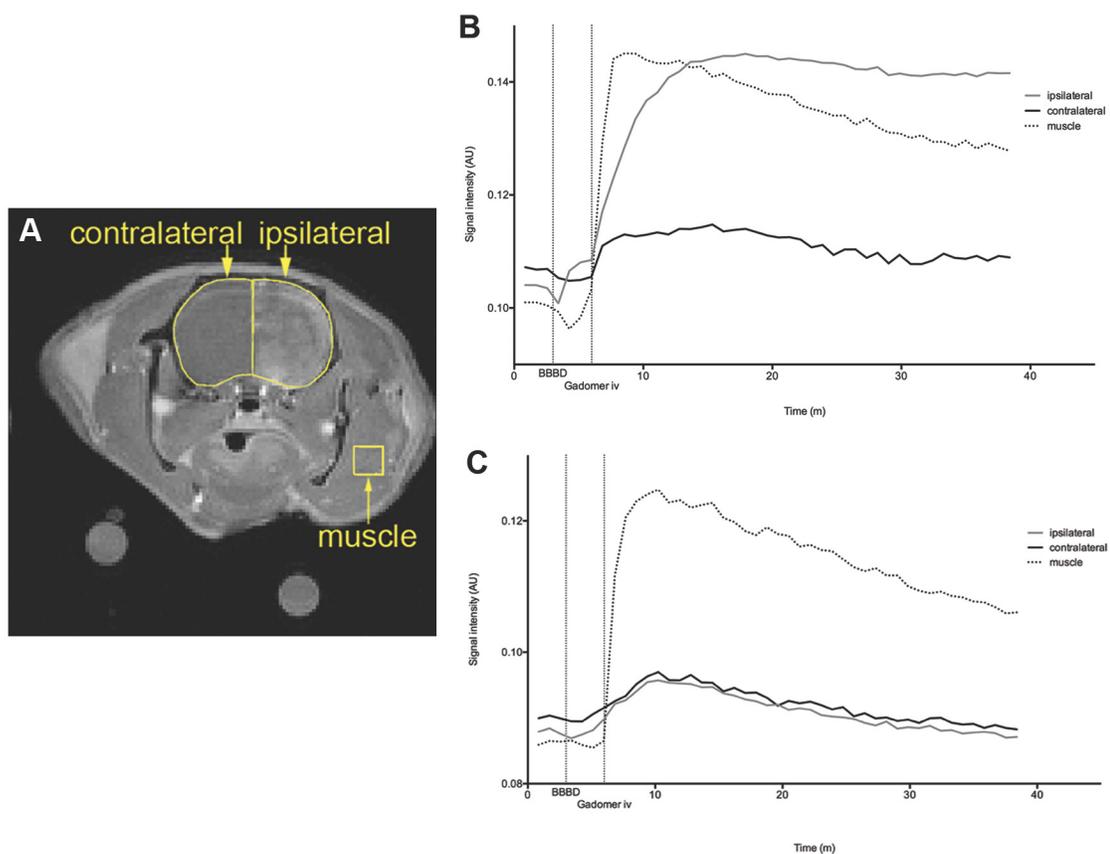
**Figure Supplementary Fig. S1. B) Gadomer concentration determined by ICP-MS and MRI signal calculations.**

Each graph represents an animal CA concentration in the untreated (left hemisphere, LH) and treated (right hemisphere, RH) hemisphere (mean  $\pm$  SD) for each measurement method. No statistical difference was found.



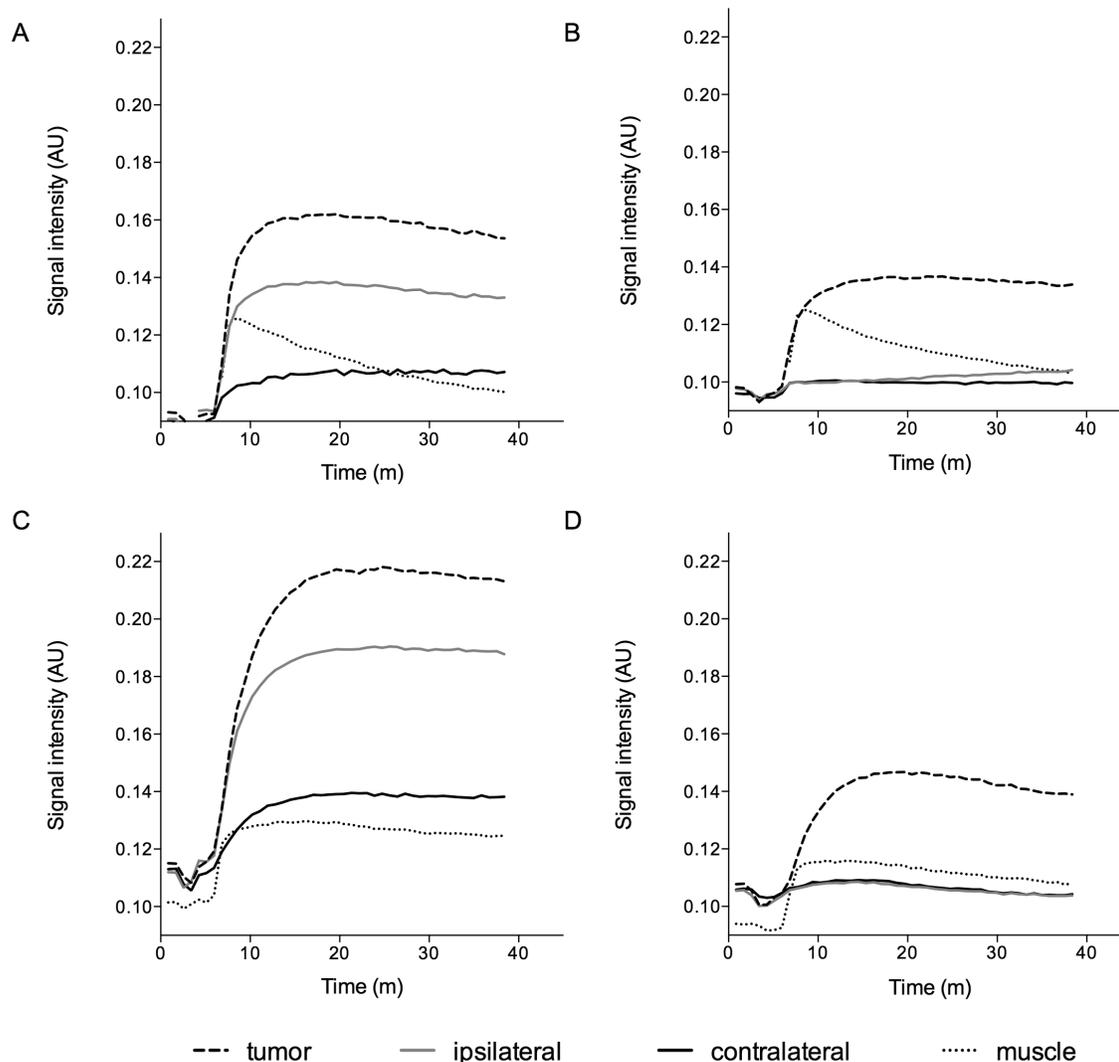
**Figure Supplementary Fig. S2. Diagram of the rat brain section corresponding to Figure 3A.**

The brainstem subarachnoid cisterna (highlighted in yellow) contains many large arteries (two are illustrated in the figure and are identified with black arrows). Those arteries are divided in multiple branches that irrigate nearby brain parenchyma more specifically of the brainstem. (Modified from Paxinos and Watson *The Rat Brain Atlas in stereotaxic coordinates*, Fifth edition, 2005).



**Figure Supplementary Fig. S3. Signal enhancement over time in selected ROIs.**

Three ROIs: muscle, ipsilateral and contralateral hemispheres have been segmented (A) and their signal enhancement plotted over time in a BBBD (B) and control (saline instead of mannitol) (C) experiment. BBBD and Gadomer injection time point are identified on the graph by vertical dashed lines. After Gadomer iv injection signal enhancement in muscle (non-CNS region) and contralateral hemisphere is similar between BBBD and control experiments.



**Figure Supplementary Fig. S4. Signal enhancement pattern for the whole dynamic for four different ROIs: tumor, muscle, ipsilateral and contralateral hemispheres for (A) Magnevist BBBD, (B) Magnevist control, (C) Gadomer BBBD and (D) Gadomer control groups.**

Magnevist and Gadomer delivery to the tumor and treated hemisphere is enhanced in BBBD groups, as signal intensity of these ROIs is higher compared to non-treated hemisphere and sustained compared to muscle.

## **OBJECTIF #2**

### **3.1 Introduction**

Cet objectif a été réalisé dans le but de quantifier l'expression et de déterminer la localisation de différentes pompes à efflux dans des échantillons de GBM comparativement aux tissus sains. Ainsi, nous pourrions déterminer parmi les pompes à efflux étudiées lesquelles seraient responsables de la limitation de l'acheminement à travers la BHE et BHT ainsi que de la chimiorésistance des cellules tumorales gliales.

### **3.2 Matériel et méthodes**

Afin d'étudier l'expression des gènes par réaction de polymérase en chaîne quantitative (qPCR), nous devions premièrement valider des gènes de référence. Ces derniers sont nécessaires pour normaliser l'expression des gènes entre échantillons et entre les essais de qPCR. Nous avons donc dans un premier temps évalué la stabilité de 8 gènes candidats pour la normalisation (Tableau 3.1). Tous les essais incluant ceux des pompes à efflux ont été faits avec une sonde d'hydrolyse et la localisation des pompes à efflux par immunohistochimie sur coupes paraffinées. Nous avons également sélectionné 4 pompes à efflux pour notre étude (Tableau 3.1).

**Tableau 3.1 Nom du gène et de la protéine associée des différentes pompes à efflux étudiées.**

<b>Gène</b>	<b>Protéine</b>
<i>ABCB1</i>	glycoprotéine P (PGP)
<i>ABCC1</i>	multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)
<i>ABCC3</i>	multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3)
<i>ABCG2</i>	breast cancer resistance protein (BCRP)
<i>HPRT</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransférase
<i>SFRS9</i>	serine/arginine-rich splicing factor 9
<i>TBP</i>	TATA box binding protein
<i>B2M</i>	beta -2-microglobuline
<i>GAPDH</i>	glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<i>ACTB</i>	β-actine
<i>RPLP0</i>	protéine ribosomale large, P0
<i>GUSB</i>	β-glucuronidase

Les quatre premiers sont les pompes à efflux, les huit suivants sont les gènes de référence candidats.

### **3.2.1 Provenance des tissus**

Les spécimens frais de gliomes malins ont été obtenus lors de la chirurgie de résection chez 109 patients opérés au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS), Québec, Canada, avec l'approbation du comité éthique de l'institution (#11-088). Tous les patients ont donné leur consentement à leur participation au protocole de recherche. Suite au prélèvement des tissus, les échantillons ont rapidement été préparés et séparés en plusieurs morceaux pour conservation dans le réactif *RNAlater* ou *ALLProtect* (Qiagen) à -80 °C pour effectuer des extractions d'ARN ou mis en cassette dans une solution de PFA pour effectuer des études histologiques. Pour 11 de ces patients, nous avons 2 échantillons de GBM, soit un premier provenant d'une chirurgie et le second provenant de la chirurgie suivante. Nous avons également 1 échantillon provenant d'un astrocytome de bas grade, 8 d'astrocytome anaplasique, 77 de GBM, 2 d'oligodendrogliome de bas grade, 9 d'oligodendrogliome anaplasique, 3

d'oligoastrocytome de bas grade, 9 oligoastrocytome anaplasique. Un tableau descriptif des échantillons est disponible en Annexe 4. Nous avons également validé les gènes de référence à utiliser pour les lignées cellulaires humaines commerciales soit les U87, U118 et U373 et inclus dans notre étude 27 échantillons de cerveaux sains provenant de la Banque de cerveaux Douglas - Bell Canada.

### ***3.2.2 Extraction d'ARN, mesure de la qualité de l'ARN et synthèse d'ADNc***

Les échantillons ont été pesés (30 à 60 mg), coupés et le réactif TRIzol (Ambion) a été ajouté afin d'induire la lyse cellulaire. L'homogénéisation des tissus a été effectuée en utilisant un homogénéisateur rotatif. Du chloroforme a été ajouté à l'homogénat et ensuite une centrifugation à 12 000 g à 4 °C a été effectuée afin de séparer la phase aqueuse de la phase organique. Le surnageant, consistant en la phase aqueuse contenant l'ARN, a été prélevé et transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, un volume équivalent d'éthanol 70 % y a été ajouté. Les échantillons ont été ensuite transférés dans une colonne RNeasy spin column (Qiagen) et la purification de l'ARN a été effectuée selon les instructions du fabricant. La concentration d'ARN et sa pureté (ratio A260/280) ont été mesurées au NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). La concentration d'ARN, la qualité et l'intégrité ont été mesurées plus précisément en utilisant les puces à ARN Agilent RNA 6000 Nano Kit lues avec l'appareil Agilent 2100 Bioanalyser. La qualité de l'ARN exprimée en *RNA integrity number* (RIN) a été mesurée sur chaque échantillon provenant de spécimens humains. L'ADNc a été synthétisée à partir de 400 ng d'ARN avec le QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Le produit de la transcription inverse a été dilué 1:3 afin de minimiser les variations des mesures en qPCR.

### 3.2.3 qPCR

La courbe standard de chaque gène a été effectuée à partir de dilutions sériées de plasmides linéaires (ORIGENE) correspondant au gène d'intérêt et de normalisation à l'exception de GUSB. Pour GUSB, nous avons utilisé l'ARN de deux lignées de GBM humain commerciales soit les U87 et U373 que nous avons groupées et pour lesquelles nous avons préparé quatre dilutions en série d'un ordre de 10. Pour les courbes standards effectuées avec les plasmides linéaires, six dilutions sériées d'un ordre de 10 ont été préparées donnant de 3 000 000 à 30 copies d'ADN plasmidiques pour 3  $\mu$ L. L'efficacité de réaction de chaque courbe standard était de 90 à 110 % et était reproductible pour chaque gène à l'étude. Chaque échantillon a été mesuré en triplicata avec l'appareil Mastercycler® ep *realplex*<sup>4</sup> s (Eppendorf). Chaque réaction a été préparée avec 3  $\mu$ L d'ADNc, 7,5  $\mu$ L du mélange réactionnel PerfeCTa qPCR ToughMix (Quanta Biosciences), le mélange comprenant la paire d'amorces et la sonde d'hydrolyse fluorescente (Integrated DNA Technologies) et a été complétée à un volume final de 15  $\mu$ L avec du tampon TE. Toutes les séquences des amorces et sondes sont listées dans le Tableau 2. Tous les essais ont été conçus pour que l'amplicon inclue la jonction d'exon afin de minimiser les risques de détection d'ADNg. Le protocole des cycles thermiques a été programmé comme suit : activation de l'enzyme à 95 °C pendant 30 secondes suivie de 40 cycles d'amplification en 2 étapes à 95 °C et 60 °C pour respectivement 15 et 60 secondes. Afin de s'assurer de ne pas avoir mesuré l'amplification d'une contamination d'ADNg ou d'ARN, à chaque essai de qPCR trois réactions supplémentaires ont été incluses (contrôles négatifs) : 1) sans matrice donc l'ADNc était remplacée par du TE, 2) avec le produit de la réaction de transcription inverse effectuée en omettant l'enzyme de transcription inverse, et 3) avec le produit de la transcription inverse effectuée omettant d'y ajouter l'ARN. La mesure utilisée pour l'analyse en qPCR est le cycle de quantification ( $C_q$ ). Le cycle de quantification est le cycle d'amplification auquel le signal de fluorescence pour un échantillon est significativement plus élevé que le bruit de fond. Donc un  $C_q$  élevé correspond à une faible quantité du gène étudié dans l'échantillon. Le cycle de quantification ( $C_q$ ) a été automatiquement déterminé par le programme de l'appareil (Realplex, Eppendorf) en fixant un seuil de détection à 10 fois l'écart-type au-dessus du bruit de la ligne de base. Les

expériences de qPCR ont été effectuées en suivant les recommandations du Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) (Bustin *et al.*, 2010; 2009). Les quatre gènes d'intérêt ont été normalisés par rapport à l'expression des trois meilleurs gènes de référence.

**Tableau 3.2 Séquences des amorces et sondes utilisées lors des réactions de qPCR.**

Gène	Séquence	
<i>HPRT</i>	amorce S	GACTTTGCTTTCCTTGGCAG
	sonde	56-FAM/ATG GTC AAG GTC GCA AGC TTG CTG GT/3IABkFQ
	amorce AS	GGCTTATATCCAACACTTCGTG
<i>SFRS9</i>	amorce S	TGTGCAGAAGGATGGAGT
	sonde	5MAXN/TGG AAT ATG CCCTGC GTA AACTGG A/3IABkFQ
	amorce AS	CTGGTGCTTCTCTCAGGATA
<i>TBP</i>	amorce S	CACGAACCACGGCACTGATT
	sonde	56-FAM/TGT GCA CAG GAG CCA AGA GTG AAG A/3IABkFQ
	amorce AS	TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC
<i>GAPDH</i>	amorce S	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG
	sonde	56-FAM/AAG GTC GGA /ZEN/GTC AAC GGATTT GGT C/3IABkFQ
	amorce AS	ACATCGCTCAGACACCATG
<i>ACTB</i>	amorce S	ACAGAGCCTCGCCTTTG
	sonde	56-FAM/TCA TCC ATG /ZEN/GTG AGCTGG CGG /3IABkFQ
	amorce AS	CCTTGCACATGCCGGAG
<i>B2M</i>	amorce S	GGACTGGTCTTTCATCTCTTGTAC
	sonde	56-FAM/CTG CCGTGT /ZEN/GAA CCATGT GACTTT G/3IABkFQ
	amorce AS	ACCTCCATGATGCTGCTTAC
<i>RPLP0</i>	amorce S	TCGTCTTTAAACCCTGCGTG
	sonde	56-FAM/CCC TGT CTT /ZEN/CCC TGG GCA TCA C/3IABkFQ
	amorce AS	TGTCTGCTCCCACAATGAAAC
<i>GUSB</i>	amorce S	TTT TAT TCC CCA GCA CTC TCG
	sonde	56-FAM /ACG CAG AAA /ZEN/ATA CGT GGT TGG AGA GC/3IABkFQ
	amorce AS	TCA CTG AAG AGT ACC AGA AAA GTC
<i>ABCB1</i>	amorce S	CTTCAGGGTTTCACATTTGGC
	sonde	56-FAM /TGGTTTTCCGATCCATGCTCAGACAG/3IABkFQ
	amorce AS	GGTAGTCAATGCTCCAGTGG
<i>ABCC1</i>	amorce S	GACCCTCCCACACTGAATG
	sonde	56-FAM /CGACTTTCGCGAGCCACCT/3IABkFQ
	amorce AS	CCTCCACTTTGTCCATCTCAG
<i>ABCC3</i>	amorce S	ACCTGTCCAAGCTCAAGATG
	sonde	56-FAM /AAAAGGTCCGCCAGGAGACG/3IABkFQ
	amorce AS	GGGTGACAAAGAAAACAGGG
<i>ABCG2</i>	amorce S	CGATATGGATTTACGGCTTTGC
	sonde	56-FAM /CCCAGGACTCAATGCAACAGGAAACA/3IABkFQ
	amorce AS	AGATCGATGCCCTGCTTTAC

Abréviations : amorce S : amorce « sens », amorce AS : amorce « anti-sens »

### ***3.2.3 Préparation des tissus pour immunohistochimie***

Les échantillons ont été gardés 48 heures (h) dans une solution de PFA 4 % afin de bien fixer le tissu. La circulation des échantillons a été commencée au laboratoire. La circulation consiste en la déshydratation graduelle des tissus dans un bain d'éthanol 30 % ensuite 50 % et pour terminer 70 %, avec agitation lente pendant 1 h pour chaque étape de déshydratation. La circulation et l'inclusion des échantillons dans la paraffine ont été complétées à la plateforme d'histologie et de microscopie électronique du département d'anatomie et biologie cellulaire de l'Université de Sherbrooke. Les tissus ont ensuite été coupés à une épaisseur de 5 µm au microtome (Leica). Un tableau descriptif des échantillons est illustré en Annexe 5.

### ***3.2.4 Immunohistochimie***

Les coupes ont été déparaffinées dans 3 bains de xylène de 5 minutes (min) chaque. Elles ont ensuite été réhydratées dans 2 bains d'éthanol 100 % et 1 bain d'éthanol 70 % pendant 5 min par bain suivi d'un bain à l'eau courante et d'un bain d'eau distillée pour une durée d'une min par bain. La révélation des antigènes a été effectuée en chauffant les lames dans un tampon citrate 0.01 M pH 6.0 dans une cocotte-minute pendant 10 min à partir du moment où la pression interne désirée est atteinte. Les coupes ont été ensuite rincées dans un bain d'eau courante suivi d'un bain d'eau distillée pendant 1 min par bain. Les peroxydases endogènes ont été inhibées en incubant les lames pendant 10 min dans une solution de peroxyde 0,5 % / méthanol. Les coupes ont été rincées dans un tampon PBS, deux fois pendant 5 min sous agitation. L'anticorps primaire a ensuite été déposé (100 µL) sur les coupes de tissus et les lames ont été incubées 48 h dans une chambre humide à 4 °C. Les coupes ont été rincées à nouveau 3 fois dans du tampon PBS pendant 10 min sous agitation et l'anticorps secondaire a ensuite été appliqué (100 µL). L'incubation des coupes avec l'anticorps secondaire a été d'une durée d'1 h dans une chambre humide à 37 °C. Les

concentrations des anticorps ainsi que la solution de blocage/incubation sont décrites dans le Tableau 3. Les coupes ont été rincées à nouveau dans du PBS, 3 fois pendant 10 min sous agitation et le signal a été révélé par l'application de DAB sur les coupes pendant 1 min. Les coupes ont été rincées 3 autres fois dans du PBS pendant 10 min et 1 min dans l'eau courante. Une contre-coloration à l'hématoxyline a été effectuée, les lames ont été déshydratées à l'éthanol et ensuite au toluène. Une fois les lames séchées, les lamelles ont été montées. Tous les anticorps ont été préalablement validés dans des tissus connus pour exprimer les pompes à efflux étudiées (contrôle positif). Des contrôles négatifs ont également été effectués pour chaque protéine d'intérêt en omettant d'appliquer l'anticorps primaire sur les coupes.

**Tableau 3.3 Liste des anticorps et de leurs conditions d'utilisation.**

<b>Anticorps</b>	<b>Dilution</b>	<b>Solution blocage/incubation</b>
<b>mouse anti-PGP (C219) Calbiochem # cat : 517310</b>	1 : 50	PBS 1 % BSA
<b>mouse anti-MRP1 (IU2H10) Abcam # cat : ab32574</b>	1 : 100	PBS 1 % BSA, 1 % sérum de mouton
<b>goat anti-MRP3 (D-15) Santa Cruz # cat : sc-5775</b>	1 : 100	PBS 1 % BSA, 1 % sérum de porc
<b>mouse anti-BCRP (clone 5D3) Milipore, # cat : MAB4155</b>	1 : 100	PBS 1 % BSA, 1 % sérum de mouton
<b>sheep ECL anti-mouse IgG HRP GE Healthcare # cat : NA931-1ML</b>	1 : 200	la même que celui de l'anticorps primaire étudié
<b>swine anti-goat HRP Cedarlane # cat : CICC50007</b>	1 : 200	la même que celui de l'anticorps primaire étudié

### 3.2.5 Analyse

Afin de déterminer l'effet de la qualité de l'ARN de nos échantillons sur la quantification de l'ARN, nous avons effectué une régression linéaire entre ces deux variables pour les gènes de référence. En utilisant Prism et le site web <http://www.leonxie.com/referencegene.php>, la stabilité des potentiels gènes de référence a été mesurée par cinq différentes méthodes couramment utilisées : coefficient de variation, comparative Delta-C<sub>t</sub>, GeNorm, NormFinder et BestKeeper (Andersen *et al.*, 2004; Dydensborg *et al.*, 2006; Pfaffl *et al.*, 2004; Silver *et al.*, 2006). Un rang global a été produit en calculant la moyenne géométrique des résultats de chaque gène pour l'ensemble des méthodes d'analyse. L'analyse des résultats de qPCR pour les gènes d'intérêt a été effectuée en normalisant leur expression par rapport à la moyenne géométrique de l'expression des trois gènes de normalisation sélectionnés. Les résultats des gènes d'intérêt ont tous été exprimés en valeur absolue (nombre de copies) produits par le programme Realplex. L'analyse des tissus en immunohistochimie a été effectuée de façon qualitative et s'est avérée à déterminer la localisation des différentes pompes à efflux donc soit au niveau des cellules endothéliales ou des cellules tumorales gliales.

### 3.2.6 Analyse statistique

Les analyses statistiques des données ont été effectuées avec le logiciel Prism 5 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Lors de l'étude des gènes de référence candidats, nous avons effectué une analyse de corrélation de Pearson ( $\alpha = 0.01$ ) avec un intervalle de confiance de 99 % afin de déterminer si l'expression de l'ARN mesurée par qPCR est associée à la qualité de l'ARN. Les différences statistiques entre les niveaux d'expression des pompes entre les échantillons de sujets sains et les échantillons de GBM ont été évaluées en effectuant le test Kolmogorov-Smirnov bilatéral avec un  $P < 0,05$  et pour les différences entre les échantillons provenant d'une résection et de la suivante un test unilatéral de Wilcoxon  $P < 0,05$ .

