

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ECOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : Biologie-Biophysique

présentée et soutenue publiquement

par

Hadrien D'INCA

le 26 janvier 2015

Titre :

Microsphères d'embolisation chargées en doxorubicine : Apports des microspectroscopies optiques pour étudier l'influence de la taille et de la concentration chargée sur les propriétés d'élution et les effets tissulaires

JURY

Pr Michel MANFAIT Pr Gérard THIÉFIN Pr Arlette BAILLET-GUFFROY Pr Marc SAPOVAL Dr Alexandre LAURENT Dr Philippe REB Dr Julien NAMUR Directeur de thèse Président du jury Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Examinateur

« Expérimenter, c'est imaginer. »

Friedrich Wilhelm Nietzsche

Remerciements

À Madame le professeur Arlette Baillet-Guffroy

Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, je vous remercie pour votre participation au jury de soutenance et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

À Monsieur le professeur Marc Sapoval

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et d'en être rapporteur. Je vous remercie pour votre participation au jury de soutenance et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

À Monsieur le professeur Gérard Thiéfin

Je vous remercie de faire partie de mon jury de thèse et également de l'intérêt que vous portez à mon travail. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir emmené vers le côté clinique de la chimioembolisation.

À Monsieur le docteur Philippe Reb

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de faire partie du jury de soutenance. Je vous remercie également pour votre contribution à l'élaboration de ce travail.

À Monsieur le professeur Michel Manfait

Je vous remercie sincèrement pour m'avoir accueilli et pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de votre unité. Je vous exprime également toute ma gratitude pour m'avoir encadré pendant ces 3 années de doctorat et pour m'avoir donné l'occasion de présenter mon travail dans des congrès nationaux et internationaux.

À Monsieur le docteur Alexandre Laurent

Je vous suis sincèrement reconnaissant d'avoir participé à l'élaboration de ce travail de thèse. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée pendant ces six années et pour avoir cru en mes capacités tout au long de ce travail. Je vous remercie pour vos conseils stimulants et la gentillesse que vous avez manifestée à mon égard. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je tiens également à remercier

Le professeur Olivier Piot, directeur de l'unité, et le professeur Ganesh Sockalingum pour vos multiples conseils méthodologiques et votre disponibilité pour discuter des problèmes rencontrés ou des axes de développement à suivre.

Valérie Untereiner pour les bons moments passés dans notre bureau, les échanges constructifs sur le plan professionnel, ta disponibilité et ton aide pour surmonter les obstacles rencontrés lors de la thèse.

Les médecins d'hépato-gastro-entérologie, les chirurgiens de chirurgie digestive et les radiologues du CHU de Reims qui m'ont donné la possibilité de travailler sur des prélèvements chez l'homme. Le professeur Diebold et son équipe pour m'avoir fournit les coupes tissulaires.

Julien Namur pour toutes les connaissances que tu m'as apportées pendant ma thèse, pour ton soutien et tes encouragements ainsi que pour ta rigueur scientifique dans les échanges multiples que nous avons eus. Je te remercie également pour les bons moments passés ensemble sur Reims quand, à cette époque, tu étais à ma place de doctorant.

L'équipe d'ArchimMed et plus particulièrement : le docteur Michel Wassef pour l'intérêt que vous portez à mon travail et votre implication dans ce projet ; Saida Homayra Ghegediban pour ton soutien, ton aide et ton œil expert en VX2 ; Florentina Pascale pour tes enseignements sur la pratique de la chimioembolisation chez l'animal et ta gentillesse ; Philippe Auclair pour votre soutien et votre implication matériel dans ce travail.

La fine équipe du laboratoire, qui est (était pour certains) une source intarissable de « joie et de bonne humeur », composée d'Adrian, David, Elodie, Caroline, Georges, Jaya, Goutam, Imane, Marie, Mathilde, The Thuong, Vincent, Christophe, Mickaël, Qwe, Nathalie, Mohammed, Jo et Math. Merci également pour les bons moments passés en dehors de la fac, la découverte de l'escalade et de la slackline et pleins d'autres souvenirs inoubliables. Mes plus fervents supporters Aurélie Lecellier et Teddy Happillon sans qui le déroulement de cette thèse n'aurait pas été le même. Merci Teddy pour ta présence sans faille du début à la fin de cette thèse (même si ça m'a coûté beaucoup de post it) et les indénombrables moments de complicité et de rigolade partagés ensemble. Je ne te remercierai jamais assez.

Mes seven keys : Dicou, Kouss, Baj, Kalexx, Koco, Benz et Pilou. Vous êtes et vous resterez le noyau dur de mes amis.

Je remercie profondément mes parents, ma sœur et tous mes proches pour leur soutien et leurs encouragements qui m'ont aidé à surmonter les moments difficiles.

Enfin je remercie amoureusement Lucie. Merci pour ta patience, ton soutien infaillible et les multiples attentions dont tu as fait preuve à mon égard tout au long de cette thèse. C'est en grande partie grâce à toi si je suis arrivé jusque là !

Je dédie cette thèse à Georgette et Vittorio D'inca

<u>Résumé</u>

Les microsphères d'embolisation, apparues dans les années 2000, sont des dispositifs médicaux dirigées contre les tumeurs hépatiques non opérables. Elles sont calibrées et peuvent être chargées en anticancéreux. Ces avancées majeures permettent de contrôler le niveau d'occlusion et la concentration en principe actif à injecter dans la tumeur. Cependant, le type, la taille des microsphères ou encore la concentration en anticancéreux varient d'un centre à un autre et d'un pays à un autre. Notre travail vise à comparer, sur des modèles de tumeurs hépatiques, les propriétés d'élution et l'efficacité antitumorale de différentes préparations de microsphères. La microspectroscopie infrarouge est utilisée pour mesurer la quantité de doxorubicine présente dans les microsphères à différents délais alors que la microspectrofluorimétrie permet d'évaluer la concentration et la distribution de la doxorubicine autour des billes. L'évaluation de l'activité antitumorale du traitement est mesurée sur les images spectrales infrarouge grâce à un modèle de prédiction et confirmée par un examen histopathologique. Les résultats ont montré que la vitesse d'élution dépend des propriétés physicochimiques de la microsphère, de sa taille et de la concentration de chargement. Les concentrations tissulaires de doxorubicine mesurées induisent une réduction significative de la viabilité tumorale. Le modèle de prédiction est un outil robuste et précis pour évaluer les modifications tissulaires. Ces résultats permettent de formuler des hypothèses mécanistiques sur l'activité antitumorale de différentes préparations de microsphères afin d'optimiser leur utilisation dans une stratégie thérapeutique clinique.

<u>Mots clés:</u> microsphère, chimioembolisation, microspectroscopie infrarouge, tumeur VX2, microspectrofluorimétrie, doxorubicine, concentration, tissu, distribution.

Transarterial chemoembolization is the most common treatment for patients with unresectable liver tumors. Calibrated drug eluting beads offer the advantages of controlling the level of occlusion, the amount of drug delivered, and the duration of drug delivery to the tumor. However, optimal procedure still remains unanswered and treatments differ through the use of various beads sizes or dose of loading. Our work is to compare, on experimental liver tumor model, the release properties and antitumor effects for different preparations of doxorubicin eluting beads. The amount of drug retained inside the beads, at different time point, is assessed by infrared microspectroscopy. Doxorubicin concentration and distribution in the tissue are determined by microspectrofluorimetry. Tissue modifications are quantified by a prediction model on infrared images and compared with the conventional pathological examination of stained tissue sections. Results show that elution rate of doxorubicin depend on the beads composition, the size and the loaded concentration. The doxorubicin tissue concentration induces a significant decrease of tumor viability. The prediction model established by infrared microspectroscopy is an accurate and robust tool to quantify tissue modifications. These results allow the formulation of mechanistic hypotheses on antitumor activity of different preparations of beads to optimize their use in a clinical therapeutic strategy.

<u>Keywords:</u> drug eluting beads, chemoembolization, infrared microspectroscopy, VX2 tumor, microspectrofluorimetry, doxorubicin, concentration, tissue, distribution.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	13
AVANT PROPOS	14
PRESENTATION DU SUJET	18
CHAPITRE 1: LA CHIMIOEMBOLISATION	19
A. Définition et historique	19
B. Contexte d'utilisation de la chimioembolisation	19
C. Les techniques de chimioembolisation	21
D. Evaluer la réponse tumorale au traitement	26
CHAPITRE 2: LES MICROSPHERES D'EMBOLISATION CHARGEABLES DIRIGEES CONTRE LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE	31
A. Principales caractéristiques des DC Bead™ et des Hepasphere™	31
B. Études précliniques sur les microsphères d'embolisation	33
C. Utilisation clinique des microsphères d'embolisation	40
MATÉRIELS ET MÉTHODES	47
CHAPITRE 1 : LES MICROSPECTROSCOPIES OPTIQUES POUR L'ETUDE DU COMPORTEMENT IN VIVO DES MICROSPHERES	48
A. Généralités	49
B. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	51
C. La microspectrofluorométrie	64
CHAPITRE 2 : L'OPTIMISATION ET LA STANDARDISATION COMME NOUVEAUX ENJEUX POUR LES MICROSPHERES	69
TRAVAUX PERSONNELS	71
CHAPITRE 1: ETUDE DE L'EFFICACITE EN FONCTION DE LA TAILLE	72
A. Travaux antérieurs	72
B. Objectifs	75
C. Matériels et méthodes	76
D. Résultats	83
E. Discussion	86
F. Conclusions	87
CHAPITRE 2: ETUDE DE L'EFFICACITE EN FONCTION DU TYPE DE MICROSPHERE UTILISE	89
A. Travaux antérieurs	89
B. Objectifs	93
C. Matériels et méthodes	94
D. Résultats	100
E. Discussion	109
F. Conclusions	110

CHAPITE	RE 3: ETUDE DES PROPRIETES D'ELUTION DES DU BEAD MIT CHARGEES À DIFFERENTES CONCENTRATION DE DOXORUBI	CINE
		. 111
A. T	ravaux antérieurs	. 111
В. О	bjectifs	. 113
C. N	1atériels et méthodes	. 114
D. R	ésultats	. 115
E. D	iscussion	. 117
F. C	onclusions	. 118
СНАРІТЯ	Re 4: Etude de l'elution de la doxorubicine hors des DC Bead 300-500 μ m dans des pieces operatoires	
D'HEPAT	TECTOMIE	. 119
A. T	ravaux antérieurs	. 119
В. О	bjectifs	. 119
C. N	1atériels et méthodes	. 120
D. R	ésultats	. 121
E. D	iscussion	. 129
F. C	onclusions	. 130
Снарітя	RE 5: DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE RECONNAISSANCE TISSULAIRE ADAPTE A LA TUMEUR VX2	. 131
A. P	réambule de l'article 1	. 132
В. Р	réambule de l'article 2 et de l'article 3	. 145
ONCLUS	IONS ET PERSPECTIVES	. 192
CONCLU	ISIONS	. 193
А.	Paramètres influençant les propriétés d'élution d'embolisation	. 193
В.	Evaluation de la viabilité tumorale après traitement	. 194
С.	Pertinence clinique des résultats	. 195
Perspec	TIVES	. 195
IBLIOGR	АРНІЕ	197
UBLICAT	IONS ET COMMUNICATIONS	211

Liste des abréviations

- ACP : analyse en composantes principales
- ADL : analyse discriminante linéraire
- ASSLD : american association for the study of liver diseases
- BCLC : barcelona clinic liver cancer
- CAH : classification ascendante hiérarchique
- CCD : coupled charge device
- CE : conformité européenne
- CHC : carcinome hépatocellulaire
- CHE : chimioembolisation
- DEB : drug eluting beads
- DOX : doxorubicine
- EASL : european association for the study of the liver
- EMSC : extended multiplicative signal correction
- FDA : food and drug administration
- IA : injection intraartérielle
- IR : infrarouge
- IRM : imagerie par résonance magnétique
- IRTF : infrarouge à transformée de Fourrier
- KM : k-means
- MEM : milieu essentiel minimum
- MCT : mercure cadmium telluride
- MS : microsphères
- OMS : organisation mondiale de la santé
- PVA : alcool de polyvinyle
- RECIST : response evaluation criteria in solid tumors
- TDM : tomodensitométrie
- TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase d'UTP nick end labeling
- VEGF : vascular endothelial growth factor
- WHO : world health organization

Liste des figures

FIGURE 1: STRATEGIE THERAPEUTIQUE EN FONCTION DU GRADE DU CHC	. 21
FIGURE 2: CRITERES RECIST 1.1 POUR L'EVALUATION DE LA REPONSE TUMORALE	. 28
FIGURE 3: CRITERES RECIST MODIFIES POUR L'EVALUATION DE LA REPONSE TUMORALE	. 28
FIGURE 4: QUANTIFICATION DE LA NECROSE TUMORALE AVEC LA METHODE DU CONTOURNEMENT DES ZONES	. 29
FIGURE 5: PRESENTATION DES DIFFERENTES TAILLES DE DC BEAD™ ET DU MECANISME DE CHARGEMENT DE LA DOXORUBICINE	. 32
FIGURE 6: PRESENTATION DES DIFFERENTES TAILLES D'HEPASPHERE™ ET MECANISME DE CHARGEMENT DE LA DOXORUBICINE	. 33
FIGURE 7: POURCENTAGE DE NECROSE SPONTANEE POUR LA TUMEUR VX2-VEGF MODIFIEE ET VX2 INITIALE	. 35
FIGURE 8: PIC DE CONCENTRATION PLASMATIQUE DE DOXORUBICINE EN FONCTION DE LA TECHNIQUE UTILISEE	. 36
FIGURE 9: DETECTION ET QUANTIFICATION DE LA DOXORUBICINE TISSULAIRE AUTOUR DES VAISSEAUX OCCLUS	. 36
FIGURE 10: QUANTIFICATION DE LA NECROSE TUMORALE APRES CHE AVEC DES HEPASPHERE [™] CHARGEES EN DOXORUBICINE ET NO	ON
CHARGEES EN FONCTION DU TEMPS	. 37
FIGURE 11: COMPARAISON DE LA CONCENTRATION PLASMATIQUE ET TUMORALE DE DOXORUBICINE EN FONCTION DE LA TECHNIQU	E
D'EMBOLISATION ET DU TEMPS	. 38
FIGURE 12: CONCENTRATION DE DOXORUBICINE TISSULAIRE ET DANS LES MICROSPHERES APRES 28 ET 90 JOURS	. 39
Figure 13: Types de reponse tumorale apres une CHE avec des Hepasphere™	.41
FIGURE 14: CONCENTRATION/PHARMACOCINETIQUE PLASMATIQUE DE DOXORUBICINE ET ETUDE DE LA FONCTION HEPATIQUE	42
FIGURE 15: COMPARAISON DE LA CONCENTRATION SERIQUE DE DOXORUBICINE ENTRE UNE CHE AVEC DC BEAD™ ET UNE CHE	
LIPIODOLEE PLUS GELFOAM [®]	43
FIGURE 16: CONCENTRATION TISSULAIRE DE DOXORUBICINE A DIFFERENTS DELAIS D'EMBOLISATION ET EN S'ELOIGNANT	
PROGRESSIVEMENT DU VAISSEAU EMBOLISE	44
FIGURE 17: REPONSE TUMORALE CHEZ LES PATIENTS TRAITES AVEC DES DC BEAD™ ET PAR CHE LIPIODOLEE	. 45
FIGURE 18: COMPARAISON D'UNE CHE AVEC DC BEAD™ CHARGEES EN DOXORUBICINE ET DES BEADBLOCK™ NON CHARGEES: TAL	XL
DE REPONSE COMPLETE ET OBJECTIVE (6 MOIS ET 9 MOIS). POURCENTAGES DE RECURRENCE APRES 6 ET 12 MOIS	. 45
FIGURE 19: SCHEMA REPRESENTATIF D'UNE ONDE ELECTROMAGNETIQUE	. 49
Figure 20: Diagramme de Jablonski	. 50
FIGURE 21: MODES DE VIBRATION DE LA MOLECULE CH2	.51
FIGURE 22: SPECTRE ELECTROMAGNETIQUE SITUANT LE DOMAINE INFRAROUGE	. 52
FIGURE 23: SCHEMA DESCRIPTIF DE L'IMAGEUR INFRAROUGE SPOTLIGHT 300	. 54
FIGURE 24: IMAGE VISIBLE ET IMAGE SPECTRALE DE MICROSPHERES D'EMBOLISATION	. 55
FIGURE 25: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INTERFEROMETRE DE MICHELSON	. 55
FIGURE 26: INTERFERENCES CONSTRUCTIVES ET DESTRUCTIVES	. 56
FIGURE 27: PRINCIPALES ETAPES DE L'OBTENTION D'UN SPECTRE INFRAROUGE	. 57
FIGURE 28: PRINCIPALES ETAPES DE LA CLASSIFICATION KM	. 63
FIGURE 29: SPECTRES D'EXCITATION ET D'EMISSION DE FLUORESCENCE	. 65
FIGURE 30: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MICROSPECTROFLUORIMETRE	. 67

FIGURE 31: PRINCIPE DE LA FOCALISATION DU FAISCEAU	67
FIGURE 32: CINETIQUE DE CHARGEMENT DE LA DOXORUBICINE EN FONCTION DE LA TAILLE DES DC BEAD [™]	72
FIGURE 33: TEMPS D'ELUTION DE LA DOXORUBICINE EN FONCTION DE LA TAILLE DES DC BEAD [™]	74
FIGURE 34: LES DC BEAD [™] 100-300 ENGENDRENT UNE DIMINUTION DU SYNDROME POSTEMBOLISATION ET UN BENEFICE EN TE	RME
DE SURVIE DES PATIENTS	75
FIGURE 35: MESURE DE L'EPAISSEUR DE NECROSE AUTOUR D'UN VAISSEAU EMBOLISE	77
FIGURE 36: IMAGE VISIBLE ET IMAGE EN TRANSMITTANCE D'UN VAISSEAU OCCLUS PAR DES MICROSPHERES CHARGEES EN DOX	79
FIGURE 37: SPECTRES INFRAROUGE MOYENS DE LA DOXORUBICINE PURE, DU PRODUIT A CHARGE EN DOX ET DU PRODUIT A NON	
CHARGEES	80
FIGURE 38: COURBE DE CALIBRATION OBTENUE EN IR SUR LES MICROSPHERES CHARGEES	81
FIGURE 39: SPECTRES D'EMISSION OBTENUS A J7 A 25µM DE DISTANCE DE LA MICROSPHERE. SPECTRES DE REFERENCE UTILISES PO	JUR
LA DECONVOLUTION SPECTRALE	82
FIGURE 40: COURBE DE CALIBRATION OBTENUE EN FLUORESCENCE SUR LES HOMOGENATS DOX + TISSU	83
FIGURE 41: ÉPAISSEUR DE NECROSE AUTOUR DES VAISSEAUX EMBOLISES A 7 JOURS DE TRAITEMENT	84
FIGURE 42: INFLUENCE DU CHARGEMENT EN DOXORUBICINE OU IRINOTECAN SUR LES PROPRIETES PHYSIQUES DES DC BEADS™	89
FIGURE 43: TEMPS DE CHARGEMENT EN DOXORUBICINE ET IRINOTECAN POUR LES DC BEAD™ ET LES HEPASPHERE™	90
FIGURE 44: POURCENTAGES DE DOXORUBICINE CHARGEE ET ELUEE EN FONCTION DU TYPE DE MICROSPHERE A TAILLE EQUIVALENTE	E.91
FIGURE 45: PROFILS D'ELUTION DE LA DOXORUBICINE ET DE L'IRINOTECAN EN FONCTION DU TYPE DE MICROSPHERES	92
FIGURE 46: SPECTRES INFRAROUGE MOYENS DE LA DOXORUBICINE PURE, DU PRODUIT B CHARGE EN DOX ET DES DU PRODUIT B N	10N
CHARGEES	97
FIGURE 47: COURBE DE CALIBRATION OBTENUE EN IR SUR LES MICROSPHERES CHARGEES	98
FIGURE 48: PROFIL DE DIFFUSION DE LA DOX DANS LE TISSU	99
FIGURE 49: COURBE DE CALIBRATION OBTENUE EN GEL DE COLLAGENE	. 100
FIGURE 50 : PROPORTION DE TUMEUR VIABLE ET DE PARENCHYME HEPATIQUE NECROSE EN PERIPHERIE DE LA TUMEUR	. 101
FIGURE 51: POURCENTAGES D'ELUTION POUR LE PRODUIT À ET LE PRODUIT B EN FONCTION DE LA LOCALISATION DU VAISSEAU	
EMBOLISE	. 104
FIGURE 52: PROFILS DE DIFFUSION TISSULAIRE DE LA DOX POUR LE PRODUIT A ET LE PRODUIT B	. 106
FIGURE 53: PROFILS DE DIFFUSION ET CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE DOX ENTRE LES PRODUITS A ET B POUR LA TAILLE 1	. 106
FIGURE 54: PROFILS DE DIFFUSION ET CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE DOX ENTRE LES PRODUITS A ET B POUR LA TAILLE 2	. 107
FIGURE 55: PROFILS DE DIFFUSION ET CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE DOX ENTRE LES TAILLES 1 ET 2 POUR LE PRODUIT A	. 107
FIGURE 56: PROFILS DE DIFFUSION ET CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE DOX ENTRE LES TAILLES 1 ET 2 POUR LE PRODUIT B	. 108
FIGURE 57: PROFILS DE DIFFUSION ET CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE DOX EN FONCTION DE LA ZONE DE PRELEVEMENT PAR	
PRODUIT	. 108
FIGURE 58: IMAGES OBTENUES PAR MICROSCOPIE CONFOCALE DE MICROSPHERES CHARGEES EN DOXORUBICINE	. 112
FIGURE 59: POURCENTAGE D'ELUTION DES MICROSPHERES CHARGEES A 18 MG/ML ET A 37 MG/ML EN FONCTION DU DELAI	. 116
FIGURE 60: PROFIL DE DIFFUSION ET CONCENTRATION TISSULAIRE MESURES A 1H	. 117
FIGURE 61: PROFIL DE DIFFUSION ET CONCENTRATION TISSULAIRE MESURES A 24H	. 117
FIGURE 62: CONCENTRATION DE DOX DANS LES MICROSPHERES AUX DIFFERENTS DELAIS	. 122