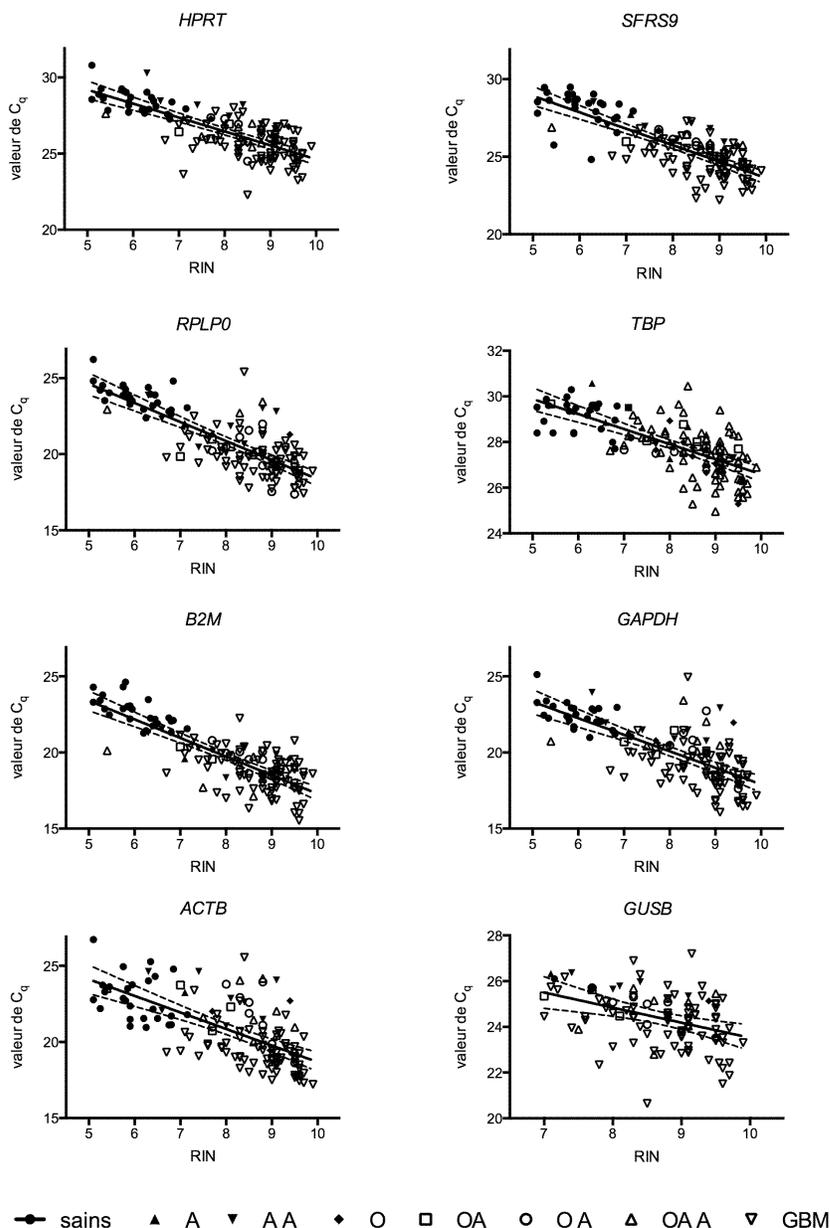
### 3.3 Résultats

#### *3.3.1 Détermination des gènes de référence à utiliser dans les gliomes malins.*

Afin de déterminer l'effet de la qualité de l'ARN sur la quantification de son expression, la corrélation entre ces deux variables a été évaluée (Figure 3.1). Une corrélation significative négative a été observée pour chaque gène à l'étude : HPRT ( $r = -0,7590$ ,  $p < 0,0001$ ), SFRS9 ( $r = -0,7935$ ,  $p < 0,0001$ ), TBP ( $r = -0,7075$ ,  $p < 0,0001$ ), RPLP0 ( $r = -0,7956$ ,  $p < 0,0001$ ), ACTB ( $r = -0,6577$ ,  $p < 0,0001$ ), GAPDH ( $r = -0,7141$ ,  $p < 0,0001$ ), B2M ( $r = -0,8148$ ,  $p < 0,0001$ ) et GUSB ( $r = -0,5852$ ,  $p < 0,0012$ ).

Nous avons ensuite mis en graphique les données de quantification par qPCR de chaque gène selon le type de tissu étudié (Figure 3.2). La variabilité d'expression de GAPDH et ACTB dans les échantillons de tumeur est beaucoup plus grande que pour les autres gènes. Les échantillons ayant un RIN inférieur à 7,5 n'ont pas été illustrés dans la Figure 3.2 et ne seront pas étudiés pour identifier les gènes de référence.

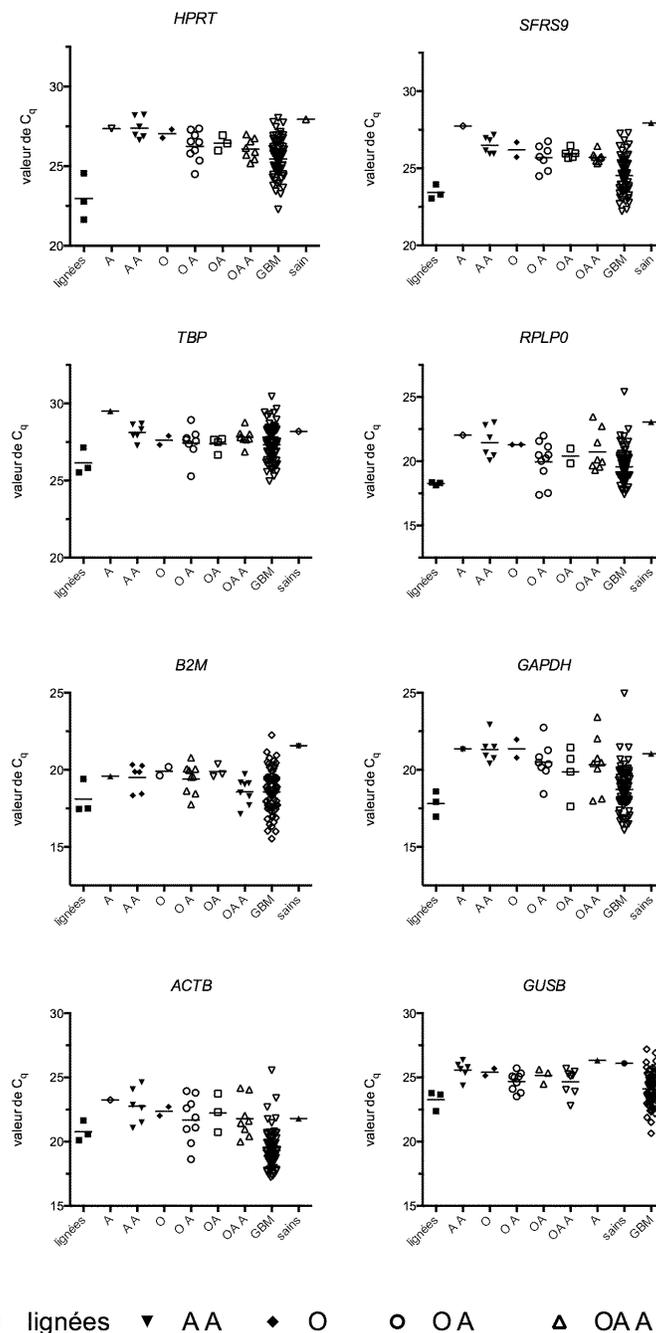
Les résultats du rang global de chaque gène sont inscrits au Tableau 3.4. TBP termine en première place des gènes les plus stables, suivi de près par HPRT et SFRS9 qui se rangent à égalité. Ils sont ensuite suivis par GUSB, B2M, RPLP0, GAPDH et ACTB, respectivement du gène le plus stable au moins stable.



**Figure 3.1. Corrélation entre la qualité de l'ARN et la quantification de son expression par qPCR.**

Niveaux d'expression en valeur de  $C_q$  par rapport à la qualité de l'ARN (RIN) pour chaque échantillon étudié et pour chaque gène de référence à l'étude. Une corrélation significative a été mesurée entre la qualité de l'ARN et sa quantification pour les 8 gènes de référence. Corrélation de Pearson ( $\alpha = 0,01$ ),  $P < 0,0012$  pour *GUSB* et  $P < 0,0001$  pour tous les autres gènes. *HPRT*, *SFRS9*, *RPLP0*, *TBP*, *B2M*, *GAPDH* et *ACTB* ( $n=135$ ), *GUSB* ( $n=106$ ).

A : astrocytome, A A : astrocytome anaplasique, O : oligodendrogliome, O A : oligodendrogliome anaplasique, OA : oligoastrocytome, OA A : oligoastrocytome anaplasique, GBM : glioblastome



**Figure 3.2. Variabilité de l'expression de différents gènes de référence selon le type d'échantillon.**

Expression des 8 gènes de références en valeur de C<sub>q</sub> selon le type d'échantillon à l'étude. Nous pouvons observer que dans les différents échantillons tumoraux *GAPDH* et *ACTB* sont les gènes ayant la plus grande variabilité pour tous les types d'échantillons étudiés. Pour les lignées cellulaires, *RPLP0* est le gène démontrant le moins de variabilité interéchantillons.

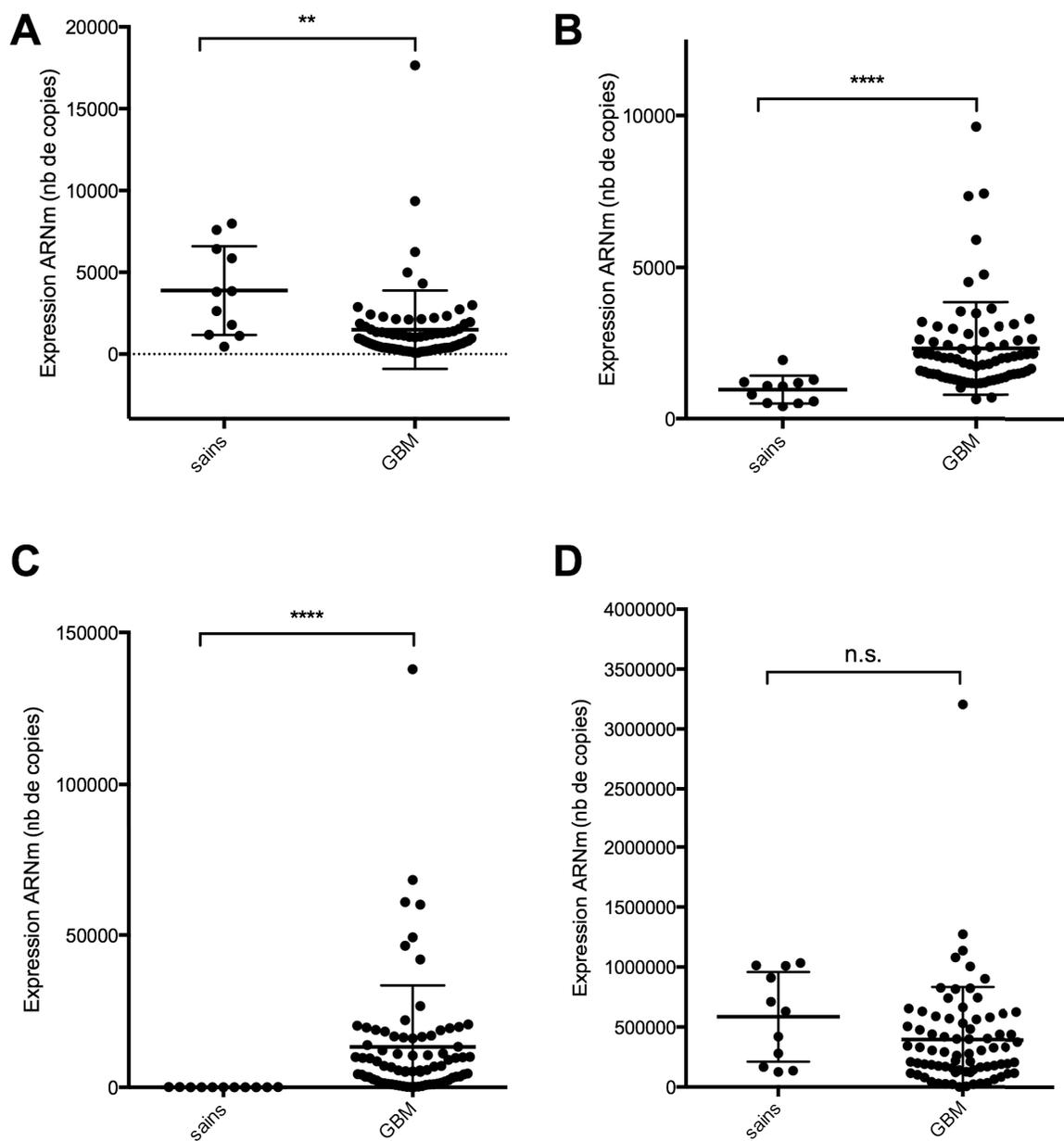
A : astrocytome (n=1), A A : astrocytome anaplasique (n=6), O : oligodendrogliome (n=2), O A : oligodendrogliome anaplasique (n=9), O A A : oligoastrocytome anaplasique (n=8), GBM : glioblastome (n=76).

**Tableau 3.4 Rang global de stabilité des huit gènes étudiés**

<b>Gène</b>	<b>Rang global</b>
<b><i>TBP</i></b>	1.158
<b><i>SFRS9</i></b>	1.167
<b><i>HPRT</i></b>	1.167
<b><i>GUSB</i></b>	1.225
<b><i>B2M</i></b>	1.425
<b><i>RPLP0</i></b>	1.439
<b><i>GAPDH</i></b>	1.637
<b><i>ACTB</i></b>	1.840

### **3.3.2 Quantification de leur expression dans les échantillons de cerveaux sains et de GBM.**

Nous avons premièrement validé l'augmentation de l'expression des pompes à efflux dans spécimens tumoraux comparativement au tissu cérébral sain. Comme l'indique la Figure 3.3, l'expression d'*ABCB1* diminue de façon significative ( $P < 0,01$ ) dans les tumeurs comparativement aux échantillons de cerveaux sains. Cependant, l'expression d'*ABCC1* ( $P < 0,0001$ ) et *ABCC3* ( $P < 0,0001$ ) augmentent significativement dans le tissu néoplasique. L'augmentation de l'expression d'*ABCG2* dans les tumeurs cérébrales comparativement au tissu sain n'est pas significative. Il est également possible de constater les niveaux d'expression des différentes pompes dans le tissu néoplasique : *ABCG2* est la plus exprimée, suivi d'*ABCC3*, *ABCC1* et finalement *ABCB1*.

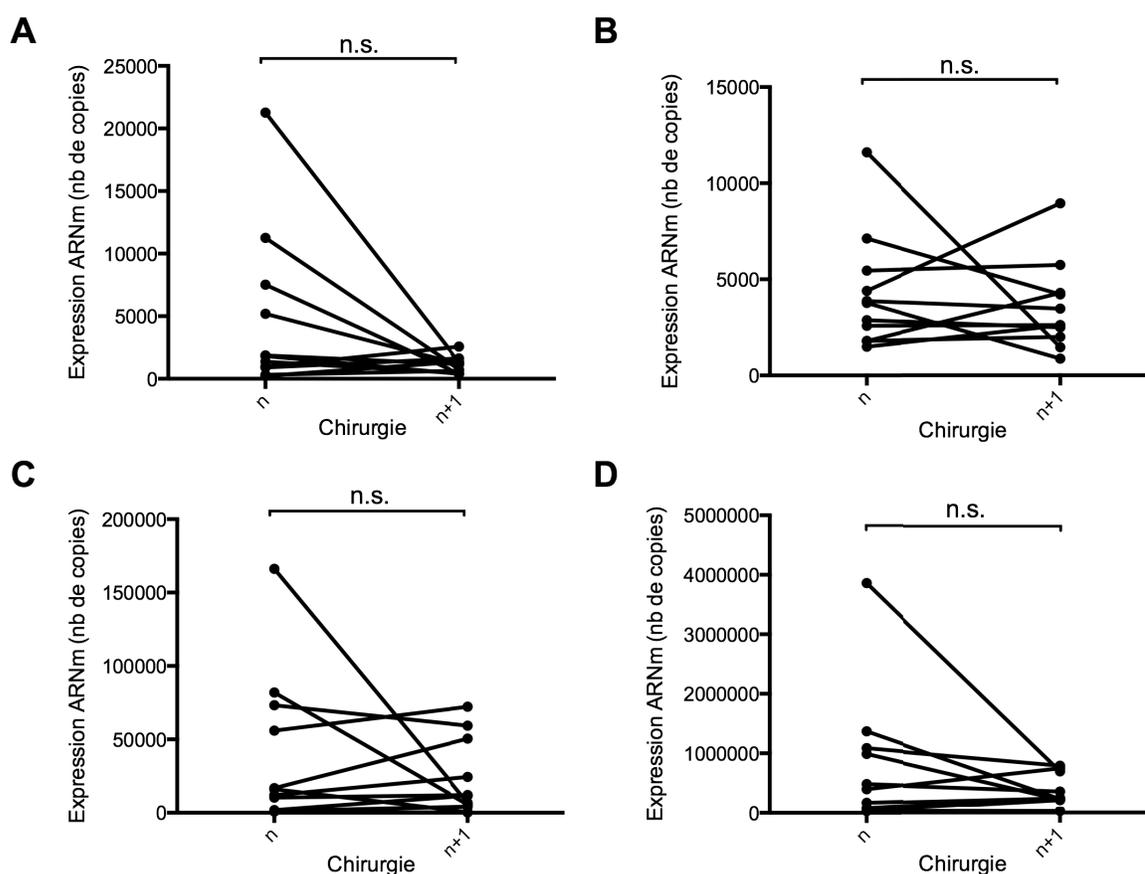


**Figure 3.3. Niveau d'expression de l'ARNm de pompes à efflux dans du tissu issu de cerveaux sains et de GBM.**

Les niveaux d'expression de l'ARNm d'*ABCB1* (A), *ABCC1* (B), *ABCC3* (C) et *ABCG2* (D) mesurés par RT-qPCR. Les résultats sont indiqués en nombre de copies. sains (n=11), GBM (n=75), Test Kolmogorov-Smirnov, bilatéral ( $P < 0,05$ ), \*\*  $< 0,01$ , \*\*\*\*  $< 0,0001$ .

### 3.3.3 Quantification de la modulation de leur expression associée à la progression tumorale.

Dans les échantillons provenant de mêmes patients, mais de chirurgies subséquentes, nous n'avons pas observé de modulation significative de l'expression pour les pompes à l'étude (Figure 3.4).

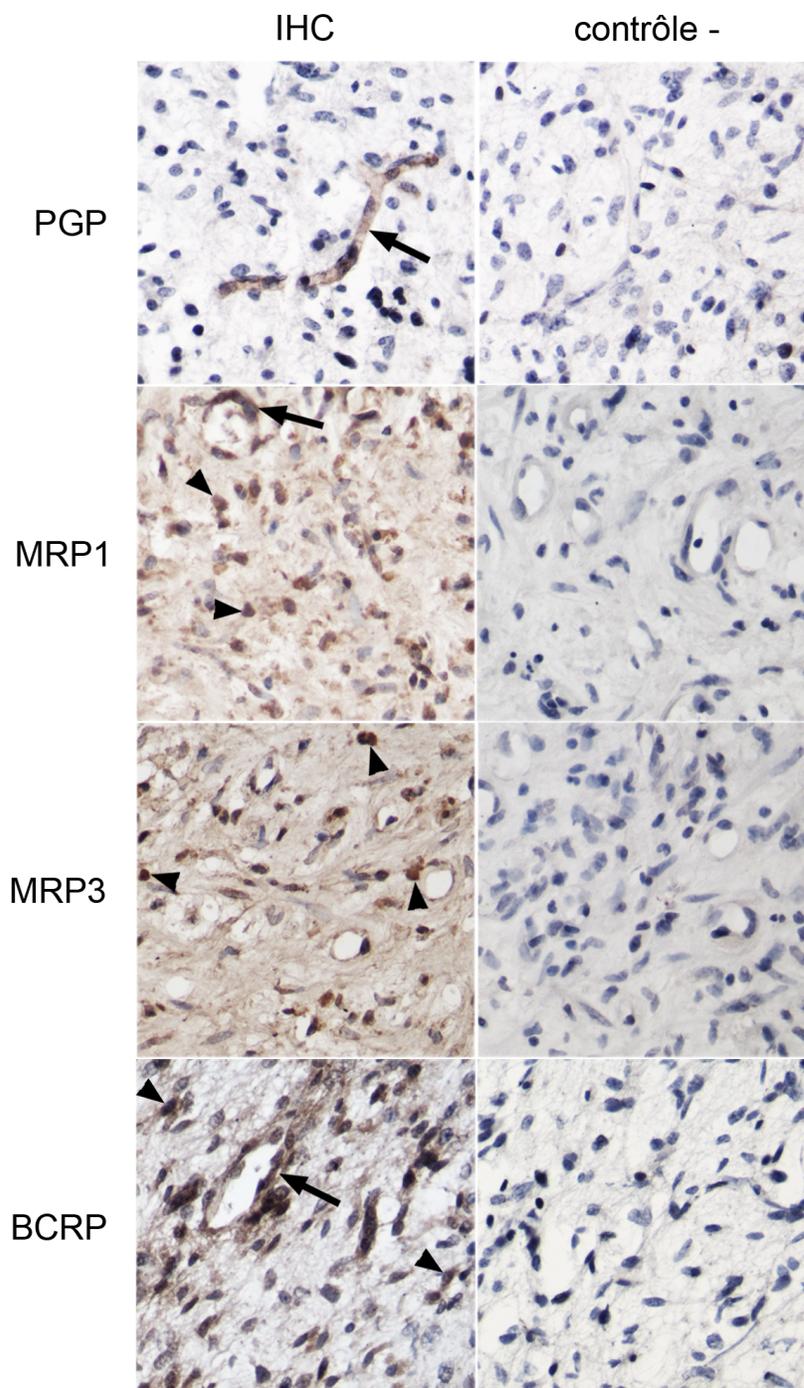


**Figure 3.4. Modulation de l'expression des pompes à efflux dans les échantillons tumoraux à travers leur évolution.**

Les niveaux d'expression d'ARNm d'*ABCB1* (A), *ABCC1* (B), *ABCC3* (C) et *ABCG2* (D) mesurés par RT-qPCR. Les résultats sont indiqués en nombre de copies. (n = 11), Wilcoxon, apparié, unilatéral,  $P \leq 0,05$ .

### ***3.3.4 Localisation des pompes à efflux dans les échantillons de GBM.***

Tel que l'on peut l'observer à la Figure 3.5, la PGP n'est exprimée que par les cellules endothéliales, à l'inverse la MRP3 qui est exclusivement exprimée par les cellules tumorales. La MRP1 et BCRP sont cependant retrouvées au niveau des deux types cellulaires.



**Figure 3.5. Localisation des pompes à efflux étudiées.**

Expression des différentes pompes à efflux étudiées (à gauche) et leur contrôle négatif (sans anticorps primaire, à droite). Grossissement 40X.

Flèche complète : cellule endothéliale, tête de flèche : cellule tumorale

## **OBJECTIF #3**

### **4.1 Introduction**

Brièvement, afin de déterminer si l'OBHE permet d'augmenter l'acheminement au SNC et à l'accumulation à la tumeur de substrats des pompes à efflux, du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol, un substrat de la PGP radiomarké au carbone-11, a été administré à des animaux porteurs d'une tumeur cérébrale. Une acquisition TEP a ensuite été effectuée. Un inhibiteur spécifique de la PGP de 3<sup>e</sup> génération (tariquidar) a été administré aux animaux faisant partie du groupe contrôle positif. La combinaison de l'OBHE et du tariquidar a également été évaluée afin de vérifier si elle permettrait d'augmenter de façon additive ou synergique l'acheminement du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol aux cellules tumorales gliales. Afin de segmenter avec précision nos volumes d'intérêt, une acquisition IRM a été effectuée la veille de l'acquisition TEP et le recalage des acquisitions a été réalisé permettant ainsi l'analyse rigoureuse des données obtenues.

### **4.2 Matériels et méthodes**

#### ***4.2.1 Animaux***

Des rats mâles de race Fischer (226-244 g) ont été achetés chez Charles River, QC, Canada. Les animaux étaient deux par cages afin d'améliorer la qualité de leur environnement et ils avaient accès à de l'eau et de la nourriture ad libitum. Les animaux ont été hébergés dans une pièce sans pathogène ayant un cycle jour/nuit 12 h /12 h. Le suivi des animaux a été effectué 2 fois par jour pour s'assurer de leur bien-être. L'euthanasie des animaux a été réalisée immédiatement après la fin des expérimentations par inhalation de  $\text{CO}_2$  sous anesthésie générale. Toutes les expériences ont été préalablement approuvées par

le comité éthique animal de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke.

#### **4.2.2 Groupes à l'étude**

Les animaux ont été distribués aléatoirement à l'un des six groupes décrits ci-dessous :

- 1) contrôle (n=6),
- 2) tariquidar (n=6),
- 3) OBHE (n=6),
- 4) véhicule tariquidar (contrôle négatif tariquidar, n=3),
- 5) salin @ 0,12 mL/s (contrôle négatif OBHE, n=3),
- 6) OBHE + tariquidar (n=6).

#### **4.2.3 Modèle animal**

Le modèle animal utilisé est le Fischer-F98 qui a été développé dans le laboratoire du Dr David Fortin (Mathieu et al., 2007). Il s'agit d'un modèle reproductible et du modèle syngénique le plus représentatif de la représentation clinique de la maladie (Blanchard, Mathieu, Patenaude et Fortin, 2006; Mathieu, Lamarche et Fortin, 2005). Brièvement, la procédure d'implantation consiste en l'anesthésie du rat par administration IP d'une dose unique d'un mélange de kétamine/xylazine (83/17 mg/kg). Une fois l'animal endormi, du gel ophtalmique est apposé ses yeux et ce dernier est placé sur un cadre stéréotaxique. Une fois qu'il est bien mis en place, une incision est pratiquée sur la peau couvrant la boîte crânienne et un trou de trépan est effectué à l'aide d'une aiguille 16G (BD Medical, Utah) ou d'une perceuse chirurgicale aux coordonnées d'implantation soit à 3 mm à droite et 1 mm antérieur du croisement des sutures Sagittale et Bregma. Une micropompe à infusion fixée sur le cadre stéréotaxique permet l'infusion des cellules murines de GBM, F98

(ATCC<sup>®</sup>, CRL-2397<sup>™</sup>), au nombre de 10 000 cellules dans un volume de 5  $\mu$ L. L'infusion est réalisée sur 5 min à 6 mm de profondeur de la surface de la boîte crânienne. L'aiguille est ensuite lentement retirée et le trou de trépan refermé par l'application de cire à os. Des points de suture sont ensuite effectués pour refermer la plaie. L'animal se réveille normalement dans l'heure qui suit.

#### ***4.2.4 Imagerie par résonance magnétique dynamique***

Neuf jours suite à l'implantation des cellules tumorales, une séquence d'imagerie par résonance magnétique (IRM) dynamique a été effectuée pour chaque animal au Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS). L'induction de l'anesthésie générale des animaux s'est faite par inhalation d'un mélange d'isoflurane 5 % et d'oxygène médical et le maintien de l'anesthésie à 2 % d'isoflurane/oxygène médical. Un cathéter a ensuite été installé dans une veine caudale pour permettre l'administration de l'agent de contraste (Magnevist). L'animal est ensuite placé sur un lit, la sonde IRM pour tête de rat installée (RAPID Biomedical, Columbus, OH, USA) et la sonde est finalement insérée dans le scanner IRM 7T pour petits animaux (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). L'acquisition des images a été effectuée en utilisant les paramètres suivants : 15 tranches axiales pondérées  $T_1$ , épaisseur : 1,0 mm, champ de vue : 30 x 30 mm<sup>2</sup>, matrice : 256 x 256 pixels, temps de répétition : 164.7 millisecondes, temps d'écho : 3.59 millisecondes, angle de bascule de la magnétisation : 30° et nombre d'accumulation : 2. Les images du cerveau ont été acquises de la fin du bulbe olfactif à la fin du lobe occipital. Les signes vitaux de l'animal ont été visualisés et enregistrés pendant toute la durée de l'acquisition. Dix séries de 15 images ont été acquises avec une résolution temporelle de 84 secondes par série. Afin de rehausser le signal IRM à la tumeur, une administration intraveineuse de Magnevist (143 mM, 500  $\mu$ L pendant 50 secondes) a été initiée en même temps que l'acquisition de la troisième série d'images. La quatrième série d'images a été sélectionnée afin d'effectuer le recalage des images IRM et TEP.

#### 4.2.5 Procédure d'OBHE

Les animaux du groupe 3, 5 et 6 ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane 5 % et l'anesthésie générale a été maintenue à 2 % d'isoflurane mélangé à de l'oxygène médical (2 L / min). Un cathéter a ensuite été installé dans l'une des veines caudales de l'animal pour permettre le transfert de l'anesthésie à l'infusion continue de propofol intraveineux (3,9 mg/ kg/h), qui par ses effets hémodynamiques permettent d'obtenir une meilleure qualité d'OBHE (Remsen *et al.*, 1999). De façon aseptique, la peau du cou a été incisée, l'animal est intubé (cathéter 16G, BD) et le complexe carotidien droit exposé. La carotide externe droite a ensuite été canulée de façon rétrograde avec un tube de PE50 afin d'infuser le mannitol dans la carotide interne droite via la carotide externe droite. Une dose d'atropine sous-cutanée (0,04 mg/kg) est ensuite administrée afin de prévenir la bradycardie induite par l'OBHE. Une fois, l'animal positionné dans le tomographe TEP, l'infusion de propofol a été interrompue et 1 min suite à son interruption, le mannitol a été infusé à un débit de 0,12 mL/s pendant 30 secondes. Pour le groupe contrôle de la procédure d'OBHE (groupe 5) le mannitol a été remplacé par une solution saline 0,9 % administrée au même débit. L'infusion de propofol a été redémarrée dans la minute suivant l'infusion du mannitol.

#### 4.2.6 <sup>11</sup>C-carvedilol

Le carvedilol est un bêta-bloqueur et un antagoniste adrénergique  $\alpha_1$ . Il a été radiomarqué pour la première fois par un groupe désirant imager les récepteurs adrénergiques au SNC. Les auteurs de ces études l'avaient sélectionné pour sa lipophilicité et son faible poids moléculaire (Doze *et al.*, 2002). Cependant, ils ont dû abandonner son utilisation puisqu'étant un substrat des pompes à efflux, il ne s'accumulait pas au SNC tel qu'espéré. Le <sup>11</sup>C-verapamil (un bloqueur des canaux calciques) est le traceur le plus utilisé pour mesurer l'activité de la PGP chez l'humain et l'animal. Bien que le volume de distribution du <sup>11</sup>C-carvedilol soit beaucoup plus petit que celui du <sup>11</sup>C-verapamil, une étude a démontré qu'à concentration équimolaire le <sup>11</sup>C-carvedilol est deux fois plus

sensible que le  $^{11}\text{C}$ -verapamil à la modulation de l'activité de la PGP par la cyclosporine A (Jonsson et al., 1999; Elsinga et al., 2004). De plus, le  $^{11}\text{C}$ -verapamil est très lipophile (log P 3,8) ce qui ferait de lui un composé traversant moins bien la BHE que le  $^{11}\text{C}$ -carvedilol (log P 2,0) suite à une inhibition de la PGP. La clairance plasmatique du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol est semblable à celle du  $^{11}\text{C}$ -verapamil et se fait en 2 phases. La première phase constitue la phase de distribution rapide et la seconde l'élimination lente. Le  $^{11}\text{C}$ -carvedilol est métabolisé par le foie. Tout comme pour les métabolites du  $^{11}\text{C}$ -verapamil, les métabolites du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol auraient une moins bonne affinité pour la PGP que la molécule initiale (Neuhoff et al., 2000). En plus d'avoir un IC50 plus grand pour la PGP, les métabolites du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol sont plus hydrophiles que le composé parent, laissant croire qu'il aurait un faible apport dans le signal TEP mesuré suite à une inhibition de la PGP (Neugebauer et Neubert, 1991). Les études effectuées chez le rat comparant les résultats *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*, pour le  $^{11}\text{C}$ -carvedilol et  $^{11}\text{C}$ -verapamil démontrent qu'il est plus facile de faire la discrimination entre le niveau de base et une accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol (Jonsson et al., 1999; Elsinga et al., 2005; Bart et al., 2005). Le  $^{11}\text{C}$ -carvedilol semble être le radiotracer idéal pour mesurer l'activité ou la modulation de l'activité de la PGP au cerveau.

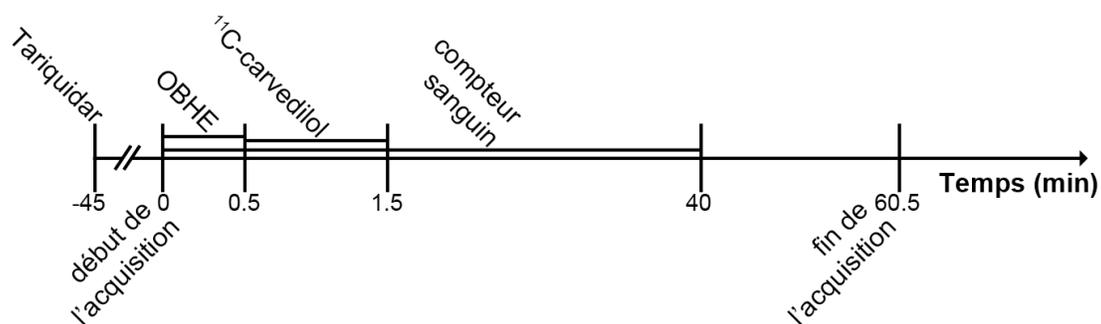
#### **4.2.7 Radiochimie**

Le  $^{11}\text{C}$ -dioxyde de carbone ( $^{11}\text{C}$ -CO<sub>2</sub>) a été produit par la réaction nucléaire du  $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ , par le bombardement de proton d'une cible d'aluminium dans un mélange gazeux contenant 99,5 % d'azote et 0,5 % d'oxygène, dans un cyclotron TR-19. Le  $^{11}\text{C}$ -dioxyde de carbone a été réduit en  $^{11}\text{C}$ -iodométhane ( $^{11}\text{C}$ -CH<sub>3</sub>I) avec du tétrahydroaluminate de lithium (LiAlH<sub>4</sub>/HI). La synthèse du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol a été effectuée à partir de la réaction de son précurseur l'O-desmethyl carvedilol (1 mg, TLC Pharmachem, Ontario) avec le  $^{11}\text{C}$ -iodométhane en présence de kryptofix et de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mg, 1 : 1 eq) dans 90 µL de DMSO, chauffé durant 7 min à 120 °C. Les produits de la réaction ont été séparés par HPLC (6 mL/min sur une colonne Gemini C18, détection UV à

254 nm). Le produit à 7,1 min correspondant au  $^{11}\text{C}$ -carvedilol a été récolté et purifié sur une colonne C-18, lavé avec 10 mL d'eau et élué dans 0,7 mL d'éthanol.

#### ***4.2.8 Tomographie d'émission par positrons***

Les animaux sont mis sous anesthésie générale par inhalation d'un mélange d'isoflurane 5 % avec 2 L / min d'oxygène médical et maintenu à 2 % d'isoflurane à l'exception des animaux des groupes : 3, 5, 6 qui seront transférés au propofol intraveineux. Un cathéter intra-artériel caudal a été installé pour comptage de la radioactivité sanguine, un intraveineux pour administration du radiotracer et un intraveineux supplémentaire pour les animaux anesthésiés au propofol, tel que décrit plus haut dans la section procédure d'OBHE. Lorsque la préparation de l'animal était complète (selon le groupe auquel il était attribué), l'animal était installé sur un lit et placé dans un scanner TEP pour petits animaux, soit le LabPET 4 ou le LabPET8 (Gamma Medica, Northridge, CA, USA) au CIMS. Le cathéter artériel est installé dans la cassette du compteur sanguin,  $\mu$ Blood counter (Gamma Medica, Northridge, CA, USA) afin de permettre l'acquisition en continu de la radioactivité sanguine durant les 40 premières min de l'acquisition TEP. Le protocole pour l'acquisition de données TEP est décrit à la Figure 4.1. Pour les animaux des groupes 2, 4 et 6, le tariquidar ou son véhicule a été administré à l'animal 45 min avant le début de l'acquisition. Pour les animaux des groupes 3, 5 et 6, le mannitol ou la solution saline a été infusé durant les 30 premières secondes de l'acquisition de données TEP. Pour tous les groupes, le  $^{11}\text{C}$ -carvedilol ( $\sim 60$  MBq) a été dilué dans 1 mL de solution saline 0,9 %) a été injecté sur 1 min, à partir de la trentième seconde de l'acquisition. Suite à l'acquisition TEP, les données ont été reconstruites en effectuant 20 itérations de l'algorithme MLEM-3D. Les acquisitions ont été reconstruites et analysées selon deux découpages dans le temps. 1) 1 x 30 s et 1 x 60 min et 2) 1 x 30 s, 8 x 5 s, 2 x 10 s, 4 x 1 min 30 s, 1 x 3 min et 5 x 10 min pour un total de 60 min. Le premier bloc de 30 premières secondes avant l'injection du traceur sert à s'assurer que le bruit de fond dans le scanner est nul et qu'ainsi les données mesurées sont réelles.



**Figure 4.1. Protocole d'imagerie TEP.**

Pour les groupes 2, 4 et 6, le tariquidar ou son véhicule a été administré environ 45 minutes avant le début de l'acquisition. Pour les groupes 3, 5 et 6, le mannitol ou la solution saline a été administré durant les 30 premières secondes de l'acquisition. Pour tous les animaux, le <sup>11</sup>C-carvedilol a été administré à partir de la 30<sup>e</sup> seconde de l'acquisition durant 1 minute. La radioactivité dans le sang de l'animal a été mesurée pour les 40 premières minutes de l'acquisition.

#### 4.2.9 Compteur sanguin

L'acquisition par le compteur sanguin était démarrée pendant les 30 premières secondes de l'acquisition TEP. Le protocole du prélèvement sanguin s'est fait en trois séquences : 1) 210 secondes à 150  $\mu$ L/min, 2) 180 secondes à 100  $\mu$ L/min suivi de 3) 2010 secondes à 50  $\mu$ L/min. Lorsque les courbes sanguines n'ont pas pu être acquises avec le compteur sanguin, le sang était prélevé manuellement et compté dans un compteur à émetteur bêta (Packard COBRA II Auto-Gamma counter).

#### 4.2.10 Analyse

Le recalage des images TEP-IRM ainsi que la quantification de l'accumulation du traceur ont été effectués avec le programme libre d'accès AMIDE. Suite au recalage des images TEP et IRM, quatre volumes d'intérêt ont été segmentés pour chaque animal sur les images IRM : un autour de la tumeur, un autre volume ne contenant que du parenchyme sain à distance de la tumeur a également été tracé dans l'hémisphère ipsilatéral. Deux autres

volumes d'intérêt de volume équivalent aux deux premiers ont été segmentés dans l'hémisphère controlatéral comme volumes contrôles. Les données d'accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol pour chacun de ces volumes d'intérêt ont été extraites en pourcentage de dose injectée par gramme de tissus (% DI/g), et ce pour les deux découpages temporels décrits dans la section Tomographie par émission de positrons. Les courbes sanguines seront mises en graphique en % DI/g dans le temps.

#### ***4.2.11 Analyse statistique***

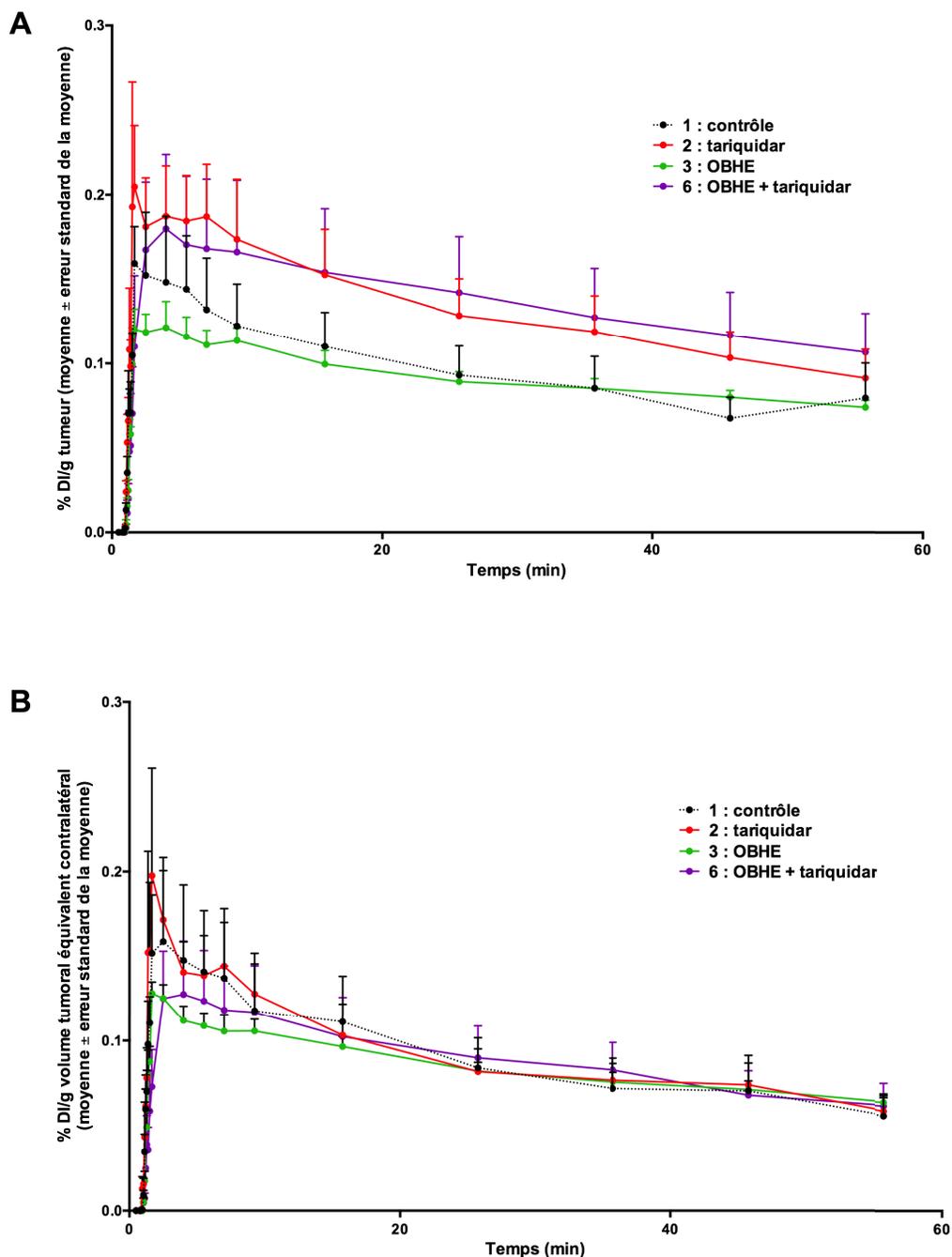
Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel Prism 5 (GraphPad Software Inc., CA, USA). L'analyse statistique des données n'a été effectuée que sur les moyennes des ratios entre les volumes d'intérêt sur leurs volumes contrôles respectifs. L'analyse de variance de type Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ) suivie d'un test de comparaison multiple de type Dunn ( $\alpha = 0,05$ ) ont été effectués afin de déterminer si les moyennes des différents groupes à l'étude étaient différentes et s'il y avait une différence significative entre la moyenne d'un groupe à l'étude et le groupe contrôle.

### **4.3 Résultats**

#### ***4.3.1 Quantification de l'accumulation du $^{11}\text{C}$ -carvedilol à la tumeur.***

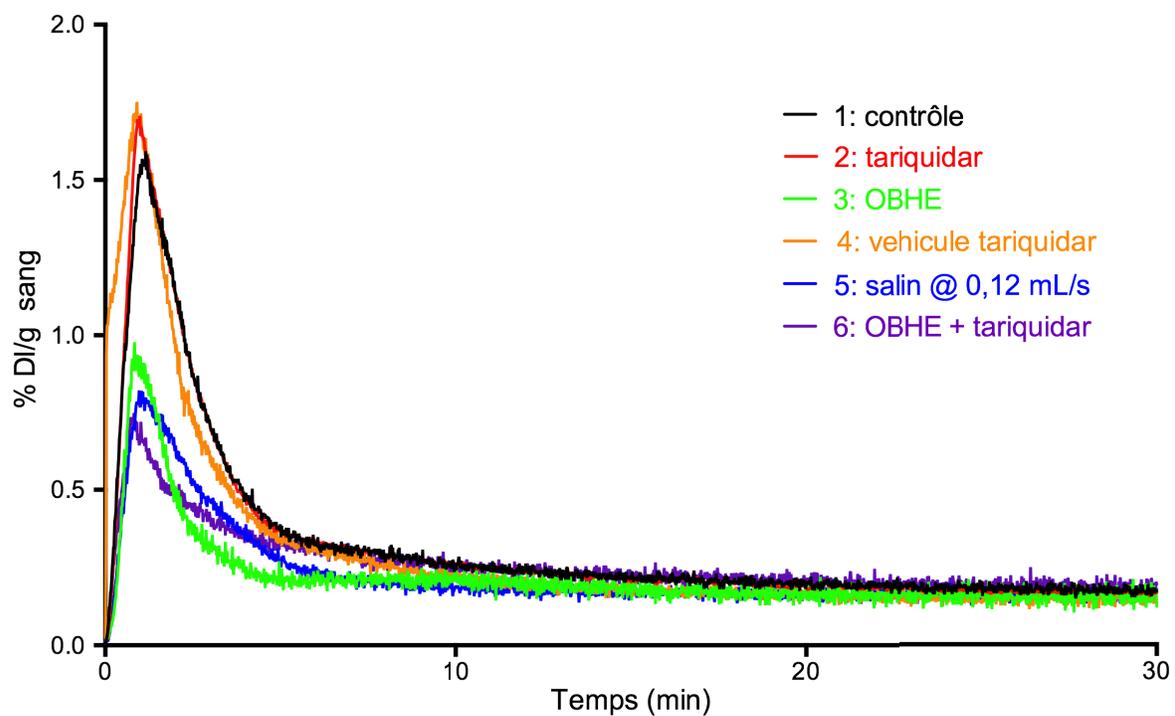
Les courbes temps-activité ont été mises en graphique pour le volume de la tumeur et le volume équivalent à la tumeur dans l'hémisphère contralatéral (Figure 4.2). Afin d'alléger le graphique, les courbes pour les groupes 4 (véhicule tariquidar) et 5 (solution saline @ 0.12 mL/s) n'ont pas été illustrées. Nous pouvons donc observer à la Figure 4.2 A) que le  $^{11}\text{C}$ -carvedilol semble s'accumuler à la tumeur seulement pour le groupe 2 (tariquidar) et 6 (OBHE + tariquidar) contrairement au groupe 3 (OBHE) où l'on peut noter que l'élimination du traceur est semblable au groupe 1 (contrôle). Il ne semble

pas y avoir aucune différence entre les courbes temps-activité du volume équivalent à la tumeur dans l'hémisphère controlatéral pour les différents groupes à l'étude (Figure 4.2 B). Nous pouvons cependant dénoter dans la Figure 4.2 B que les pics maximaux du radiotraceur pour les groupes 1 (contrôle) et 2 (tariquidar) sont semblables, mais qu'ils sont plus élevés que les pics des groupes 3 (OBHE) et 6 (OBHE + tariquidar). Ce phénomène est également observé dans les courbes activité-temps sanguines (Figure 4.3). Le pic maximal d'accumulation sanguine du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol pour les groupes 1, 2 et 4 est plus élevé que pour les groupes 3, 5 et 6. Afin d'évaluer l'accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans les tumeurs, nous avons dans un premier temps calculé l'activité moyenne mesurée durant les 60 min de l'acquisition TEP et effectué un ratio de cette valeur pour le volume tumoral sur le volume équivalent dans l'hémisphère controlatéral (Figure 4.4.). Ainsi, nous éliminons la variabilité interanimale en se servant de chaque animal comme étant son propre contrôle. Nous pouvons observer à la Figure 4.4, qu'il n'y a que pour les groupes 2 : tariquidar et 6 : OBHE + tariquidar où le ratio d'accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol à la tumeur est significativement augmenté par rapport au groupe 1 : contrôle ( $P < 0,01$ ).



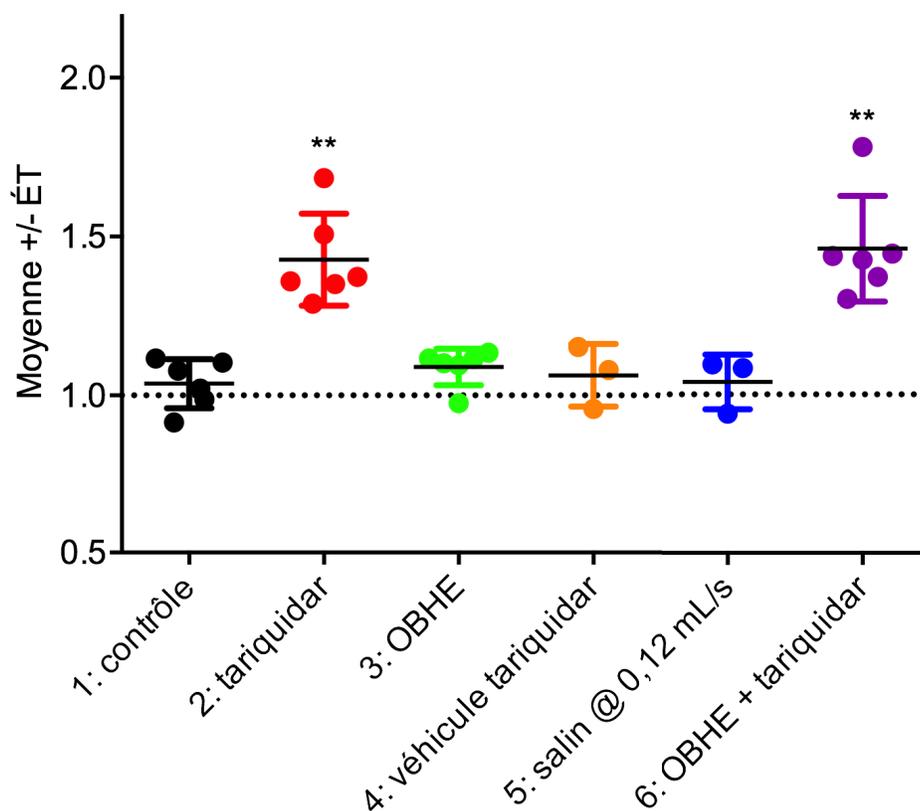
**Figure 4.2. Courbes temps-activité du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol en % DI/g de tissus pour la tumeur et le volume équivalent dans l'hémisphère contralatéral.**

Courbes (moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne) temps-activité des animaux des groupes 1 : contrôle, 2 : tariquidar, 3 : OBHE et 6 : OBHE + tariquidar pour les volumes d'intérêt correspondant à la tumeur (A) et le volume tumoral équivalent dans l'hémisphère contralatéral. (n = 6 pour chaque groupe). Pour alléger le graphique les courbes des groupes contrôles négatifs (4 : véhicule tariquidar et 5 : salin @ 0,12 mL/s, n'ont pas été illustrées.



**Figure 4.3. Courbes temps-activité sanguines du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol (moyenne % DI/g).**

Les courbes moyennes temps-activité des six groupes à l'étude sont illustrées. Le pic d'accumulation maximale dans le sang dans les premières minutes de l'acquisition est plus élevé pour les groupes 1, 2 et 4 comparativement aux groupes 3, 5 et 6. Groupe 1 (n=3), 2 (n=1), 3 (n=1), groupe 4, 5 et 6 (n=2).