FIGURE 63: PROFIL DE DIFFUSION ET CONCENTRATION TISSULAIRE DE DOX AUX DIFFERENTS DELAIS	3
FIGURE 64: CONCENTRATION DE DOX DANS LES MICROSPHERES. ILLUSTRATION DE VAISSEAUX ANALYSES A 57 JOURS	4
FIGURE 65: PROFIL DE DIFFUSION ET CONCENTRATION TISSULAIRE DE DOX A 57 JOURS EN FONCTION DU NOMBRE DE MICROSPHERES	
OCCLUANT LE VAISSEAU	4
FIGURE 66: CONCENTRATION DE DOX DANS LES MICROSPHERES. ILLUSTRATION DE VAISSEAUX ANALYSES A 79 JOURS	5
FIGURE 67: PROFIL DE DIFFUSION ET CONCENTRATION TISSULAIRE DE DOX A 79 JOURS EN FONCTION DU NOMBRE DE MICROSPHERES	
OCCLUANT LE VAISSEAU	6
FIGURE 68: CONCENTRATION DE DOX DANS LES MICROSPHERES. ILLUSTRATION DE VAISSEAUX ANALYSES A 80 JOURS	7
FIGURE 69: PROFIL DE DIFFUSION ET CONCENTRATION TISSULAIRE DE DOX A 80 JOURS EN FONCTION DU NOMBRE DE MICROSPHERES	
OCCLUANT LE VAISSEAU	8
FIGURE 70: CONCENTRATION DE DOX DANS LES MICROSPHERES. ILLUSTRATION DE VAISSEAU ANALYSE A 105 IOURS	9

Liste des tableaux

TABLEAU 1: CLASSIFICATION BCLC ET GRADE DU CHC 20
TABLEAU 2: PRINCIPALES ETUDES SUR LA CHE AVEC DES PARTICULES CHARGEES 23
TABLEAU 3: EXEMPLE DE MICROSPHERES NON CHARGEABLES 24
TABLEAU 4: FREQUENCE DES PRINCIPALES COMPLICATIONS SURVENANT APRES EMBOLISATION (E) ET CHIMIOEMBOLISATION
LIPIODOLEE (CEL)
TABLEAU 5: ÉVALUATION DE LA REPONSE SELON LES CRITERES DE L'OMS, DE L'EASL, RECIST ET RECIST MODIFIE (MRECIST) 27
TABLEAU 6: ESSAIS CLINIQUES RECENTS AVEC LES DC BEAD [™] POUR TRAITER LES CHC NON OPERABLES
TABLEAU 7: LIMITE DE QUANTIFICATION ET RESOLUTION SPATIALE DES MICROSPECTROSCOPIES INFRAROUGE ET DE FLUORESCENCE 48
TABLEAU 8: REPARTITION TISSULAIRE DES EMBOSPHERE™ EN FONCTION DE LEUR TAILLE
TABLEAU 9: ETUDES IN VITRO COMPARANT LES TEMPS D'ELUTION (T75%) DE L'IRINOTECAN EN FONCTION DE LA TAILLE ET DU TYPE DE
MICROSPHERE
TABLEAU 10: TYPES DE LESIONS TISSULAIRES ASSOCIEES A LA PRESENCE DES DC BEAD 100-300 μ M et 700-900 μ M75
TABLEAU 11: PRESENCE DE NECROSE SUR LES COUPES TISSULAIRES ET AUTOUR DES VAISSEAUX OCCLUS 84
TABLEAU 12: QUANTIFICATION DE LA DOXORUBICINE DANS LES MICROSPHERES, POURCENTAGES DE RETENTION ET D'ELUTION EN
FONCTION DU DELAI
FONCTION DU DELAI. 85 TABLEAU 13: CONCENTRATION DE DOXORUBICINE TISSULAIRE EN FONCTION DE LA DISTANCE D'ELOIGNEMENT DU VAISSEAU 86 TABLEAU 14: TAILLE DES HEPASPHERE™ AVANT ET APRES CHARGEMENT EN PRINCIPE ACTIF 90 TABLEAU 15: POURCENTAGES D'ELUTION ET DE RETENTION DE LA DOX DANS LES MICROSPHERES APRES 3 JOURS DE TRAITEMENT . 102 TABLEAU 16: COMPARAISON DES POURCENTAGES D'ELUTION ET DE RETENTION DE LA DOX ENTRE LES PRODUITS A TAILLE DE MICROSPHERE EQUIVALENTE 103 TABLEAU 17: COMPARAISON DES POURCENTAGES D'ELUTION ET DE RETENTION DE LA DOX ENTRE LES DIFFERENTES TAILLES POUR UN MEME PRODUIT 103 TABLEAU 18: CONCENTRATION TISSULAIRE DE DOX (µMOL/L) POUR LE PRODUIT A ET LE PRODUIT B EN FONCTION DE LA DISTANCE DU VAISSEAU. 105
FONCTION DU DELAI. 85 TABLEAU 13: CONCENTRATION DE DOXORUBICINE TISSULAIRE EN FONCTION DE LA DISTANCE D'ELOIGNEMENT DU VAISSEAU. 86 TABLEAU 14: TAILLE DES HEPASPHERE™ AVANT ET APRES CHARGEMENT EN PRINCIPE ACTIF 90 TABLEAU 15: POURCENTAGES D'ELUTION ET DE RETENTION DE LA DOX DANS LES MICROSPHERES APRES 3 JOURS DE TRAITEMENT . 102 TABLEAU 16: COMPARAISON DES POURCENTAGES D'ELUTION ET DE RETENTION DE LA DOX ENTRE LES PRODUITS A TAILLE DE MICROSPHERE EQUIVALENTE 103 TABLEAU 17: COMPARAISON DES POURCENTAGES D'ELUTION ET DE RETENTION DE LA DOX ENTRE LES DIFFERENTES TAILLES POUR UN MEME PRODUIT 103 TABLEAU 18: CONCENTRATION TISSULAIRE DE DOX (μMOL/L) POUR LE PRODUIT A ET LE PRODUIT B EN FONCTION DE LA DISTANCE DU VAISSEAU. 105 TABLEAU 19: HETEROGENEITE DANS LE CHOIX DU PRINCIPE ACTIF. 111
FONCTION DU DELAI
FONCTION DU DELAI. 85 TABLEAU 13: CONCENTRATION DE DOXORUBICINE TISSULAIRE EN FONCTION DE LA DISTANCE D'ELOIGNEMENT DU VAISSEAU. 86 TABLEAU 14: TAILLE DES HEPASPHERE™ AVANT ET APRES CHARGEMENT EN PRINCIPE ACTIF 90 TABLEAU 15: POURCENTAGES D'ELUTION ET DE RETENTION DE LA DOX DANS LES MICROSPHERES APRES 3 JOURS DE TRAITEMENT . 102 TABLEAU 16: COMPARAISON DES POURCENTAGES D'ELUTION ET DE RETENTION DE LA DOX ENTRE LES PRODUITS A TAILLE DE MICROSPHERE EQUIVALENTE 103 TABLEAU 17: COMPARAISON DES POURCENTAGES D'ELUTION ET DE RETENTION DE LA DOX ENTRE LES DIFFERENTES TAILLES POUR UN MEME PRODUIT 103 TABLEAU 18: CONCENTRATION TISSULAIRE DE DOX (µMOL/L) POUR LE PRODUIT A ET LE PRODUIT B EN FONCTION DE LA DISTANCE DU VAISSEAU 105 TABLEAU 19: HETEROGENEITE DANS LE CHOIX DU PRINCIPE ACTIF 111 TABLEAU 20: INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SUR LA VITESSE DE CHARGEMENT DES DC BEAD [™] 112 TABLEAU 21: VITESSE D'ELUTION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE DOXORUBICINE 113

Avant propos

La chimioembolisation est une technique mini-invasive de radiologie interventionnelle actuellement recommandée pour le traitement des tumeurs hépatiques malignes non opérables. Elle consiste à injecter, à travers un cathéter et directement dans les vaisseaux irriguant la tumeur, un médicament et un agent occlusif. Le but est d'augmenter la concentration locale de médicament par une injection ciblée, ainsi que son temps de résidence dans la tumeur grâce au ralentissement du flux sanguin dû à l'embole. Cette procédure, développée au début des années 1980, a peu évolué jusqu'à l'apparition au milieu des années 2000 des microsphères d'embolisation. Elles se présentent sous forme de particules sphériques et calibrées, pouvant être chargées en médicament de manière extemporané avant injection. L'utilisation d'une microsphère de taille calibrée permet de contrôler le niveau d'occlusion et la distribution des particules dans le réseau vasculaire tumoral. Le chargement du principe actif dans la microsphère permet un contrôle précis de la dose administrée localement et également de la durée de libération en modulant les propriétés chimiques des microsphères.

À ce jour, deux types de microsphères chargeables en doxorubicine (antinéoplasique) ont reçu le marquage Conformité Européenne (CE) et l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA). Elles sont disponibles sur le marché et sont actuellement en phase III des essais cliniques. Des études antérieures menées sur ces produits ont validé le concept de microsphères d'embolisation, en démontrant qu'elles remplissaient leur double fonction d'agent d'embolisation et de vecteur de principe actif. Leur capacité à libérer le principe actif de façon prolongée et à des doses biologiquement actives *in situ* après embolisation a également été mis en exergue.

La preuve du concept ayant été apportée, se pose alors la question de l'optimisation des performances des microsphères dans leur utilisation clinique. Deux paramètres apparaissent comme étant les plus susceptibles d'influencer l'efficacité du traitement, la taille et la concentration de chargement en médicament. Le calibre des particules détermine leur répartition dans le réseau vasculaire intra et péri-tumoral. En clinique, les tailles utilisées varient entre 40 et 700 µm de diamètre et il n'y a pas d'études qui à ce jour permettent de déterminer le diamètre optimal permettant d'atteindre le centre de la tumeur. Il a également été démontré que la cinétique de libération du médicament était dépendante de la taille des particules, les microsphères de petite taille libérant leur contenu plus rapidement que celles de

grande taille. Cependant, cette observation n'a pu être confirmée *in vivo*. Dans un second temps, se pose la question de la concentration de chargement en médicament. Ce choix est complexe car aucune étude ne rapporte les effets biologiques des anticancéreux en fonction des concentrations tissulaires ou en fonction des doses administrées par voie locale. Actuellement, les concentrations utilisées dans les essais cliniques sont identiques aux concentrations injectées en intraveineuse lors d'une chimiothérapie classique, ce qui peut sembler paradoxal avec le principe même du traitement local.

L'utilisation de modèles expérimentaux représente l'étape préliminaire dans le développement et l'amélioration de ces nouvelles stratégies thérapeutiques. Le modèle tumoral VX2 développé dans le foie de lapin est sensible aux chimiothérapies et a prouvé son utilité en radiologie interventionnelle car il est compatible avec le matériel utilisé en pathologie humaine. C'est le modèle expérimental le plus utilisé pour tester l'efficacité antitumorale de la chimioembolisation. L'évaluation de l'activité cytotoxique du traitement est un critère essentiel pour optimiser les paramètres de la procédure de la chimioembolisation. Bien que la réduction de la taille de la tumeur soit la méthode classique pour évaluer la réponse tumorale au traitement, le pourcentage de nécrose tumorale tend à devenir le principal indicateur de succès des thérapies anticancéreuses. Après la résection de tumeurs VX2 traitées, la proportion de nécrose et de cellules tumorales résiduelles est déterminée lors d'un examen histopathologique. Il repose sur la lecture de coupes tissulaires colorées par un médecin spécialisé en cytologie. Récemment, le développement de scanner de lames et d'outils de traitement d'images ont permis de faciliter la quantification de la viabilité tumorale après traitement. Cependant, ces technologies reste observateur dépendante et nécessitent encore de longues étapes de repérage et de contournement des zones tissulaires d'intérêts.

En parallèle de ces techniques et depuis maintenant plusieurs décennies, s'est développé un intérêt grandissant pour les microspectroscopies optiques, et plus particulièrement dans le domaine de la caractérisation tissulaire et de l'aide au diagnostic en cancérologie. Les appareils de microspectroscopie sont basés sur le couplage d'un dispositif spectrométrique, capable d'enregistrer des informations (ou spectres) à l'échelle moléculaire, et d'un dispositif d'imagerie, permettant de relier chaque spectre à une position spatiale sur l'échantillon avec une précision de l'ordre de quelques µm. Les spectres enregistrés sont de véritables empreintes de la composition biochimique de l'échantillon analysé. De plus, cette technologie a l'avantage de ne nécessiter aucune coloration ou marquage de l'échantillon au préalable. L'analyse de ces données spectroscopiques par des méthodes statistiques

multivariées permet de classer les spectres d'une image spectrale en fonction de leur ressemblance. Cela va générer une image spectrale en fausses-couleurs de l'échantillon tissulaire. Ces images spectrales peuvent être directement comparées avec la coupe histologique adjacente colorée et lue par un anatomopathologiste. Ainsi, chaque couleur peut être corrélée avec un type de tissu. L'intérêt de cette méthodologie est que la surface occupée par chaque couleur est automatiquement calculée sur les images spectrales. Ce moyen peut facilement être utilisé pour quantifier la surface occupée par un type de tissu sur une coupe histologique.

Des études antérieures ont permis d'identifier des zones de nécrose au sein d'un modèle de gliome développé chez le rat et de caractériser des marqueurs spectroscopiques distinguant les cellules nécrotiques et apoptotiques et ce, à l'aide des microspectroscopies vibrationnelles. De plus les microspectroscopies infrarouge et de fluorescence, méthodes informatives et complémentaires, se sont révélées applicables à l'étude de trois couples microsphère/médicament. La microspectroscopie infrarouge a été utilisée pour mesurer, sur une coupe histologique, la concentration du principe actif toujours présent dans la microsphère à différents délais. La microspectroscopie de fluorescence a permis de mesurer la concentration et la distribution d'anticancéreux dans le tissu autour de la microsphère. La mise en œuvre des microspectroscopies est simple, rapide, et leur résolution spatiale est satisfaisante compte tenu de la taille des microsphères.

L'ensemble de ces études a justifié notre intérêt pour les microscopies optiques, en complément de l'analyse histologique, pour évaluer l'influence que pourrait avoir la taille des microsphères et la concentration en médicament chargé sur les propriétés d'élution et les effets antitumoraux.

Ce manuscrit de thèse s'articule en quatre parties:

La première partie introduit et présente le sujet de ce manuscrit sur la base d'une revue bibliographique des travaux antérieurs réalisés dans ce domaine :

- Le chapitre 1 présente le concept de la chimioembolisation
- Le chapitre 2 présente les microsphères d'embolisation dirigées contre le carcinome hépatocellulaire et quelques utilisations précliniques et cliniques

La seconde partie présente les microspectroscopies optiques et le matériel utilisé, ainsi que la méthodologie suivie pour le traitement des données numériques :

- Le chapitre 1 présente les microspectroscopies infrarouge et de fluorescence et montre l'intérêt de ces techniques pour l'analyse du comportement *in vivo* des microsphères d'embolisation et l'évaluation de l'efficacité du traitement
- Le chapitre 2 introduit les objectifs de ce travail

La troisième partie de ce mémoire présente l'ensemble des travaux personnels :

- Le chapitre 1 présente la comparaison de l'efficacité de deux tailles de microsphères au sein d'un modèle de foie de porc
- Le chapitre 2 présente la comparaison de l'efficacité de deux types de microsphères au sein d'un modèle de tumeur du foie
- Le chapitre 3 présente les effets de la concentration de chargement sur les propriétés d'élution
- Le chapitre 4 présente une application des techniques de microspectroscopies vibrationnelles chez l'humain, dans le cadre d'un essai clinique sur les microsphères d'embolisation
- Le chapitre 5 détaille le développement d'un nouvel outil chimiométrique, permettant d'évaluer l'action antitumorale de la chimioembolisation utilisant des microsphères sur la tumeur expérimentale VX2.

La dernière partie expose les conclusions et perspectives relatives aux différentes thématiques abordées.

PRESENTATION DU SUJET

Chapitre 1: La chimioembolisation

A. Définition et historique

La chimioembolisation (CHE) est une technique de radiologie interventionnelle locorégionale qui consiste à injecter, successivement ou simultanément, un principe actif et un agent d'occlusion vasculaire dans les artères nourricières d'une tumeur. Le principe actif peut être vectorisé en le mélangeant à du lipiodol (agent de contraste huileux iodé) ou être directement chargé dans le vecteur lorsque des microsphères d'embolisation sont utilisées.

La chimioembolisation s'est développée à partir de l'embolisation, apparue dans les années 1960. L'embolisation consistait à occlure des vaisseaux de gros calibre pour stopper des hémorragies et traiter des malformations artérioveineuses (1, 2) en injectant une suspension de particules polymériques de taille très variable (de quelques centaines de micromètres à plusieurs millimètres). Cette technique a ensuite été proposée pour traiter les tumeurs bénignes de l'utérus, les léiomyomes (3). En 1974, l'embolisation artérielle a été utilisée pour traiter les patients atteints de carcinomes hépatocellulaire (CHC). L'idée principale était d'exploiter la double vascularisation du foie (artérielle et veineuse), qui permettait d'occlure l'artère hépatique irriguant la tumeur sans toutefois induire une nécrose complète de l'organe. La technique de la CHE s'est principalement développée au Japon dans les années 1980, où en 1983, le chirurgien japonais Konno met en évidence une fixation élective du lipiodol dans la tumeur de patients atteints de CHC. Il utilisa cette propriété pour injecter un mélange lipiodol/anticancéreux (SMANCS) par voie intraartérielle à ces derniers (4). Par la suite, différents anticancéreux ont été étudiés dans le but d'être mélangés au lipiodol comme la doxorubicine (DOX) ou le cisplatine (5-7).

Les avantages théoriques de la CHE par rapport à l'injection intraveineuse (communément utilisée pour les chimiothérapies) sont d'une part de limiter la circulation systémique et la distribution non spécifique du principe actif, et d'autre part, d'augmenter la concentration locale et le temps de résidence du principe actif dans le tissu cible, ceci afin d'améliorer les effets thérapeutiques du traitement (8-10).

B. Contexte d'utilisation de la chimioembolisation

Le grade du CHC est évalué sur la morphologie tumorale, le statut fonctionnel hépatique, l'état général du patient et la réponse aux traitements réalisés. Ces critères ont été

adoptés par la communauté scientifique en 1999 (11) sous l'appellation de « classification BCLC » (Barcelona Clinic Liver Cancer) (Tableau 1).

Stade BCLC	Statut de performance selon l'ECOG	Stade tumoral	Stade Okuda	Statut fonctionnel du foie
A1	0	Uninodulaire	I	Pas d'hypertension portale et bilirubine normale
A2	0	Uninodulaire	I	Hypertension portale et bilirubine normale
A3	0	Uninodulaire	1	Hypertension portale et bilirubine anormale
A4	0	3 tumeurs < 3 cm	1-11	Child-Pugh A-B
В	0	Grosses tumeurs CHC multinodulaire	1-11	Child-Pugh A-B
c	1-2 ¹	Envahissement vasculaire ou extrahépatique ¹	1-11	Child-Pugh A-B
D	3-4 ²	Tous		Child-Pugh C ²

Tableau 1: Classification BCLC et grade du CHC (11)

¹ Statut de performance 1-2 ou envahissement vasculaire ou extrahépatique. ² Statut de performance 3-4 ou stade Okuda III ou grade Child-Pugh C.

La stratégie thérapeutique est orientée par l'établissement du grade du CHC. À l'heure actuelle, seul 30 à 40% des patients atteints d'un CHC ont accès aux traitements curatifs comme la transplantation ou la résection partielle. Ce chiffre est souvent la conséquence d'un diagnostic tardif et souligne le manque de méthodes de dépistage efficaces. La CHE est recommandée pour les stades d'évolutions intermédiaires ou stade B (Figure 1). Son application touche 20% des patients et les différentes études montrent un prolongement de la durée de vie de 20 mois en moyenne.



Figure 1: Stratégie thérapeutique en fonction du grade du CHC (12)

C. Les techniques de chimioembolisation

La chimioembolisation lipiodolée

Le lipiodol est un agent de contraste huileux iodé, utilisé en radiologie depuis les années 1980, présentant une affinité avec les cellules tumorales hépatiques (13, 14). Ces deux propriétés ont conduit les radiologues interventionnels à l'utiliser comme vecteur d'agent anticancéreux pour traiter les patients atteints de CHC. En pratique, l'injection intraartérielle de lipiodol est complétée par l'injection d'un agent d'embolisation dans le but d'obtenir une embolisation réelle (15). Certaines études ont démontré que l'utilisation du lipiodol permettait une rémanence de l'anticancéreux dans le tissu tumoral sur une durée de plusieurs mois (5, 16-19), ou encore qu'une amélioration significative du taux de survie était constatée chez des patients atteints de CHC non opérables (20-23).

Cependant, il existe plusieurs inconvénients quant à l'utilisation de la chimioembolisation lipiodolée. Dans un premier temps, l'émulsion de lipiodol et de l'agent

anticancéreux, réalisée avant l'injection, est instable et se dissocie rapidement en une phase huileuse et une phase aqueuse (18). Ce phénomène entraine une répartition non contrôlée du principe actif, plus fortement dépendante de la répartition des particules d'embolisation que de la répartition du lipiodol lui-même. D'autre part, la formation de microgouttelettes de différentes tailles lors de la préparation de l'émulsion influence la répartition du mélange dans le système vasculaire tumoral et participe à cette distribution non contrôlée du principe actif (24, 25). Enfin, il a été démontré que la fixation du lipiodol sur le tissu tumoral n'est pas toujours homogène, pouvant même être absente chez certaines tumeurs hépatiques, et rendant par conséquent le traitement inefficace (26-28). La chimioembolisation lipiodolée présente donc certaines faiblesses quant au ciblage optimal des tumeurs et à la distribution non contrôlée du principe actif utilisé.