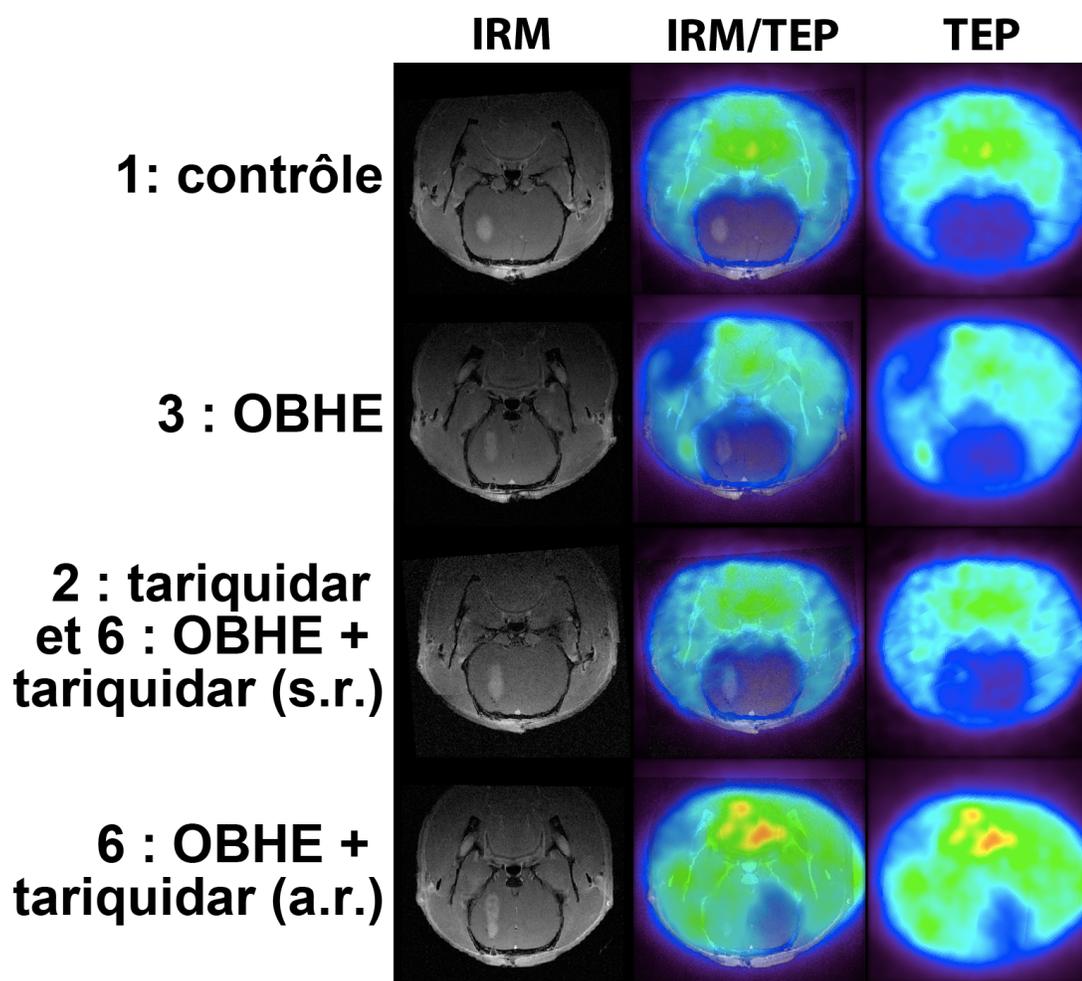


**Figure 4.4 Ratio de l'accumulation du traceur dans le volume tumoral sur le volume controlatéral.**

L'activité totale moyenne du volume tumoral a été divisée par l'activité totale moyenne du volume tumoral équivalent dans l'hémisphère controlatéral pour les soixante minutes de l'acquisition TEP. Le groupe 2 et le groupe 6 sont significativement différents du groupe contrôle. Kruskal-Wallis ( $P < 0,0005$ ) suivi d'un test de comparaison multiple de type Dunn ( $\alpha = 0,05$ ). \*\*  $< 0,01$ .

#### 4.3.2 Quantification de l'accumulation du $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans le parenchyme cérébral suite à l'OBHE.

Lors de l'analyse des images et de leur recalage, nous avons constaté un rehaussement dans tout l'hémisphère ipsilatéral pour 2 des 6 animaux du groupe 6 (Figure 4.5). Nous avons séparé le groupe 6 en deux sous-groupes, soit le sous-groupe 6 : OBHE + tariquidar avec rehaussement ( $n = 2$ , OBHE + tariquidar (a. r.)) et le sous-groupe 6 : OBHE + tariquidar sans rehaussement ( $n = 4$ , OBHE + tariquidar (s.r.)).



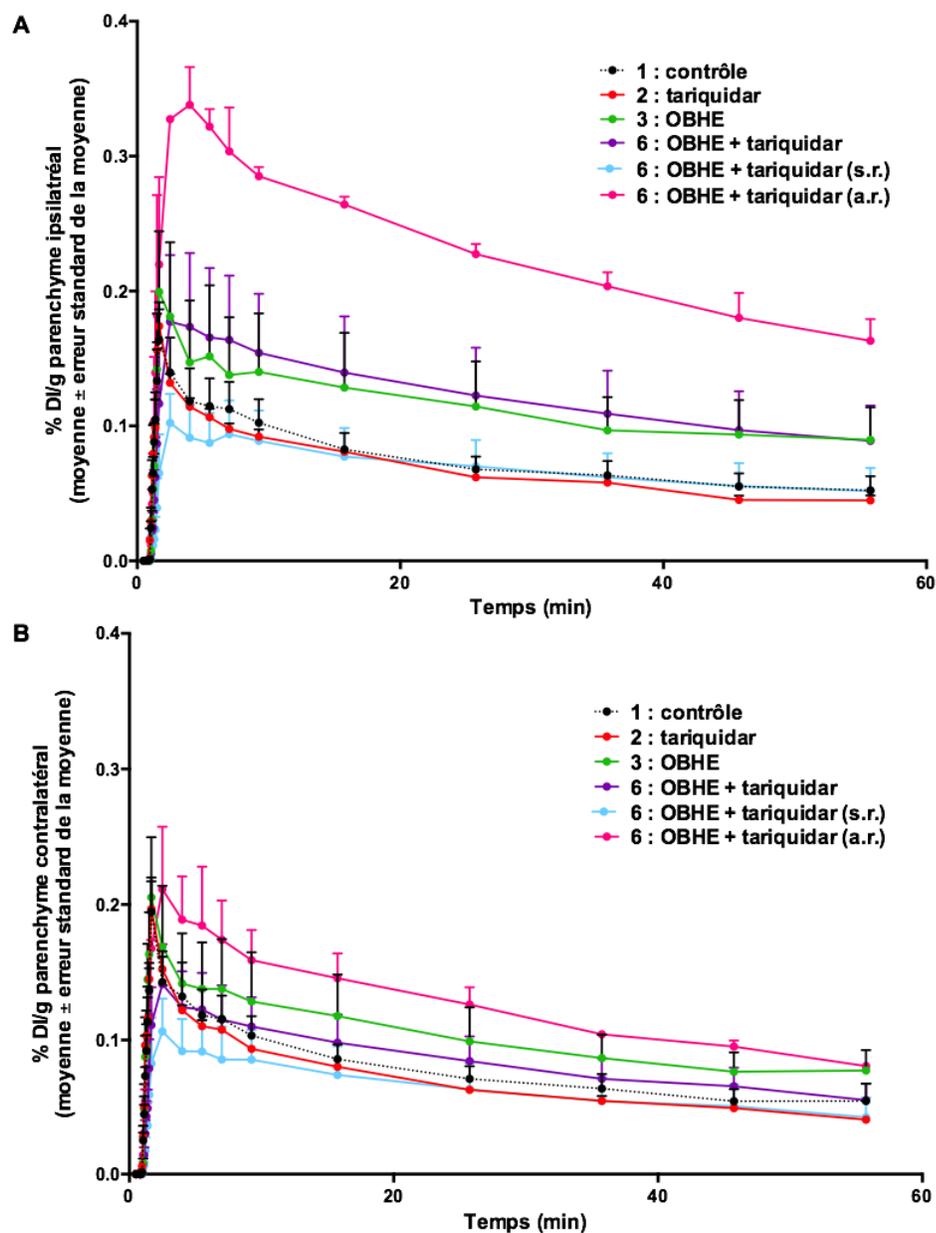
**Figure 4.5. Recalage des images TEP et IRM.**

Aucune accumulation n'est observable pour le groupe contrôle et le groupe OBHE et ce autant au niveau de la tumeur que dans le parenchyme cérébral. Les groupes 4 : véhicule tariquidar et 5 : saline @ 0,12 mL/s ne sont pas illustrés puisqu'ils ne sont pas visuellement différents du groupe contrôle. Dans le groupe 2 : tariquidar, une accumulation de  $^{11}\text{C}$ -carvedilol est observée au niveau de la tumeur seulement. Dans le groupe 6 : OBHE + tariquidar, 4 animaux n'avaient que du rehaussement à la tumeur (OBHE + tariquidar sans rehaussement dans le parenchyme ipsilatéral : OBHE + tariquidar (s.r.)) et ont été regroupés avec les animaux tariquidar sur cette figure. Les deux autres animaux du groupe OBHE + tariquidar démontrant du rehaussement dans le parenchyme ipsilatéral (OBHE + tariquidar avec rehaussement dans le parenchyme ipsilatéral : OBHE + tariquidar (a. r.)) sont illustrés dans la dernière rangée. Pour toutes les images TEP et IRM/TEP du montage, le seuil minimal a été fixé 0 % DI/g, le seuil maximal à 0,5 % DI/g, le champ de vue à 35 % de l'image initiale et l'agrandissement à 2,5.

Pour l'étude des courbes temps-activité pour les volumes d'intérêt correspondant au parenchyme ipsilatéral et au parenchyme controlatéral, le groupe 6 : OBHE + tariquidar a été séparé de la même façon qu'à la Figure 4.5 (Figure 4.6). Lors de l'étude des courbes temps-activité pour le parenchyme ipsilatéral (Figure 4.6 A), seul le groupe 6 : OBHE + tariquidar) semble présenter une augmentation de la captation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol comparativement au groupe contrôle. Lors de l'étude du sous-groupe sans rehaussement (6 : OBHE + tariquidar (s.r.)), il ne semble pas y avoir de différence entre sa courbe temps-activité et la courbe des autres groupes à l'étude. Cependant, la courbe temps-activité du sous-groupe avec rehaussement (6 : OBHE + tariquidar (a. r.)) semble démontrer une accumulation moyenne du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol environ deux fois plus grande que celle des autres groupes. Dans l'hémisphère controlatéral, lors de l'analyse des groupes 1 à 6, il n'y a que la courbe du groupe 6 : OBHE + tariquidar qui semble être légèrement plus élevée que la courbe du groupe contrôle (Figure 4.6 B). Lors de l'étude des sous-groupes 6 : OBHE + tariquidar, nous pouvons observer que la courbe du sous-groupe sans rehaussement ne semble pas différente du groupe contrôle, mais que la courbe du sous-groupe avec rehaussement semble démontrer une accumulation de  $^{11}\text{C}$ -carvedilol environ deux fois plus grande que celle du groupe contrôle.

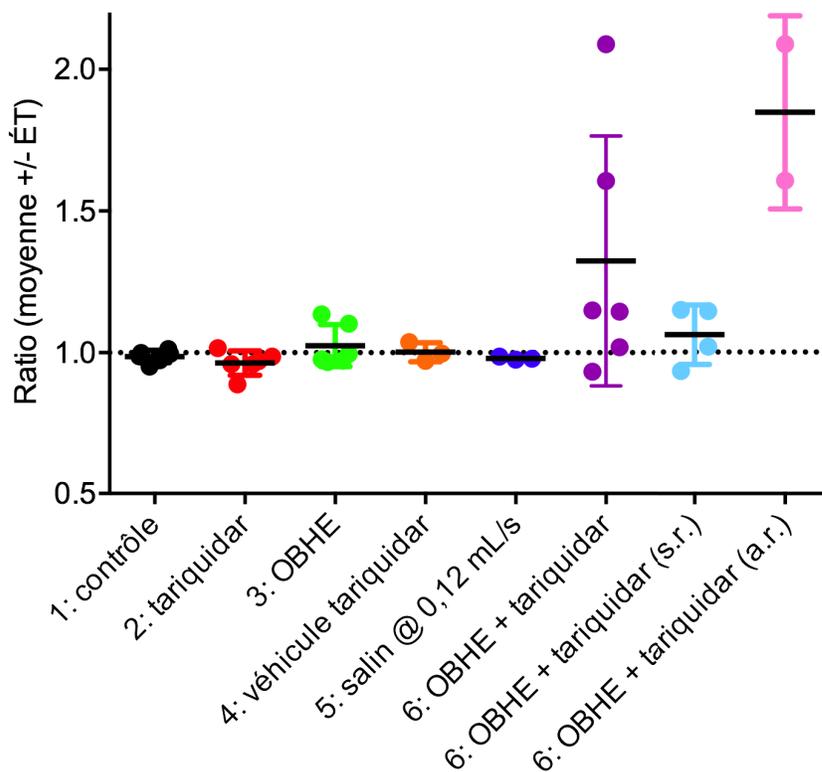
Afin de déterminer s'il y avait une différence de captation significative du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans le parenchyme de l'hémisphère ipsilatéral pour les différents groupes à l'étude, nous avons calculé le ratio de l'activité moyenne mesurée durant les 60 min de l'acquisition TEP pour le volume du parenchyme ipsilatéral sur le volume équivalent dans l'hémisphère controlatéral (Figure 4.7). Tout comme pour le ratio du volume tumoral sur le volume tumoral équivalent dans l'hémisphère contralatéral, nous éliminons ainsi la variabilité interanimale en se servant de chaque animal comme étant son propre contrôle. Lorsque l'on étudie le groupe 1 : contrôle, 2 : tariquidar, 3 : OBHE, 4 : véhicule tariquidar, 5 : salin @ 0,12 mL/s et 6 : OBHE + tariquidar, nous n'observons aucune différence significative entre les moyennes des différents groupes à l'étude. Par conséquent, aucun groupe ne présente une accumulation significative du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans l'hémisphère ipsilatéral comparativement au groupe 1 : contrôle (Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ , suivi d'un test de comparaison multiple de type Dunn,  $\alpha = 0,05$ ). Même lors que l'on étudie les sous-

groupes groupe 6 : OBHE + tariquidar (s.r.) et 6 : OBHE + tariquidar (a. r.), nous n'observons pas de différence significative avec la moyenne des autres groupes soit les groupes 1 : contrôle, 2 : tariquidar, 3 : OBHE, 4 : véhicule tariquidar et 5 : salin @ 0,12 mL/s. Malgré que nous observons un plus grand ratio pour le sous-groupe 6 : OBHE + tariquidar (a. r.), cependant la moyenne de ce groupe n'est pas significativement différente de celle des autres groupes, ni du groupe 1 : contrôle (Figure 4.7, Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ) suivi d'un test de comparaison multiple de type Dunn ( $\alpha = 0,05$ )).



**Figure 4.6. Courbes temps-activité pour le  $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans le parenchyme ipsilatéral et contralatéral.**

Courbes (moyenne ± erreur standard de la moyenne) temps-activité des groupes 1 : contrôle, 2 : tariquidar, 3 : OBHE, 6 : OBHE + tariquidar et ses deux sous-groupes 6 : OBHE + tariquidar (s.r.) et 6 : OBHE + tariquidar (a. r.) pour les volumes d'intérêt correspondant au parenchyme ipsilatéral (A) et au parenchyme contralatéral (B). Groupes 1, 2, 3, et 6 (n=6), sous-groupe 6 : OBHE + tariquidar (s.r.) (n=4), sous-groupe 6 : OBHE + tariquidar (a. r.) (n=2). Pour alléger le graphique les courbes des groupes contrôles négatifs (4 : véhicule tariquidar et 5 : salin @ 0,12 mL/s, n'ont pas été illustrées.



**Figure 4.7. Ratio de l'accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans le parenchyme ipsilatéral sur le parenchyme contralatéral.**

L'activité totale moyenne du volume d'intérêt parenchyme ipsilatéral a été divisée par l'activité totale moyenne du volume d'intérêt parenchyme contralatéral les 60 minutes de l'acquisition TEP pour chaque animal de chaque groupe. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes ou entre les groupes expérimentaux et le groupe contrôle, lorsque l'on compare les groupes 1 à 6. Une très grande variabilité est observée dans le groupe 6. Lorsque l'on sépare les animaux avec rehaussement des animaux sans rehaussement du groupe 6, le ratio des deux sous-groupes n'est pas significativement différent du ratio des autres groupes à l'étude, ni du groupe contrôle. (Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ , suivi d'un test de comparaison multiple de type Dunn,  $\alpha = 0,05$ ). Groupes 1, 2, 3, et 6 ( $n=6$ ), groupes 4 et 5 ( $n=3$ ), groupe 6 s.r. ( $n=4$ ), groupe 6 a. r. ( $n=2$ ).

## DISCUSSION

L'acheminement de composés au SNC et à la tumeur n'est pas du même ordre pour toutes les molécules. De plus, la présence des pompes à efflux limite l'acheminement au SNC de plusieurs agents anti-néoplasiques et ensuite leur accumulation au niveau des cellules tumorales gliales. Dans le contexte actuel où plusieurs neuro-oncologues à travers le monde négligent l'importance de l'acheminement des agents anti-néoplasiques aux cellules tumorales, les résultats que nous avons obtenus démontrent une fois de plus qu'il faut porter davantage d'intérêt à ces limitations thérapeutiques en neuro-oncologie.

### **5.1 Objectif 1 : Comparaison de l'acheminement de deux composés de taille et poids moléculaire différents.**

#### ***5.1.1 Durée de la perméabilité de la BHE suite à la procédure d'OBHE***

Nous avons premièrement observé que la durée de la perméabilité de la BHE pour le Gadomer suite à la procédure d'OBHE est plus courte que pour le Magnevist. En effet, la perméabilité de la BHE pour le Gadomer décroît très rapidement dans les 5 premières minutes suite à l'OBHE. La BHE ne semble plus perméable au Gadomer à partir de la dixième minute post-OBHE (Figure 2.2). Ce résultat contraste avec la durée de perméabilisation de la BHE obtenue pour Magnevist, où la BHE est toujours perméable au Magnevist 30 minutes suite à l'OBHE (Annexe 1) (Blanchette *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent donc que la durée de la période de temps suite à l'OBHE où une molécule peut traverser la BHE serait influencée par la taille et le poids moléculaire de la molécule à acheminer. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse émise par Rapoport et Robinson, qui stipule que des pores seraient créés par le choc osmotique et que leur taille diminuerait à mesure que les cellules endothéliales se réhydratent (Rapoport et Robinson, 1986). Ces résultats corroborent également la haute variabilité de la durée de la perméabilisation de la

BHE suite à l'OBHE par les différentes études effectuées à ce sujet (Bhattacharjee *et al.*, 2001b; Blanchette *et al.*, 2009; Kessler *et al.*, 1984; Neuwelt *et al.*, 1988; 1991; Rapoport *et al.*, 1980b; Zünkeler *et al.*, 1996a; Zünkeler *et al.*, 1996b). En plus du poids moléculaire et de la taille, la charge d'une molécule peut également affecter sa capacité à traverser la BHE perméabilisée (Armstrong *et al.*, 1989). Dans le cas de notre étude, nous avons utilisé deux agents de contraste de même charge afin d'évaluer de façon spécifique l'effet de la taille et poids moléculaire sur l'acheminement.

### ***5.1.2 Distribution des agents dans le parenchyme cérébral suite à l'OBHE***

La distribution du Gadomer suite à une procédure d'OBHE est relativement homogène à travers l'hémisphère traité. Nous pouvons observer quelques variations à travers l'encéphale, plus spécifiquement une légère augmentation est observée dans la matière grise puisque cette dernière est plus vascularisée que la matière blanche (Figure 2.1 B et 2.1 C). La distribution du Gadomer à travers le parenchyme cérébral ne semble être régulée que par son extravasation suite à l'OBHE. Tel que l'on peut voir à la Figure 3A de l'article, nous avons tracé cinq régions d'intérêt (ROI), la première étant située dans une région hautement vascularisée de l'hémisphère traité, les régions suivantes, 2 à 4, s'éloignent graduellement de la première ROI. La cinquième ROI est située à distance dans l'hémisphère controlatéral. Lorsque l'on étudie les courbes d'intensité de signal pour ces ROIs à la Figure 2.3 B, on observe que l'intensité maximale est obtenue environ 14 minutes suite à l'administration du Gadomer effectuée à 3 min post-OBHE et ce pour toutes les ROIs et qu'il s'élimine ensuite très lentement. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus pour le Magnevist. En effectuant la même analyse, nous avons observé que la distribution du Magnevist au SNC suite à l'OBHE s'effectuait premièrement par son extravasation, mais qu'elle était suivie de sa diffusion dans l'espace extracellulaire (Annexe 2) (Blanchette *et al.*, 2009). Ces résultats s'expliquent facilement par la différente taille des molécules, le Gadomer étant beaucoup plus volumineux (5-6 nm) que le Magnevist (<1 nm). Notre raisonnement est également appuyé par plusieurs articles dans lesquels l'influence de la taille de différentes molécules sur leur diffusion à travers l'espace

extracellulaire cérébral a été démontrée (Thorne, 2004; Thorne et Nicholson, 2006; Thorne *et al.*, 2008; Wolak et Thorne, 2013).

### ***5.1.3 Acheminement d'agents à la tumeur et au SNC sans moduler la perméabilité de la BHE***

Afin de déterminer la perméabilité basale de la BHE et BHT pour les deux agents de contraste à l'étude, nous avons calculé leur exposition à la tumeur, dans le parenchyme ipsilatéral et controlatéral pour les 30 premières minutes suite à leur administration. La Figure 2.4 D indique que la BHE empêche autant le Magnevist que le Gadomer d'atteindre le parenchyme cérébral, l'exposition mesurée correspond donc à la présence des ACs dans le compartiment vasculaire. Cependant, le Magnevist s'accumule environ 3 fois plus à la tumeur que le Gadomer. Nos résultats confirment donc que la perméabilité de la BHT varie selon les propriétés du composé administré et tel qu'observé dans ce cas-ci, selon la taille et le poids moléculaire du composé.

### ***5.1.4 Acheminement d'agents à la tumeur et au SNC suite à une procédure d'OBHE***

Nous avons ensuite évalué l'acheminement des ACs à travers la BHE et la BHT suite à la procédure d'OBHE. Nous avons encore une fois observé l'impact de la taille et poids moléculaire de nos ACs sur leur acheminement au niveau des trois ROIs étudiées. Premièrement, nous observons que l'exposition des deux ACs à la tumeur est doublée comparativement aux animaux contrôles. L'augmentation de l'exposition des ACs au parenchyme de l'hémisphère ipsilatéral est grandement augmentée suite à la procédure d'OBHE. Il est cependant très intéressant de constater que le Magnevist s'accumule toujours davantage que le Gadomer que ce soit à la tumeur ou dans le parenchyme de l'hémisphère traité. La perméabilité de la BHE et de la BHT suite à la procédure d'OBHE

est donc molécule-dépendante et tel que le suggèrent nos résultats, le poids moléculaire et la taille des molécules ont un impact sur le degré de leur acheminement.

## **5.2 Objectif 2 : Expression et localisation de différentes pompes à efflux dans des échantillons de GBM.**

Nous avons étudié l'expression et la localisation de 4 pompes à efflux soit la PGP, MRP1, MRP3 et BCRP, afin d'évaluer l'impact de la présence des pompes à efflux sur l'acheminement au SNC et l'accumulation dans les cellules tumorales gliales.

### **5.2.1 Quantification de l'expression des pompes à efflux**

Dans le but de quantifier l'expression des pompes à efflux par qPCR, nous devions dans un premier temps identifier des gènes de référence valides. Nous avons vérifié l'effet de la qualité de l'ARN sur sa quantification par qPCR. Pour chaque gène étudié, nous avons observé que lorsque l'ARN est dégradé nous détectons un  $C_q$  plus élevé (Figure 3.1). Cependant, il peut s'agir d'efficacité de détection, puisque l'ARN partiellement dégradé est moins facilement reconnu par les amorces et la sonde menant à une plus faible capacité de détection des fragments d'ARN. Afin d'effectuer une analyse valide de la variabilité des gènes de référence candidats, nous avons décidé d'imposer un seuil et d'exclure tous les échantillons ayant un RIN inférieur à 7,5. Cette procédure est acceptée par la littérature, les publications en qPCR certaines études fixent même leur seuil à un RIN de 7,0.

Nous avons par la suite évalué la stabilité de ces différents gènes. Même si les résultats des différentes méthodes étaient généralement semblables, nous avons décidé de générer un rang global pour l'ensemble des gènes à l'étude. Les gènes les plus stables se retrouvant en haut de la liste ayant une valeur de variabilité plus petite et les moins stables au bas de la liste. Selon ce rang global, les trois gènes occupant les trois premiers rangs sont *TBP*, *HRPT* et *SFRS9*. Valente et ses collaborateurs ont démontré que la combinaison de *HPRT* et *TBP* était appropriée pour normaliser l'expression de gènes dans les études

effectuées par qPCR dans des échantillons de GBM (Valente *et al.*, 2009). Plusieurs autres études ont identifié *HPRT* et *TBP* comme étant des gènes de référence appropriés pour des échantillons tumoraux (de Kok *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2007; Ohl *et al.*, 2005; 2006). Nous n'avons pas trouvé d'autres études ayant évalué *SRFS9* comme gène de référence. Pour les lignées cellulaires, nous suggérons cependant l'utilisation de *RPLP0*. Les lignées cellulaires cancéreuses représentent des populations cellulaires beaucoup plus homogènes que les tumeurs primaires et les résultats obtenus à la Figure 3.2 suggèrent que *RPLP0* serait le gène de référence le plus stable que nous avons étudié pour les lignées cellulaires (Ertel *et al.*, 2006; Gillet *et al.*, 2011).

Dans l'intention de déterminer l'impact de la présence de chaque pompe à efflux, nous avons quantifié leur expression en qPCR dans des échantillons de cerveaux sains et dans les échantillons de GBM suivi d'une comparaison entre deux échantillons de chirurgies subséquentes effectuées chez les mêmes patients. Nous avons observé une diminution de l'expression de l'ARN d'*ABCB1* dans les tumeurs comparativement aux tissus sains ainsi qu'une augmentation de l'expression d'*ABCC1* et d'*ABCC3* dans les échantillons tumoraux et aucun changement d'expression pour *ABCG2*. Ces résultats concordent avec la littérature où l'expression de la protéine MRP1 issue du gène *ABCC1* augmenterait avec le grade de la tumeur, et inversement pour la PGP issue du gène *ABCB1* (Calatuzzolo *et al.*, 2005; Spiegl-Kreinecker *et al.*, 2002). L'augmentation de l'expression de la protéine MRP3 issue du gène *ABCC3* entre le tissu tumoral et sain est également appuyée par la littérature (Calatuzzolo *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2010; Kuan *et al.*, 2010; Valera *et al.*, 2007). Cependant, les papiers cités suggèrent une augmentation de l'expression de MRP3 avec le grade de la tumeur, nous supposons ainsi qu'une augmentation de l'expression aurait pu être observée entre les échantillons provenant de chirurgies subséquentes. D'un autre point de vue, si nous considérons observer une augmentation de l'expression d'MRP3 reliée à l'agressivité de la maladie, l'augmentation entre deux résections d'un même GBM, donc d'un même grade devrait être moins marquée que l'augmentation entre une tumeur de bas grade avec une tumeur de haut grade tel que cité dans les précédents articles.

La BCRP issue du gène *ABCG2* est exprimée au niveau de la BHE saine et au niveau de la BHT (Zhang et al., 2003). Selon les travaux de Zhang et ses collaborateurs, l'expression de la BCRP serait même augmentée les cellules tumorales et les vaisseaux provenant d'échantillon de GBM comparativement avec du tissu cérébral sain (Zhang *et al.*, 2003). Les travaux sur les cellules souches de cancer du cerveau (brain tumor stem cells, BTSC, exprimant le marqueur CD133) ont démontré que cette sous-population de cellules tumorales exprimerait des niveaux de BCRP de 2 à 6 fois élevés que le reste de la population cellulaire tumorale, soit les cellules tumorales clonogéniques (CD133-) (Liu *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2001). L'expression de la BCRP devrait donc être augmentée entre les échantillons de tissus sains et GBM ainsi qu'entre une chirurgie et une subséquente. Selon la théorie des cellules souches cancéreuses, ces cellules radio- et chimiorésistantes seraient responsables de la récurrence tumorale et par conséquent, leur nombre augmenterait avec l'avancement de la maladie (Qin *et al.*, 2010; Tanamura *et al.*, 2010). Cependant, bien que le qPCR soit une technique très sensible, les cellules souches cancéreuses représentent une très faible population cellulaire dans l'ensemble de la tumeur (environ 4 %) et ainsi lors d'une extraction d'ARN sur un échantillon total tel que nous l'avons fait, la surexpression de BCRP a été moyennée sur l'ensemble des cellules présentes dans l'échantillon. Ce qui expliquerait les résultats obtenus. Cependant, nous devons tenir compte que même si nos résultats semblent corrélés avec la littérature, il était impératif pour nous d'effectuer ces expériences, car dans les articles de la littérature les expériences effectuées en qPCR avaient pour gène de référence *GAPDH* et *ACTB*. Or, nous avons démontré que ces gènes de référence ne sont pas valides pour effectuer la normalisation d'expression de gènes d'intérêt en qPCR. Plusieurs autres articles de la littérature démontrent également que l'expression de *GAPDH* et *ACTB* n'est pas assez stable pour que ceux-ci puissent être utilisés comme gènes de référence (Bie *et al.*, 2011; Bustin, 2000; Fossdal *et al.*, 2012; Glare *et al.*, 2002; Huth *et al.*, 2013; Selvey *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2000). Il est également à noter qu'aucun article de la littérature n'a comparé comme nous l'avons fait l'augmentation de l'expression de ces gènes entre deux chirurgies subséquentes dans des astrocytomes de grade IV (GBM). Nous comparons donc nos résultats avec différents articles de la littérature ayant comparé l'expression de ces gènes entre des échantillons tumoraux et de tissu sain cérébral ainsi qu'entre des échantillons provenant de différents

grades de gliomes malins. De plus, le plus grand nombre d'échantillons de GBM étudiés lors de ces études était de 23 alors que nous en avons étudié 75 en incluant les échantillons provenant de chirurgies subséquentes.

### ***5.2.2 Localisation de l'expression des pompes à efflux***

Les pompes à efflux sont exprimées au niveau de la BHE, BHT et des cellules tumorales. Dans le cadre de notre étude, il était donc impératif d'identifier par quel type cellulaire elles sont exprimées. En effet, cette information permet de déterminer si la pompe limite l'acheminement au SNC et/ou à la tumeur et ce dernier cas implique évidemment la chimiorésistance des cellules tumorales gliales. Nous avons pu observer que la PGP n'était pas exprimée par les cellules tumorales, tandis que MRP1, MRP3 et BCRP l'étaient. Parmi les quatre pompes à efflux étudiées, il n'y a que MRP3 qui n'était pas exprimée par l'endothélium vasculaire. Selon la littérature PGP, MRP1 et BCRP sont exprimées par les cellules endothéliales cérébrales tel que nous l'avons observé (Aronica *et al.*, 2005). Bien que dans le contexte de notre étude, l'intérêt est d'apprendre quelles pompes à efflux nous devons cibler pour augmenter l'acheminement au SNC et aux cellules tumorales, il aurait pu être intéressant de comparer nos résultats d'immunohistochimie avec d'autres immunohistochimies effectuées sur des tissus de cerveaux sains. Nous avons tenté de le faire avec des coupes en paraffine provenant de la Banque de cerveaux Douglas - Bell Canada, cependant les tissus provenaient de sujets dont le cerveau avait été prélevé au-delà de 24 h post-mortem. La reconnaissance des protéines par les anticorps n'était donc pas possible dû au haut taux d'autolyse des tissus. L'autre alternative aurait d'avoir accès au tissu en marge de la tumeur provenant des échantillons de tumeur des patients du service de neuro-oncologie du CHUS. Cependant, nous savons que dû au caractère hautement invasif des gliomes que nous ne pouvons pas considérer ce tissu comme étant sain. La dernière option que nous avons considérée est d'utiliser comme tissu sain le tissu cérébral provenant du foyer épileptique d'un patient en ayant subi l'exérèse. Encore une fois, nous devons nous soustraire à cette possibilité, car il est bien connu que plusieurs pompes à efflux la BHE sont surexprimées chez les patients qui ne répondent plus aux antiépileptiques

(Dombrowski *et al.*, 2001; Sisodiya *et al.*, 2001; Aronica *et al.*, 2004; Feldmann *et al.*, 2013).

### **5.3 Objectif 3 : Évaluation de l'accumulation au parenchyme et à la tumeur d'un substrat des pompes à efflux suite à une procédure d'OBHE.**

Nous avons dans un premier temps évalué l'accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol, un substrat des pompes à efflux, au niveau de la tumeur. Étonnement il n'y a que dans les groupes ayant reçu l'inhibiteur spécifique de la PGP, le tariquidar, que l'on observe une accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol à la tumeur. La procédure d'OBHE ne permettrait pas d'augmenter l'acheminement à la lésion tumorale ni aux foyers néoplasiques à distance du foyer principal protégés par la BHE.

Lors de l'étude des courbes temps-activité dans le sang, nous avons observé que le pic maximal des groupes contrôle, tariquidar et véhicule tariquidar étaient semblables. La même observation a été effectuée pour les groupes OBHE, solution saline @ 0,12 mL/s et OBHE + tariquidar. Cependant, le pic maximal des courbes temps-activité des groupes 1, 2 et 4 était plus élevé que celui des groupes 3, 5 et 6. Le seul élément liant les groupes 3, 5 et 6 et les différenciant des groupes 1, 2 et 4 est l'anesthésie au propofol. L'anesthésie au propofol par voie veineuse pour les groupes 3, 5 et 6, cause une augmentation du volume sanguin. Au moment où le traceur est administré, l'animal a déjà reçu de 1.5 à 2 mL de propofol. En plus de l'anesthésie, la procédure d'OBHE ou son contrôle nécessite l'administration d'un volume de 3.6 mL dans le compartiment vasculaire, et ce immédiatement avant l'administration du traceur. Au moment où le traceur est administré, les groupes 3, 5 et 6 ont une augmentation de 5 à 6 mL de leur volume sanguin. En situation normale, le volume sanguin de ces animaux est d'environ 10 mL. Il est à noter que la dose de  $^{11}\text{C}$ -carvedilol administrée aux animaux n'est pas significativement différente d'un animal à l'autre. Ainsi, le pic maximal est donc plus bas pour les groupes 3, 5 et 6 puisque l'augmentation du volume sanguin inhérent à la procédure a mené à une dilution de la dose administrée.

Ensuite, les résultats de l'accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol au niveau du parenchyme cérébral, pour les groupes 2 : tariquidar), 3 : OBHE et 6 : OBHE + tariquidar nous ont étonnés. Premièrement, nous avons observé que l'administration de tariquidar seule ne permet pas d'accumuler le  $^{11}\text{C}$ -carvedilol au niveau du parenchyme cérébral des deux hémisphères. Il a été démontré que le  $^{11}\text{C}$ -carvedilol est un substrat de la PGP, mais pas de la MRP1 (Bart *et al.*, 2005). Aucune autre étude n'a été effectuée afin de déterminer s'il pouvait être le substrat d'une autre pompe à efflux. Nous supposons donc qu'il serait également un substrat de la BCRP qui est exprimée par la BHE et ne l'est pas par les cellules F98. Il est important de noter que les niveaux d'expression des pompes à efflux diffèrent entre espèces. Une très belle étude a fait la comparaison entre les taux d'expression à la BHE chez l'homme versus chez la souris; la BCRP est deux fois plus exprimée chez l'homme que chez la souris et l'inverse pour la PGP (Uchida *et al.*, 2011). Cependant, aucune comparaison du genre n'a été effectuée avec le rat. Il est également à noter qu'au niveau des F98, nous avons vérifié l'expression de la PGP, MRP1, MRP3 et BCRP. Nous avons observé que les F98 expriment fortement la PGP, faiblement la BCRP et que la MRP1 et MRP3 n'étaient pas détectables par immunobuvardage dans cette lignée (Annexe 3). La PGP, la MRP1 et la BCRP sont présentes au niveau de la BHE chez le rat et ceci a bien été caractérisé par plusieurs études (Babakhanian *et al.*, 2007; Begley *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2000; Regina *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Ce serait cependant la PGP qui serait le plus exprimée, suivie de la BCRP, MRP1 et MRP2. Il a également été démontré que le tariquidar était un inhibiteur spécifique de la PGP, mais qu'à haute concentration ( $>100$  nM) il pouvait également inhiber la BCRP (Kannan *et al.*, 2011). Cependant, à la dose administrée (7,5 mg/kg), la quantité administrée par animal était d'environ 2,83  $\mu\text{M}$  dans un volume de 175  $\mu\text{L}$  et les animaux de ce poids ont un volume sanguin d'environ 10 à 15 mL. Ainsi, nous pouvons estimer que la concentration sanguine totale de tariquidar devait se situer entre 37,7 et 56,6 nM. Ainsi, à la dose que nous avons utilisée, nous avons bel et bien inhibé de façon spécifique que la PGP.

Nous n'avons pas observé d'accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans le parenchyme ipsilatéral pour le groupe OBHE et, à l'inverse, 2 animaux du groupe 6 (OBHE + tariquidar) démontraient une accumulation du traceur dans l'hémisphère ipsilatéral. Il est certain que cette accumulation est la conséquence de l'OBHE et ce résultat soulève donc

une très importante question ou hypothèse par rapport à l'ensemble des résultats obtenus pour les groupes 3 : OBHE et 6 : OBHE + tariquidar. C'est à dire, nos résultats sont-ils valides? Est-ce que l'OBHE n'a tout simplement pas fonctionné pour les 10 autres animaux ayant subi une procédure d'OBHE? L'OBHE est connue pour être une procédure très variable d'un individu à l'autre (Neuwelt *et al.*, 1983b; Siegal *et al.*, 2000). Il serait toutefois très étonnant que la procédure d'OBHE n'ait fonctionné que sur 2 animaux sur un total de 12. Selon mes expériences passées, à un débit d'infusion du mannitol de 0,12 mL/s, 70 % des OBHE sont réussies, même si leur intensité varie d'un individu à l'autre. De plus, la TEP est une technique d'imagerie très sensible, donc même suite à une OBHE de faible intensité nous aurions dû mesurer une différence d'accumulation entre le parenchyme de l'hémisphère traité et le parenchyme de l'hémisphère controlatéral. Nous avons utilisé dans la présente étude un débit de 0,12 mL/s et dans la plupart des études effectuées chez le rat le débit utilisé est de 0,08 à 0,12 mL/s. Les études utilisant un débit de 0,12 mL/s chez le rat obtiennent une augmentation significative de l'acheminement de molécules, liposomes et virus donnés en IA suite à l'OBHE (Charest *et al.*, 2013; Muldoon *et al.*, 1995; Nilaver *et al.*, 1995). Afin de valider la qualité de l'OBHE chez les animaux, il aurait été préférable de prélever les cerveaux des animaux suite à l'acquisition TEP, les fixer et effectuer une immunohistochimie contre l'albumine afin de quantifier sa présence et de confirmer ou infirmer s'il y a eu perméabilisation de la BHE (Blanchette *et al.*, 2012). D'autres expériences seront effectuées au laboratoire et se dérouleront ainsi afin de confirmer les résultats obtenus. En effet, si nous n'observons pas d'accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans le parenchyme de l'hémisphère traité, mais que le marquage contre l'albumine est positif, nous pourrions confirmer que nos résultats sont valides et que l'activité des pompes à efflux à la BHE est suffisamment élevée pour rejeter dans la circulation sanguine les agents anti-néoplasiques substrats des pompes à efflux ayant tenté d'atteindre le parenchyme cérébral suite à l'OBHE.

Cette discussion sur l'absence de l'accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans 10 animaux sur 12 ayant eu une OBHE, n'explique cependant pas l'accumulation observée dans le parenchyme des 2 autres animaux. Il convient d'insister à nouveau sur le fait que le processus d'OBHE est très variable d'un individu à l'autre (Neuwelt *et al.*, 1983b; Siegal *et al.*, 2000). Il est également important de spécifier que la procédure d'OBHE ne

perméabilise normalement que l'hémisphère traité tel que vous pouvez l'observer dans la Figure 2.S4. du chapitre 2 de cette thèse. Également comme observé avec la diffusion du Magnevist chez les animaux sains, si nous observons une augmentation de Magnevist dans l'hémisphère controlatéral, ce ne sera pas immédiatement suite à son administration, puisqu'il faut permettre à l'agent de diffuser d'un hémisphère à l'autre (Blanchette *et al.*, 2009). Cependant, lors d'une excellente OBHE, un rehaussement de signal est immédiatement observé dans l'hémisphère contralatéral. Ces cas d'OBHEs excellentes ne représentent pas la norme dans nos observations. Un seul animal sur un groupe de 44 animaux que nous avons étudié par IRM dynamique, ayant subi une OBHE à 0,12 mL/s, a eu une OBHE de cette envergure. Le polygone de Willis est un réseau vasculaire ou plus précisément la connexion du réseau vasculaire cérébral. Grossièrement, il relie les deux artères carotidiennes internes (gauche et droite) ainsi que le tronc basilaire qui provient de la fusion des deux artères vertébrales. Lorsque nous effectuons une OBHE chez l'animal qui est très réussie, il arrive que l'OBHE s'effectue également dans l'hémisphère controlatéral, mais de moindre intensité que dans l'hémisphère ipsilatéral. L'accumulation dans l'hémisphère ipsilatéral est également très importante lors de ces OBHEs très réussies. Selon les résultats obtenus, c'est exactement ce qu'il se serait produit pour les deux animaux du groupe 6 (OBHE + tariquidar). Tel que l'on peut le voir à la Figure 4.6 A, la courbe temps-activité dans l'hémisphère traité du groupe 3 (OBHE) n'est pas significativement différente de celle des animaux sans rehaussement du groupe 6 : OBHE + tariquidar. Cependant, pour les 2 animaux avec rehaussement du groupe 6 : OBHE + tariquidar la courbe temps-activité démontre une importante accumulation du  $^{11}\text{C}$ -cardevilol dans le parenchyme cérébral. Lors de l'analyse détaillée de la courbe, nous observons un pic maximal élevé au début et une lente élimination du traceur qui peuvent suggérer une accumulation dans le tissu d'intérêt. En étudiant maintenant les courbes temps-activité de l'hémisphère controlatéral à la Figure 4.6 B, nous observons qu'il n'y a toujours pas de différence entre la courbe du groupe 3 : OBHE et la courbe du sous-groupe sans rehaussement du groupe 6 : OBHE + tariquidar. Cependant, lorsque l'on étudie la courbe du sous-groupe avec rehaussement du groupe 6 : OBHE + tariquidar, nous observons à nouveau un pic maximal important, ainsi qu'une élimination lente du traceur se traduisant à nouveau en son accumulation dans le parenchyme de l'hémisphère

controlatéral. Sur cette courbe, nous ne percevons pas l'accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans l'hémisphère controlatéral de par sa diffusion de l'hémisphère ipsilatéral. Théoriquement, il est fort possible qu'il puisse diffuser de par son poids moléculaire qui n'est que de 406,474 g/mol, donc plus petit que le Magnevist. Cette diffusion se fait théoriquement par gradient de concentration et nous supposons que l'accumulation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans l'hémisphère controlatéral est d'un ordre trop important pour que l'on puisse observer un changement de la courbe temps-activité dû au processus de diffusion. Ce phénomène est également observé lorsque l'on effectue des OBHE à très haut débit d'infusion du mannitol tel qu'à 0,14 ou 0,15 mL/s. Cependant, à ces hauts débits le taux de mortalité dû à la procédure d'OBHE est également plus élevé (Blanchette, Michaud et Fortin, 2012).

Il y a également lieu de se demander si le protocole utilisé pourrait être modifié pour améliorer la sensibilité de détection. La dose de Magnevist et de Gadomer administrée dans la réalisation de l'objectif #1 était beaucoup plus grande que la quantité de  $^{11}\text{C}$ -carvedilol administrée en TEP. Cependant, en tenant compte de la grande sensibilité de la TEP, détection dans l'ordre du femtomolaire, je ne crois pas que ce point justifie les résultats obtenus d'autant plus que nous observons une augmentation de la captation à la tumeur lorsque les animaux reçoivent une dose de tariquidar. De plus selon les propriétés des deux traceurs, précédemment décrites dans la sous-section 4.1.6  $^{11}\text{C}$ -carvedilol, la sensibilité deux fois plus grande du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol comparativement au  $^{11}\text{C}$ -verapamil lors d'une inhibition de la PGP, me porte à croire que le  $^{11}\text{C}$ -carvedilol constitue toujours le meilleur choix de traceur pour cette étude.

Jusqu'à confirmation par les études supplémentaires en cours au laboratoire, nous croyons que l'activité des pompes à efflux lors du processus d'OBHE est suffisante pour que les substrats des pompes soient expulsés dans la circulation sanguine et ainsi ne peuvent s'accumuler dans le parenchyme cérébral, sauf dans certains cas où l'OBHE est d'intensité exceptionnelle. L'idée qu'une OBHE de forte intensité puisse mener à l'accumulation de substrats des pompes à efflux au SNC est appuyée par les travaux du laboratoire de Dr David S. Miller. En effet, son groupe de recherche étudie l'expression et l'activité des pompes à efflux à la BHE. La technique principalement utilisée dans son laboratoire consiste à visualiser par fluorescence des fluorophores qui sont des substrats

spécifiques des pompes à efflux. Le contrôle positif de leurs expériences consiste à ajouter une solution hyperosmolaire de mannitol pendant 60 min dans le pétri contenant les microvaisseaux cérébraux de rat fraîchement extraits et le fluorophore substrat de la pompe à efflux étudiée (Hartz *et al.*, 2004; Hartz *et al.*, 2010; Rigor *et al.*, 2010). Les résultats de cette procédure ne peuvent évidemment pas être directement transposés au processus d'OBHE et par conséquent n'invalident pas la raison d'être de notre étude.

Il serait très intéressant de poursuivre cette étude en évaluant la survie des animaux lorsqu'un agent anti-néoplasique substrat des pompes à efflux est administré au lieu du <sup>11</sup>C-carvedilol.

#### 5.4 Discussion générale et perspectives

D'un point de vue global, plusieurs critiques peuvent être énoncées sur mes travaux. Premièrement, la comparaison de l'expression des pompes à efflux dans la tumeur et le tissu sain est à considérer avec une certaine réserve. Le RIN des échantillons de cerveau provenant de sujets sains variait entre 5 et 7,15. La comparaison d'échantillons ne possédant pas la même qualité d'ARN peut mener à une sous-estimation ou une surestimation des résultats obtenus. Cependant, comme discuté précédemment, il est très difficile d'obtenir des échantillons de cerveau sain. L'utilisation du qPCR en essai Taqman en premier lieu a ainsi permis d'identifier de façon rapide et simple une variation de l'expression pour certains gènes d'intérêt en utilisant les plus petites quantités de spécimens humains possibles avec une grande spécificité et sensibilité. Nous avons ensuite validé leur expression protéique et leur localisation en immunohistochimie. L'étude de l'expression des différents ARNm aurait pu être effectuée par hybridation *in situ*. L'avantage de cette technique est qu'elle est effectuée directement sur les coupes histologiques et permet de déterminer la localisation de l'expression. Elle n'est cependant pas aussi sensible que le qPCR en plus d'être une technique semi-quantitative. L'utilisation de microchips à ARN aurait pu être une autre méthode intéressante pour identifier des gènes d'intérêt. La microdissection au laser aurait été une technique très intéressante puisque cette dernière permet de découper les cellules d'intérêt et ensuite de quantifier leur ADN, ARN ou

protéines. Ainsi nous aurions d'emblée quantifié l'expression des pompes au niveau des cellules endothéliales et des cellules tumorales. Cette technique est cependant plus difficile et exigeante que celles utilisées dans notre présente étude.

L'augmentation de l'expression de *ABCC3* dans les tissus tumoraux comparativement aux tissus sains est très intéressante. Surtout lorsque nous avons observé que sa localisation protéique (MRP3) est au niveau des cellules tumorales gliales et non à la BHT. Elle n'est toutefois pas exprimée par toutes les cellules tumorales. Il serait très intéressant de déterminer si les cellules l'exprimant constituent une sous-population tumorale responsable de chimiorésistance et par conséquent induisant la récurrence tumorale. Nous collignons des données cliniques afin de vérifier s'il y a une corrélation entre les niveaux d'expression d'ARN des pompes à efflux ainsi que la progression de la maladie.

Plusieurs pompes à efflux sont exprimées par les cellules tumorales, tel qu'observé dans cette étude avec MRP3, MRP1 et BCRP. Il est important de rappeler que ces dernières possèdent des substrats croisés. Il serait donc pertinent de développer des inhibiteurs spécifiques non sélectifs afin d'inhiber plusieurs pompes avec une même molécule. Il faudrait évidemment l'acheminer de façon spécifique aux cellules cancéreuses afin d'éviter les effets secondaires délétères d'une grande biodistribution systémique ou à grande échelle au SNC. Ainsi, l'expression de MRP3 spécifique aux cellules tumorales pourrait être utilisée afin de cibler spécifiquement ces dernières et par conséquent augmenter l'acheminement spécifique et diminuer les effets secondaires indésirables des agents antinéoplasiques.

L'objectif 1 nous a permis de déterminer qu'il y avait une différence dans l'acheminement de deux molécules de poids et taille différentes avec ou sans OBHE. Puisque la charge d'une molécule pourrait avoir un impact sur son acheminement au SNC à travers la BHE perméabilisée, il aurait été intéressant d'approfondir davantage la différence d'acheminement pour des molécules possédant d'autres caractéristiques. Par exemple, il serait intéressant d'étudier l'acheminement de deux molécules ayant pour différence principale leur charge.

L'étude de l'acheminement de différents composés (substrat ou non des pompes à efflux) aurait pu également pu être effectuée qu'en utilisant la TEP. Ainsi, nous aurions pu utiliser des agents de chimiothérapie radiomarqués tels que le et la translation de nos données vers la réalité clinique aurait eu un plus grand impact. Cependant, nos données obtenues par IRM dynamique n'en sont pas moins pertinentes. Même si l'information provenant de l'IRM nous donne une mesure indirecte, nous avons pu démontrer que la concentration calculée à partir du signal IRM correspondait à la concentration réelle de l'agent de contraste dans le tissu cérébral des animaux.

Lors de la réalisation du troisième objectif, l'utilisation du propofol comme anesthésiant pour les groupes 3, 5 et 6, et de l'isoflurane pour les groupes 1, 2 et 4 a participé à induire des variations dans les courbes temps-activités pour les régions d'intérêt étudiées ainsi que les courbes sanguines. Il aurait évidemment été préférable que tous les animaux soient anesthésiés au propofol afin d'éliminer toute variable confondante. Il est cependant à noter qu'il y aurait toutefois eu dilution du radiotraceur dans le sang pour les groupes 3, 5 et 6 dû à l'administration supplémentaire de 3,6 mL de mannitol ou de la solution saline. Cette dilution serait également plus marquée dans le groupe 5 : salin @ 0,12 mL/s, puisque le mannitol est un diurétique, l'animal l'urine pratiquement immédiatement suite à l'OBHE, ce qui n'est pas le cas du salin, ce qui augmente donc de façon encore plus importante le volume sanguin total des animaux du groupe 5.