La chimioembolisation avec des particules chargées

La CHE utilisant des particules chargées en principe actif a été développée au Japon dans les années 1980 (29). Différentes études précliniques, *in vitro* et *in vivo* sur des modèles tumoraux, ont démontré que ces premières particules, composées d'éthyl cellulose (30-32), étaient capables de libérer lentement le principe actif au sein du tissu cible (32, 33). Par la suite, des études menées chez l'homme ont prouvé que l'utilisation de ces particules chargées augmentait la concentration du principe actif dans la tumeur et diminuait sa diffusion systémique en comparaison d'une simple injection intraartérielle ou intraveineuse. Le taux de réponse tumorale et le taux de survie étaient également améliorés (29-31, 34, 35).

Depuis Kato, de nombreuses études expérimentales sur la CHE par particules chargées ont été réalisées (Tableau 2). Cependant, les études cliniques demeurent peu nombreuses et sont souvent réalisées à titre de recherche clinique sur des séries limitées de cas. La calibration non précise de ces particules chargées, *i.e.* particules souvent trop petites pour induire une embolisation efficace, ne permet pas de réaliser une chimioembolisation contrôlée et ciblée (36). Aucune de ces particules chargées à notre connaissance n'a été commercialisée.

Tableau 2: Principales études sur la CHE avec des particules chargées (37)

Médicament	Type de microsphère	Chargement du médicament (%)	Type d'étude	Reference
Mitomycin C	Albumin	$45 \pm 8 \mu m$	Clinical, HCC 19 patients vs. infusion	Fuilmoto et al. (1985
5-FU	Camuba wax		In vitro	Benita et al. (1986)
Cisplatin	Poly(lactic acid)	22 (1939) (1	In vitro	Spenlehauer <i>et al.</i> (1986)
Mitomycin C	Albumin	$45\pm8\mu\text{m}$	Preclinical/clinical, VX-2 model, CRCm 19 patients vs. infusion	Endoh (1987)
Doxorubicin	Albumin		Clinical, breast, 5 patients	Asaishi et al. (1988)
Doxorubicin	Albumin	15–20 µm, 1%	Preclinical, renal study	Kerr et al. (1988)
Doxorubicin	Albumin or casein	15–30 μm	Preclinical, ¹²⁵ I radiolabelled study	Willmott et al. (1989)
Aclarubicin	Poly(lactic acid)	200 µm, 10%	Clinical, 62 patients, 50-100 mg dose	Ichihara et al. (1989)
CPT	Albumin		Preclinical, rats	Wu (1990)
NA	Poly(lactic acid)		In vitro	Flandroy et al. (1990
Cisplatin	Ethylcellulose		Preclinical, rats	Wang (1991)
Methotrexate	Gelatin		Preclinical, rats	Chen et al. (1991)
Aclarubicin	Poly(lactic acid)		Clinical, 67 patients + cisplatin/ Lipiodol	Beppu et al. (1991)
Cisplatin	Albumin+chitin/ chitosan		Preclinical, VX-2 model	Kyotani et əl. (1992)
Cisplatin	Albumin+chitin/ chitosan		Preclinical, dog PK	Nishioka et al. (1992)
Cisplatin	Ethylcellulose		Preclinical, dog PK	Wei et al. (1992)
Cisplatin	Albumin	56 µm, 14%	Preclinical, in vitro + rabbits	Cheng et al. (1993)
Mathemate	Albumin	40 um	Practinical dog	Xu and 7hu (1993)
Cicplatin	Albumin to bitin	40 µm	Precinical VX-2 model	Nishioka et al. (1993)
Davorubicio	Carbon mathul daytran		Preclinical, dog PK	He et al (1993)
Cieplatin	Carboxymethy dextran		Praclinical, dog r k	Liu et al. (1993)
Daupomucio	Albumin	52 um + 16	Preclinical, mouse ascites model	Wang et al. (1994)
Cieplatio	Albumintchitin	20_37 um	Preclinical VX-2 model	Nishioka et al. (1994)
Cisplatin	Poly/benzyl clutamate)	100-200 um 44%	In vitro	Li et al. (1994)
Cicolatin	Albumin	59-256 um 51%	Preclinical in vitro + rabbit PK	Zhang et al. (1995)
Cisplatin	Chitosan		Preclinical dogs	Wang et al. (1995)
Cisplatin	Ethylcellulose		Preclinical, dog PK	Yang et al. (1995)
Taxol	Ethylene vinyl acetate/ Poly(lactic acid) blend	10-30 μm, 30-100 μm, 10-13%	In vitro + CAM assay	Burt et al. (1995)
Mitoxantrone	Ethylcellulose	110 µm ± 38, 12.5%	Preclinical, dogs	Zhang et al. (1996)
Taxol	Poly(lactic/glycolic acid)		In vitro	Wang et al. (1996)
Rifampicin	Poly(hydroxy butyrate)		In vitro	Kassab et al. (1997)
Mitoxantrone	Carboxymethyl starch		Preclinical, rabbit PK	Zhang et al. (1998)
Cisplatin	Albumin		Clinical, 7 patients	Li et al. (1999)
5-FU	Chitosan		In vitro	Denkbas et al. (1999)
Epirubicin	Poly(lactic acid)		Preclinical, rabbit PK	Fujiwars et al. (2000)
Pingyangmycin	Gelatin		Preclinical, in vitro + rabbits	Wu et al. (2003)
Mitomycin C	Poly(lactic/glutamic acid)		Preclinical, rats	Qian et al. (2003)
Mitomycin C	Alginate/chitosan	100-400 µm, 65%	In vitro	Misirli et al. (2005)
Doxorubicin	Alginate		Preclinical, pigs	D. Liu et al. (2006)
NA	Alginate/chitosan	100 4 00 μm	Preclinical, in vitro + rabbits	Eroglu et al. (2006)
Norcantharidin	Poly(lactic/glycolic acid)/alginate		Preclinical, rats	X. Liu et al. (2006)
Doxorubicin	Chitosan	10%	Preclinical VX-2 model	Kim et al. (2007)

La chimioembolisation avec des microsphères d'embolisation

Différentes microsphères non chargées ont déjà été testées chez l'Homme, dans les années 1960, dans le but de réaliser des embolisations (billes de plomb, d'acier inoxydable, de silicone). Cependant, la petite taille de ces microsphères et le reflux important dans les organes sains non ciblés ont augmenté les taux de complication chez les patients (38). En 1993, la première particule sphérique a été mise sur le marché européen, puis en 2000 sur le marché américain, sous le nom commercial d'Embosphere[™]. Le composant principal de cette microsphère est un polymère, le trisacryl (N-acryloyl-2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3 diol), initialement utilisé comme support dans les colonnes de chromatographie. Par la suite

d'autres microsphères ont été commercialisées, sans toutefois apporter de réelle innovation (Tableau 3): les EmboGold[™] qui contiennent un colorant à base d'or colloïdal rendant la microsphère visible à l'œil nu, les Contour SE[™] composées d'alcool de polyvinyle (PVA) et les Bead Block[™] qui sont des microsphères colorées à base de PVA.

Type d'embole	Sphérique				
Matériaux	Acrylique	PVA			
Noms commerciaux	Embosphere TM Bead Block ^{TI}				
Mise sur le marché	1993 2003				
Principales propriétés	 Occlusion distale Non résorbable 	 Occlusion distale Non résorbable 			
Photographies des produits					
Photographies de coupes histologiques avec emboles (*)					

Tableau 3: Exemple de microsphères non chargeables (39)

Il faudra attendre les années 2000 pour que des microsphères chargées en principes actifs soient certifiées conformes aux normes européennes. Elles sont considérées comme des dispositifs médicaux de classe IIb. Leur développement est le résultat de l'expérience obtenue grâce aux travaux des équipes japonaises, dans les années 1980, sur les particules d'embolisation et de l'expérience clinique de l'embolisation avec des microsphères non chargées. Il existe trois types de microsphères chargeables en principe actif ayant reçues le marquage CE :

- Les microsphères Bead Block[™] (Biocompatibles, UK) sont destinées à être chargées avec de l'ibuprofène pour réduire les douleurs post-embolisation des fibromes utérins.
- Les DC BeadTM (Biocompatibles, UK) et les HepasphereTM (Biosphere Medical, USA) peuvent quant à elles être chargées avec différents agents anticancéreux (comme la doxorubicine, l'irinotecan ou l'oxaliplatine) et sont principalement destinées au traitement des CHC.

A notre connaissance, ces microsphères de chimioembolisation sont les seuls dispositifs médicaux implantables à proposer un chargement extemporané du principe actif.

Déroulement de la chimioembolisation avec des microsphères d'embolisation

Au préalable, le patient est soumis à un examen radiologique avec produit de contraste permettant une exploration vasculaire complète : cathétérisme fémoral, aortographie, tronc coeliaque, artère mésentérique supérieure et recherche de vascularisations accessoires éventuelles (artères diaphragmatiques, surrénaliennes, intercostales). Ces informations sont nécessaires au radiologue interventionnel pour se repérer au sein du système vasculaire hépatique et tumoral le jour de la CHE.

La préparation de la seringue contenant les microsphères est réalisée, généralement la veille de la CHE, dans les pharmacies à usage intérieur sous hotte à flux d'air laminaire ou sous isolateur. En effet, la stabilité des solutions de microsphères chargées est de plusieurs jours (15 jours pour DC BeadTM et HepasphereTM chargées avec 75 mg de doxorubicine). Le jour de la CHE, la seringue est livrée prête à l'emploi.

La chimioembolisation s'effectue sous une anesthésie locale. Le médecin insère un cathéter (flexible et radio-opaque à son extrémité) dans le système vasculaire du patient via l'artère fémorale et le dirige, en temps réel sous contrôle radioscopique, pour atteindre l'artère hépatique puis la lésion à traiter. Juste avant injection, le radiologue ajoute quelques millilitres d'un produit de contraste non ionique par un robinet 3 voies dans la seringue contenant les microsphères chargées. Le mélange microsphères chargées/produit de contraste est ensuite homogénéisé par simple retournement. L'injection des microsphères se fait de la manière la plus sélective possible (lobaire si la lésion est très volumineuse sinon segmentaire ou sous-segmentaire). En cas de vascularisation accessoire, l'injection est réalisée dans les branches accessoires le plus en distalité possible. Le radiologue vérifie l'occlusion et le ralentissement du flux à l'aide d'un produit de contraste iodé injecté à la fin de la procédure.

Syndrome postembolisation

Les effets secondaires les plus fréquents après chimioembolisation sont la survenue de fièvre, de douleurs hépatiques et de nausées ou vomissements regroupés sous le terme de syndrome postembolisation (Tableau 4). Ce syndrome survient dans 70% à 100% des cas lors d'une embolisation ou d'une chimioembolisation lipiodolée (22, 23, 40). Ces symptômes sont habituellement bien contrôlés par un traitement adapté. Le problème est d'éviter que les effets

secondaires de la chimioembolisation chez des patients fragiles ne viennent annihiler les bénéfices obtenus grâce à la régression tumorale. Plusieurs études ont finalement démontré que l'utilisation des microsphères engendre une diminution du taux de complication expliquant en partie les bons résultats obtenus en termes de survie des essais randomisés les plus récents.

	Fréquence / Nb total de cures		Fréquence/Nb de patients		
	GETCH [4]	LO [9]	GETCH [4]	LLOVE	ET [10]
	n = 148 (CEL)	n = 192 (CEL)	n = 50 (CEL)	n = 40) (CEL)	n = 37 (E)
Fièvre > 38°C	49	33	76	-	-
Douleurs abdominales	55	26	80	-	-
Vomissements	57	17	80	-	-
Hémorragie digestive	3	4	8	0	3
Cholécystite	1	0	4	5	5
Abcès	0	0,5	0	0	3
Leucopénie	0	-	0	5	0
Défaillance hépatique	32	7	58	0	3

Tableau 4: Fréquence des principales complications survenant après embolisation (E) et chimioembolisation lipiodolée (CEL)

D. Evaluer la réponse tumorale au traitement

Les critères d'évaluation de la réponse tumorale des tumeurs solides ont été fixés par le RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) (41, 42), l'EASL (European Association for the Study of the Liver) (43) et la WHO (World Health Organization) (44) (Tableau 5). La réponse au traitement est évaluée sur la présence ou non de lésions après le traitement (réponse complète), une diminution de celles-ci (réponse partielle), une stabilisation ou une progression des lésions.

Paramètres	OMS	EASL	RECIST	mRECIST
Méthode d'évaluation	Bidimensionnelle (somme des produits des deux plus longs diamètres mesurés perpendiculairement)	Bidimensionnelle, excluant les zones nécrosées* (somme des produits des deux plus longs diamètres mesurés perpendiculairement)	Unidimensionnelle (somme des plus longs diamètres)	Unidimensionnelle, excluant les zones nécrosées* (somme des plus longs diamètres)
Réponse complète	Disparition complète des lésions	Disparition des lésions viables ^{&}	Disparition complète des lésions	Disparition des lésions viables [®]
Réponse partielle	Réduction d'au moins 50 %	Réduction d'au moins 50 % des lésions viables ^{&}	Réduction d'au moins 30 %	Réduction d'au moins 30 % des lésions viables ^{&}
Maladie en progression	Augmentation d'au moins 20 % ou apparition de nouvelles lésions	Augmentation d'au moins 20 % des lésions viables [®] ou apparition de nouvelles lésions viables	Augmentation d'au moins 20 % ou apparition de nouvelles lésions	Augmentation d'au moins 20 % des lésions viables ^{&} ou apparition de nouvelles lésions viables
Maladie stable	Toute variation qui ne répond pas aux critères d'une réponse ou d'une maladie en progression			

* Absence de contraste.

[&] Tissu contrastant en phase artérielle.

Evaluer la réponse tumorale in vivo

Afin d'évaluer la réponse tumorale aux traitements, chez des patients participant à des études de phase II et III mais également au stade préclinique, il est essentiel de disposer de techniques précises. De nos jours, deux modalités d'imagerie sont fréquemment utilisées pour apprécier cette réponse tumorale, la tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (couplées à une injection de produit de contraste).

L'évaluation de la réponse tumorale nécessite toutefois d'être standardisée, par la détermination des examens de référence précédent le traitement, mais également par la détermination des lésions dites cibles et non cibles, ou encore en fonction de la progression de la taille de la tumeur (depuis la plus petite taille obtenue sous traitement *i.e.* examen nadir).

La WHO et le RECIST (version 1.0) ont publié des guides permettant d'évaluer la réponse tumorale aux traitements chimiothérapiques systémiques, à partir des mesures bidimensionnelles et unidimensionnelles des lésions (42, 45). Plusieurs études ont, par ailleurs, démontré que l'évaluation de la réponse tumorale était semblable avec les critères OMS et RECIST (46).

La réponse (ou la progression) tumorale, selon les critères RECIST 1.1, est établie à partir de l'évaluation unidimensionnelle des lésions cibles et non cibles. Une réponse au traitement étant considérée comme complète si plus aucune lésion n'apparaît, partielle si la taille tumorale a diminuée d'au moins 30% sur les lésions cibles ayant les plus grands diamètres, stable si la modification de la taille tumorale n'est pas suffisamment forte pour être

dans le cas d'une réponse partielle ou d'une progression tumorale (augmentation de la taille et/ou du nombre de lésions cibles et non cibles) (Figure 2).



Figure 2: Critères RECIST 1.1 pour l'évaluation de la réponse tumorale (47)

Cependant, il est à noter que les traitements locorégionaux, ou encore les thérapies ciblées, entrainent une dévascularisation totale ou partielle des tumeurs. Ainsi, ces critères d'évaluation basés sur les dimensions tumorales n'apparaissent pas applicables dans la mesure où ils ne tiennent pas compte de cet effet des traitements sur le CHC (41, 48, 49). En réponse à cette restriction qu'imposent les critères dimensionnels, l'EASL a proposé de nouveaux critères basés sur l'appréciation du tissu tumoral viable. Ces critères furent par la suite validés par l'American association for the study of liver diseases (ASSLD) puis intégrés à ceux communément employés, *i.e.* critères RECIST modifiés (Figure 3).



Figure 3: Critères RECIST modifiés pour l'évaluation de la réponse tumorale (47)

Dans les essais cliniques, le taux de réponse global est représenté par la proportion de patients ayant une réponse complète et une réponse partielle. On pourra toutefois noter qu'aucune méthode rigoureuse et uniforme n'est proposée afin de pallier les limites des critères RECIST modifiés, ces-derniers relevant principalement d'observations qualitatives que de données quantitatives (50).

Evaluer la réponse tumorale ex vivo

La méthode de référence pour évaluer l'effet antitumoral d'un traitement est l'examen histopathologique. Cet examen est réalisé par un médecin anatomopathologiste et a pour but d'identifier les modifications tissulaires. Il repose sur l'utilisation de colorants (hématoxyline éosine safran par exemple) ou marqueurs spécifiques (ex : TUNEL pour visualiser l'apoptose) sur des coupes tissulaires permettant ainsi de mettre en évidence les zones viables ou nécrosées du tissu tumoral.

La quantification de ces modifications post-traitement est de plus en plus réalisée à partir de lames digitales ou lames numérisées. La microscopie digitale permet la normalisation de la numérisation et l'affichage des images microscopiques sur un écran d'ordinateur. Elle améliore de fait la précision, la fiabilité et la reproductibilité de la quantification en mettant en évidence les erreurs possibles d'interprétation en microscopie manuelle (51). Ainsi, à partir d'images numérisées, la mesure de l'intensité des colorations a été reconnue comme étant plus précise que celle faite avec des microscopes classiques dont un manque de calibrage peut entraîner une variation d'interprétation, les lames histologiques semblant alors différentes d'un microscope à l'autre (52). Cependant, la quantification de zones tissulaires d'intérêt est réalisée par contournement ce qui nécessite un niveau d'expertise obligatoire pour les identifier et beaucoup de temps de manipulation (Figure 4).



Rouge: zone de nécrose / vert: circonférence de la tumeur



Figure 4: Quantification de la nécrose tumorale avec la méthode du contournement des zones (53)

Les méthodes de quantification sur lames sont plus avancées dans le domaine de l'immunomarquage. En effet, le développement d'algorithmes pour analyser les images numérisées permet d'automatiser le processus de quantification d'évènements fluorescent (54). Ces algorithmes commencent à être développés pour l'analyse de lames colorées ce qui permettrait une meilleure standardisation et une interprétation plus quantitative des analyses effectuées sur coupes tissulaires (54).

Chapitre 2: Les microsphères d'embolisation chargeables dirigées contre le carcinome hépatocellulaire

A. Principales caractéristiques des DC BeadTM et des HepasphereTM

Les microsphères d'embolisation présentent certaines caractéristiques permettant une occlusion ciblée:

- Elles sont hydrophiles pour permettre leur transit dans le cathéter et éviter leur agglutination dans le réseau vasculaire
- Elles sont calibrées pour pouvoir contrôler le niveau d'occlusion et leur répartition dans le réseau vasculaire tumoral
- Elles sont élastiques pour pouvoir se déformer lors du passage dans le cathéter et ensuite reprendre leur forme initiale. Une microsphère trop rigide ne pourrait pas être injectée avec un cathéter de faible diamètre alors qu'une microsphère trop molle risquerait d'occlure un vaisseau distal de diamètre inférieur à celui de la bille
- Elles sont biocompatibles pour éviter des réactions inflammatoires chroniques ou plus rarement une immunisation dirigée contre des matériaux de la bille

Le mode de chargement du principe actif diffère entre les microsphères DC BeadTM et les HepasphereTM. Les microsphères DC BeadTM fixent l'agent anticancéreux par interactions ioniques (mode de chargement actif). Le polymère dont elles sont constituées (PVA) est modifié par le greffage de fonctions ionisées négatives SO_3^- (Figure 5), on parle alors de microsphères fonctionnalisées. Ces groupements sulfonates chargés négativement vont pouvoir fixer des molécules anticancéreuses chargées positivement comme les anthracyclines (doxorubicine) ou l'irinotecan. Elles sont présentées en flacon sous forme hydratée dans une solution saline de 2 mL. Il existe cinq tailles différentes : les DC BeadTM M1 de calibre 70-150 µm, les DC BeadTM de calibre 100-300 µm, 300-500 µm, 500-700 µm et 700-900 µm (Figure 5). Les DC BeadTM M1 sont indiquées pour le traitement des métastases hépatiques alors que les autres calibres sont plutôt dirigés contre les tumeurs primitives du foie.

Chapitre 2: Les microsphères d'embolisation chargeables dirigées contre le carcinome hépatocellulaire



Figure 5: Présentation des différentes tailles de DC Bead[™] et du mécanisme de chargement de la doxorubicine (http://www.btg-im.com/products)

Les Hepasphere[™] se chargent en principe actif par absorption (mode de chargement passif) et par interactions ioniques (mode de chargement actif). Elles sont constituées d'un copolymère de PVA/acrylate de sodium sur lequel sont greffées des fonctions carboxylates COO⁻ (Figure 6). Le mode de chargement passif fonctionne suivant le principe de l'éponge. La microsphère va absorber le principe actif à travers les mailles du polymère sans qu'une affinité particulière entre le principe actif et la microsphère ne soit nécessaire, contrairement au mode de chargement actif. Les groupements carboxylates vont pouvoir fixer les molécules chargées positivement de la même façon que les DC Bead[™]. Elles sont présentées en flacon de 25 mg ou de 50 mg sous forme déshydratées. Il existe 4 tailles différentes : 30-60µm, 50-100µm, 100-150µm et 150-200µm (Figure 6). Les Hepasphere[™] sont indiquées pour le traitement des métastases et des tumeurs primitives hépatiques.

Chapitre 2: Les microsphères d'embolisation chargeables dirigées contre le carcinome hépatocellulaire



Figure 6: Présentation des différentes tailles d'HepasphereTM et mécanisme de chargement de la doxorubicine (www.merit.com/products/media)

B. Études précliniques sur les microsphères d'embolisation

Il existe différents modèles de tumeurs expérimentales mimant le CHC. Ces modèles sont utilisés comme des « substituts » aux systèmes biologiques humains et fournissent une base pour développer ou comprendre les nouveaux traitements, notamment en radiologie interventionnelle. Ces modèles sont développés chez le petit animal comme la souris (55, 56), le rat (57) ou le lapin (58) mais aussi sur un animal plus proche de l'échelle humaine comme le porc (59). Bien que Li *et al.* ont réalisé une CHE transartérielle chez le rat (57), les techniques de radiologie interventionnelle sont difficilement applicables à l'échelle des rongeurs. Les modèles développés chez le lapin (tumeur VX2) et le porc se sont révélés plus pertinents car il est possible d'utiliser le même matériel que chez l'homme pour la procédure de CHE. La tumeur VX2 développée chez le lapin présente néanmoins plusieurs avantages en comparaison de celle développée chez le porc (60, 61):

- La croissance tumorale est plus rapide : 15 jours pour la tumeur VX2 contre 10 à 12 mois pour la tumeur développée chez le porc
- Moins de contraintes concernant l'hébergement des animaux

- Pas de risque pour les manipulateurs : la tumeur développée chez le porc est induite par une molécule carcinogène (N-nitrosodiethylamine)
- Moindre coût

Ces différents arguments ont également favorisé l'utilisation du modèle de foie de porc sain par rapport au modèle tumoral.

La tumeur VX2 développée chez le lapin

La tumeur VX2 développée dans le foie de lapin est considérée comme un modèle de référence pour étudier le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dirigées contre le CHC et notamment pour évaluer les thérapies ciblées comme la chimioembolisation (61).

Origine et caractéristiques

Le virus du papillome de Shope est à l'origine de papillomes qui peuvent évoluer vers un carcinome épidermoïde. Les carcinomes V (V pour virus, aussi appelés VX) correspondent à des séries de tumeurs transplantables dérivées de ces carcinomes épidermoïdes (62). La série la plus utilisée est la série n°2, appelée carcinome VX2. Le génome du virus du papillome de Shope, au départ conservé dans les cellules carcinomateuses, a fini par ne plus être détectable, faisant du carcinome VX2 une tumeur classique sans aucun agent étiologique détectable (63, 64).

Il peut être transplanté dans toutes les lignées de lapins. Cette tumeur présente un mode de croissance invasif après implantation sur à peu près n'importe quelle région du corps de l'animal, grâce à la néovascularisation qu'il développe (65). L'inconvénient majeur de ce modèle expérimental est l'apparition de nécrose spontanée après 15 jours de développement (de 30 à 40%) (65-67). En raison de sa croissance rapide, l'apport sanguin peut s'avérer insuffisant dans certaines régions tumorales et entrainer la formation d'une nécrose ischémique. Ce phénomène peut être gênant dans le cadre de l'évaluation d'un traitement comme la CHE avec des microsphères entrainant également une ischémie. Pour pallier cet inconvénient, l'équipe de Pascale *et al.* a proposé un modèle VX2 modifié (61) issu d'une lignée cellulaire VX2 transfectée pour exprimer de façon stable le facteur VEGF (vascular endothelial growth factor). Les auteurs ont pu réduire de façon significative le taux de nécrose spontanée comparée à la tumeur VX2 initiale (Figure 7).



Figure 7: Pourcentage de nécrose spontanée pour la tumeur VX2-VEGF modifiée et VX2 initiale (61)

Le modèle tumoral VX2, développé dans le foie de lapin, est sensible aux chimiothérapies (68, 69) et a prouvé son utilité en radiologie interventionnelle puisqu'il est compatible avec le matériel utilisé en pathologie humaine, comme les cathéters par exemple (70-72). C'est le modèle expérimental le plus utilisé pour tester les nouveaux traitements locorégionaux comme la CHE.

Données précliniques sur les HepasphereTM

L'équipe de Maeda *et al.* a récemment utilisé ce modèle pour caractériser le profil pharmacocinétique et l'efficacité des HepasphereTM chargée en cisplatine. Les auteurs ont montré que cette combinaison était bien tolérée par les animaux et ont prouvé son action antitumorale en comparant l'évolution de la taille de la tumeur entre un groupe d'animaux embolisés avec des HepasphereTM non chargées et un autre utilisant des HepasphereTM chargées en cisplatine (73).

En 2011, Gupta *et al.* ont comparé le profil pharmacocinétique des Hepasphere[™] chargées en doxorubicine à ceux d'une injection intraartérielle et d'une CHE lipiodolée (74). Ils ont démontré que la concentration plasmatique de doxorubicine était significativement abaissée dans le groupe de lapins embolisés avec les Hepasphere[™] (Figure 8).

Chapitre 2: Les microsphères d'embolisation chargeables dirigées contre le carcinome hépatocellulaire



Figure 8: Pic de concentration plasmatique de doxorubicine en fonction de la technique utilisée (74)

Les auteurs ont également démontré que la doxorubicine diffusait dans le tissu situé autour des vaisseaux occlus par les microsphères, et ceci jusqu'à une distance de 1600 µm. Ils ont également montré que la quantité d'anticancéreux dans le tissu tumoral après 24h de traitement était plus importante en comparaison des deux autres techniques étudiées (Figure 9).



Figure 9: Détection et quantification de la doxorubicine tissulaire autour des vaisseaux occlus (74)

Une étude publiée en 2010 a montré l'effet additif de l'embolisation utilisant des microsphères chargées en comparaison de l'utilisation de microsphères non chargées (75). Les auteurs ont montré qu'après 3 jours de traitement, 90% des cellules tumorales VX2 était
nécrosées chez les animaux ayant reçu des Hepasphere[™] chargées en doxorubicine contre seulement 60% pour le groupe Hepasphere[™] non chargées (Figure 10).



Figure 10: Quantification de la nécrose tumorale après CHE avec des Hepasphere™ chargées en doxorubicine et non chargées en fonction du temps (http://www.btg-im.com/products, (75))

Données précliniques sur les DC BeadTM

Une étude de 2006 rapportait déjà les bénéfices de l'utilisation des microsphères DC Bead[™] pour emboliser une tumeur solide du foie (76). Les auteurs ont trouvé une concentration plasmatique de doxorubicine plus faible et une concentration tumorale plus élevée avec les DC Bead[™] par comparaison avec une injection intraartérielle (IA), une injection intraartérielle couplée à des microsphères non chargées ou encore une CHE lipiodolée avec de la doxorubicine (Figure 11).

Chapitre 2: Les microsphères d'embolisation chargeables dirigées contre le carcinome hépatocellulaire



Figure 11: Comparaison de la concentration plasmatique et tumorale de doxorubicine en fonction de la technique d'embolisation et du temps (76)

Les auteurs ont également montré une nécrose tumorale complète après 7 jours de traitement dans le groupe DC BeadTM qui n'atteignait pas plus de 35% dans les groupes contrôle, hormis pour le groupe CHE lipiodolée où les valeurs ont atteint 90% (76). Des travaux similaires menés par l'équipe de Rao *et al.* ont démontré que l'utilisation de DC BeadTM chargées en irinotecan engendrait une diminution du niveau plasmatique, une augmentation de la concentration tumorale et un pourcentage de nécrose (à 24h) plus important que l'injection intraveineuse ou intraartérielle d'irinotecan (77).

Le foie de porc

Origine et caractéristiques

Dans la littérature, le modèle de CHC développé chez le porc n'est pas associé à l'étude de la CHE. Cela s'explique en partie par la méthodologie employée pour obtenir ces tumeurs. La tumeur est induite par l'injection intrapéritonéale hebdomadaire d'une substance carcinogène, le N-nitrosodiethylamine, sur une période de 3 mois. Après intervention, 10 à 12 mois sont nécessaires pour obtenir des lésions. Le temps de développement trop important et l'obtention de plusieurs petites tumeurs s'éloignent de l'aspect du CHC observé chez l'être humain (59). De plus, cette méthode n'est pas sans risque pour le manipulateur qui doit manipuler la substance cancérigène.

En outre, l'anatomie du foie de porc est assez similaire à celle de l'être humain, et sa taille permet l'utilisation des mêmes dispositifs médicaux. Ces caractéristiques rendent donc

le modèle de foie de porc sain très utile pour étudier le comportement des microsphères plutôt que leur efficacité antitumorale. Cette dernière application étant préférentiellement testée sur les tumeurs VX2 du lapin comme expliquée précédemment.

Données précliniques sur les DC BeadTM

Plusieurs équipes ont travaillé sur le foie de porc non tumoral. En 2006, Lewis *et al.* ont étudié le profil pharmacocinétique et la tolérance aux DC BeadTM chargées en doxorubicine (100-300 μ m et 700-900 μ m) en comparaison de microsphères non chargées (100-300 μ m) (78). Ils ont montré un effet antitumoral plus important avec les microsphères chargées et une bonne tolérance au traitement.

La diffusion de la doxorubicine autour des vaisseaux occlus par des DC BeadTM a été démontrée par Namur *et al.* en 2102, qui ont déterminé la concentration tissulaire de DOX ainsi que celle à l'intérieure des microsphères après 28 et 90 jours de traitement (79). Cette étude portait sur la comparaison entre des DC BeadTM de taille 100-300 μ m et 900-700 μ m chargées en doxorubicine. Ils ont prouvé qu'après 90 jours de traitement, il existait encore une diffusion du principe actif à des concentrations cytotoxiques et que la doxorubicine était encore présente dans les microsphères (Figure 12).



Figure 12: Concentration de doxorubicine tissulaire et dans les microsphères après 28 et 90 jours (DEB=drug eluting beads) (79)

Une autre étude a comparé la concentration locale et le profil pharmacologique de la doxorubicine entre les DC Bead[™] et la CHE lipiodolée (80). Dans cette étude le groupe contrôle était composé d'animaux ayant reçus une injection intraveineuse de doxorubicine. Ils ont montré que comparé à la CHE lipiodolée, l'exposition systémique était significativement diminuée avec les microsphères. Cependant la concentration tissulaire était plus importante

dans le groupe CHE lipiodolée s'expliquant par l'élution plus lente de la doxorubicine hors des microsphères.

Plusieurs études précliniques ont donc validé le concept des microsphères d'embolisation en tant que vecteur de principe actif et d'agent d'occlusion vasculaire. Les résultats obtenus doivent être vérifiés chez l'être humain par la suite. Le contexte biologique étant différent, le traitement peut ne pas avoir la même efficacité ou engendrer certaines complications.

C. Utilisation clinique des microsphères d'embolisation

Les microsphères d'embolisation chargées présentent donc deux propriétés intéressantes. D'une part, elles embolisent les vaisseaux alimentant la ou les tumeurs hypervascularisées induisant une ischémie (15) et d'autre part, elles libèrent au contact des cellules tumorales, un agent anticancéreux de façon contrôlée et prolongée. Cette seconde propriétés limite la dissémination systémique et entraine une bonne tolérance du traitement. L'objectif de la CHE avec des microsphères est d'accroître l'efficacité antitumorale avec une réponse prolongée au traitement et une diminution du taux de complications.

Données cliniques sur les HepasphereTM

La 1^{ère} étude utilisant des Hepasphere[™] pour traiter des patients atteints de CHC non opérables a été publiée en 2002 (81). Elle concernait 6 patients et portait sur l'étude de 9 nodules tumoraux au total. Les auteurs ont observé une nécrose complète ou quasi complète pour 6 nodules et une nécrose partielle pour 3 nodules, sans dommages ischémiques du parenchyme hépatique et sans détérioration de la fonction hépatique. La même équipe a démontré sur 59 patients que les Hepasphere[™] non chargées étaient bien tolérées avec un taux de survie à 2 ans de 83% (82) et un taux de réponse tumorale de 66%. Aucune complication majeure n'a été observée et le syndrome postembolisation était minime chez tous les patients traités. Par la suite, une étude italienne multicentrique incluant 50 patients traités par des Hepasphere[™] chargées en doxorubicine ou en épirubicine a été publiée en 2008 (83). Les auteurs ont montré un taux de réponse objective à 6 mois de 77% selon les critères RECIST (Figure 13).



Réponse tumorale à 1 mois (rouge) et 6 mois (bleu)

Une autre étude italienne a démontré que les Hepasphere[™] pouvaient être chargées en oxaliplatine et appliquées en traitement de métastases hépatiques issues d'un cancer colorectal (8 patients) et de cholangiocarcinomes hépatiques inopérables (7 patients). Ils ont comparé les résultats obtenus avec ceux d'une chimiothérapie classique utilisant l'oxaliplatine et ont montré une diminution du pic plasmatique ainsi qu'une concentration tumorale de

l'oxaliplatine 28 fois supérieure avec les microsphères (84).

Deux études ont été publiées par l'équipe de Seki *et al.* en 2012 et 2011. La première a évalué l'efficacité et la tolérance d'une CHE avec les HepasphereTM chargées avec du cisplatine après un échec d'une CHE avec les HepasphereTM chargées avec de l'épirubicine (85). Les auteurs ont montré que le traitement était bien toléré par les patients et qu'il était efficace contre les CHC résistant à la 1^{ère} série de traitement. La seconde étude a montré sur 135 patients atteints de CHC que l'utilisation de microsphères chargées en épirubicine présentait un taux de complication inférieure à 18%, une réponse tumorale à 6 mois de 53%, un taux de survie à 1 an de 74% et à 2 ans de 59% (86).

Une étude de phase II sur 30 patients (14 patients CHE lipiodolée et 16 patient CHE Hepasphere[™]) a montré une diminution significative de la concentration systémique de doxorubicine et une fonction hépatique mieux préservée chez les patients traités par des Hepasphere[™] (87) (Figure 14). Les auteurs ont également rapporté un taux de complications significativement plus bas chez les patients traités par les microsphères. Cependant le taux de réponse tumoral n'était pas différent d'un groupe à l'autre.

Chapitre 2: Les microsphères d'embolisation chargeables dirigées contre le carcinome hépatocellulaire



Figure 14: Concentration/pharmacocinétique plasmatique de doxorubicine et étude de la fonction hépatique (87)

L'étude la plus récente a prouvé l'efficacité des HepasphereTM 30-60 μ m, chargées en doxorubicine, sur 45 patients atteints de CHC. Les microsphères ont bien été tolérées par les patients, le profil pharmacocinétique a montré un pic de doxorubicine plasmatique plus faible que chez les patients traités avec une CHE lipiodolée. Le taux de réponse objective était de 68% et le taux de survie médian à 1 an de 100% (88).

Données cliniques sur les DC BeadTM

Les études utilisant les DC BeadTM sont plus représentées dans la littérature. La première étude effectuée en 2007, sur 27 patients atteints de CHC non opérables et traités par des DC BeadTM (300-500 μ m) chargées en doxorubicine, a rapporté un taux de réponse de 66% selon les critères de l'EASL, un taux de complications de 7% et un taux de survie à 2 ans de 89% (89). La concentration plasmatique de doxorubicine était inférieure avec les microsphères en comparaison d'une CHE lipiodolée seule ou d'une CHE lipiodolée complétée avec une occlusion des vaisseaux par un matériau (Gelfoam®) (Figure 15).



Figure 15: Comparaison de la concentration sérique de doxorubicine entre une CHE avec DC Bead™ et une CHE lipiodolée plus Gelfoam® (89)

L'équipe de RT poon *et al.* a ensuite poursuivi avec une étude de phase I/II et a obtenu sur 30 patients traités une réponse tumorale partielle au traitement de 63% et complète de 7% (90). Ces résultats encourageants ont été confirmés par une autre étude, portant sur le traitement de 62 patients avec des CHC non opérables. Les auteurs ont rapporté un taux de réponse objective à 9 mois de 80% selon les critères EASL et un taux de complications de 3,2% (91). Depuis ces études publiées en 2007-2008, de nombreuses autres études, menées sur des patients atteints d'un CHC non résécable, ont confirmé l'efficacité des CHE utilisant des microsphères chargées et le faible taux de complications associées (92-94) (Tableau 6).

Report (reference)	Study design	n	Particle size (µm)	Doxorubicin dose (mg)	Repeat	Response rate (criteria)	Procedure-related complications (n)
Varela et al. [37]	P-I/II	27	500700	47-150	At 2 months	67 % at 6 months (EASL)	Liver abscess (2)
Poon et al. [38]	P-I/II	35	500700	-150	At 2 months	70 % at 5 months (mRECIST)	Tumor rupture (1)
							Liver failure (1)
							Pleural effusion (1)
							Gastric ulcer bleeding (1)
							Esophageal variceal bleeding (1)
							Spontaneous bacterial peritonitis (1)
Malagari et al. [39]	Р-Ш	62	100-300, 300-500	-150	At 3 and 6 months	81 % at 9 months (EASL)	Cholecystitis (1)
							Liver abscess (1)
Reyes et al. [40]	Р-П	20	100-300, 300-500	50-100	As needed	60 % at 1 month (EASL)	Tumor rupture (1)
							Pancreatitis (1)
Lammer et al. [43]	P-II, RCT	93	300-500, 500-700	-150	At 2 and 4 months	52 % at 6 months (EASL)	Liver failure (2)
							Gastrointestinal bleeding (1)
							Infection (1)
Malagari et al. [44]	P-II, RCT	41	100-300, 300-500	-150	At 2 and 4 months	73 % at 6 months (EASL)	Liver failure (2)
							Liver abscess (2)
							Cholecystitis (2)

Tableau 6: Essais cliniques récents avec les DC BeadTM pour traiter les CHC non opérables (95)

P-I/II phase-I/II study, P-II phase-II study, RCT randomized controlled trial, mRECIST modified RECIST

Il a également été démontré que l'élution de l'anticancéreux, dans le tissu situé autour des vaisseaux occlus par des DC BeadTM (sur 6 explants de foie de patients), pouvait s'effectuer sur une période de plus d'un mois (Figure 16) (96).



Figure 16: Concentration tissulaire de doxorubicine à différents délais d'embolisation et en s'éloignant progressivement du vaisseau embolisé (DC BeadTM) (96)

Des études ont comparé les différentes techniques d'embolisation pour prouver l'avantage des microsphères d'embolisation chargées en anticancéreux par rapport aux autres techniques. Cependant, un essai clinique de phase II utilisant des microsphères sur 102 patients et la CHE lipiodolée sur 110 patients (92) n'a pas réussi a démontré une différence significative concernant la réponse objective tumorale (réponse complète + réponse partielle). On notera cependant que la réponse objective tumorale était significativement différente chez les patients atteints d'un stade avancé du CHC et que le taux de complication était globalement moins élevé avec une CHE utilisant des microsphères.

Song *et al.* confirment, en 2011, l'efficacité des microsphères sur les stades avancés de CHC (tumeur > 5 cm) en comparaison de la CHE conventionnelle (lipiodolée) (97). Les auteurs ont trouvé une meilleure réponse objective avec le traitement par microsphères (Figure 17) et un taux de survie significativement supérieur après 36 mois.

Chapitre 2: Les microsphères d'embolisation chargeables dirigées contre le carcinome hépatocellulaire



Figure 17: Réponse tumorale chez les patients traités avec des DC Bead™ et par CHE lipiodolée (97)

L'étude de Malagari *et al.* publiée en 2010 a comparé la CHE utilisant des DC BeadTM chargées en doxorubicine (41 patients) versus des BeadBlockTM non chargées (43 patients). Les auteurs ont montré que la CHE avec des microsphères chargées induisait un taux de réponse tumorale significativement plus important (55% versus 32%) (Figure 18) et un taux de récurrence des lésions (locale ou nouvelle lésion) plus faible (93). Cependant, aucune différence n'a été observée, entre les 2 groupes, concernant le taux de survie.



Figure 18: Comparaison d'une CHE avec DC BeadTM chargées en doxorubicine et des BeadBlockTM non chargées: taux de réponse complète et objective (6 mois et 9 mois). Pourcentages de récurrence après 6 et 12 mois (93)

Une étude plus récente n'a pas réussi à prouver l'avantage de l'utilisation des microsphères (89 patients) comparé à la CHE lipiodolée (88 patients) en terme de survie ou de réponse tumorale (98). Le seul avantage avancé était un taux de complication moins élevé avec utilisation de microsphères.

Pour conclure, l'efficacité supérieure d'une CHE utilisant des microsphères comparée à une CHE lipiodolée n'est pas encore établie. Ces deux techniques semblent équivalentes quand la sélection des patients est réalisée de façon pertinente. En outre, plusieurs études ont démontré la faisabilité de la CHE avec des microsphères d'embolisation chargées, leur bonne tolérance par les patients traités et certains bénéfices en termes de taux de survie et de taux de complications.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'utilisation des microsphères d'embolisation vise à standardiser la procédure de la CHE mais il persiste une grande disparité dans les solutions injectées. Les études réalisées pour le moment différent dans le choix du type et de la taille des microsphères mais également au niveau du choix et de la concentration en principe actif. A l'heure actuelle, il est donc important de mieux comprendre le comportement de ces microsphères *in vivo* en termes de propriétés d'élution et d'efficacité antitumorale dans le but de standardiser et surtout d'optimiser la procédure.

L'application des microspectroscopies vibrationnelles infrarouge et de fluorescence a déjà été validée pour l'étude des microsphères d'embolisation (79, 96, 99). Ces deux techniques, informatives et complémentaires, se sont révélées applicables pour notre étude. La microspectroscopie infrarouge a été utilisée pour mesurer sur une coupe histologique la concentration du principe actif toujours présent dans la microsphère (ibuprofène, irinotecan et doxorubicine). La technique est potentiellement applicable à tout type de médicament et à tout type d'implant chargé. La microspectroscopie de fluorescence a permis de mesurer la concentration et la distribution de doxorubicine dans le tissu autour de la bille. La mise en œuvre des microspectroscopies est simple et rapide. La résolution spatiale est satisfaisante compte tenu de la taille des microsphères (Tableau 7).