L'accumulation de  $^{11}\text{C}$ -carvedilol à la tumeur et au parenchyme n'a été mesurée que par TEP et comme discuté dans l'introduction, l'accumulation d'un composé au SNC peut être extracellulaire ou intracellulaire. Afin de confirmer par une autre méthode que l'accumulation tumorale d'un substrat des pompes à efflux est intracellulaire suite à l'administration d'une dose de tariquidar, il serait très intéressant d'effectuer l'OBHE en utilisant deux molécules fluorescentes qui ne passe pas la BHE normale, dont l'une serait être un substrat des pompes à efflux (ex : Rhodamine 123) et l'autre, pas (ex : dextran, Texas Red<sup>®</sup>, 3000 Da). Ainsi, nous pourrions effectuer l'OBHE et observer par microscopie multiphotonique si l'accumulation du substrat des pompes à efflux est intracellulaire ou

dans le liquide interstitiel dans la lésion tumorale. Cette technique nous permettrait également de déterminer s'il y a une augmentation de l'activité des pompes à efflux suite à l'OBHE, ce qui pourrait expliquer l'absence de captation du  $^{11}\text{C}$ -carvedilol dans le parenchyme cérébrale suite à l'OBHE.

Il est également essentiel de poursuivre ces travaux en effectuant une étude de survie préclinique en combinant l'administration de deux agents de chimiothérapie, l'un substrat des pompes à efflux et l'autre ne l'étant pas, par exemple : elortinib et carboplatin. L'étude serait construite selon les mêmes six groupes que l'étude effectuée avec le  $^{11}\text{C}$ -carvedilol soit contrôle, OBHE, Tariquidar, OBHE + Tariquidar, contrôle (d'OBHE, salin au lieu du mannitol) et contrôle (véhicule Tariquidar). Nous devons légèrement modifier le modèle animal que nous utilisons en changeant la lignée F98 pour des F98 surexprimant l'EGFR (ATCC<sup>®</sup> CRL-2948<sup>™</sup>) ou des F98 exprimant EGFR<sub>vIII</sub> (ATCC<sup>®</sup> CRL-2949<sup>™</sup>) puisque l'elortinib est un inhibiteur spécifique de l'EGFR. Cliniquement, cette étude pourrait avoir une portée très intéressante puisque l'EGFR est le gène le plus amplifié/muté des GBMs primaires (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Parsons *et al.*, 2008). Il est primordial de noter que le mutant (EGFR<sub>vIII</sub>) est constitutivement actif. Comme discuté dans l'introduction, il a été démontré que les inhibiteurs des récepteurs tyrosine-kinase seraient des substrats des pompes à efflux. Il n'est donc pas étonnant que les études cliniques utilisant les inhibiteurs de ce récepteur chez des patients atteints de GBM n'aient pas démontré d'impact sur la survie des patients, malgré l'utilisation de fortes doses, elortinib (150 à 500 mg) ou de gefitinib (500 à 1000 mg) par jour (Uhm *et al.*, 2011; Reardon *et al.*, 2010; Mellinshoff *et al.*, 2005). Alors qu'une importante étude chez des patients atteints de cancer du poumon exprimant un mutant de l'EGFR, a démontré que la prise orale quotidienne d'elortinib (150 mg) ou du gefitinib (250 mg/jour) en monothérapie devait être considéré comme nouveau traitement de première ligne pour cette population de patients (Jackman *et al.*, 2009).

La translation directe de nos données obtenues chez l'animal vers la clinique est évidemment impossible. Premièrement, la différence interspèce doit être considérée et ce incluant les différences de la vascularisation cérébrale, les paramètres régissant l'OBHE, les différences entre l'application de l'OBHE en clinique versus chez l'animal. De plus,

l'expression et l'activité des différentes pompes à efflux au niveau de la BHE sont différentes entre le rat et l'humain (Uchida *et al.*, 2011; Bauer *et al.*, 2012). De même, les cellules F98 n'expriment que la PGP, nous avons cependant observé dans les échantillons de provenant de GBM humain que ces tumeurs sont très hétérogènes et peuvent exprimer plusieurs pompes à efflux. Ainsi, il serait très naïf de croire que le tariquidar administré IV ou même IA permettrait d'augmenter l'acheminement de substrats des pompes à efflux au niveau du nodule tumoral principal tel que nous l'avons observé dans notre étude. De plus, d'un point de vue translationnel je crois qu'il serait complètement irresponsable d'administrer IV une combinaison d'inhibiteurs, un inhibiteur non spécifique ou spécifique des pompes à efflux. Plusieurs autres tissus et barrières que la BHE et la barrière sang-LCR expriment ces pompes à efflux : le foie, les glandes surrénales, la barrière hématorétinienne, hémotesticulaire ainsi que la barrière placentaire chez la femme enceinte. L'inhibition de toutes les pompes à efflux avec ou sans administration d'agents antinéoplasiques aura évidemment des conséquences dans ces autres systèmes. Même chose au niveau intestinal où plusieurs pompes à efflux sont exprimées afin de rejeter dans la lumière intestinale des molécules possiblement dangereuses pour l'organisme. De plus, même si les inhibiteurs de troisième génération ne réagissent plus avec le cytochrome P450 il n'en demeure pas moins qu'ils ont des vies plasmatiques très longues et qu'une inhibition des pompes à efflux à grande échelle et de longue durée aurait sans doute des effets néfastes.

En conclusion, dans l'optique d'augmenter l'efficacité des traitements de chimiothérapie administrés aux patients atteints de gliomes malins, une stratégie permettant d'acheminer sur un large volume au SNC est essentielle. Jusqu'à ce que de nouvelles stratégies moins invasives et aussi efficaces soient disponibles, l'OBHE est sans conteste la meilleure option en neuro-oncologie. Il est cependant important de contourner les pompes à efflux à la BHE et au niveau des cellules tumorales gliales. L'OBHE devrait donc être combinée avec l'administration d'agents modifiés pour cibler les cellules cancéreuses et être invisibles aux différentes pompes à efflux en utilisant par exemple des liposomes contenant différents agents, dont un inhibiteur spécifique non-sélectif des pompes à efflux. Ces liposomes seraient fonctionnalisés et cibleraient l'EGFR et MRP3.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes trois codirecteurs Pr David Fortin, Pr Martin Lepage et Pr Roger Lecomte. Merci de m'avoir permis de travailler sur ce projet et de votre mentorat au cours des dernières années. Je suis très heureuse de ce que j'ai acquis grâce à vous.

J'aimerais également remercier les membres du Jury : Pr Kevin Whittingstall, Pre Nathalie Rivard ainsi que Pr Frédéric Calon pour votre temps et ainsi que votre apport scientifique. Merci aux organismes subventionnaires soit les Instituts de recherche en santé du Canada et La Fondation Canadienne des Tumeurs Cérébrales pour le financement de mon projet ainsi que le FRQ-S de m'avoir accordé une bourse salariale.

Merci, à Marie-Belle Poirier et Luc Tremblay pour l'aide professionnelle et les conseils scientifiques qu'ils m'ont prodigués.

À tous mes collègues qu'ils soient étudiants, assistants de recherche, agents de recherche, merci d'avoir agrémenteé significativement mon passage aux études supérieures. J'ai vécu de très bons moments avec vous. Les études graduées sont d'autant plus agréables en bonne compagnie.

Finalement, un grand merci à mon conjoint pour son support dans tous les moments incluant évidemment les plus difficiles. Beaucoup de bonheur et de plaisir nous attendent dans la prochaine année. C'est le début euphorique de nouvelles aventures.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abbott, N. J. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat*, 200(6), 629–638.
- Abu Lila, A. S., Kizuki, S., Doi, Y., Suzuki, T., Ishida, T. et Kiwada, H. (2009). Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual-targeting approach in a murine solid tumor model. *J Control Release*, 137(1), 8–14.
- Alata, W., Paris-Robidas, S., Emond, V., Bourasset, F. et Calon, F. (2014). Brain Uptake of a Fluorescent Vector Targeting the Transferrin Receptor: A Novel Application of in Situ Brain Perfusion. *Mol Pharm*, 11(1), 243–253.
- Albert, F. K., Forsting, M., Sartor, K., Adams, H. P. et Kunze, S. (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.
- Al-Sarraf, H., Ghaedi, F. et Redzic, Z. (2007). Time course of hyperosmolar opening of the blood-brain and blood-CSF barriers in spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res*, 44(2), 99-109.
- Armstrong, B. K., Smith, Q., Rapoport, S. I., Strohmalm, J., Kopeček, J. et Duncan, R. (1989). Osmotic opening of the blood-brain barrier permeability to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. Effect of polymer -Mw charge and hydrophobicity. *J Control Release*, 10(1), 27–35.
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., et al. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, 468(7323), 557–561.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L. and Orntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64(15), 5245-5250.
- Aronica, E., Gorter, J.A., Ramkema, M., Redeker, S., Filiz, O.-G., van Vliet, E.A., Scherffer, G.L., et al. (2004). Expression and cellular distribution of multidrug

- resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 45(5), 441-451.
- Aronica, E., Gorter, J. A., Redeker, S., van Vliet, E. A., Ramkema, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., et al. (2005). Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain. *Epilepsia*, 46(6), 849–857.
- Artemov, D. (2003). Molecular magnetic resonance imaging with targeted contrast agents. *J Cell Biochem*, 90(3), 518–524.
- Babakhanian, K., Bendayan, M. et Bendayan, R. (2007). Localization of P-glycoprotein at the nuclear envelope of rat brain cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 361(2), 301–306.
- Bai, C. Z., Choi, S., Nam, K., An, S. et Park, J.-S. (2013). Arginine modified PAMAM dendrimer for interferon beta gene delivery to malignant glioma. *Int J Pharm*, 445(1-2), 79–87.
- Ballabh, P., Braun, A. et Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier : an overview : structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, 16(1), 1-13.
- Bart, J., Dijkers, E. C. F., Wegman, T. D., de Vries, E. G. E., van der Graaf, W. T. A., Groen, H. J. M., Vaalburg, W., et al. (2005). New positron emission tomography tracer [(11)C]carvedilol reveals P-glycoprotein modulation kinetics. *Br J Pharmacol*, 145(8), 1045–1051.
- Bauer, M., Zeitlinger, M., Karch, R., Matzneller, P., Stanek, J., Jäger, W., Böhmendorfer, M., et al. (2012). Pgp-mediated interaction between (R)-[11C]verapamil and tariquidar at the human blood-brain barrier: a comparison with rat data. *Clin Pharmacol Ther*, 91(2), 227–233.
- Baumbach, G. L., Mayhan, W. G. et Heistad, D. D. (1986). Protection of the blood-brain barrier by hypercapnia during acute hypertension. *Am J Physiol*, 251(2 Pt 2), H282-H287.
- Beck, D. W., Hart, M. N. et Hansen, K. E. (1984). Effect of intracarotid hyperosmolar mannitol on cerebral cortical arterioles—a morphometric study. *Stroke*, 15(1), 134-136.
- Begley, D. J., Lechardeur, D., Chen, Z. D., Rollinson, C., Bardoul, M., Roux, F., Scherman, D., et al. (1996). Functional expression of P-glycoprotein in an immortalised cell line

- of rat brain endothelial cells, RBE4. *J Neurochem*, 67(3), 988–995.
- Bélanger, S., Bovenzi, V., Côté, J., Neugebauer, W., Amblard, M., Martinez, J., Lammek, B., et al. (2009). Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor. *Peptides*, 30(4), 777–787.
- Bellail, A. C., Hunter, S. B., Brat, D. J., Tan, C. et van Meir, E. G. (2004) Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(6), 1046-1069.
- Bellavance, M.-A., Blanchette, M. et Fortin, D. (2008). Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. *AAPS J*, 10(1), 166-177.
- Bhattacharjee, A. K., Nagashima, T., Kondoh, T. et Tamaki, N. (2001a). The effects of the Na(+)/Ca(++) exchange blocker on osmotic blood-brain barrier disruption. *Brain Res*, 900(2), 157–162.
- Bhattacharjee, A. K., Nagashima, T., Kondoh, T. et Tamaki, N. (2001 b). Quantification of early blood-brain barrier disruption by in situ brain perfusion technique. *Brain Res Brain Res Protoc*, 8(2), 126–131.
- Bie, L., Zhao, G., Cheng, P., Rondeau, G., Porwollik, S., Ju, Y., Xia, X.-Q., et al. (2011). The accuracy of survival time prediction for patients with glioma is improved by measuring mitotic spindle checkpoint gene expression. *PLoS ONE*, 6(10), e25631.
- Bien-Ly, N., Yu, Y. J., Bumbaca, D., Elstrott, J., Boswell, C. A., Zhang, Y., Luk, W., et al. (2014). Transferrin receptor (TfR) trafficking determines brain uptake of TfR antibody affinity variants. *J Exp Med*, 211(2), 233–244.
- Blanchard, J., Mathieu, D., Patenaude, Y. et Fortin, D. (2006). MR-pathological comparison in F98-Fischer glioma model using a human gantry. *Can J Neurol*, 33(1), 86–91.
- Blanchette, M. et Fortin, D. (2011). Blood-brain barrier disruption in the treatment of brain tumors. *Methods Mol Biol*, 686, 447–463.
- Blanchette, M., Michaud, K. et Fortin, D. (2012). A new method of quantitatively assessing the opening of the blood-brain barrier in murine animal models. *J Neurosci Methods*, 207(2), 125–129.
- Blanchette, M., Pellerin, M., Tremblay, L., Lepage, M. et Fortin, D. (2009). Real-time monitoring of gadolinium diethylenetriamine penta-acetic acid during osmotic blood-

- brain barrier disruption using magnetic resonance imaging in normal wistar rats. *Neurosurgery*, 65(2), 344–50.
- Blasberg, R. G. et Groothuis, D. R. (1986). Chemotherapy of brain tumors: physiological and pharmacokinetic considerations. *Semin Oncol*, 13(1), 70–82.
- Blasberg, R. G., Patlak, C. et Fenstermacher, J. D. (1975). Intrathecal chemotherapy: brain tissue profiles after ventriculocisternal perfusion. *J Pharmacol Exp Ther*, 195(1), 73–83.
- Boado, R. J. et Pardridge, W. M. (2011). The Trojan Horse Liposome Technology for Nonviral Gene Transfer across the Blood-Brain Barrier. *J Drug Deliv*, 2011, 296151.
- Boje, K. M. (1996). Inhibition of nitric oxide synthase attenuates blood-brain barrier disruption during experimental meningitis. *Brain Res*, 720(1-2), 75-83.
- Boje, K. M. et Lakhman, S. S. (2000). Nitric oxide redox species exert differential permeability effects on the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*, 293(2), 545-550.
- Bota, D. A., Alexandru, D., Keir, S. T., Bigner, D., Vredenburgh, J. et Friedman, H. S. (2013). Proteasome inhibition with bortezomib induces cell death in GBM stem-like cells and temozolomide-resistant glioma cell lines, but stimulates GBM stem-like cells' VEGF production and angiogenesis. *J Neurosurg*, 119(6), 1415–1423.
- Boyle, F.M., Eller, S.L. et Grossman, S.A. (2004). Penetration of intra-arterially administered vincristine in experimental brain tumor. *Neuro-oncology*, 6(4), 300-305.
- Brandes, A. A., Tosoni, A., Spagnolli, F., Frezza, G., Leonardi, M., Calbucci, F. et Franceschi, E. (2008). Disease progression or pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy treatment: Pitfalls in neurooncology. *Neuro-oncology*, 10(3), 361–367.
- Brasnjevic, I., Steinbusch, H. W. M., Schmitz, C., Martinez-Martinez, P. et European NanoBioPharmaceutics Research Initiative (2009). Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. *Prog Neurobiol*, 87(4), 212–251.
- Brightman, M. W. et Reese, T. S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*, 40(3), 648–677.
- Brown, R. C., Davis, T. P. (2002). Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke*,

- 33(6), 1706-1711.
- Brown, R. C., Egleton, R. D. et Davis, T. P. (2004). Mannitol opening of the blood-brain barrier: regional variation in the permeability of sucrose, but not  $^{86}\text{Rb}^+$  or albumin. *Brain Res*, 1014(1-2), 221–227.
- Bullard, D. E., Bourdon, M. et Bigner, D.D. (1984). Comparison of various methods for delivering radiolabeled monoclonal antibody to normal rat brain. *J Neurosurg*, 61(5), 901-911.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2), 169–193.
- Bustin, S. A., Beaulieu, J.-F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S. B., Olsvik, P. A., Penning, L. C., et al. (2010). MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol*, 11, 74.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4), 611-622.
- Butt, A. M., Jones, H. C. et Abbott, N. J. (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol*, 429, 47–62.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061-1068.
- Cairncross, G. et Jenkins, R. (2008). Gliomas with 1p/19q codeletion: a.k.a. oligodendroglioma. *Cancer J*, 14(6), 352–357.
- Cairncross, G. J., Wang, M., Jenkins, R.B., Shaw, E.G., Giannini, C., Brachman, D.G., Buckner, J.C., Fink, K.L., Souhami, L., Laperriere, N.J., Huse, J.T., Mehta, M.P. et Curran, W.J. (2014). Benefit from procarbazine, lomustine and vincristine in oligodendroglioma is associated with mutation of IDH. *J Clin Oncol*, 32(8), 783-790.
- Calatuzzolo, C., Gelati, M., Ciusani, E., Sciacca, F. L., Pollo, B., Cajola, L., Marras, C., et al. (2005). Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 and GST- $\pi$  in human glioma. *J Neurooncol*, 74(2), 113–121.
- Chang, S. M., Wen, P., Cloughesy, T., Greenberg, H., Schiff, D., Conrad, C., Fink, K., et

- al. (2005). Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Invest New Drugs*, 23(4), 357–361.
- Charest, G., Sanche, L., Fortin, D., Mathieu, D. et Paquette, B. (2013). Optimization of the route of platinum drugs administration to optimize the concomitant treatment with radiotherapy for glioblastoma implanted in the Fischer rat brain. *J Neurooncol*, 115(3), 365–373.
- Chi, O. Z., Chun, T. W., Liu, X. et Weiss, H. R. (1998). The effects of pentobarbital on blood-brain barrier disruption caused by intracarotid injection of hyperosmolar mannitol in rats. *Anesth Analg*, 86(6), 1230-1235.
- Chi, O. Z., Lee, D. I., Liu, X. et Weiss, H. R. (2000). The effects of morphine on blood-brain barrier disruption caused by intracarotid injection of hyperosmolar mannitol in rats. *Anesth Analg*, 90(3), 603-608.
- Chi, O. Z., Liu, X. et Weiss, H. R. (2001). Effects of mild hypothermia on blood-brain barrier disruption during isoflurane or pentobarbital anesthesia. *Anesthesiology*, 95(4), 933-938.
- Coley, H. M. (2010). Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Clinical Studies of P-Glycoprotein Inhibitors. Dans J. Zhou (Éd). *Multi-Drug Resistance in Cancer*. New York: Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, 341-358.
- Côté, J., Bovenzi, V., Savard, M., Dubuc, C., Fortier, A., Neugebauer, W., Tremblay, L., et al. (2012). Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model. *PLoS ONE*, 7(5), e37485.
- Côté, J., Savard, M., Bovenzi, V., Bélanger, S., Morin, J., Neugebauer, W., Larouche, A., et al. (2009). Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides*, 30(4), 788–795.
- Côté, J., Savard, M., Bovenzi, V., Dubuc, C., Tremblay, L., Tsanaclis, A. M., Fortin, D., et al. (2010). Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe(8)psi(CH(2)NH)Arg(9)]-BK in a F98 glioma rat model: an MRI study. *Neuropeptides*, 44(2), 177–185.
- Côté, J., Savard, M., Neugebauer, W., Fortin, D., Lepage, M. et Gobeil, F. (2013). Dual kinin B1 and B2 receptor activation provides enhanced blood-brain barrier

- permeability and anticancer drug delivery into brain tumors. *Cancer Biology & Therapy*, 14(9), 806-811.
- Dandy, W. E. (1928). Removal of right cerebral hemisphere for certain tumors with hemiplegia preliminary report. *JAMA*, 90(11), 823–825.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A. et Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562–566.
- de Boer, A. G. et Gaillard, P. J. (2007). Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 323–355.
- de Kok, J.B., Roelofs, R.W., Giesendorf, B.A., Pennings, J.L., Waas, E.T., Feuth, T., Swinkels, D.W. et al. (2005). Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest*, 85(1), 154-159.
- Dea, N., Fournier-Gosselin, M.-P., Mathieu, D., Goffaux, P. et Fortin, D. (2012). Does extent of resection impact survival in patients bearing glioblastoma? *Can J Neurol Sci*, 39(5), 632–637.
- Dean, M., Hamon, Y. et Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*, 42(7), 1007-1017.
- Deane, B. R. et Lantos, P. L. (1981a). The vasculature of experimental brain tumours. Part 1. A sequential light and electron microscope study of angiogenesis. *J Neurol Sci*, 49(1), 55–66.
- Deane, B. R. et Lantos, P. L. (1981b). The vasculature of experimental brain tumours. Part 2. A quantitative assessment of morphological abnormalities. *J Neurol Sci*, 49(1), 67–77.
- Deli, M. A. (2009). Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *BiochimBiophys Acta*, 1788(4), 892–910.
- Desjardins, A. et Vredenburgh, J. J. (2010). The Basic Science of Avastin (Bevacizumab) Therapy. Dans T. C. Chen et M. Chamberlain (Éds). *Controversies in Neuro-Oncology (Avastin and Malignant Gliomas)*. Bentham Science Publishers. 7-11.
- Di, L., Rong H., et Feng B. (2013) Demystifying brain penetration in central nervous system drug discovery. Miniperspective. *J Med Chem*, 56(1), 2-12.
- Dombrowski, S.M., Desai, S.Y., Marroni, M., Cucullo, L., Goodrich, K., Bingaman, W.,

- Mayberb, M.R., et al. (2001). Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*, 42(12), 1501-1506.
- Doolittle, N. D., Miner, M. E., Hall, W. A., Siegal, T., Jerome, E., Osztie, E., McAllister, L. D., 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), 637-647.
- Doze, P., Elsinga, P. H., Maas, B., van Waarde, A., Wegman, T. et Vaalburg, W. (2002). Synthesis and evaluation of radiolabeled antagonists for imaging of beta-adrenoreceptors in the brain with PET. *Neurochem Int*, 40(2), 145-155.
- Drappatz, J., Brenner, A., Wong, E. T., Eichler, A., Schiff, D., Groves, M. D., Mikkelsen, T., et al. (2013). Phase I study of GRN1005 in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res*, 19(6), 1567-1576.
- Dydensborg, A.B., Herring, E., Auclair, J., Tremblay, E. et Beaulieu, J.-F. (2006). Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(5), G1067-G1074.
- Elsinga, P. H., Hendrikse, N. H., Bart, J., Vaalburg, W. et van Waarde, A. (2004). PET studies on P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS. *Curr Pharm Des*, 10(13), 1493-1503.
- Elsinga, P. H., Hendrikse, N. H., Bart, J., van Waarde, A. et Vaalburg, W. (2005). Positron emission tomography studies on binding of central nervous system drugs and P-glycoprotein function in the rodent brain. *Mol Imaging Biol*, 7(1), 37-44.
- Ertel, A., Verghese, A., Byers, S.W., Ochs, M. et Tozeren, A. (2006). Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Mol Cancer*, 5(5), 1-13.
- Euser, A. G., Bullinger, L. et Cipolla, M. J. (2008) Magnesium sulphate treatment decreases blood-brain barrier permeability during acute hypertension in pregnant rats. *Exp Physiol*, 93(2), 254-261.
- Fang, J., Nakamura, H. et Maeda, H. (2011). The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(3), 136-151.

- Feldmann, M., Asselin, M.-C., Liu, J., Wang, S., McMahon, A., Anton-Rodriguez, J., Walker, M. et al. (2013). P-glycoprotein expression and function in patients with temporal lobe epilepsy: a case-control study. *Lancet Neurol*, *12*(8), 777-785.
- Figarella-Branger, D., Maues de Paula, A., Colin, C. et Bouvier, C. (2011). Histomolecular classification of adult diffuse gliomas: the diagnostic value of immunohistochemical markers. *Rev Neurol*, *167*(10), 683–690.
- Fillmore, H. L., VanMeter, T. E. et Broaddus, W. C. (2001). Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J Neurooncol*, *53*(2), 187-202.
- Fortin, D., Adams, R. et Gallez, A. (2004). A blood-brain barrier disruption model eliminating the hemodynamic effect of ketamine. *Can J Neurol*, *31*(2), 248–253.
- Fortin, D., Desjardins, A., Benko, A., Niyonsega, T. et Boudrias, M. (2005). Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in malignant brain tumors: the Sherbrooke experience. *Cancer*, *103*(12), 2606–2615.
- Fortin, D., Gendron, C., Boudrias, M. et Garant, M.-P. (2007). Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in the treatment of cerebral metastasis. *Cancer*, *109*(4), 751–760.
- Fortin, D., McCormick, C. I., Rensen, L. G., Nixon, R. et Neuwelt, E. A. (2000). Unexpected neurotoxicity of etoposide phosphate administered in combination with other chemotherapeutic agents after blood-brain barrier modification to enhance delivery, using propofol for general anesthesia, in a rat model. *Neurosurgery*, *47*(1), 199–207.
- Fossdal, G., Vik-Mo, E. O., Sandberg, C., Varghese, M., Kaarbø, M., Telmo, E., Langmoen, I. A., et al. (2012). Aqp 9 and brain tumour stem cells. *Scientific World Journal*, *2012*, 915176.
- Fu, L.-Y., Jia, H.-L., Dong, Q.-Z., Wu, J.-C., Zhao, Y., Zhou, H.-J., Ren, N. et al. (2009). Suitable reference genes for real-time PCR in human HBV-related hepatocellular carcinoma with different clinical prognoses. *BMC Cancer*, *9*(49), 1-11.
- Germano, I., Swiss, V. et Casaccia, P. (2010). Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: where is the link? *Neuropharmacology*, *58*(6), 903–910.
- Giese, A., Kluwe, L., Laube, B., Meissner, H., Berens, M. E. et Westphal, M. (1996).

- Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery*, 38(4), 755-764.
- Giese, A., Loo, M. A., Rief, M. D., Tran, N. et Berens, M.E. (1995). Substrates for astrocytoma invasion. *Neurosurgery*, 37(2), 294-301.
- Giese, A., Rief, M. D., Loo, M. A. et Berens, M. E. (1994). Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Res*, 54(14), 3897-3904.
- Giese, A. et Westphal, M. (1996). Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery*, 39(2), 235–50; discussion 250–2.
- Gillet, J.-P., Efferth, T., Steinbach, D., Hamels, J., de Longueville, F., Bertholet, V. et Remacle, J. (2004). Microarray-based detection of multidrug resistance in human tumor cells by expression profiling of ATP-binding cassette transporter genes. *Cancer Res*, 64(24), 8987–8993.
- Gillet, J.-P., Calcagno, A.M., Varma, S., Marino, M., Green, L.J., Vora, M.I., Patel, C., Orina, J.N., Eliseeva, T.A., Singal, V., Padmanabhan, R., Davidson, B., Ganapathi, R., Sood, A.K., Rueda, B.R., Ambudkar, S.V. et Gottesman, M.M. (2011). Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *PNAS*, 108(46), 18708-18713.
- Glare, E. M., Divjak, M., Bailey, M. J. et Walters, E. H. (2002). beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*, 57(9), 765–770.
- Goldbrunner, R. H., Wagner, S., Roosen, K. et Tonn, J. C. (2000). Models for assessment of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol*, 50(1-2), 53–62.
- Gong, W., Wang, Z., Liu, N., Lin, W., Wang, X., Xu, D., Liu, H., et al. (2011). Improving efficiency of adriamycin crossing blood brain barrier by combination of thermosensitive liposomes and hyperthermia. *Biol Pharm Bull*, 34(7), 1058–1064.
- Greig, N. H., Soncrant, T. T., Shetty, H. U., Momma, S., Smith, Q. R. et Rapoport, S. I. (1990). Brain uptake and anticancer activities of vincristine and vinblastine are restricted by their low cerebrovascular permeability and binding to plasma constituents in rat. *Cancer Chemother Pharmacol*, 26(4), 263-268.
- Groothuis, D. R., Fischer, J. M., Pasternak, J. F., Blasberg, R. G., Vick, N. A. et Bigner, D. D. (1983). Regional measurements of blood-to-tissue transport in experimental RG-2 rat gliomas. *Cancer Res*, 43(7), 3368–3373.

- Groothuis, D. R., Fischer, J. M., Vick, N. A. et Bigner, D. D. (1981). Comparative permeability of different glioma models to horseradish peroxidase. *Cancer Treat Rep*, 65 Suppl 2, 13–18.
- Gumerlock, M. K. et Neuwelt, E.A. (1990). The effects of anesthesia on osmotic blood-brain barrier disruption. *Neurosurgery*, 26(2), 268-277.
- Hallani, el, S., Boisselier, B., Peglion, F., Rousseau, A., Colin, C., Idbaih, A., Marie, Y., et al. (2010). A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain*, 133(Pt 4), 973–982.
- Haluska, M. et Anthony, M. L. (2004). Osmotic blood-brain barrier modification for the treatment of malignant brain tumors. *Clin J Oncol Nurs*, 8(3), 263-267.
- Haqqani, A. S., Caram-Salas, N., Ding, W., Brunette, E., Delaney, C. E., Baumann, E., Boileau, E., et al. (2013). Multiplexed evaluation of serum and CSF pharmacokinetics of brain-targeting single-domain antibodies using a NanoLC-SRM-ILIS method. *Mol Pharm*, 10(5), 1542–1556.
- Hardee, M. E. et Zagzag, D. (2012). Mechanims of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol*, 181(4), 1126-1141.
- Hartz, A. M. S., Bauer, B., Fricker, G. et Miller, D. S. (2004). Rapid regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier by endothelin-1. *Mol Pharmacol*, 66(3), 387–394.
- Hartz, A. M. S., Mahringer, A., Miller, D. S. et Bauer, B. (2010). 17- $\beta$ -Estradiol: a powerful modulator of blood–brain barrier BCRP activity. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(10), 1742–1755.
- Hau, P., Fabel, K., Baumgart, U., Rümmele, P., Grauer, O., Bock, A., Dietmaier, C., et al. (2004). Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma. *Cancer*, 100(6), 1199–1207.
- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J. et Yamamoto, H. (1997). Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia*, 19(1), 13–26.
- Hicks, J.T., Albrecht, P. et Rapoport, S.I. (1976). Entry of neutralizing antibody to measles into brain and cerebrospinal fluid of immunized monkeys after osmotic opening of the blood-brain barrier. *Exp Neurol*, 53(3), 768-779.

- Hirano, A. et Matsui, T. (1975). Vascular structures in brain tumors. *Hum Pathol*, 6(5), 611–621.
- Hofman F. M. et Chen, T. C. (2010). The Basic Science of Avastin (Bevacizumab) Therapy. Dans T. C. Chen et M. Chamberlain (Éds). *Controversies in Neuro-Oncology (Avastin and Malignant Gliomas)*. Bentham Science Publishers. 1-6.
- Hoffmeyer, S., Burk, O., Richter, von, O., Arnold, H. P., Brockmüller, J., Johne, A., Cascorbi, I., et al. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *PNAS*, 97(7), 3473–3478.
- Horinouchi, M., Sakaeda, T., Nakamura, T., Morita, Y., Tamura, T., Aoyama, N., Kasuga, M., et al. (2002). Significant genetic linkage of MDR1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin. *Pharm Res*, 19(10), 1581–1585.
- Hsieh, C.-H., Chen, Y.-F., Chen, F.-D., Hwang, J.-J., Chen, J.-C., Liu, R.-S., Kai, J.-J., et al. (2005). 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(11), 1858–1865.
- Huth, A., Vennemann, B., Fracasso, T., Lutz-Bonengel, S. et Vennemann, M. (2013). Apparent versus true gene expression changes of three hypoxia-related genes in autopsy derived tissue and the importance of normalisation. *Int J Legal Med*, 127(2), 335–344.
- Hynynen, K., McDannold, N., Sheikov, N. A., Jolesz, F. A. et Vykhodtseva, N. (2005). Local and reversible blood-brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications. *NeuroImage*, 24(1), 12–20.
- Hynynen, K., McDannold, N., Vykhodtseva, N. et Jolesz, F. A. (2001). Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiology*, 220(3), 640–646.
- Hynynen, K., Vykhodtseva, N. I., Chung, A. H., Sorrentino, V., Colucci, V. et Jolesz, F. A. (1997). Thermal effects of focused ultrasound on the brain: determination with MR imaging. *Radiology*, 204(1), 247–253.
- Idbaih, A. (2011). [OMICS and biomarkers of glial tumors]. *Rev Neurol*, 167(10), 691–698.

- Imai, Y., Nakane, M., Kage, K., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Miki, Y., et al. (2002). C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther*, 1(8), 611–616.
- Inamura, T., Nomura, T., Bartus, R. T. et Black, K. L. (1994). Intracarotid infusion of RMP-7, a bradykinin analog: a method for selective drug delivery to brain tumors. *J Neurosurg*, 81(5), 752–758.
- Jackman, D.M., Miller, V.A., Cioffredi, L.-A., Yeap, B.Y., Jänne, P.A., Riely, G.J., Ruiz, G., Giaccone, G., Sequist, L.V. et Johnson, B.E. (2009). Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials. *Clin Cancer Res*, 15(16), 5267-5273.
- Janzer, R. C. et Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325(6101), 253–257.
- Jin, F., Zhao, L., Guo, Y.-J., Zhao, W.-J., Zhang, H., Wang, H.-T., Shao, T., et al. (2010). Influence of Etoposide on anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes in CD133 positive U251 glioblastoma stem-like cells. *Brain Res*, 1336, 103–111.
- Jonsson, O., Behnam-Motlagh, P., Persson, M., Henriksson, R. et Grankvist, K. (1999). Increase in doxorubicin cytotoxicity by carvedilol inhibition of P-glycoprotein activity. *Biochem Pharmacol*, 58(11), 1801-1806.
- Joshi, S., Ergin, A., Wang, M., Reif, R., Zhang, J., Bruce, J. N. et Bigio, I. J. (2010). Inconsistent blood brain barrier disruption by intraarterial mannitol in rabbits: implications for chemotherapy. *J Neurooncol*, 104(1), 11–19.
- Juliano, R. L. et Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, 455(1), 152–162.
- Jung, M., Ramankulov, A., Roigas, J., Johannsen, M., Ringsdorf, M., Kristiansen, G. et Jung, K. (2007). In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 8(47), 1-13.
- Kalayci, R., Kaya, M., Ahishali, B., Arican, N., Elmas, I. et Kucuk, M. (2006). Long-term L-NAME treatment potentiates the blood-brain barrier disruption during pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Life Sci*, 79(1), 16-20.

- Kannan, P., Brimacombe, K. R., Kreisl, W. C., Liow, J.-S., Zoghbi, S. S., Telu, S., Zhang, Y., et al. (2011). Lysosomal trapping of a radiolabeled substrate of P-glycoprotein as a mechanism for signal amplification in PET. *PNAS*, *108*(6), 2593–2598.
- Kaya, M., Gulturk, S., Elmas, I., Kalayci, R., Arican, N., Kocyildiz, Z. C., Kucuk, M., et al. (2004). The effects of magnesium sulfate on blood-brain barrier disruption caused by intracarotid injection of hyperosmolar mannitol in rats. *Life Sci*, *76*(2), 201–212.
- Kessler, R. M., Goble, J. C., Bird, J. H., Girton, M. E., Doppman, J. L., Rapoport, S. I. et Barranger, J. A. (1984). Measurement of blood-brain barrier permeability with positron emission tomography and [68Ga]EDTA. *J Cereb Blood Flow Metab*, *4*(3), 323–328.
- Kim, R. B., Leake, B. F., Choo, E. F., Dresser, G. K., Kubba, S. V., Schwarz, U. I., Taylor, A., et al. (2001). Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*, *70*(2), 189–199.
- Kroll, R. A. et Neuwelt, E. A. (1998). Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery*, *42*(5), 1083–99; discussion 1099–100.
- Kuan, C.-T., Srivastava, N., McLendon, R. E., Marasco, W. A., Zalutsky, M. R. et Bigner, D. D. (2010). Recombinant single-chain variable fragment antibodies against extracellular epitopes of human multidrug resistance protein MRP3 for targeting malignant gliomas. *Int J Cancer*, *127*(3), 598–611.
- Kurzrock, R., Gabrail, N., Chandhasin, C., Moulder, S., Smith, C., Brenner, A., Sankhala, K., et al. (2012). Safety, pharmacokinetics, and activity of GRN1005, a novel conjugate of angiopep-2, a peptide facilitating brain penetration, and paclitaxel, in patients with advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther*, *11*(2), 308–316.
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F. F., et al. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*, *95*(2), 190–198.
- Lamborn, K.R., Chang, S.M. and Prados, M.D. (2004). Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro-oncology*, *6*(3), 227–235.
- Landis, C. S., Li, X., Telang, F. W., Coderre, J. A., Micca, P. L., Rooney, W. D., Latour, L. L., et al. (2000). Determination of the MRI contrast agent concentration time course in

- vivo following bolus injection: effect of equilibrium transcytolemmal water exchange. *Magn Reson Med*, 44(4), 563–574.
- Law, M., Yang, S., Wang, H., Babb, J. S., Johnson, G., Cha, S., Knopp, E. A. et Zagzag, D. (2003). Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*, 24(10), 1989-1998.
- Lee, C. H. (2010). Reversing Agents for ATP-Binding Cassette Drug Transporters. Dans J. Zhou (Éd). *Multi-Drug Resistance in Cancer*. New York: Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, 325-340.
- Lee, G., Babakhanian, K., Ramaswamy, M., Prat, A., Wosik, K. et Bendayan, R. (2007). Expression of the ATP-binding cassette membrane transporter, ABCG2, in human and rodent brain microvessel endothelial and glial cell culture systems. *Pharm Res*, 24(7), 1262–1274.
- Létourneau, I. J., Deeley, R. G. et Cole, S. P. C. (2005). Functional characterization of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the gene encoding human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pharmacogenet Genomics*, 15(9), 647–657.
- Lindner, L. H., Reinl, H. M., Schlemmer, M., Stahl, R. et Peller, M. (2005). Paramagnetic thermosensitive liposomes for MR-thermometry. *I J Hyperthermia*, 21(6), 575–588.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., Lu, L., et al. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5, 67.
- Lockman, P. R., Mittapalli, R. K., Taskar, K. S., Rudraraju, V., Gril, B., Bohn, K. A., Adkins, C. E., et al. (2010). Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clin Cancer Res*, 16(23), 5664–5678.
- Long, D. M. (1970). Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors. *J Neurosurg*, 32(2), 127–144.
- Löscher, W. et Postchka, H. (2005). Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx*, 2(1), 86-98.
- Macnealy, M. W. C., Newton, H. B., McGregor, J. M., Bell, S. D., Chaudhury, A. R., Slone, H. W. et Bourekas, E. C. (2008). Primary meningeal CNS lymphoma treated

- with intra-arterial chemotherapy and blood-brain barrier disruption. *J Neurooncol*, 90(3), 329-333.
- Marquet, F., Teichert, T., Wu, S.-Y., Tung, Y.-S., Downs, M., Wang, S., Chen, C., et al. (2014). Real-Time, Transcranial Monitoring of Safe Blood-Brain Barrier Opening in Non-Human Primates. *PLoS ONE*, 9(2), e84310.
- Mathieu, D. et Fortin, D. (2006). The role of chemotherapy in the treatment of malignant astrocytomas. *Can J Neurol Sci*, 33(2), 127–140.
- Mathieu, D., Lamarche, J.B. et Fortin, D. (2005). The Importance of a Syngeneic Glioma Implantation Model: Comparison of the F98 Cell Line in Fischer and Long-Evans Rats. *The Journal of Applied Research*, 5(1), 17–25.
- Mathieu, D., Lecomte, R., Tsanaclis, A. M., Larouche, A. et Fortin, D. (2007). Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can J Neurol Sci*, 34(3), 296–306.
- Matsukado, Y., MacCarty, C.S. et Kernohan J.W. (1961). The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice. *J Neurosurg*, 18(5), 636-644.
- Mayas, M. D., Ramírez-Expósito, M. J., Carrera, M. P., Cobo, M. et Martínez-Martos, J. M. (2012). Renin-angiotensin system-regulating aminopeptidases in tumor growth of rat C6 gliomas implanted at the subcutaneous region. *Anticancer Res*, 32(9), 3675–3682.
- McAllister, L.D., Doolittle, N.D., Guastadisegni, P.E., Kraemer, D.F., Lacy, C.A., Crossen, J.R. et Neuwelt E.A. (2000). Cognitive outcomes and long-term follow-up results after enhanced chemotherapy delivery for primary central nervous system lymphoma. *Neurosurgery*, 46(1), 51-60.
- McMillan, K.M., Ehtesham, M., Stevenson, C. B., Edgeworth, M.L., Thompson, R.C. and Price, R.R. (2009). T2 detection of tumor invasion within segmented components of glioblastoma multiforme. *J Magn Reson Imaging*, 29(2), 251-257.
- Mellinghoff, I. K., Wang, M. Y., Vivanco, I., Haas-Kogan, D. A., Zhu, S., Dia, E. Q., Lu, K. V., et al. (2005). Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*, 353(19), 2012-2024.
- Miller, D. S., Nobmann, S. N., Gutmann, H., Toeroek, M., Drewe, J. et Fricker, G. (2000).

- Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy. *Mol Pharmacol*, 58(6), 1357–1367.
- Misselwitz, B., Schmitt-Willich, H., Ebert, W., Frenzel, T. et Weinmann, H. J. (2001). Pharmacokinetics of Gadomer-17, a new dendritic magnetic resonance contrast agent. *MAGMA*, 12(2-3), 128–134.
- Morikawa, N., Mori, T., Abe, T., Kawashima, H., Takeyama, M. et Hori, S. (1999). Pharmacokinetics of etoposide and carboplatin in cerebrospinal fluid and plasma during hyperosmotic disruption of the blood brain barrier and intraarterial combination chemotherapy. *Biol Pharm Bull*, 22(4), 428–431.
- Motzer, R. J., Mazumdar, M., Bosl, G. J., Bajorin, D. F., Amsterdam, A. et Vlamis, V. (1996). High-dose carboplatin, etoposide, and cyclophosphamide for patients with refractory germ cell tumors: treatment results and prognostic factors for survival and toxicity. *Clin J Oncol Nurs*, 14(4), 1098-1105.
- Muldoon, L. L., Nilaver, G., Kroll, R. A., Pagel, M. A., Breakefield, X. O., Chiocca, E. A., Davidson, B. L., et al. (1995). Comparison of intracerebral inoculation and osmotic blood-brain barrier disruption for delivery of adenovirus, herpesvirus, and iron oxide particles to normal rat brain. *Am J Pathol*, 147(6), 1840–1851.
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimonio, T., Kittel, A., Tanaka, K., et al. (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*, 54(3-4), 253–263.
- Narayana, A., Kunnakkat, S. D., Medabalmi, P., Golfinos, J., Parker, E., Knopp, E., Zagzag, D., Eagan, P., Gruber, D. et Gruber, M. L. (2012). Change in pattern of relapse after antiangiogenic therapy in high-grade glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 82(1), 77-82.
- Neugebauer, G. et Neubert, P. (1991). Metabolism of carvedilol in man. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 16(4), 257-260.
- Neuhoff, S., Langguth, P., Dressler, C., Andersson, T. B., Regårdh, C. G. et Spahn-Langguth, H. (2000). Affinities at the verapamil binding site of MDR1-encoded P-glycoprotein: drugs and analogs, stereoisomers and metabolites. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 38(4), 168-179.
- Neuwelt, E. A., Balaban, E., Diehl, J., Hill, S. et Frenkel, E. (1983a). Successful treatment

- of primary central nervous system lymphomas with chemotherapy after osmotic blood-brain barrier opening. *Neurosurgery*, 12(6), 662–671.
- Neuwelt, E. A., Barnett, P. A. et Frenkel, E. P. (1984). Chemotherapeutic agent permeability to normal brain and delivery to avian sarcoma virus-induced brain tumors in the rodent: observations on problems of drug delivery. *Neurosurgery*, 14(2), 154-160.
- Neuwelt, E. A., Barnett, P. A., Hellström, I., Hellström, K. E., Beaumier, P., McCormick, C. I. et Weigel, R. M. (1988). Delivery of melanoma-associated immunoglobulin monoclonal antibody and Fab fragments to normal brain utilizing osmotic blood-brain barrier disruption. *Cancer Res*, 48(17), 4725–4729.
- Neuwelt, E. A., Barnett, P. A., Ramsey, F. L., Hellström, I., Hellström, K. E. et McCormick, C. I. (1993). Dexamethasone decreases the delivery of tumor-specific monoclonal antibody to both intracerebral and subcutaneous tumor xenografts. *Neurosurgery*, 33(3), 478-84.
- Neuwelt, E. A., Diehl, J. T., Vu, L. H., Hill, S. A., Michael, A. J. et Frenkel, E. P. (1981). Monitoring of methotrexate delivery in patients with malignant brain tumors after osmotic blood-brain barrier disruption. *Ann Intern Med*, 94(4 pt 1), 449-454.
- Neuwelt, E. A., Frenkel, E. P., Diehl, J. T., Maravilla, K. R., Vu, L. H., Clark, W. K., Rapoport, S. I., et al. (1979a). Osmotic blood-brain barrier disruption: a new means of increasing chemotherapeutic agent delivery. *Trans Am Neurol Assoc*, 104, 256–260.
- Neuwelt, E. A., Frenkel, E. P., Rapoport, S. et Barnett, P. (1980). Effect of osmotic blood-brain barrier disruption on methotrexate pharmacokinetics in the dog. *Neurosurgery*, 7(1), 36-43.
- Neuwelt, E. A., Maravilla, K. R., Frenkel, E. P., Rapoport, S. I., Hill, S. A. et Barnett, P. A. (1979b). Osmotic blood-brain barrier disruption. Computerized tomographic monitoring of chemotherapeutic agent delivery. *J Clin Invest*, 64(2), 684–688.
- Neuwelt, E. A., Minna, J., Frenkel, E., Barnett, P. A. et McCormick, C. I. (1986). Osmotic blood-brain barrier opening to IgM monoclonal antibody in the rat. *Am J Physiol*, 250(5 Pt 2), R875–83.
- Neuwelt, E. A., Pagel, M. A. et Dix, R. D. (1991). Delivery of ultraviolet-inactivated 35S-herpesvirus across an osmotically modified blood-brain barrier. *J Neurosurg*, 74(3),

- 475–479.
- Neuwelt, E. A., Specht, H. D., Howieson, J., Haines, J. E., Bennett, M. J., Hill, S. A. et Frenkel, E. P. (1983 b). Osmotic blood-brain barrier modification: clinical documentation by enhanced CT scanning and/or radionuclide brain scanning. *AJR Am J Roentgenol*, 141(4), 829–835.
- Nguyen-minh, C., Haughton, V. M., An, H. S., You, J. W., Wook, S. et Ho, K. C. (1998). Contrast media of high and low molecular weights in the detection of recurrent herniated disks. *AJNR Am J Neuroradiol*, 19(5), 889–893.
- Nilaver, G., Muldoon, L. L., Kroll, R. A., Pagel, M. A., Breakefield, X. O., Davidson, B. L. et Neuwelt, E. A. (1995). Delivery of herpesvirus and adenovirus to nude rat intracerebral tumors after osmotic blood-brain barrier disruption. *PNAS*, 92(21), 9829–9833.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., et al. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, 161(3), 653–660.
- Ohgaki, H. et Kleihues, P. (2011). Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol*, 28(3), 17-183.
- Ohl, F., Jung, M., Xu, C., Stephan, C., Rabien, A., Burkhardt, M., Nitshe, A. et al. (2005) Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization ? *J Mol Med*, 83(12), 1014-1024.
- Ohl, F., Jung, M., Radonic, A., Sachs, M., Loening, S.A. et Jung, K. (2006) Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. *J Urol*, 175(5), 1915-1920.
- Ohtsuki, S., Ikeda, C., Uchida, Y., Sakamoto, U., Miller, F., Glacial, F., Declèves, X., Scherrmann, J. M., Couraud, P.O., Kubo, Y., Tachikawa, M. et Terasaki, T. (2013). Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model. *Mol Pharm*, 10(1), 289-296.
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N. E., et al. (2013). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-oncology*,

- 15(suppl 2), ii1–ii56.
- Pardridge, W. M. (2007a). 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), 1733–1744.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Cheng-HO, J., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321(5897), 1807-1812.
- Percy, D. B., Ribot, E. J., Chen, Y., McFadden, C., Simeanea, C., Steeg, P. S., Chambers, A. F., et al. (2011). In vivo characterization of changing blood-tumor barrier permeability in a mouse model of breast cancer metastasis: a complementary magnetic resonance imaging approach. *Invest Radiol*, 46(11), 718–725.
- Pedersen, P. H., Marienhagen, K., Mørk, S. et Bjerkvig, R. (1993). Migratory pattern of fetal rat brain cells and human glioma cells in the adult rat brain. *Cancer Res*, 53(21), 5158-5165.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. et Neuvians, T.P. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel—based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 26(6), 509-515.
- Prados, M. D., Schold SC JR, S. C., Fine, H. A., Jaeckle, K., Hochberg, F., Mechtler, L., Fetell, M. R., 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.
- Qin, K., Jiang, X., Zou, Y., Wang, J., Qin, L. et Zeng, Y. (2010). Study on the proliferation and drug-resistance of human brain tumor stem-like cells. *Cell Mol Neurobiol*, 30(6), 955-960.
- Rapoport, S. I. (1985). A model for brain edema. *Brain Edema, Proceedings of the Sixth Internation Symposium*, 59-71.
- Rapoport, S. I., Bachman, D. S. et Thompson, H. K. (1972). Chronic effects of osmotic opening of the blood-brain barrier in the monkey. *Science*, 176(40), 1243-1245.
- Rapoport, S. I., Hori, M. et Klatzo, I. (1971). Reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Science*, 173(4001), 1026-1028.

- Rapoport, S. I. et Robinson, P. J. (1986). Tight-junctional modification as the basis of osmotic opening of the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci*, 481, 250–267.
- Rapoport, S. I., Fredericks, W. R., Ohno, K. et Pettigrew, K. D. (1980a). Quantitative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am J Physiol*, 238(5), R421–31.
- Rapoport, S. I., Maravilla, K. R., Frenkel, E.P., Barnett, P., Hill, S. et Moore, R.J. (1980b). Use of enhanced computerized tomography to evaluate osmotic blood-brain barrier disruption. *Neurosurgery*, 6(1), 49-56.
- Rapoport, S. I., Hori, M. et Klatzo, I. (1971). Reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Science*, 173(4001), 1026–1028.
- Rapoport, S. I. et Thompson, H. K. (1973). Osmotic opening of the blood-brain barrier in the monkey without associated neurological deficits. *Science*, 180(89), 971.
- Reardon, D. A., Desjardins, A., Vredenburgh, J. J., Gururangan, S., Friedman, A. H., Herndon, J. E., Marcello, J., et al. (2010). Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*, 96(2), 219–230.
- Reese, T. S. et Karnovsky, M. J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*, 34(1), 207–217.
- Regina, A., Demeule, M., Ché, C., Lavallée, I., Poirier, J., Gabathuler, R., Béliveau, R., et al. (2008). Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br J Pharmacol*, 155(2), 185–197.
- Regina, A., Koman, A., Piciotti, M., Hafny, El, B., Center, M. S., Bergmann, R., Couraud, P. O., et al. (1998). Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem*, 71(2), 705–715.
- Rensen, L. G., Pagel, M. A., McCormick, C. I., Fiamengo, S. A., Sexton, G. et Neuwelt, E. A. (1999). The influence of anesthetic choice, PaCO<sub>2</sub>, and other factors on osmotic blood-brain barrier disruption in rats with brain tumor xenografts. *Anesth Analg*, 88(3), 559–567.
- Rigor, R. R., Hawkins, B. T. et Miller, D. S. (2010). Activation of PKC isoform beta(I) at the blood-brain barrier rapidly decreases P-glycoprotein activity and enhances drug delivery to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(7), 1373–1383.
- Rivest, V., Phivilay, A., Julien, C., Bélanger, S., Tremblay, C., Emond, V. et Calon, F.