	Microspectroscopie infrarouge	Microspectroscopie de fluorescence
Limite de détection	10-3 M	10-7 M
Résolution spatiale	10 µm	250 nm

Tableau 7: Limite de quantification et résolution spatiale des microspectroscopies infrarouge et de fluorescence

De plus, elles peuvent toutes les deux êtres appliquées directement sur une coupe de tissu sans préparation particulière. La coupe ayant servi à l'acquisition spectroscopique peut ensuite être utilisée pour une caractérisation morphologique et fonctionnelle, soit par les techniques classiques d'histologie, soit par l'imagerie infrarouge (100-102). On peut ainsi effectuer sur le même échantillon : la quantification du principe actif dans les microsphères, visualiser sa distribution tissulaire et quantifier ses effets sur le tissu cible.

A. Généralités

Le rayonnement électromagnétique peut être décrit comme la propagation d'énergie ou de particules (photons), grâce aux variations périodiques, à la fréquence v, d'un champ électrique et d'un champ magnétique (Figure 19).



Figure 19: Schéma représentatif d'une onde électromagnétique (103)

De manière générale une onde peut être caractérisée par sa longueur d'onde (λ) ou par l'énergie *E* des photons qui lui sont associés selon la formule suivante :

$$E = hv = h * \frac{c}{\lambda}$$

avec : h constante de Planck (6,626*10⁻³⁴ J/s)

c vitesse de la lumière dans le vide $(3*10^8 \text{ m/s}^{-1})$

Lorsqu'un rayonnement est envoyé sur un échantillon, plusieurs types d'interactions peuvent se produire en fonction de l'énergie de l'onde électromagnétique et des propriétés de l'échantillon analysé. Le diagramme de Jablonski distingue trois types d'interactions : l'absorption, la diffusion et l'émission (Figure 20).



Figure 20: Diagramme de Jablonski (104)

Les microspectroscopies vibrationnelles d'absorption infrarouge et de diffusion Raman reposent sur l'interaction entre un rayonnement électromagnétique et la matière. D'après la mécanique quantique, l'énergie (E) d'une molécule est quantifiée, et peut être approximée comme la somme des énergies de rotation (Erot), de vibration (Evib) et d'état électronique (Eel) :

Nous nous intéresserons ici aux énergies de vibration des molécules. Dans le cas de molécules polyatomiques non linéaires de N atomes, on dénombre 3N-6 degrés de liberté pour les modes de vibration des liaisons atomiques. Ces modes de vibration correspondent à des élongations, à des déformations d'angles ou à des déformations hors du plan. Les modes de vibration sont schématisés ci-dessous (Figure 21). On associe à chacun de ces modes un nombre d'onde de vibration ν qui correspond à une transition entre deux niveaux d'énergie vibrationnelle de l'état électronique fondamental. La spectroscopie vibrationnelle consiste à déterminer les fréquences de vibrations des molécules de l'échantillon analysé. Ces fréquences dépendent de l'énergie des liaisons entre les atomes d'une molécule. Il est donc possible de déduire d'un spectre des informations sur la nature et la structure d'une molécule.





Figure 21: Modes de vibration de la molécule CH2 (105)

Les vibrations simples peuvent être classées en deux grands groupes : les vibrations d'élongation (stretching) et les vibrations de déformation (bending) qui se déclinent en fonction de leur symétrie. Les vibrations d'élongation, appelées aussi vibrations de valence, concernent la vibration de la molécule le long de l'axe des liaisons atomiques. Ce mouvement implique une variation de la distance interatomique de façon symétrique ou asymétrique (Figure 21). Les vibrations de déformation impliquent un changement de l'angle des liaisons atomiques et peut se traduire par une flexion ou une déformation dans le plan ou hors du plan des liaisons impliquées.

B. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Généralités (105)

Cette méthode est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge (IR) par l'échantillon analysé Le rayonnement infrarouge a été découvert en 1800 par l'astronome Frédéric Wilhelm Herschel. C'est une radiation de nature électromagnétique, correspondant à la partie du spectre comprise entre 12500 cm⁻¹ et 10 cm⁻¹. La fenêtre spectrale de l'IR, se décompose en 3 parties : le proche infrarouge se situe entre 12500-4000 cm⁻¹ (0,8 μ m à 2,5 μ m), le moyen infrarouge entre 4000-400 cm⁻¹ (2,5 μ m à 25 μ m) et le lointain infrarouge entre 400-10 cm⁻¹ (25 μ m à 1000 μ m). Nous nous intéresserons plus particulièrement à la région du moyen infrarouge (MIR), qui correspond au domaine des transitions moléculaires observées dans les échantillons organiques et inorganiques (Figure 22).



Figure 22: Spectre électromagnétique situant le domaine infrarouge (101)

En 1924, des scientifiques se sont aperçus que l'énergie du rayonnement infrarouge moyen coïncidait avec celle des vibrations fondamentales des molécules. Ainsi, la relation entre l'absorption d'un rayonnement IR par une molécule et sa structure moléculaire est mise en évidence. Le rayonnement IR permet l'analyse des fonctions chimiques présentes au sein d'un échantillon. Le rayonnement du proche infrarouge, qui est plus énergétique, permet d'étudier les vibrations harmoniques, alors que le rayonnement de l'infrarouge lointain, qui est moins énergétique, permet d'étudier les vibrations rotationnelles. Si les régions du proche IR et du lointain IR ont suscité un certain intérêt, l'utilisation de la spectroscopie moyen IR reste la plus adaptée pour l'étude de la composition moléculaire d'un échantillon.

Interaction rayonnement-matière

Lorsqu'une molécule est irradiée par un rayonnement IR, elle peut absorber partiellement et sélectivement ce rayonnement. Les liaisons chimiques qui la composent doivent être considérées comme des oscillateurs. Si une liaison oscille à la même fréquence que la composante électrique de l'onde lumineuse IR, celle-ci pourra transmettre son énergie à la liaison. Plus précisément, un rayonnement de fréquence donnée pourra être absorbé ce qui conduira à l'état excité, caractérisé par une amplitude de vibration plus élevée. De ce fait, l'énergie du rayonnement IR se retrouve diminuée après l'interaction, conduisant à l'apparition d'une bande d'absorption à cette fréquence. L'énergie absorbée est donc caractéristique de chacune des liaisons chimiques de la molécule analysée. Notons que s'il n'y a pas de dipôle permanent, c'est à dire si les charges électriques sont parfaitement symétriques, il n'y aura pas de couplage possible avec l'onde électromagnétique. Il n'y aura donc aucune absorption d'énergie. Les molécules polaires sont « transparentes » dans l'IR, on parle de transition inactive. Une transition active possède donc nécessairement un dipôle dont le module fluctue avec la distance interatomique.

Un spectre infrarouge est ainsi composé de nombreuses bandes d'absorption. Il représente l'absorbance A (ou la transmittance T) en fonction du nombre d'onde σ correspondant à l'inverse de la longueur d'onde λ (le nombre d'onde étant proportionnel à l'énergie du rayonnement). L'absorbance est définie par la loi de Bouguer-Beer-Lambert :

$$A(\sigma \text{ ou } \lambda) \log\left(\frac{Io}{I}\right) = \varepsilon(\sigma \text{ ou } \lambda) cl$$

avec Io intensité du rayonnement incident

I intensité du rayonnement transmis

 ε coefficient d'extinction molaire

c concentration de la substance absorbante

l épaisseur de l'échantillon

Dans le MIR, tout composé organique possède une signature qui lui est propre. C'est pour cette raison que cette technique est très souvent utilisée pour caractériser un échantillon. L'étude des spectres permet d'obtenir deux types d'informations :

- Informations qualitatives : les liaisons chimiques absorbent à une longueur d'onde caractéristique. Des tables IR permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques en présence et donc d'identifier la ou les molécules présentes.
- Informations quantitatives : l'intensité de la bande d'absorption rend compte de la concentration du groupe chimique caractéristique de cette absorption (loi de Bouguer-Beer-Lambert). Cependant cette linéarité n'est vérifiée que dans un domaine limité d'absorbance, situé en général entre 0.3 et 2.

Instrumentation

L'imageur IRTF Spotlight 300 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) est composé d'un microscope couplé à un spectromètre IR équipé de 2 détecteurs MCT refroidit à l'azote liquide (Figure 23). Un détecteur est composé de 16 éléments de 6.25 x 6.25 μ m² pour l'imagerie spectrale et l'autre de 100 x 100 μ m² pour l'acquisition de spectres points.



Figure 23: Schéma descriptif de l'imageur infrarouge Spotlight 300

Le microscope est connecté à une caméra permettant de visualiser et de sélectionner les zones d'intérêt à analyser sur l'échantillon. L'image visible est obtenue sous lumière blanche et son acquisition se fait à l'aide d'une platine motorisée. Grâce à ce système, il est possible de relier le spectre IR à des coordonnées spatiales (xy) et ainsi reconstruire une image spectrale de la zone analysée. Le système permet d'analyser une surface maximum de 1 cm². Le logiciel Spectrum image sert à l'acquisition et la reconstruction des images spectrales (Figure 24).



Figure 24: Image visible et image spectrale de microsphères d'embolisation (Logiciel Spectrum image)

Lors de l'acquisition des images IR, une source de lumière polychromatique (dans le moyen infrarouge) est focalisée sur l'échantillon à l'aide d'objectifs Cassegrain (mode transmission). Un système Z-fold permet de changer la taille du pixel de $6.25 \ \mu\text{m}^2$ à $25 \ \mu\text{m}^2$.



Figure 25: Représentation schématique de l'interféromètre de Michelson (101)

L'élément essentiel d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier est l'interféromètre de Michelson (Figure 25). Il mesure simultanément les intensités des différents nombres d'onde transmis (ou absorbés) sur toute la gamme spectrale définie. Ce

dispositif est constitué d'une lame séparatrice semi-réfléchissante (en fluorure de calcium pour le moyen IR) sur laquelle arrive le faisceau incident. Ce faisceau est séparé en deux faisceaux : l'un est réfléchi sur un miroir fixe, et l'autre passe à travers la séparatrice puis est dirigé sur un miroir mobile. Les deux miroirs sont positionnés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. Le miroir mobile se déplace à vitesse constante le long de son axe. Le premier faisceau parcourt un trajet optique fixe et le deuxième, un trajet optique de longueur variable selon la position du miroir mobile. Les deux faisceaux se recombinent ensuite sur la séparatrice mais les différences entre les chemins optiques empruntés par les faisceaux créent des interférences. Lorsque les deux faisceaux parcourent le même trajet optique, ils sont en phase (même longueur d'onde) et leurs intensités s'ajoutent. On parle dans ce cas d'interférences constructives. A l'inverse, lorsque le trajet optique est différent, les faisceaux arrivent en opposition de phase (longueur d'onde différente) et l'intensité est alors nulle. On parle dans ce cas d'interférences destructives (Figure 26).

Faisceaux en phase: interférence constructive

Faisceaux déphasés: interférence destructive



Figure 26: Interférences constructives et destructives (103)

L'ensemble des interférences constructives et destructives constituent l'interférogramme. Le faisceau modulé est ensuite réfléchi vers l'échantillon où il sera absorbé à certaines longueurs d'onde caractéristiques des liaisons atomiques impliquées. Le signal obtenu avec le détecteur MCT se présente comme un interférogramme contenant la somme de toutes les fréquences du faisceau absorbé par l'échantillon. Il est ensuite transformé en spectre infrarouge par une opération mathématique appelée transformée de Fourier, d'où l'appellation spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Le spectre infrarouge représente l'intensité en fonction de la fréquence ou nombre d'onde (Figure 27).



Figure 27: Principales étapes de l'obtention d'un spectre infrarouge (101)

Prétraitements des spectres infrarouges

Les prétraitements permettent de supprimer l'influence de phénomènes qui parasitent les spectres infrarouges. Ces phénomènes peuvent être d'ordre physique comme les effets de dispersion de la lumière tel que l'effet Mie qui peut être défini par la dispersion de la lumière par des particules sphériques de même taille que la longueur d'onde du rayonnement (106). Ils peuvent aussi être engendrés par le matériel utilisé (bruit de fond du détecteur) ou encore par des caractéristiques propres à l'échantillon analysé comme les différences d'épaisseur sur une coupe tissulaire. Ces étapes de prétraitements sont essentielles et doivent être appliquées avant toutes analyses statistiques ou chimiométriques pour obtenir un résultat représentatif et robuste. Les prétraitements sont réalisés en utilisant des fonctions mathématiques du logiciel OPUS 5,5 (Bruker).

Correction de la ligne de base

La correction de la ligne de base permet d'éliminer les distorsions et les dérives dues aux effets physiques. Lors de l'analyse d'un échantillon par spectroscopie infrarouge en mode transmission, un phénomène d'absorption de la lumière par l'échantillon est observé. D'autres phénomènes optiques comme les aberrations chromatiques ou le phénomène de diffusion et de diffraction de lumière peuvent être observés. Dans ces différents cas, une partie de la lumière transmise est alors déviée et n'est pas détectée. Ces phénomènes, entraînant une déformation de la ligne de base des spectres, dépendent de la longueur du trajet optique à travers l'échantillon et des propriétés physiques de l'échantillon. Cette dérive peut être rectifiée en procédant à la correction de la ligne de base. Celle-ci consiste à modéliser, sous la forme d'équations, les différentes variations souvent retrouvées dans les régions où il n'y a aucune bande d'absorption. La modélisation de ces variations spectrales est réalisée à partir de quelques points du spectre. Le nombre de points est défini par l'opérateur et la ligne de base passant par ces points est assimilée à une fonction polynômiale. L'allure de cette ligne de base est dépendante du degré du polynôme choisi et du nombre de points sélectionnés (107). Les variations spectrales ainsi modélisées sont ensuite soustraites point par point au signal observé.

Normalisation

La normalisation vectorielle est une opération mathématique qui consiste à ramener les spectres à une même échelle afin de pouvoir les comparer aussi bien sur le plan quantitatif que sur le plan qualitatif. La méthode de normalisation vectorielle calcule d'abord la moyenne des valeurs d'absorbance (y) du spectre dans la gamme sélectionnée. Cette moyenne est ensuite soustraite à chaque valeur du spectre, de manière à positionner le milieu du spectre à y = 0. Ensuite, la somme des carrés des ordonnées (y) est calculée puis le spectre est divisé par la racine de cette somme (108). Après la normalisation des spectres, seules les intensités relatives peuvent être comparées.

Prétraitements des images infrarouge

Les prétraitements des images infrarouge sont réalisés en utilisant des fonctions mathématiques du logiciel Matlab 7.2 (The Mathworks, Natick, MA).

Analyse en composantes principales

Pour le prétraitement des données, les spectres sont numérisés et sont assimilés à des vecteurs. La longueur du vecteur ($N\lambda$) dépend de la gamme spectrale et de la résolution spectrale. Un ensemble de Ns spectres constitue donc une matrice de données de dimensions $N\lambda \times Ns$. Les différentes variables (ici les nombres d'onde) contiennent des informations

redondantes, il est donc possible de réduire la dimension des données tout en conservant l'information liée à la variabilité (109). L'analyse en composante principale (ACP) est un outil de compression qui permet de remplacer les variables redondantes par des composantes principales qui sont en fait des combinaisons linéaires des variables initiales (110-112). L'ACP est une méthode de traitement couramment utilisée en spectroscopie (113-115).

Neutralisation de l'influence de la paraffine : l'EMSC

L'analyse des images infrarouge est effectuée sur la gamme spectrale 900-1800 cm⁻¹, considérée comme la zone la plus informative du spectre infrarouge. La majorité des échantillons analysés au cours de cette thèse proviennent de prélèvements inclus en paraffine. Hors, la paraffine absorbe dans le MIR aux longueurs d'ondes 1378 cm⁻¹ et 1467 cm⁻¹. Il est donc nécessaire de neutraliser son influence dans les spectres obtenus à partir de ces échantillons afin de ne conserver que les informations pertinentes lors des processus de classification et d'analyse statistique.

Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode de déparaffinage numérique appelé « extended multiplicative signal correction » (EMSC). L'EMSC a été développée dans le but de corriger les effets physiques de dispersion de la lumière sur les spectres infrarouge (116, 117). Récemment, elle a été adaptée pour neutraliser la contribution de la paraffine au sein des spectres infrarouge (100). Cette méthode intègre également la correction de la ligne de base des spectres et une normalisation vectorielle des données spectrales.

Un spectre infrarouge si peut être décrit de la façon suivante :

$$s_i = a_i \hat{s} + b_i I + c_i P + e_i$$

avec

ŝ

bi

$$\in \mathbb{R}^{1 \times n}$$
 un spectre de *n* nombres d'onde, représentatif des spectres
de l'échantillon (spectre moyen en général)

$$I \in \mathbb{R}^{k \times n} \qquad \begin{array}{c} \text{la matrice des } k \text{ spectres représentatifs de chaque} \\ \text{contaminant à retirer des données} \end{array}$$

$$\boldsymbol{P} = \begin{pmatrix} \boldsymbol{v}_1^0 & \cdots & \boldsymbol{v}_1^p \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \boldsymbol{v}_n^0 & \cdots & \boldsymbol{v}_n^p \end{pmatrix} \in \mathbb{R}^{(p+1) \times n} \quad \text{fonction polynomiale d'ordre } p \text{ représentant la déformation} \\ \text{de la ligne de base des spectres enregistrés} \end{cases}$$

$$e_i \in \mathbb{R}^{1 \times n}$$
 un vecteur d'erreur du model EMSC

$$a_i$$
 scalaire un coefficient d'approximation de s_i par \hat{s}

$$\in \mathbb{R}^{1 \times k}$$
 un vecteur de coefficients d'approximation de S_i par I

$$c_i \in \mathbb{R}^{1 \times (p+1)}$$
 un vecteur de coefficients d'approximation de s_i par **P**

Pour construire la matrice des contaminants **I**, le spectre moyen de plusieurs spectres enregistrés sur la paraffine pure n'est pas suffisant. En effet, en raison de leur hétérogénéité, il est nécessaire de réaliser en premier lieu une analyse en composantes principales sur ces spectres. On notera cependant qu'un test qualité est réalisé sur les spectres de paraffine en amont de l'analyse en composantes principales. Ce test, basé sur des rapports d'amplitude de pics, permet d'écarter les spectres trop bruités ou ne présentant pas un signal de paraffine bien défini. Le spectre moyen ainsi que les composantes principales les plus représentatives de la paraffine (ayant les plus grandes valeurs propres donc expliquant la plus grande variabilité du signal de la paraffine) constituent la matrice des signaux contaminants **I**.

Les trois coefficients a_i , b_i et c_i sont estimés par la méthode des moindres carrés dans le but de minimiser la somme des erreurs calculées sur chaque spectre $\sum_{j=1}^{n} \mathbf{e_{ij}}^2$, avec n le nombre de données à corriger. Les spectres corrigés de la contribution des contaminants et de la déformation de leur ligne de base peuvent alors s'écrire sous la forme :

$$s_{icorr} = a_i \hat{s} + e_i$$

Afin d'analyser les différences biochimiques existantes entre les différents pixels, et non les différences d'épaisseur de la coupe tissulaire, les spectres sont normalisés autour du spectre moyen \hat{s} selon l'équation :

$$s_{icorr}^{N} = \hat{s} + \frac{e_i}{a_i}$$

À la suite de la correction par EMSC, les spectres infrarouge peuvent être utilisés dans un processus de classification.

Traitements des images infrarouge

<u>Classification non supervisée des spectres : Classification K-</u> <u>means</u>

L'algorithme des K-means (KM) est un algorithme de classification non supervisée couramment utilisé en classification de données (100, 102, 118). Il est également appelé algorithme des centres mobiles ou des K-moyennes. Il admet un paramètre devant être fixé a priori par l'utilisateur, à savoir le nombre de classes désirées, noté K. La procédure de classification est réalisée au fur et à mesure d'itérations consécutives et prend fin lorsqu'au moins un des deux critères d'arrêt est atteint. Le premier critère est l'optimisation d'une fonction objective, dont une valeur est calculée à chaque itération de l'algorithme. Si cette valeur objective ne varie plus au-delà d'un certain seuil (paramétrable) sur deux itérations successives, alors la classification est considérée comme convergente et le résultat final est révélé. Le second critère d'arrêt n'est autre qu'un nombre d'itérations maximum au-delà duquel l'algorithme dévoile le résultat de classification, que la fonction objective ait convergé ou non. Ce second critère est nécessaire dans certains cas, où les valeurs objectives consécutives oscillent et ne tendent pas à converger.

Concernant le processus de classification en lui-même, il faut tout d'abord distinguer la première itération des suivantes. Lors de cette première itération, K objets sont aléatoirement sélectionnés, ils constituent les K centroïdes, et représentent les centres de classes. Une matrice de distances (euclidiennes) entre tous les objets restants et chacun des centroïdes est calculée. Chaque objet est ensuite rattaché au centroïde le plus proche. Il est à noter ici que les affectations se font de façon exclusive et qu'à chaque objet ne correspond qu'un seul et unique centroïde. La première valeur de la fonction objective est également calculée. Cette valeur prend en considération la somme des distances de chaque objet avec le centroïde lui étant attribué suivant l'équation suivante :

$$J = \sum_{j=1}^{K} \sum_{i=1}^{n} \left\| x_i^{(j)} - c_j \right\|^2$$

Avec *J* la fonction objective à minimiser, *K* le nombre de centroïdes, *n* le nombre d'objets, $x_i^{(j)}$ un objet *i* rattaché au centroïde c_i .