- (2007). Novel Liposomal Formulation for Targeted Gene Delivery. *Pharm Res*, 24(5), 981–990.
- Roberts, L. M., Black, D. S., Raman, C., Woodford, K., Zhou, M., Haggerty, J. E., Yan, A. T., et al. (2008). Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience*, 155(2), 423–438.
- Robinson, P. J. et Rapoport, S. I. (1987). Size selectivity of blood-brain barrier permeability at various times after osmotic opening. *Am J Physiol*, 253(3 Pt 2), R459–66.
- Rogers, L. R. (2012). Neurologic complications of radiation. *Continuum*, 18(2), 343–354.
- Roman-Goldstein, S., Clunie, D. A., Stevens, J., Hogan, R., Monard, J., Ramsey, F. et Neuwelt, E. A. (1994). Osmotic blood-brain barrier disruption: CT and radionuclide imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*, 15(3), 581-590.
- Roman-Goldstein, S., Mitchell, P., Crossen, J. R., Williams, P. C., Tindall, A. et Neuwelt, E. A. (1995). MR and cognitive testing of patients undergoing osmotic blood-brain barrier disruption with intraarterial chemotherapy. *AJNR Am J Neuroradiol*, 16(3), 543–553.
- Roux, F., Durieu-Trautmann, O., Chaverot, N., Claire, M., Mailly, P., Bourre, J. M., Strosberg, A. D., et al. (1994). Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol*, 159(1), 101–113.
- Rudà, R., Trevisan, E. et Soffietti, R. (2010). Epilepsy and brain tumors. *Curr Opin Oncol*, 22(6), 611-620.
- Salazar, O. M. et Rubin, P. (1976). The spread of glioblastoma multiforme as a determining factor in the radiation treated volume. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1(7-8), 627-637.
- Sanai, N. et Berger, M. S. (2011). Extent of resection influences outcomes for patients with gliomas. *Rev Neurol*, 167(10), 648–654.
- Sanovich, E., Bartus, R. T., Friden, P. M., Dean, R. L., Le, H. Q. et Brightman, M. W. (1995). Pathway across blood-brain barrier opened by the bradykinin agonist, RMP-7. *Brain Res*, 705(1-2), 125–135.
- Scherer, H. J. (1940). The forms of growth in gliomas and their practical significance.

*Brain*, 63, 1-34.

Scott, J.G., Bauchet, L., Fraum, T.J., Nayak, L., Cooper, A.R., Chao, S.T. et al. (2012).

Recursive partitioning analysis of prognostic factors for glioblastoma patients aged 70 years or older. *Cancer*, 118(22), 5595-5600.

Selvey, S., Thompson, E. W., Matthaei, K., Lea, R. A., Irving, M. G. et Griffiths, L. R.

(2001). Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes*, 15(5), 307-311.

Shaifer, C. A., Huang, J. et Lin, P.C. (2010). Glioblastoma cells incorporate into tumor vasculature and contribute to vascular radioresistance. *Int J Cancer*, 127(9), 2063-2075.

Shang, X., Wang, P., Liu, Y., Zhang, Z. et Xue, Y. (2011) Mechanism of low-frequency ultrasound in opening blood-tumor barrier by tight junction. *J Mol Neurosci*, 43(3), 364-369.

Shapiro, W. R., Green, S. B., Burger, P. C., Selker, R. G., VanGlider, J. C., Robertson, J.

T., Mealey, J., Ransohff, J. et Mahaley, M.S. (1992). A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU, with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma. *J Neurosurg*, 76(5), 772-781.

Shiekov, N., McDannold, N., Sharma, S. et Hynynen, K. (2008). Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. *Ultrasound Med Biol*, 34(7), 1093-1104.

Shi, N. et Pardridge, W. M. (2000). Noninvasive gene targeting to the brain. *PNAS*, 97(13), 7567-7572.

Siegal, T., Rubinstein, R., Bokstein, F., Schwartz, A., Lossos, A., Shalom, E., Chisin, R., 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.

Silver, N., Best, S., Jiang, J. and Thein, S.L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 7(33), 1-9.

Sisodiya, S.M., Lin, W.R., Squier, M.V. et Thom, M. (2001). Multidrug-resistance protein 1 in focal cortical dysplasia. *Lancet*, 357(9249), 42-43.

Soda, Y., Myskiw, C., Rommel, A. et Verma, I. M. (2013). Mechanisms of

- neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme. *J Mol Med*, 91(4), 439-448.
- Soon, D., Tozer, D. J., Altmann, D. R., Tofts, P. S. and Miller, D. H. (2007). Quantification of subtle blood-brain barrier disruption in non-enhancing lesions in multiple sclerosis: a study of disease and lesion subtypes. *Mult Scler*, 13(7), 884-894.
- Spiegel-Kreinecker, S., Buchroithner, J., Elbling, L., Steiner, E., Wurm, G., Bodenteich, A., Fischer, J., et al. (2002). Expression and functional activity of the ABC-transporter proteins P-glycoprotein and multidrug-resistance protein 1 in human brain tumor cells and astrocytes. *J Neurooncol*, 57(1), 27–36.
- Stanisz, G. J. et Henkelman, R. M. (2000). Gd-DTPA relaxivity depends on macromolecular content. *Magn Reson Med*, 44(5), 665–667.
- Staud, F., Ceckova, M., Micuda, S. et Pavek, P. Expression and Function of P-Glycoprotein in Normal Tissues: Effect on Pharmacokinetics. Dans J. Zhou (Éd). *Multi-Drug Resistance in Cancer*. New York: Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, 199-222.
- Straathof, C. S., van den Bent, M. J., Loos, W. J., Vecht, C. J. et Schellens, J. H. (1999). The accumulation of topotecan in 9L glioma and in brain parenchyma with and without dexamethasone administration. *J Neurooncol*, 42(2), 117–122.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10), 987–996.
- Suzuki, T., Higgins, P. J. et Crawford, D. R. (2000). Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques*, 29(2), 332–337.
- Syková, E. et Nicholson, C. (2008). Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev*, 88(4), 1277–1340.
- Szakács, G., Annereau, J.-P., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K. J., Reinhold, W., et al. (2004). Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell*, 6(2), 129–137.
- Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. et Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5(3), 219-234.
- Tamura, K., Aoyagi, M., Wakimoto, H., Ando, N., Narial, T., Yamamoto, M. et Ohno, K.

- (2010). Accumulation of CD133-positive glioma cells after high-dose irradiation by Gamma Knife surgery plus external beam radiation. *J Neurosurg*, *113*(2), 310-318.
- Tanabe, M., Ieiri, I., Nagata, N., Inoue, K., Ito, S., Kanamori, Y., Takahashi, M., et al. (2001). Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther*, *297*(3), 1137–1143.
- Thiessen, B., Stewart, C., Tsao, M., Kamel-Reid, S., Schaiquevich, P., Mason, W., Easaw, J., et al. (2010). A phase I/II trial of GW572016 (lapatinib) in recurrent glioblastoma multiforme: clinical outcomes, pharmacokinetics and molecular correlation. *Cancer Chemother Pharmacol*, *65*(2), 353–361.
- Thorne, R. G. (2004). Diffusion of Epidermal Growth Factor in Rat Brain Extracellular Space Measured by Integrative Optical Imaging. *J Neurophysiol*, *92*(6), 3471–3481.
- Thorne, R. G. et Nicholson, C. (2006). In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *PNAS*, *103*(14), 5567–5572.
- Thorne, R. G., Lakkaraju, A., Rodriguez-Boulan, E. et Nicholson, C. (2008). In vivo diffusion of lactoferrin in brain extracellular space is regulated by interactions with heparan sulfate. *PNAS*, *105*(24), 8416–8421.
- Tian, W., Ying, X., Du, J., Guo, J., Men, Y., Zhang, Y., Li, R.-J., et al. (2010). Enhanced efficacy of functionalized epirubicin liposomes in treating brain glioma-bearing rats. *Eur J Pharm Sci*, *41*(2), 232–243.
- Treat, L. H., McDannold, N., Zhang, Y., Vykhodtseva, N. et Hynynen, K. (2012). Improved anti-tumor effect of liposomal doxorubicin after targeted blood-brain barrier disruption by MRI-guided focused ultrasound in rat glioma. *Ultrasound Med Biol*, *38*(10), 1716–1725.
- Uchida, Y., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Ikeda, C., Suzuki, T., Kamiie, J. et Tetsuya, T. (2011). Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem*, *117*(2), 333-345.
- Ueno, M. (2007). Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features. *Curr Med Chem*, *14*(11), 1199-1206.
- Uhm, J. H., Ballman, K. V., Wu, W., Giannini, C., Krauss, J. C., Buckner, J. C., James, C. D., et al. (2011). Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed

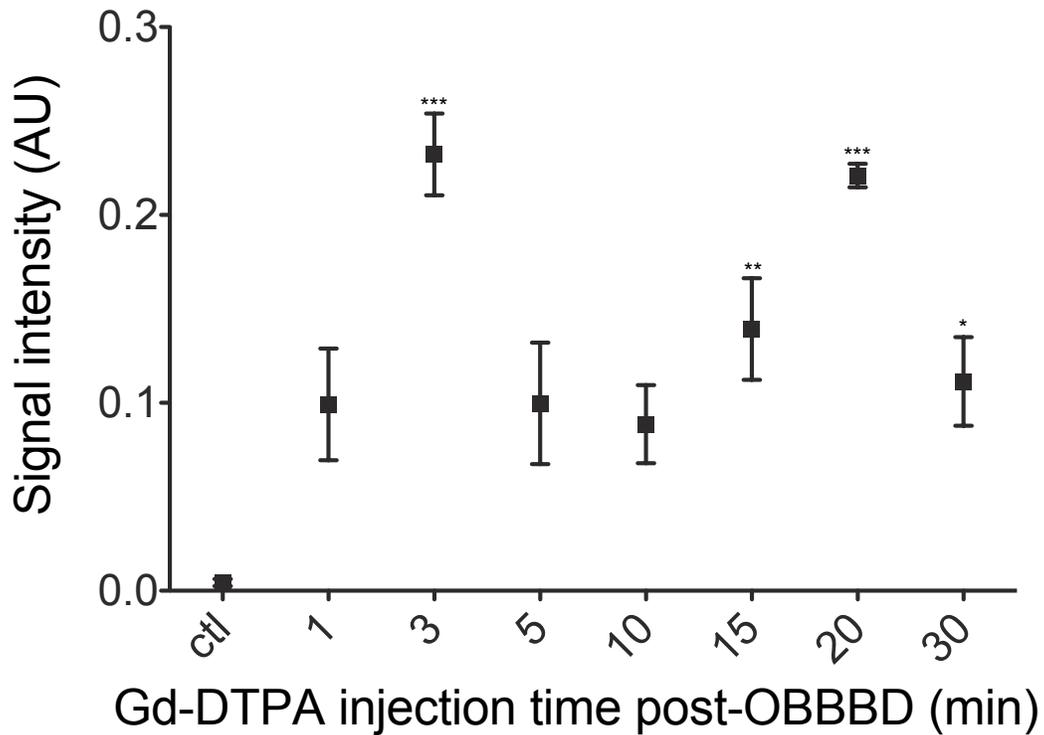
- Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 80(2), 347–353.
- Urich, E., Lazic, S.E., Molnos, J., Wells, I. et Fresgård P.O. (2012). Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. *PLoS ONE*, 7(5), e38149.
- Valente, V., Teixeira, S.A., Neder, L., Okamoto, O.K., Oba-Shinjo, S.M., Marie, S.K.N., Scrideli, C.A. et al. (2009). Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol*, 10(17) 1-11.
- Valera, E. T., Lucio-Eterovic, A. K. B., Neder, L., Scrideli, C. A., Machado, H. R., Carlotti-Junior, C. G., Queiroz, R. G. de P., et al. (2007). Quantitative PCR analysis of the expression profile of genes related to multiple drug resistance in tumors of the central nervous system. *J Neurooncol*, 85(1), 1–10.
- Vallero, S.G., Bertin, D., Basso, M.E., Pittana, L.S., Mussano, A. et Fagioli F. (2014). Diffuse intrinsic pontine glioma in children and adolescents: a single-center experience. *Childs Nerv Syst*, 14 Jan 2014 epub
- van Horssen, J., Brink, B. P., de Vries, H. E., van der Valk, P. et Bø, L. (2007). *J Neuropathol Exp Neurol*, 66(4), 321-328.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K. et Nebert, D.W. (2009). *Hum Genomics*, 3(3), 281-290.
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110.
- Visser, C. C., Stevanović, S., Voorwinden, L. H., van Bloois, L., Gaillard, P. J., Danhof, M., Crommelin, D. J. A., et al. (2005). Targeting liposomes with protein drugs to the blood-brain barrier in vitro. *Eur J Pharm Sci*, 25(2-3), 299–305.
- Vredenburgh, J. J., Desjardins, A., Herndon, J. E., Marcello, J., Reardon, D. A., Quinn, J. A., Rich, J. N., et al. (2007). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*, 25(30), 4722–4729.
- Walker, M. D., Alexander, E., Hunt, W. E., MacCarty, C. S., Mahaley, M. S., Mealey, J., Norrell, H. A., et al. (1978). Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*, 49(3), 333–343.

- Wang, M., Etu, J. et Joshi, S. (2007). Enhanced disruption of the blood brain barrier by intracarotid mannitol injection during transient cerebral hypoperfusion in rabbits. *J Neurosurg Anesthesiol*, 19(4), 249-256.
- Wang, X., Sykes, D. B. et Miller, D. S. (2010). Constitutive androstane receptor-mediated up-regulation of ATP-driven xenobiotic efflux transporters at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol*, 78(3), 376–383.
- Watne, K., Hannisdal, E., Nome, O., Hager, B. et Hirschberg, H. (1992). Combined intra-arterial and systemic chemotherapy for recurrent malignant brain tumors. *Neurosurgery*, 30(2), 223-227.
- Wen, P. Y. et Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359(5), 492–507.
- Wick, W., Meisner, C., Hentschel, B., Platten, M., Schilling, A., Wiestler, B., Sabel, M. C., et al. (2013). Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology*, 81(17), 1515–1522.
- Wolak, D. J. et Thorne, R. G. (2013). Diffusion of Macromolecules in the Brain: Implications for Drug Delivery. *Mol Pharm*, 10(5), 1492–1504.
- Wolburg, H., Noell, S., Fallier-Becker, P., Mack, A. F. et Wolburg-Buchholz, K. (2012). The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma. *Mol Aspects Med*, 33(5-6), 579-589.
- Yamada, K., Hayakawa, T., Ushio, Y., Arita, N., Kato, A. et Mogami, H. (1981). Regional blood flow and capillary permeability in the ethylnitrosourea-induced rat glioma. *J Neurosurg*, 55(6), 922–928.
- Yamashita, T., Ohnishi, T., Nakajima, Y., Terasaki, T., Tanaka, M., Yamashita, J., Sasaki, T., et al. (1993). Uptake of drugs and expression of P-glycoprotein in the rat 9L glioma. *Exp Brain Res*, 95(1), 41–50.
- Yuan, F., Salehi, H. A., Boucher, Y., Vasthare, U. S., Tuma, R. F. et Jain, R. K. (1994). Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer Res*, 54(17), 4564–4568.
- Zhang, W., Mojsilovic-Petrovic, J., Andrade, M. F., Zhang, H., Ball, M. et Stanimirovic, D. B. (2003). The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *The FASEB J*, 17(14), 2085–2087.

- Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., et al. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*, 7(9), 1028–1034.
- Ziylan, Y. Z., Robinson, P. J. et Rapoport, S. I. (1984). Blood-brain barrier permeability to sucrose and dextran after osmotic opening. *Am J Physiol*, 247(4 Pt 2), R634–8.
- Zünkeler, B., Carson, R. E., Olson, J., Blasberg, R. G., DeVroom, H., Lutz, R. J., Saris, S. C., et al. (1996a). Quantification and pharmacokinetics of blood-brain barrier disruption in humans. *J Neurosurg*, 85(6), 1056–1065.
- Zünkeler, B., Carson, R. E., Olson, J., Blasberg, R. G., Girton, M., Bacher, J., Herscovitch, P., et al. (1996 b). Hyperosmolar blood-brain barrier disruption in baboons: an in vivo study using positron emission tomography and rubidium-82. *J Neurosurg*, 84(3), 494–502.
- Zylber-Katz, E., Gomori, J. M., Schwartz, A., Lossos, A., Bokstein, F. et Siegal, T. (2000). Pharmacokinetics of methotrexate in cerebrospinal fluid and serum after osmotic blood-brain barrier disruption in patients with brain lymphoma. *Clin Pharmacol Ther*, 67(6), 631-641.

## ANNEXES

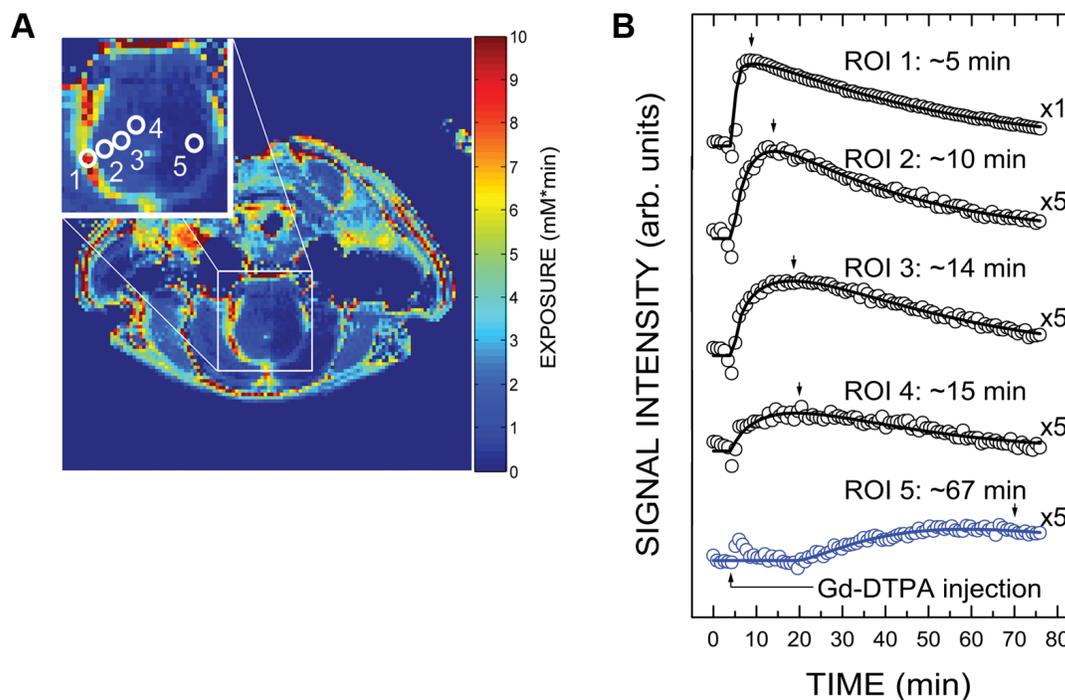
## Annexe 1



**Figure A1. Durée de la perméabilité de la BHE pour le Magnevist suite à une procédure d'OBHE. (Figure tirée de Blanchette *et al.* 2009, avec permission du journal)**

Analyse de l'intensité de signal sur une tranche de cerveau à 15 minutes suite à l'administration de l'agent de contraste. Le Gadolinium-DTPA a été administré à 1, 3, 5, 10, 15, 20 ou 30 minutes suite à l'OBHE. Dans le groupe contrôle, le Gd-DTPA a été administré 3 min suite à l'infusion de la solution saline. L'intensité de signal est significativement différente du contrôle Test T de student,  $P < 0,05$ , \*  $< 0,05$ , \*\*  $< 0,01$ , \*\*\*  $< 0,001$ .

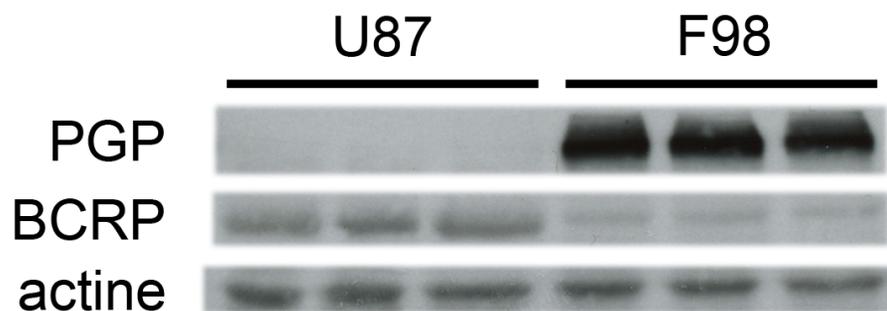
## Annexe 2



**Figure A2. Distribution du Magnevist dans le parenchyme cérébrale suite à une procédure d'OBHE. (Figure tirée de Blanchette *et al.* 2009, avec permission du journal)**

(A) Image IRM pondérée  $T_1$  en code de couleur, l'exposition du Magnevist ( $\text{mM} \cdot \text{min}$ ) a été mesurée pour les 17 premières minutes suite à son administration effectuée 3 min post-OBHE. (B) Courbes d'intensité de signal (unités arbitraires) dans le temps pour chaque région d'intérêt (ROI) illustrée en A. Les courbes des ROIs 2 à 5 ont été multipliées par 5 afin d'être comparables avec la courbe de la ROI 1. Le Magnevist a été administré 3 min post-OBHE. Le délai pour atteindre la concentration maximale de Magnevist dans la ROI est indiqué par une flèche au-dessus de chaque courbe.

## Annexe 3



**Figure A3. Expression de la PGP et de la BCRP dans une lignée humaine (U87) et une lignée murine (F98) de GBM.**

Immunobuvardage contre la PGP et la BCRP effectué sur des lysats totaux des lignées cellulaires U87 et F98. L'actine a été utilisée comme contrôle de chargement.

## Annexe 4

**Tableau A1. Données cliniques et qualité de l'ARN des échantillons ayant servi à identifier les meilleurs gènes de référence ainsi que pour l'étude de l'expression des pompes à efflux pour les études par qPCR de gliomes malins.**

Diagnostic	Âge	Sexe	RIN
sain	78	M	6.25
astro ana	27	F	6.3
sain	61	M	6.30
sain	77	F	6.35
sain	74	M	6.4
sain	70	F	6.45
sain	71	F	6.50
astro ana	36	F	6.6
GBM	75	M	6.7
sain	50	F	6.75
sain	80	M	6.80
sain	79	F	6.8
sain	80	F	6.85
GBM	73	F	7
oligoastro	42	F	7
astro	41	F	7.1
GBM	74	F	7.1
sain	88	M	7.15
GBM	54	M	7.2
GBM	43	M	7.3
astro ana	28	F	7.4
GBM	70	M	7.4
oligoastro ana	78	M	7.5
GBM	74	M	7.6
GBM	51	M	7.6
oligo	58	M	7.7
oligo ana	51	M	7.7
oligoastro	38	F	7.7
GBM	58	M	7.8
GBM	71	M	7.8
GBM	65	M	7.9

Diagnostic	Âge	Sexe	RIN
GBM	74	M	7.9
astro ana	60	F	8
GBM	76	M	8
GBM	59	F	8
oligo ana	44	F	8
astro ana	46	M	8.1
oligoastro	26	F	8.1
GBM	48	F	8.2
GBM	35	F	8.30
GBM	48	F	8.3
GBM	64	M	8.3
GBM	62	M	8.3
GBM	33	M	8.3
GBM	55	M	8.3
oligo ana	38	M	8.3
oligoastro ana	45	F	8.3
astro ana	30	M	8.4
GBM	61	F	8.4
GBM	23	M	8.4
GBM	65	M	8.5
GBM	58	F	8.5
oligo ana	52	M	8.5
oligo ana	35	M	8.5
GBM	56	M	8.6
oligoastro ana	30	F	8.6
oligoastro ana	32	M	8.6
GBM	83	F	8.70
astro ana	43	M	8.8
GBM	60	M	8.8
GBM	63	F	8.8
GBM	61	F	8.8

Diagnostic	Âge	Sexe	RIN
GBM	56	M	8.8
GBM	29	F	8.8
GBM	31	M	8.8
oligo ana	30	M	8.8
oligo ana	61	M	8.8
oligoastro ana	57	M	8.8
GBM	54	F	8.9
GBM	65	F	8.9
GBM	72	M	9
GBM	64	M	9
GBM	44	M	9
GBM	52	F	9
GBM	49	M	9
GBM	33	H	9
oligo ana	41	F	9
astro ana	33	F	9.1
GBM	60	M	9.10
GBM	28	F	9.1
GBM	53	M	9.1
GBM	71	F	9.1
GBM	57	F	9.1
GBM	79	M	9.1
GBM	53	M	9.1
GBM	60	F	9.1
GBM	70	F	9.1
GBM	59	M	9.10

Diagnostic	Âge	Sexe	RIN
oligoastro ana	45	M	9.1
oligoastro ana	32	M	9.1
GBM	49	F	9.15
GBM	42	F	9.2
GBM	50	M	9.2
GBM	30	M	9.2
GBM	53	F	9.3
GBM	55	F	9.3
GBM	69	M	9.3
GBM	51	M	9.4
oligo	31	F	9.4
GBM	61	M	9.5
GBM	59	M	9.5
GBM	48	F	9.5
GBM	58	F	9.5
GBM	81	F	9.5
GBM	55	M	9.5
GBM	50	F	9.5
GBM	58	M	9.5
oligo ana	47	F	9.5
oligoastro ana	36	M	9.5
GBM	52	F	9.55
GBM	55	F	9.6
GBM	74	M	9.6
GBM	66	M	9.6
GBM	63	F	9.6

Abréviations :

astro : astrocytome de bas grade, astro ana : astrocytome anaplasique, oligo : oligodendrogliome, oligo ana : oligodendrogliome anaplasique, oligo-astro : oligoastrocytome, oligoastro ana : oligoastrocytome anaplasique, GBM : glioblastome multiforme

## Annexe 5

Tableau A2. Données cliniques des échantillons étudiés en immunohistochimie.

Diagnostic	Âge	Sexe
GBM	66	M
GBM	76	M
GBM	73	M
GBM	49	M
GBM avec composante oligodendrogliale	75	M
GBM	59	M
GBM avec composante petites cellules	69	M
GBM	61	M
GBM multifocal	55	M
GBM	70	F