A partir de la deuxième itération, chacun des centroïdes est recalculé comme étant la moyenne des objets lui étant rattachés, on parle de repositionnement des centroïdes :

$$c_j = \left(\frac{1}{n_j}\right) \sum_{i=1}^{n_j} x_i^{(j)}$$

Avec c_i le centroïde à recalculer et n_i le nombre d'objets $x_i^{(j)}$ lui étant rattachés.

La matrice de distances entre eux et tous les objets est recalculée et chaque objet est rattaché au centroïde le plus proche. La fonction objective est calculée de nouveau et est comparée à sa précédente valeur (premier critère d'arrêt). Les itérations suivantes s'exécutent de la même manière et on remarquera qu'après avoir recalculé la matrice des distances, certains objets peuvent être rattachés à des centroïdes différents (Figure 28).



Figure 28: Principales étapes de la classification KM (www.wikipedia.org)

<u>Classification supervisée des spectres : Analyse discriminante</u> <u>linéaire</u>

L'analyse discriminante linéaire (ADL) est une méthode de classification dite supervisée. Cette méthode se réfère à un jeu de donnée de référence X, classé dans N groupes ou classes, pour déterminer l'appartenance d'un objet inconnu Y à l'une des N classes. Ces classes correspondent dans notre cas à un type de tissu de la tumeur VX2. Le concept de la ADL réside dans le fait que tous les spectres d'un même groupe ressemblent davantage au spectre moyen de ce groupe qu'au spectre moyen d'un autre groupe. Cette ressemblance est basée sur un calcul de distance interspectrale. Dans un premier temps, on recherche un ensemble d'axes (ou fonctions discriminantes) qui résument au mieux la distance entre deux classes différentes. Si on se place dans le cas où le nombre d'individus est supérieur au nombre de variables, alors on pourra trouver N-1 fonctions discriminantes. Dans ce nouveau repère, on cherchera à maximiser la distance entre les spectres de deux groupes différents (variance intergroupe) et à minimiser la distance entre les points d'un même groupe (variance intragoupe) (113, 119). Pour prédire la classe d'appartenance d'une nouvelle observation, on calcule la distance (par exemple, euclidienne) entre cette observation et les centres de chaque classe. L'algorithme donne alors une probabilité d'appartenance à chaque classe. Si cette probabilité est supérieure à un certain seuil (0,75 dans notre cas), alors l'observation appartient à la classe identifiée.

C. La microspectrofluorométrie

Généralités (104, 120)

C'est en 1845 que le scientifique John Frederick William Herschel observa pour la 1^{ère} fois le phénomène de fluorescence sur une solution de quinine. Les analyses fluorimétriques ont vu le jour en 1867 grâce à Friedrich Goppelsröder. La grande sensibilité et la sélectivité des techniques de fluorescence ont permis de développer de nombreuses applications dans les domaines de la physique, la chimie ou encore la biologie.

La fluorescence se traduit par l'émission de photons lorsqu'une molécule, dans un état excité (état singulet) après exposition à une source lumineuse excitatrice (UV/visible), retourne à son état énergétique fondamental (phénomène de relaxation). Des phénomènes compétitifs de cette émission de photons peuvent se produire lors du retour à l'état fondamental (Figure 20) :

- L'énergie absorbée peut être dissipée à l'environnement. Ce mécanisme est favorisé à hautes températures. On parlera dans ce cas de conversion interne.
- Une fois l'état excité atteint, les molécules peuvent passer d'un état singulet à un état triplet. C'est à partir de cet état que le phénomène de phosphorescence apparaît. On parlera dans ce cas de conversion inter-système.

Le rendement quantique de fluorescence φ permet d'évaluer la fraction de molécules excitées qui émettent un photon comparée aux autres voies de désexcitation possible. Il représente le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés.

Interaction rayonnement-matière (104, 120, 121)

Une molécule fluorescente est caractérisée par des spectres d'excitation et des spectres d'émission (Figure 29). Un spectre d'excitation d'une molécule est obtenu en mesurant la fluorescence émise à une longueur d'onde fixe et en faisant varier la longueur d'onde d'excitation. Le spectre d'excitation d'une molécule est obtenu en mesurant la fluorescence émise aux différentes longueurs d'onde d'émission en excitant à une longueur d'onde fixe. La longueur d'onde d'excitation optimale qui correspond à une intensité maximale d'émission de fluorescence ne correspond pas obligatoirement au maximum d'absorption du composé. En

pratique on mesure l'intensité de fluorescence pour chaque valeur de longueur d'onde d'excitation pour trouver celle qui optimise le phénomène.



Figure 29: Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence (http://www.edu.upmc.fr)

La longueur d'onde du maximum d'émission est inférieure à la longueur d'onde du maximum d'excitation. La distance entre ces maxima est appelée le déplacement de Stockes. La détection d'une molécule fluorescente est d'autant plus facile que le déplacement de Stockes est important. Ce décalage s'explique par le fait que la molécule excitée perd de l'énergie avant de revenir à son état fondamental impliquant ainsi une diminution de l'énergie émise par rapport à l'énergie d'excitation.

D'autre part, le spectre d'émission est identique quelque soit la longueur d'onde excitatrice choisie (règle de Kasha). Cela est dû au fait que la relaxation vibrationnelle de la molécule $(10^{-12}s)$ est généralement plus rapide que son émission de fluorescence $(10^{-8}s)$. Enfin, l'intensité d'émission est proportionnelle à l'intensité de l'excitation (120). L'intensité du spectre d'émission est donc maximale au maximum d'intensité du spectre d'excitation.

Il est possible de représenter l'intensité de fluorescence *F* (ou brillance) en fonction de l'intensité du rayonnement incident *I*o selon la formule suivante :

$$F = \varphi(I - Io) = \varphi Io(1 - e^{-\varepsilon cl})$$

Avec φ rendement quantique

Io intensité du rayonnement incident

I intensité du rayonnement transmis

 ε coefficient d'extinction molaire

c concentration de la substance absorbante

l épaisseur de l'échantillon

En général, $\varepsilon cl < 0.02$ et on peut faire l'approximation $e^{-\varepsilon cl} \approx 1 - \varepsilon cl$. La formule peut être simplifiée :

$$F = \varphi \ Io \ \varepsilon cl$$

L'intensité du rayonnement d'une molécule fluorescente est donc proportionnelle à la concentration de cette molécule et à l'intensité d'excitation. Cependant cette relation présente les mêmes limites que la loi de Beer-Lambert sur laquelle elle est basée. En effet, l'intensité de fluorescence n'est plus proportionnelle au-delà d'une certaine concentration de fluorophore et peut même décroître comme c'est cas avec les phénomènes de quenching dynamique (la fluorescence est désactivée via une collision avec une autre molécule) ou statique (formation de complexe stable et non fluorescent avec une autre molécule).

Instrumentation

L'appareil utilisé est le microspectrofluorimètre Dilor V45 (Jobin-Yvon/Horriba, Lille, France). Il est basé sur le couplage optique entre un microscope confocal et un spectromètre permettant l'acquisition des spectres d'émission de fluorescence des échantillons analysés (Figure 30).





Figure 30: Représentation schématique du microspectrofluorimètre (122)

Cet appareil est équipé d'un laser Argon ionisé (série 2000, Spectra Physics, UK) capable de générer diverses raies monochromatiques (de 300 nm à 800 nm). Un filtre interférentiel permet d'éliminer les raies parasites avant l'entrée du faisceau dans le spectrofluorimètre. Un filtre Notch (passe-haut) est également ajouté pour diminuer l'intensité de la source d'excitation et éviter les phénomènes optiques non spécifiques entrainés par la superposition des trajets optiques du rayon d'excitation et d'émission. Un diaphragme à ouverture variable (ou trou confocal) de 50 à 1000 μ m, placé dans le plan focal image, confère la confocalité du système (Figure 31).



Figure 31: Principe de la focalisation du faisceau (122)

L'objectif du microscope focalise le faisceau laser sur l'échantillon et collecte la fluorescence émise. Une optique de couplage permet de projeter l'émission de fluorescence sur la fente d'entrée du spectrographe stigmatique. La lumière émise est ensuite dispersée par

le réseau (300 traits/mm) et est analysée par un détecteur CCD (coupled charge device) bidimensionnel de 1200 x 300 pixels, refroidit par effet Peltier.

Avant toute utilisation de l'appareil, une solution contrôle de fluorescéine est analysée pour vérifier son étalonnage. L'image spectrale est obtenue par cartographie, c'est-à-dire par acquisition ponctuelle et déplacements successifs de la platine motorisée sur un axe ou une surface définis par l'opérateur. La résolution spatiale de l'image n'est donc pas définie par les dimensions du détecteur mais par le pas entre 2 mesures spectrales.

Traitement des données numériques

Les différentes études réalisées au cours de cette thèse portent sur l'analyse de coupes tissulaires de foie (ou de tumeur du foie). Le but de ces études est de quantifier la doxorubicine qui a diffusée dans le tissu autour des vaisseaux embolisés par des microsphères. Lors des analyses, nous avons observé que la longueur d'onde maximale d'émission du tissu (550 nm) était très proche de celle de la doxorubicine (600 nm). Le signal de fluorescence collecté ne représentait donc pas la fluorescence de la doxorubicine seule mais l'addition de celle du tissu et du principe actif. Nous avons donc réalisé une déconvolution spectrale afin d'éliminer la contribution du signal tissulaire dans le signal total. Pour ce faire, nous avons utilisé 2 spectres d'émission de référence : un spectre d'émission du tissu sans doxorubicine et un spectre d'émission de la doxorubicine pure. Sur la base de ces spectres de référence, le logiciel (LabSpec, Horiba scientific) est capable de déterminer la contribution du signal tissulaire.

Chapitre 2 : L'optimisation et la standardisation comme nouveaux enjeux pour les microsphères

Le développement des microsphères d'embolisation vise à standardiser la procédure de chimioembolisation dans le cas de patients atteints de CHC non opérables. Cependant, un problème majeur réside dans le fait qu'il existe une grande disparité entre les solutions injectées chez les patients et que les études comparatives entre ces différentes préparations ne sont que peu représentées dans la littérature scientifique. De fait, beaucoup de questions se posent quant à l'impact qu'ont les propriétés de ces microsphères (type, taille, concentration en anticancéreux) sur l'efficacité du traitement.

Plusieurs études *in vitro* ont montré que des microsphères de différents types présentaient des propriétés d'élution spécifiques en raison de leurs propriétés physicochimiques respectives (78, 123, 124). D'autres études ont rapporté que des microsphères de petites tailles diffusaient l'anticancéreux plus rapidement que des microsphères plus larges (125, 126), ou encore que la concentration de chargement en principe actif influençait également la vitesse de relargage du médicament (125, 127). Ces études montrent bien l'influence de ces facteurs sur les propriétés d'élution mais sont insuffisantes pour standardiser le choix du type, de la taille et de la concentration en principe actif des microsphères. Dans le but de relier les propriétés d'élution aux effets antitumoraux induits par le traitement, il est nécessaire de réaliser des études comparatives sur des modèles expérimentaux, *i.e.* rattacher les différences de comportements des microsphères à leurs impacts sur l'activité antitumorale.

L'observation de ces comportements nécessite toutefois l'utilisation d'outils adaptés, que ce soit dans la détection des microsphères au sein de l'échantillon ou encore dans la mesure du principe actif, qu'il soit diffusé ou non dans les tissus. Les microspectroscopies optiques apparaissent ici comme des outils pouvant apporter des réponses concrètes à la question du comportement des microsphères *in vivo*. À partir d'une coupe tissulaire contenant des microsphères, il est possible grâce à ces technologies de quantifier le principe actif au sein des microsphères mais également dans les tissus situés autour des vaisseaux occlus (79, 96, 99). Au-delà de l'aspect quantitatif, la microspectroscopie infrarouge est également capable de caractériser la morphologie et la composition biochimique des tissus étudiés, ceci grâce à des images spectrales obtenues à partir de coupes tissulaires non colorées. En d'autres mots, cette technique peut différencier les zones de nécrose tumorale des zones de tumeur viable sur une coupe tissulaire, et ceci à une résolution spatiale de l'ordre de la cellule (128). Toutes ces caractéristiques apparaissent comme des atouts potentiels pour l'étude du comportement des microsphères dans un tissu et pour la visualisation de l'activité cytotoxique du traitement.

Les enjeux des différents travaux présentés dans ce manuscrit sont dans un premier temps de décrire à l'aide de l'histologie conventionnelle ou de l'imagerie spectrale infrarouge, les effets de différentes tailles, de différents types de microsphères et de différentes concentrations de chargement sur les modifications tissulaires ; puis dans un second temps de relier ces modifications aux différents comportements des microsphères (propriétés d'élution). Les informations apportées par ces études seront susceptibles d'impacter le choix de la solution à injecter aux patients atteints de CHC non opérables.

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre 1: Etude de l'efficacité en fonction de la taille

A. Travaux antérieurs

La taille des microsphères est parfaitement calibrée mais il n'y a pas réellement de données dans la littérature qui définissent la taille optimale pour une CHE. Comme nous avons pu le voir précédemment, la taille des microsphères utilisées en cliniques est variable (129). Plusieurs études ont démontré que la taille des microsphères avait une influence sur le chargement et l'élution du principe actif mais également sur leur répartition au sein du tissu cible.

Influence sur le chargement

Deux études sur les DC Bead[™] effectuées par Lewis *et al.* (78, 130) ont démontré qu'une microsphère de petite taille se chargeait plus rapidement qu'une microsphère plus large pour une même concentration de doxorubicine (Figure 32). Ce phénomène est en partie expliqué par un effet de surface, les microsphères plus petites présentant une surface d'échange plus importante avec le milieu de contact que les plus larges. Les résultats obtenus montraient qu'un temps de chargement de 120 minutes était nécessaire pour que les DC Bead[™] 700-900 µm chargent 99% d'une concentration de doxorubicine à 25 mg contre seulement 20 minutes pour les DC Bead[™] 100-300 µm. La cinétique de chargement détaillée dans la figure 32 permet de visualiser parfaitement cette tendance.



Figure 32:Cinétique de chargement de la doxorubicine en fonction de la taille des DC BeadTM (78, 130)
Répartition des microsphères dans le tissu cible

Une étude publiée en 2008 a montré, sur un modèle de tumeur du foie VX2 développée chez le lapin, que les microsphères de petites tailles se logeaient préférentiellement dans la tumeur ou à proximité des marges tumorales en comparaison avec des microsphères plus larges (131). Les auteurs ont étudié, par imagerie IRM et sur coupes tissulaires, la répartition de microsphères d'acrylique de taille 100-300 μ m et 300-500 μ m chargées en magnétite (Tableau 8).

	Group SM	Group L	
Finding	(100 -300-µm IOE)	(300 –500-µm IOE)	P Value
MR Imaging			
MR sensitivity	10/10 (100)	10/10 (100)	
Quantification score	20	16	<.05
Artifact in artery	10/10 (100)	10/10 (100)	
Artifact in tumor bed			<.05
Periphery of tumor	10/10 (100)	6/10 (60)	
Inside tumor	3/10 (30)	0/10	
Histopathology			
Quantification score	20	14	<.05
IOEs in artery	10/10 (100)	10/10 (100)	
IOEs in tumor bed			<.05
Periphery of tumor	10/10 (100)	4/10 (40)	
Inside tumor	7/10 (70)	0/10	

Tableau 8: Répartition tissulaire des EmboSphere™ en fonction de leur taille (131)

Cependant, l'effet de cette répartition sur l'action antitumorale du traitement n'a pas été évalué. Une seconde étude, dans un modèle de rein de porc, a démontré que des microsphères de taille 70-150 μ m (chargées en DOX) se logeaient plus en profondeur dans l'organe cible et présentaient une distribution plus dense que des microsphères de taille 100-300 μ m induisant ainsi une répartition plus uniforme du principe actif (132).

Influence sur les propriétés d'élution

Plusieurs études *in vitro* ont démontré qu'une microsphère de petite taille se vidait plus rapidement qu'une microsphère plus large pour une même concentration de doxorubicine chargée (125) (Figure 33). De la même façon que pour la vitesse de chargement, l'élution plus rapide des petites microsphères est le résultat d'une plus grande surface d'échange avec le milieu de contact.



Figure 33: Temps d'élution de la doxorubicine en fonction de la taille des DC BeadTM (125)

Dans le même esprit, Blümmel et al. ont rapporté les différents temps d'élution (pour atteindre 75% d'élution, t_{75%}) de l'irinotecan hors de microsphères de différentes tailles et de différents fabricants (126). Les études citées montraient bien que le t75% était inférieur pour les microsphères de petites tailles avec les DC Bead™ (124, 127, 133). Cependant cette tendance n'était pas retrouvée pour les Embozene[™], mettant de nouveau en évidence la différence de comportement en fonction du vecteur (Tableau 9).

Tableau 9: Etudes in vitro comparant les temps d'élution (t_{75%}) de l'irinotecan en fonction de la taille et du type de microsphère (126)

	DC Bead				HepaSphere	Embozene TAI	NDEM	
Source	70–150 µm (DC Bead ^{M1})	100–300 µm	500–700 µm	700–900 µm	400–600 µm	40 ± 10 µm	75 ± 15 μm	100 ± 25 μm
Jordan et al., 201037*			66		7			
Taylor et al., 2007 ^{s1‡}		25	60	160				
Tang et al., 2008≌†		23		205				
CeloNova BioSciences#	9 ± 1	9 ± 1				67 ± 12	49 ± 5	60 ± 8
rss: time to reach 75 % of release plateau level								

All releases monitored in process via ultraviolet-visible spectroscop

In releases information process via unanone visione spectroscopy. So mg/ml microspheres (Deado or per 25 mg dyr microspheres (HepaSphere); 37 °C in SOTAX CE 6 elution system using isotonic medium, 5 ml/min flow rate 50 mg/ml microspheres; 37 °C in T-cell apparatus using phosphate buffered saline as release medium, –50 ml/min flow rate; t75%, estimated from given graphs. 47 mg/ml microspheres; 57 °C in T-cell apparatus using phosphate buffered saline as release medium, 136 ml/min flow rate; t75%, estimated from given graphs. 50 mg/ml microspheres; 37 °C in SOTAX CE1 elution system using isotonic medium, 5 ml/min flow rate.

Etudes in vivo

Une étude préclinique comparative entre des DC Bead[™] 100-300 µm (n=5 porcs) et 700-900 µm (n=5 porcs) chargées en doxorubicine a été réalisée par Namur et al. en 2010 sur le modèle de foie de porc (79). Les auteurs ont évalué, sur des coupes tissulaires colorées à l'HES, l'association entre la présence des microsphères et le tissu nécrosé autour des vaisseaux occlus. Ils ont démontré que les DC BeadTM 100-300 µm induisaient plus souvent une nécrose tissulaire que les microsphères plus larges (Tableau 10).

Group	DEB Type	Size (µm)	Follow-up Day	No. of Pigs	Coagulative Necrosis (%)	Fibrotic Tissue (%)	Normal Liver (%)
1	Unloaded	100-300	28	6	0	0	100
			90	27	0	33	67
2	Doxorubicin	100-300	28	105	58	41	1
			90	67	12	81	7
3	Doxorubicin	700-900	28	21	19	81	0
			00	8	0	100	0

Tableau 10: Types de lésions tissulaires associées à la présence des DC Bead 100-300 µm et 700-900 µm (79)

Récemment, une étude clinique a également démontré les bénéfices de l'utilisation de petites microsphères pour la CHE. Padia *et al.* ont obtenu une diminution significative du syndrome postembolisation lors d'une CHE avec des DC BeadTM 100-300 μ m par comparaison avec une CHE avec des DC BeadTM 300-500 μ m chargée à une même concentration de doxorubicine (134). De plus, la durée de vie des patients traités avec les petites microsphères était significativement augmentée (Figure 34).



Figure 34: Les DC Bead™ 100-300 engendrent une diminution du syndrome postembolisation et un bénéfice en terme de survie des patients (134)

B. Objectifs

Cette étude est réalisée dans le cadre d'une collaboration avec un industriel. Les résultats étant confidentiels, nous avons l'autorisation de les présenter dans ce rapport à la condition de masquer les noms et les tailles des microsphères utilisées.

Dans cette étude, deux tailles de microsphères du même fabricant (**produit A**) sont analysées dans un modèle de foie de porc:

- Les microsphères de petite taille sont notées « taille 1 »
- Les microsphères plus large sont notées « taille 2 »

Les objectifs de cette étude sont de déterminer si les microsphères de petites tailles se vident plus rapidement que les microsphères plus larges entrainant :

- une nécrose du tissu hépatique plus importante
- une concentration de DOX dans les microsphères moins élevée aux différents délais d'analyse
- une concentration tissulaire de DOX plus importante autour des vaisseaux occlus

C. Matériels et méthodes

Chargement des microsphères d'embolisation

Les deux tailles de microsphères sont chargées à une même concentration de doxorubicine de 17 mg DOX/mL de microsphères et selon la procédure indiquée par le fabricant. Elles sont chargées avec un flacon de 50 mg de doxorubicine (Adriblastine®, chlorhydrate de doxorubicine, Pfizer, New York, USA).

Modèle animal

Cette étude est réalisée sur le foie de porc. Ce modèle a déjà été utilisé pour étudier, après une injection intraartérielle hépatique, la distribution et les modifications tissulaires engendrés par différents types de médicaments ou d'agents d'embolisation (78, 79, 135). De plus, l'embolisation est réalisée avec le même matériel qu'en pathologie humaine.

Dix-huit porcs sont traités aléatoirement avec des microsphères de taille 1 (n=9) et de taille 2 (n=9). Un vétérinaire assure un suivi des animaux après embolisation (état général, poids, numération sanguine, analyses biochimiques...) jusqu'au sacrifice. Les animaux sont sacrifiés à trois délais différents après traitement :

- 7 jours (taille 1 : n=3 ; taille 2 : n=3) : ce délai correspond au maximum de nécrose observé après embolisation (75, 76)
- 1 mois (taille 1 : n=3 ; taille 2 : n=3) : ce délai correspond généralement au 1^{er} suivi après une embolisation chez les patients (83, 91, 92). La concentration de doxorubicine devrait décroître (96) et le processus de cicatrisation s'initialiser
- 3 mois (taille 1 : n=3 ; taille 2 : n=3) : la nécrose devrait disparaître et laisser place à un tissu fibreux (79)

Prélèvements

Les foies sont extraits puis examinés macroscopiquement. Les échantillons tissulaires ont été immédiatement prélevés dans le lobe gauche (ciblé par l'embolisation) à différents niveaux de coupe, inclus dans un milieu dédié à la cryosection (OCT TissueTek®, Sakura) et congelés dans l'azote liquide. Les échantillons congelés sont ensuite placés à -80 °C jusqu'au moment de l'analyse. Le reste du tissu est fixé par imprégnation dans une solution de formol pendant au moins 24 heures.

Analyses histopathologiques

Des tranches de tissu (1 à 2 cm d'épaisseur) sont coupées à partir des lobes gauches fixés au formol supposés contenir les microsphères. Les échantillons sont ensuite déshydratés par une série de bains d'alcool, fixés dans le xylène et inclus en paraffine. Des coupes tissulaires (3 à 4 µm d'épaisseur) sont réalisées grâce à un microtome, colorées à l'HES puis examinées avec un microscope optique (Leitz Diaplan, Leica, Wetzlar, Allemagne). Sur chaque lame nous avons observé la présence de nécrose hépatique et également le type de tissu présent autour des vaisseaux occlus. Après numérisation des lames, l'épaisseur de nécrose après 7 jours de traitement est mesurée en partant du bord des microsphères jusqu'à atteindre une zone de parenchyme hépatique saine (Figure 35).



Figure 35: Mesure de l'épaisseur de nécrose autour d'un vaisseau embolisé

Quantification de la doxorubicine dans les microsphères

La microspectroscopie infrarouge est utilisée pour quantifier la concentration de DOX retenue dans les microsphères à chaque délai de sacrifice.

Acquisition des images infrarouge

Des coupes tissulaires sont réalisées à partir des blocs congelés de foie de porc à l'aide d'un cryomicrotome à une épaisseur de 8 μ m. Elles sont disposées sur un support en CaF₂ (Crystran Ltd, Poole, UK) transparent aux rayonnements infrarouge. Une coupe adjacente est également réalisée et colorée à l'hémalun-éosine (HE) afin de repérer plus facilement les microsphères présentes sur la coupe non colorée servant à l'analyse IR.

En parallèle, nous avons préparé des solutions de microsphères chargées avec des concentrations connues de doxorubicine (de 0,7 mg à 13,6 mg DOX/mL de microsphères). Les microsphères sont inclues dans le milieu de cryosection et directement congelées à l'azote liquide comme effectué précédemment avec les échantillons tissulaires. Ensuite, des coupes sont réalisées à partir des différentes préparations congelées (8 μ m) et disposées sur un support en CaF₂.

Les lames, issues des prélèvements tissulaires ou des préparations de microsphères, sont analysées avec le microspectromètre Spotlight 300 à transformée de Fourier (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) en utilisant le mode image de l'instrument. Une zone d'intérêt est définie autour de chaque vaisseau obstrué ou de chaque microsphère et une image visible de l'échantillon est acquise (Figure 36). Avant d'effectuer l'image infrarouge de l'échantillon, un spectre de référence est collecté sur une zone « propre » de la lame (sans échantillon). Ce spectre, contenant les variations dues aux conditions atmosphériques (vapeur d'eau, CO₂), sera soustrait à tous les spectres de l'échantillon. L'acquisition de l'image infrarouge est effectuée en transmission avec une taille de pixel de $6,25 \,\mu\text{m}^2$, une résolution spectrale de 4 cm⁻¹, un nombre d'accumulations de 8, sur la gamme spectrale 4000-800 cm⁻¹. Nous obtenons à la fin de l'acquisition une image infrarouge brute en transmittance (Figure 36).



Figure 36: Image visible et image en transmittance d'un vaisseau occlus par des microsphères chargées en DOX (logiciel Spectrum image)

Extraction et prétraitements des spectres infrarouge

Les spectres sont extraits des pixels situés à l'intérieur des microsphères (centre et périphérie, $n \ge 5$ par microsphères, Spectrum image logiciel, Perkin Elmer). Ils sont conjointement convertis en absorbance, coupés sur la gamme 1800-880 cm⁻¹, corrigés de la déformation de la ligne de base et normalisés vectoriellement (logiciel Opus v5.5, Bruker Optik GmbH, Allemagne).

Courbe de calibration

La première étape est d'identifier les bandes d'absorption caractéristiques de la doxorubicine et du polymère composant les microsphères (gamme spectrale d'étude : 900-1800 cm⁻¹). Pour ce faire, nous avons comparé visuellement les spectres obtenus sur de la doxorubicine pure, les microsphères chargées en doxorubicine (de différentes concentrations) et les microsphères non chargées (Figure 37).



Figure 37: Spectres infrarouge moyens de la doxorubicine pure, du produit A chargé en DOX et du produit A non chargées

En comparant ces 3 spectres moyens, on peut s'apercevoir que la bande d'absorption située à 988 cm⁻¹ est commune aux spectres de la doxorubicine pure et des microsphères chargées et qu'elle est absente sur le spectre de la microsphère non chargée. Cette bande d'absorption est donc spécifique de la signature de la doxorubicine au sein de la microsphère. L'intensité de la bande d'absorption est proportionnelle à la concentration de la molécule identifiée selon la loi de Burguer Beer-Lambert. Il est donc possible, en calculant l'aire sous la bande située à 988 cm⁻¹ d'extraire des informations quantitatives quant à la quantité de doxorubicine présente dans les microsphères.

La deuxième étape est de convertir la valeur d'aire en concentration. Nous avons pu tracer une courbe de calibration (Figure 38) en reliant les valeurs d'aires, obtenues à partir des différentes préparations de microsphères (n=143), aux concentrations de chargement utilisées. La courbe de calibration donnant le meilleur coefficient de corrélation a été obtenue en effectuant le ratio des aires des bandes situées à 988 cm⁻¹ et 1406 cm⁻¹ (A988/A1406), attribuées respectivement à la doxorubicine et au polymère (R^2 =0.9689).



Figure 38: Courbe de calibration obtenue en IR sur les microsphères chargées (de 0,7 à 13,6 mg/mL microsphères)

La limite de quantification (0,7 mg DOX/mL de microsphères soit 4% de la concentration initiale) est déterminée en comparant statistiquement (Mann Whithney, MW) les ratios A988/A1406 obtenus avec les microsphères non chargées et chacune des préparations de microsphères chargées.

Nous avons ensuite projeté sur cette droite, les valeurs d'aires calculées pour les microsphères injectées dans le foie afin d'obtenir la concentration résiduelle après 7 jours, 1 mois et 3 mois de traitement.

Quantification de la doxorubicine dans le tissu

La microspectroscopie de fluorescence est utilisée pour quantifier la concentration tissulaire de DOX autour des vaisseaux occlus à chaque délai de sacrifice.

Acquisition des images de fluorescence

Avant toute utilisation de l'appareil, une solution contrôle de fluorescéine est analysée pour vérifier son étalonnage. Nous avons travaillé à partir des coupes tissulaires analysées en IR. Les acquisitions sont effectuées, en s'éloignant peu à peu du vaisseau (à 25 μ m, 400 μ m et 800 μ m), avec un microspectromètre (V45 Dilor, Jobin-Yvon/Horiba, Lille, France) équipé d'un objectif 10x (ouverture numérique 0,25), et avec un temps d'exposition de 10s (n=6 spectres en chaque point) (Figure 39).



Figure 39: Spectres d'émission obtenus à J7 à 25µm de distance de la microsphère. Spectres de référence utilisés pour la déconvolution spectrale

Prétraitements des données

Après la déconvolution spectrale (voir chapitre sur la microspectrofluorimétrie, traitement des données numériques), l'aire sous la bande de DOX (550-729 nm) est calculée et normalisée par l'aire calculée sous la bande de fluorescéine (493-585 nm).

Courbe de calibration

Nous avons mélangé des concentrations connues de DOX (de $0.1 \ \mu g/mL$ à 2mg/mL) à des broyat de foie (1 mg de tissu) de porc non traités. Une préparation contrôle est effectuée en remplaçant le volume de DOX ajouté par une solution saline. Les homogénats de tissu et de DOX sont inclus en milieu de cryosection, congelés en azote liquide, coupés et analysés comme décrit précédemment. L'aire sous la bande de DOX est calculée pour chacun des homogénats, normalisée par celle de la fluorescéine et comparée (Mann Whithney) avec celle de la préparation contrôle afin de déterminer la limite de quantification (4.1 μ g DOX/mg tissu soit 7,6 μ mol DOX/g tissu) (Figure 40).



Figure 40: Courbe de calibration obtenue en fluorescence sur les homogénats DOX + tissu (de 7,6 µmol DOX/ g tissu à 1 mg DOX/mg tissu)

Les concentrations tissulaires de DOX à 7 jours, 1 mois et 3 mois sont obtenues en projetant sur la courbe étalon les valeurs d'aires calculées à $25\mu m$, $400\mu m$ et $800\mu m$ de distance du vaisseau occlus.

D. Résultats

Analyses histopathologiques

Après 7 jours de traitement, la nécrose du parenchyme hépatique est présente sur 92% des coupes tissulaires (11/12) provenant des foies embolisés avec les microsphères de taille 1 contre 58% avec les microsphères de taille 2 (7/12) (p=0,0593, chi²) (Tableau 11). Néanmoins, nous avons observé la présence de nécrose autour des vaisseaux embolisés dans 52% des cas avec les microsphères de taille 1 et seulement dans 29% des cas avec les microsphères de taille 2 (p=0,0173, chi²) (Tableau 11). De plus, la nécrose autour de ces vaisseaux est plus étendue avec les microsphères de taille 1 qu'avec celles de taille 2 (p=0.0429, MW) (Figure 41).



Figure 41: Épaisseur de nécrose autour des vaisseaux embolisés à 7 jours de traitement

Après 1 mois de traitement, la présence de nécrose diminue fortement et n'est observée que sur 31% des coupes tissulaires (4/13) pour la taille 1 et sur aucune des coupes tissulaires pour la taille 2 (0/12) (p=0,0360, chi²). Aucune nécrose n'est observée autour des vaisseaux occlus (Tableau 11).

Après 3 mois de traitement, nous n'avons pas retrouvé de nécrose que ce soit sur les coupes tissulaires ou autour des vaisseaux occlus (Tableau 11).

Présence de parenchyme nécrosé sur les coupes tissulaires				Présence d	Présence de parenchyme nécrosé autour des vaisseaux occlus			
Time point	Taille 1	Taille 2	P value Chi ²	Time point	Taille 1	Taille 2	P value Chi ²	
D7	92 % (11/12)	58 % (7/12)	0.0593	D7	52 % (44/85)	29 % (12/41)	0.0173	
<u>M1</u>	31 % (4/13)	0 % (0/12)	0.0360	M1	0 % (0/45)	0 % (0/26)	NA	
МЗ	0% (0/12)	0 % (0/11)	NA	МЗ	0 % (0/38)	0 % (0/13)	NA	

Tableau 11: Présence de nécrose sur les coupes tissulaires et autour des vaisseaux occlus

Quantification de la doxorubicine dans les microsphères

Un total de 347 microsphères est analysé par microspectroscopie infrarouge. Nous remarquons tout d'abord que la concentration de DOX dans les microsphères diminue avec le temps. Pour la taille 1, la concentration de DOX est de 4,75 mg DOX/mL microsphères à 7 jours et en dessous de la limite de quantification aux deux délais 1 mois et 3 mois. Ces concentrations correspondent respectivement à un pourcentage d'élution de 72% à 7 jours et de plus de 96% après 1 mois et 3 mois (Tableau 12). Pour la taille 2, la concentration de DOX est de 6,32 mg DOX/mL microsphères à 7 jours, de 1,74 mg DOX/mL microsphères à 1 mois

et en dessous de la limite de quantification après 3 mois. Ces concentrations correspondent respectivement à un pourcentage d'élution de 63% à 7 jours, de 90% à 1 mois et de plus de 96% à 3 mois (Tableau 12).

La comparaison statistique entre les deux tailles n'est pas significative à 7 jours (p=03358, MW) et n'a pas pu être réalisée aux délais les plus élevés à cause des valeurs obtenues en dessous de la limite de quantification. Afin d'établir une comparaison statistique dans ce genre de cas, nous avons comparé nos données de façon qualitative à l'aide du test statistique chi² (χ^2) (Tableau 12). Les valeurs au dessus de la limite de quantification sont remplacées par le terme « détectable » et les valeurs en dessous de la limite de quantification sont remplacées par le terme « non détectable ».

Tableau 12: Quantification de la doxorubicine dans les microsphères, pourcentages de rétention et d'élution en fonction du délai (limite de quantification : 0,7 mg DOX/mL microsphères)

Délai	Type de MS	Nombre de MS analysées	Aire 989/Aire 1406	Concentration Dox mg Dox/mL bille	% rétention	% élution	Mann Whithney	χ²
Ziours	Produit A Taille 1	95	0.211±0.128	4.75±2.5 med: 4.5	27.9%	72.1%	D - 0 2259	B 0.2440
7 jours Produit A Taille 2	39	0.269±0.221	6.32±5.02 med:5.61	37.2 %	62.8%	P = 0.5558	P = 0.2448	
1 mois	Produit A Taille 1	58	0.055±0.161	< 0.7	< 4 %	> 96 %	Nop attribuó	P = 0.009
1 mois Produit A Taille 2	Produit A Taille 2	18	0.100±0.087	1.74±1.39 med:1.2	10.2 %	89.8%	Non attribué	
2 mais	Produit A Taille 1	87	0.017±0.038	< 0.7	< 4 %	> 96 %	Nop attribué	R = 0 1020
3 mois Produit A Taille 2	15	0.007±0.012	< 0.7	< 4 %	>96 %	Non attribue	F - 0.1920	

La comparaison statistique entre les deux tailles n'est pas significative à 7 jours $(p=0,2448, chi^2)$ avec 85,3% (81 microsphères sur 95) des microsphères de taille 1 et 76,9% (30 sur 39) des microsphères de taille 2 contenant encore une quantité de doxorubicine détectable. À 1 mois, seulement 19% des microsphères de taille 1 (11 sur 58) contiennent encore une quantité décelable de principe actif contre 50% (9 sur 18) des microsphères de taille 2 (p=0,009, chi²). À 3 mois, la comparaison entre les deux tailles n'est pas significative avec 5,7% des microsphères de taille 1 (5 sur 87) et 0% des microsphères de taille 2 (15 sur 15) contenant encore une quantité de doxorubicine détectable (p=0,1920, chi²).

Quantification de la doxorubicine dans le tissu

Un total de 66 vaisseaux est analysé en microspectroscopie de fluorescence. Nous avons détecté la doxorubicine à 25 μ m des microsphères mais aux distances de 400 et 800 μ m les valeurs sont en dessous de la limite de détection (7,6 μ mol DOX/g tissu). La concentration tissulaire à 25 μ m de distance décroît avec le temps et est supérieure avec les microsphères de taille 2 après 7 jours de traitement (1138 μ mol DOX/g tissu versus 382 μ mol DOX/g tissu pour les taille 1, p<0,0001). Elle est globalement plus élevée pour la taille 2 aux autres délais mais n'a pu être comparée statistiquement à cause des valeurs obtenues en dessous de la limite de quantification (Tableau 13). L'analyse qualitative des données n'apporte pas d'informations supplémentaires du fait que la doxorubicine n'est pas détectable à 400 μ m et 800 μ m de distance pour les deux tailles.

Tableau 13: Concentration de doxorubicine tissulaire en fonction de la distance d'éloignement du vaisseau (limite de quantification : 7,6 µmol DOX/g tissu)

Délais	Distance du	Concentr (μmol/g	ation Dox de tissu)	Mann	
(n= 66 Vx)	vaisseau	Produit A Taille 1	Produit A Taille 2	Whithney	
	25 μm	382	1138	P < 0.0001	
7 jours	400 µm	< 7.6	< 7.6	Non attribué	
	800 µm	< 7.6	< 7.6	Non attribué	
	25 μm	109	339	P = 0.1144	
1 mois	400 µm	< 7.6	< 7.6	Non attribué	
	800 µm	< 7.6	< 7.6	Non attribué	
3 mois	25 μm	117	201	P = 0.2016	
	400 µm	< 7.6	< 7.6	Non attribué	
	800 μm	< 7.6	< 7.6	Non attribué	

E. Discussion

Les deux tailles de microsphères analysées sont associées avec la présence de nécrose du parenchyme hépatique témoignant de l'effet cytotoxique du traitement. Par ailleurs, nous retrouvons plus souvent de la nécrose hépatique, et sur une zone plus étendue, autour des vaisseaux embolisés avec les microsphères de taille 1. Cette modification tissulaire peut être associée au fait que les microsphères de taille 1 se sont vidées plus rapidement entrainant ainsi une diffusion plus lointaine de la doxorubicine dans le tissu. La disparition quasi complète de la nécrose à 1 mois et complète à 3 mois témoigne de l'activation du processus de réparation tissulaire, sans différence notable entre les deux tailles analysées.

Le fait de retrouver plus de doxorubicine au bord du vaisseau avec les microsphères de taille 2 témoigne d'une élution plus lente entrainant une diffusion moins importante de la DOX. Les microsphères de taille 2 contiennent encore 10% de la concentration initiale de chargement après 1 mois de traitement entrainant une durée d'élution plus soutenue dans le temps que les microsphères de taille 1 qui sont déjà vides à ce délai. L'analyse qualitative des données montre que la durée de réservoir des microsphères de taille 1 est d'environ 1 mois et se situe entre 1 mois et 3 mois pour les microsphères de taille 2. En effet, les microsphères plus larges ont une plus grande capacité de chargement donc à concentration de chargement identique, elles contiennent plus de médicament et mettent plus de temps pour l'éluer.

D'autre part, la doxorubicine est métabolisée et éliminée au sein du parenchyme hépatique ce qui peut considérablement diminuer les concentrations tissulaires. Le pic de concentration tissulaire est observé dans les premières heures qui suivent l'embolisation. Cela a été démontré, dans un modèle de foie de porc, par l'équipe de Dreher *et al.* (132). Ils ont observé des concentrations tissulaires importantes de doxorubicine aux abords des microsphères entre 30 minutes et 1h (\approx 30-40 µmol/L) après la CHE, puis une stabilisation à des concentrations élevées entre 1h et 8h (\approx 20-15 µmol/L) et enfin une forte diminution après 24h (\approx 0,5-5 µmol/L) (132). Par conséquent, si les microsphères de taille 1 se sont vidées rapidement, la majorité de la DOX relarguée a pu être éliminée du tissu avant l'analyse. Il aurait été nécessaire d'avoir des délais intermédiaires avant 7 jours. Une autre limite de l'étude est le manque de points de mesure entre 25 µm et 400 µm de distance afin de mieux se représenter la distribution de la DOX.

F. Conclusions

Cette étude confirme la tendance observée dans les études *in vitro*; *i.e* les microsphères de petites tailles se vident de leur principe actif plus rapidement que les microsphères plus larges. Les différences concernant les propriétés d'élution ne sont pas significatives ou n'ont pas pu être comparées quantitativement entre les tailles à tous les délais, mais l'analyse qualitative des données confirme bien l'élution plus rapide de la doxorubicine avec les petites microsphères. L'activité cytotoxique est également plus marquée avec les microsphères de petites tailles. Outre le fait qu'elles se soient vidées plus

rapidement, cela pourrait être due à une embolisation plus dense et plus distale du territoire tissulaire (131, 132).

Chapitre 2: Etude de l'efficacité en fonction du type de microsphère utilisé

A. Travaux antérieurs

Les types de microsphères utilisés en CHE sont différents en termes de composition. Le matériel qui les compose a des propriétés d'élasticité, de déformation et de biocompatibilité qui lui sont propres. Ces différentes propriétés sont susceptibles d'influencer la capacité de chargement et d'élution du principe actif mais aussi la répartition des microsphères au sein du tissu cible et le diamètre des vaisseaux occlus. Sur la base de ces différences, l'efficacité du traitement peut varier d'un type de microsphère à l'autre.

Influence sur le chargement

Le chargement du principe actif dans la microsphère modifie la taille, l'élasticité et les propriétés hydrophiles de la microsphère. Par exemple, la taille des microsphères DC BeadTM diminue après le chargement du principe actif (130). Cette diminution peut atteindre 30% de la taille initiale de la microsphère. La diminution du diamètre moyen des DC BeadTM est d'autant plus importante que la concentration de doxorubicine ou d'irinotecan est élevée (Figure 42, A). La décroissance de taille est aussi accompagnée d'une augmentation de la résistance des microsphères (test de compression : Figure 42, B). Ceci correspond à une perte d'élasticité entrainée par la perte d'eau lors de l'incorporation du principe actif.



Figure 42: Influence du chargement en doxorubicine ou irinotecan sur les propriétés physiques des DC BeadsTM (130)

Cette perte d'eau rend la microsphère plus hydrophobe, augmentant le risque d'adhésion des microsphères au cathéter et d'agglomérats entre elles si la quantité de principe actif chargée est trop importante (78, 124, 127, 136, 137). L'effet du chargement est inverse pour les HepasphereTM. Ces microsphères étant fournies sous une forme déshydratée, leur diamètre augmente lors du chargement en principe actif. Le diamètre des microsphères hydratées est multiplié par 4 par rapport à celui des microsphères lyophilisées. (Tableau 14).

Sec (µm)	Gamme de taille reconstituée approximative (µm)	Diamètre interne du cathéter (pouces)
30-60	120 - 240	≥ 0.021
50-100	200 - 400	≥ 0.021
100-150	400 - 600	≥ 0.024
150-200	600 - 800	≥ 0.027

Tableau 14: Taille des Hepasphere[™] avant et après chargement en principe actif (procédure d'utilisation des Hepaspehre[™], http://fr-www.merit.com/products/media)

Le choix du matériel d'embolisation (diamètre du cathéter, taille des microsphères) doit tenir compte de ces propriétés physiques des microsphères qui influencent directement le niveau d'occlusion de la CHE.

En outre, la vitesse de chargement en principe actif est similaire entre les DC BeadTM et les HepasphereTM pour une même concentration de principe actif. Ce résultat a été démontré par Jordan *et al.* (124) en chargeant les microsphères avec une solution de doxorubicine ou d'irinotecan (Figure 43). Ils ont montré que 80% à 90% de la dose du principe actif est chargée en une heure sans différence notable entre les deux types de microsphères pour un principe actif donné et une taille de microsphères donnée.



Figure 43: Temps de chargement en doxorubicine et irinotecan pour les DC BeadTM et les HepasphereTM (124)

Par contre, la comparaison entre d'autres types de microsphères met en évidence une disparité dans l'efficacité du chargement. Lewis *et al.* ont montré que les DC BeadTM se chargeaient plus rapidement que les EmboSphereTM, les ContourTM et les Bead BlockTM au contact d'une même quantité de doxorubicine et à taille équivalente (Figure 44) (78).



Figure 44: Pourcentages de doxorubicine chargée et éluée en fonction du type de microsphère à taille équivalente (78)

Répartition dans le tissu cible

Les propriétés physiques d'une microsphère vont déterminer sa répartition au sein du tissu cible. Quelques études *in vivo* se sont intéressées à la comparaison de la répartition de différentes microsphères. L'étude de Bilbao en 2008 menée chez le porc démontre bien que des vecteurs avec des capacités de déformation différentes présentent une répartition différente (138). Ils ont embolisé les reins de 18 porcs : pour chaque animal le rein gauche a été embolisé par des HepasphereTM (200-300 µm réhydratées) et le rein droit alternativement par des EmboSphereTM (100-300 µm), des ContourTM (150-350 µm) ou des Bead BlockTM (150-350 µm). La répartition des HepasphereTM et Bead BlockTM était plus distale alors qu'elle était plus proximale pour les ContourTM et les EmboSphereTM. La taille, la déformation et l'aspect des particules ont été évaluées en histologie et ont montré une disparité en fonction du type de microsphère.

Un autre exemple de comparaison entre deux produits d'embolisation a été publié en 2011 par l'équipe de Verret *et al.* (139). Les auteurs ont comparé la répartition et la

déformation des EmboSphere[™] et des Embozene[™] dans le rein et l'utérus de moutons. Ils ont démontré que les Embozene[™] présentaient une déformation plus importante engendrant une occlusion vasculaire plus distale que les EmboSphere[™].

La connaissance de ces différences a un intérêt clinique certain car le choix d'un agent d'embolisation repose sur ses bonnes performances à occlure les vaisseaux et sur son niveau d'occlusion.

Influence sur les propriétés d'élution

Les performances de libération du principe actif sont directement liées au mécanisme et au mode opératoire du chargement (78, 137). Le principe actif chargé par absorption dans la microsphère est libéré de façon passive dans le milieu extérieur. La diffusion du principe actif s'effectue via un phénomène d'osmose engendré par les différences de concentrations entre l'intérieure de la microsphère et le milieu extérieur. Le principe actif chargé par échange ionique est libéré de la microsphère par échange d'ions avec le milieu extérieur.

Cette différence liée au mode de chargement a été mise en évidence par l'équipe de Jordan *et al.* (124). Les auteurs ont chargé des DC BeadTM (500-700 μ m) et des HepasphereTM (400-600 μ m) avec une même concentration de doxorubicine ou d'irinotecan. Ils ont montré que pour un même principe actif chargé, la vitesse d'élution *in vitro* (NaCl 0,9%) était modifiée (Figure 45). Les microsphères ayant des groupements carboxylates libéraient plus rapidement l'irinotécan et présentaient un taux d'élution de la doxorubicine plus faible que les microsphères ayant des groupements sulfonates.



Figure 45: Profils d'élution de la doxorubicine et de l'irinotecan en fonction du type de microsphères (124)

L'étude menée par Lewis *et al.* a également prouvé que le type de vecteur avait une influence sur la vitesse d'élution du principe actif et que la libération par échange ionique était plus lente comparée à une libération par diffusion (78). Comme nous pouvons le visualiser sur la figure 44, la quantité de doxorubicine éluée était moins importante avec les DC BeadTM après 10 minutes et 24 heures dans une solution saline que pour les EmboSphereTM, les ContourTM et les Bead BlockTM avec une concentration de chargement identique (25 mg de doxorubicine). Ce résultat était attendu du fait que les EmboSphereTM, les ContourTM et les Bead BlockTM ne sont pas des microsphères optimisées pour un chargement en principe actif.

Une étude, portant sur la comparaison entre des microsphères ONCOZENE[™] (Celo Nova, Biosciences, USA) et des DC Bead[™] chargées à une même concentration d'idarubicine, a montré une différence quant à la vitesse de relargage *in vitro* du principe actif. Le temps pour atteindre un taux de 75% d'élution était de 37 minutes avec les DC Bead[™] contre 170 minutes avec les ONCOZENE[™] (123).

B. Objectifs

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec un industriel. Les résultats étant confidentiels, nous avons eu l'autorisation de les présenter dans ce rapport à la condition de masquer les noms et les tailles des microsphères utilisées.

Dans cette étude, deux tailles de microsphères de deux fabricants (**produit A et produit B**) sont analysées dans un modèle de tumeur VX2:

- Produit A : les microsphères de petite taille sont notées « taille 1 » et les microsphères plus large sont notées « taille 2 ». Le produit A analysé dans cette étude correspond au même type de microsphères que dans la première étude.
- Produit B : les microsphères de petite taille sont notées « taille 1 » et les microsphères plus large sont notées « taille 2 ».

Les objectifs de cette étude préclinique sont de:

- comparer l'effet antitumoral entre une CHE utilisant des microsphères chargées et une CHE utilisant des microsphères non chargées
- comparer l'effet antitumoral de deux types de microsphères
- comparer les propriétés d'élution de la doxorubicine entre produits
- démontrer que les petites microsphères se vident plus rapidement que les plus larges

C. Matériels et méthodes

Chargement des microsphères d'embolisation

La doxorubicine, fournie sous forme de poudre (50mg, Pfiser USA), est reconstituée avec une solution saline stérile. La préparation des microsphères et leur chargement en doxorubicine sont adaptés des protocoles fournis par les fabricants afin de travailler à concentration de chargement équivalente entre les produits. La concentration finale de chargement est de 17 mg de DOX /mL de microsphères pour les deux types de produits.

Modèle animal

Des tumeurs VX2 sont développées dans le foie de lapins adultes (race : néozélandais). Nous avons choisit ce modèle car :

- il n'y a pas de modèle de CHC reproductible chez le gros animal (porc, mouton)
- ce modèle a déjà été utilisé pour évaluer l'efficacité des procédures d'embolisation et de chimioembolisation (8, 75, 76, 131)
- il est facilement implantable et se développe rapidement dans le foie (66, 140, 141)
- l'embolisation est réalisée avec le même matériel qu'en pathologie humaine

Trente et un lapins sont inclus dans cette étude et traités aléatoirement avec des microsphères du produit A ou du produit B :

- Produit A taille 1 : 5 animaux
- Produit A taille 2 : 6 animaux
- Produit B taille 1 : 6 animaux
- Produit B taille 2 : 5 animaux
- Microsphères non chargées (aussi appelé bland embolization en anglais) : 5 animaux
- Aucun traitement : 4 animaux

Un vétérinaire assure un suivi des animaux après embolisation (état général, poids, numération sanguine, analyses biochimiques...) jusqu'au sacrifice. Les animaux sont sacrifiés après 3 jours de traitement, délai correspondant selon des études antérieures à la concentration tissulaire maximale de DOX après une CHE avec des microsphères chargées et à

l'augmentation significative de nécrose en comparaison d'une embolisation utilisant des microsphères non chargées (75, 76).

Prélèvements

Après exérèse, les tumeurs sont examinées macroscopiquement et sectionnées en deux parties dans le sens de la longueur. Quatre prélèvements tissulaires sont réalisés : deux dans la tumeur et deux autres dans des zones péritumorales. Les prélèvements sont ensuite inclus dans un milieu de cryosection et congelés rapidement dans l'azote liquide. Les échantillons congelés sont ensuite placés à -80 °C jusqu'au moment de l'analyse. Le reste du tissu est fixé par imprégnation dans une solution de formol pendant au moins 24 heures.

Analyses histopathologiques

Les échantillons sont déshydratés par une série de bains d'alcool, fixés dans le xylène et inclus en paraffine. Des coupes tissulaires (3 à 4 µm d'épaisseur) sont réalisées grâce à un microtome, colorées à l'HES puis examinées avec un microscope optique (Leitz Diaplan, Leica, Wetzlar, Allemagne). Sur chaque lame, nous avons évalué la proportion de nécrose tumorale et de nécrose du parenchyme hépatique.

Quantification de la doxorubicine dans les microsphères

La microspectroscopie infrarouge est utilisée pour quantifier la concentration de DOX retenue dans les microsphères après 3 jours de traitement.

Acquisition des images infrarouge

Des coupes tissulaires sont réalisées à partir des blocs congelés de tissu à l'aide d'un cryomicrotome à une épaisseur de 8 μ m. Elles sont disposées sur un support en CaF₂ (Crystran Ltd, Poole, UK) transparent aux rayonnements infrarouge. Une coupe adjacente est également réalisée et colorée à l'hémalun-éosine (HE) afin de repérer plus facilement les microsphères présentes sur la coupe non colorée servant à l'analyse IR.

En parallèle, nous avons préparé, pour le produit B, des solutions de microsphères chargées avec des concentrations connues de doxorubicine (de 1 mg/mL à 25 mg/mL de microsphères). Les microsphères sont inclues dans le milieu de cryosection et directement congelées à l'azote liquide comme effectué précédemment avec les échantillons tissulaires.

Ensuite, des coupes sont réalisées à partir des différentes préparations congelées (8 μ m) et disposées sur un support en CaF₂. L'acquisition des images infrarouge est réalisée dans les mêmes conditions que l'étude précédente.

Extraction et prétraitements des spectres infrarouge

Les procédures d'extraction des spectres et de prétraitements sont identiques à l'étude précédente.

Courbe de calibration

La courbe de calibration pour le produit A a été établit lors de l'étude précédente et a été utilisée pour ces travaux (Figure 38).

En revanche, nous devons établir la courbe de calibration pour le produit B. La première étape a été d'identifier les bandes d'absorption caractéristiques de la doxorubicine et du polymère composant les microsphères (gamme spectrale d'étude : 900-1800 cm⁻¹). Pour ce faire, nous avons comparé visuellement les spectres obtenus sur de la doxorubicine pure, des microsphères chargées en doxorubicine et des microsphères non chargées (Figure 46).



Figure 46: Spectres infrarouge moyens de la doxorubicine pure, du produit B chargé en DOX et des du produit B non chargées

En comparant ces 3 spectres, on peut s'apercevoir que la bande d'absorption située à 988 cm⁻¹ est commune aux spectres de la doxorubicine pure et des microsphères chargées et qu'elle est absente sur le spectre de la microsphère non chargée. De la même façon que pour le produit A, nous avons calculé l'aire sous le pic situé à 988 cm⁻¹ pour les différentes préparations de microsphères chargées et avons tracé la courbe de calibration (Figure 47).



Figure 47: Courbe de calibration obtenue en IR sur les microsphères chargées (de 1 mg à 25 mg DOX/mL microsphères)

La limite de quantification (1 mg DOX/mL de microsphères soit 6% de la concentration initiale) est déterminée en comparant statistiquement (Mann Whithney, MW) les aires A988 obtenues avec les microsphères non chargées et chacune des préparations de microsphères chargées.

Nous avons ensuite projeté sur leur courbe de calibration respective, les valeurs d'aires calculées pour les microsphères du produit A et du produit B afin de déterminer la concentration résiduelle après 3 jours de traitement.

Quantification de la doxorubicine dans le tissu

La microspectroscopie de fluorescence est utilisée pour quantifier la concentration tissulaire de DOX autours des vaisseaux occlus et pour établir les profils de diffusion. Cependant, la méthode d'acquisition des images de fluorescence et les préparations pour obtenir la courbe de calibration diffèrent de l'étude précédente.

Acquisition des images de fluorescence

Nous avons travaillé à partir des coupes tissulaires analysées en IR. Les profils de diffusion de la DOX sont réalisés en ligne et dans quatre directions autour des vaisseaux occlus, en partant du bord de la microsphère jusqu'à la disparition du signal fluorescent de la DOX. Les profils de diffusion sont composés de spectres d'émission enregistré tous les 40 μ m, avec un temps d'exposition de 10s et 2 accumulations par point. Apres la déconvolution spectrale, l'aire sous la bande de DOX (570-674 nm) est calculée en chaque point de mesure

et nous obtenons un profil dont l'intensité de fluorescence diminue en s'éloignant du vaisseau (Figure 48).



Figure 48: Profil de diffusion de la DOX dans le tissu

Courbe de calibration

Nous avons préparé différents gels de collagène contenant chacun des concentrations de DOX connues. Les gels de collagène de type I (pour culture cellulaire 3D) sont préparés à partir de tendon de queue de rats (122). Le collagène est extrait, sans trypsinisation, par des bains d'acide acétique et des centrifugations successives. Après lyophilisation, le collagène est dissous dans une solution d'acide acétique, à la concentration finale de 3 mg/mL. Les gels de collagènes sont préparés à partir de la solution mère de collagène (500 μ L), d'une solution de Milieu Essentiel Minimum (MEM, 100 μ L), d'une solution de bicarbonate de sodium à 0.26 μ M (100 μ L), de soude à 0.1 M (100 μ L), et enfin de DOX à une concentration connue (200 μ L) ou d'eau distillée (200 μ L) pour le gel contrôle (toutes les solutions sont maintenues à 4°C). Le mélange (1 mL) est alors coulé dans une boîte de Pétri de 35x10 mm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA). Le mélange précipite en 4 à 5 minutes à température ambiante. La boîte de Pétri est alors placée sur la platine du microspectrofluorimètre et analysée dans les même conditions que les échantillons tissulaires. Apres la déconvolution spectrale, l'aire sous la bande de DOX (570-674 nm) est calculée pour chaque gel de

collagène et comparée (Mann Whithney) avec celui de la préparation contrôle afin de déterminer la limite de quantification (287 nM). La courbe obtenue est linéaire entre 287 nM et 9,20 μ M avec un R² de 0,99 (Figure 49).



Figure 49: Courbe de calibration obtenue en gel de collagène

Les valeurs de concentrations tissulaires en DOX sont calculées en projetant sur cette droite les aires obtenues, après déconvolution spectrale, en chacun des points des profils de diffusion.

D. Résultats

Analyses histopathologiques

Nous avons évalué sur 32 coupes tissulaires, la proportion de tumeur viable et de parenchyme hépatique nécrosé. Sur les lames issues des tumeurs CTRL, la proportion de tumeur viable est de 66%. Elle est significativement diminuée (MW, p<0,05) pour les tumeurs embolisées avec des microsphères non chargées (20%) par rapport aux tumeurs CTRL. La proportion de tumeur viable est nettement diminuée, par rapport aux tumeurs embolisées avec des microsphères non chargées (MW, p=0,0163), chez les tumeurs embolisées par des microsphères chargées en doxorubicine sans différence significatives entre les produits A et B ou entre les tailles étudiées (MW, p>0,05). Les tumeurs traitées par les microsphères chargées en DOX sont totalement nécrosées et présentent une proportion de cellules tumorales viables comprise entre 1,2% et 0,1% (Figure 50).



Figure 50 : Proportion de tumeur viable et de parenchyme hépatique nécrosé en périphérie de la tumeur

Concernant les modifications tissulaires du parenchyme hépatique en périphérie de la tumeur, les résultats montrent qu'il n'est que très peu dégradé par un traitement avec des microsphères non chargées (4.7% de nécrose) néanmoins la différence est significative en comparaison des tumeurs non traitées (MW, p=0,0143). D'autre part, la proportion de nécrose du parenchyme est plus importante pour les groupes de tumeurs traitées avec des microsphères chargées en DOX, sans différences significatives entre les produits A et B ou entre les tailles étudiées (MW, p>0,05). Les tumeurs traitées par les microsphères chargées présentent en moyenne 38% de parenchyme nécrosé ce qui est significativement plus élevé que pour les tumeurs traitées en utilisant des microsphères non chargées (MW, p=0,0125).

Quantification de la doxorubicine dans les microsphères

Comparaison des produits A et B : tailles confondues

Nous avons d'abord réuni les données par produit (103 microsphères analysées). La différence est marquante entre ces deux produits, le produit B s'étant vidé totalement après 3 jours de traitement (>94% d'élution) alors que le produit A contient encore 40% de la concentration initiale de chargement en doxorubicine (Tableau 15). La comparaison statistique n'est pas exprimée du fait des valeurs inférieures à la limite de quantification pour

le produit B. Afin d'établir une comparaison statistique dans ce genre de cas, nous avons comparé nos données de façon qualitative à l'aide du test statistique chi² (χ^2) (Tableau 15). Les valeurs au dessus de la limite de quantification sont remplacées par le terme « détectable » et les valeurs en dessous de la limite de quantification sont remplacées par le terme « non détectable ». La comparaison statistique entre les deux produit est significative à 3 jours (p<0,0001, chi²) avec 0% (71 microsphères sur 71) des microsphères du produit B et 81,3% (26 sur 32) des microsphères du produit A contenant une quantité de doxorubicine détectable.

Tableau 15: Pourcentages d'élution et de rétention de la DOX dans les microsphères après 3 jours de traitement

Groupe	Nombre de MS	% rétention	% élution	P (MW)	χ²	
Produit B	71	< 6 %	>94 %	Non		
Produit A	32	39.5 ±33% med: 31.5%	60.5 ±32% med: 68.6%	attribué	P< 0.0001	

Comparaison des produits A et B : à taille équivalente

Les comparaisons des produits A et B à taille équivalente (produit A, taille 1 versus produit B, taille 1, de même pour la taille 2) montrent les mêmes informations. À savoir, le produit A contient encore de la doxorubicine après 3 jours alors que le produit B a élué la majorité du principe actif (Tableau 16). La comparaison statistique n'est pas exprimée du fait des valeurs inférieures à la limite de quantification pour le produit B. Cependant l'analyse qualitative des données confirme que les petites microsphères du produit A contiennent plus de doxorubicine que les petites microsphères du produit B (p<0,0001, chi²). Nous retrouvons un résultat similaire pour les microsphères de taille plus large (p=0,001, chi²).

Groupe	Nombre de MS	% rétention	% élution	P (MW)	χ²
Produit B Taille 1	67	< 6 %	>94 %	Non attribué	D < 0.0001
Produit A Taille 1	21	44.7±38% med: 38.8%	55.3±37% med: 61%	Non attribue	P < 0.0001
Produit B Taille 2	4	< 6 %	>94 %	N	D 0.001
Produit A Taille 2	11	29.5±18% med: 24%	70.5±18% med: 75%	Non attribué	P = 0,001

Tableau 16: Comparaison des pourcentages d'élution et de rétention de la DOX entre les produits à taille de microsphère équivalente

Comparaison des tailles par produits

Les comparaisons des différentes tailles par produits ne montrent pas de différences significatives. La taille 1 du produit A contient 45% de doxorubicine après 3 jours de traitement et la taille 2 contient encore 30% de la concentration initialement chargée (p=0,331) (Tableau 17). Les deux tailles du produit B affichent un pourcentage d'élution supérieure à 94%. La comparaison statistique n'est pas exprimée du fait des valeurs inférieures à la limite de quantification pour le produit B. L'analyse qualitative des données confirme qu'il n'y a pas d'effet taille entre les microsphères d'un même produit. En effet, 76,2% des microsphères de taille 1 du produit A contiennent une quantité détectable de doxorubicine contre 90,9% des microsphères de taille 2 (p=0,3110, chi²). En revanche, la doxorubicine n'est pas décelable à l'intérieure des microsphères du produit B, que ce soit pour la taille 1 ou la taille 2 (calcul impossible du chi² car seule la catégorie « non détectable » est présente).

Tableau 17: Comparaison des pourcentages d'élution et de rétention de la DOX entre les différentes tailles pour un même produit

Groupe	Nombre de MS	% rétention	% élution	MW	χ²	
Produit A Taille 1	21	44.7±38% med: 38.8%	55.3±37% med: 61%	D = 0.221	D = 0.211	
Produit A Taille 2	11	29.5±18% med: 24%	70.5±18% med: 75%	P = 0.331	P = 0.311	
Produit B Taille 1	67	< 6 %	>94 %	N		
Produit B Taille 2	4	< 6 %	>94 %	Non attribue	Non attribue	

Comparaison des concentrations en fonction du type de tissu entourant les microsphères

Le type de tissu entourant les microsphères d'embolisation a une influence sur la vitesse à laquelle elles éluent le principe actif. En effet, les microsphères se trouvant dans la tumeur relarguent une quantité de doxorubicine significativement plus importante (> 94% en moyenne) que celles situées dans les zones péritumorales (45,5±35% en moyenne, médiane 46%). Cette différence est surtout marquée pour le produit A car les microsphères du produit B sont entièrement vides après 3 jours de traitement peu importe le type de tissu à proximité (Figure 51).



Figure 51: Pourcentages d'élution pour le produit A et le produit B en fonction de la localisation du vaisseau embolisé

Les comparaisons entre les produits montrent que dans les deux zones de prélèvements analysées les microsphères du produit B ont relargué une quantité plus importante de doxorubicine (Figure 51) (tumeur : 80% d'élution pour le produit A contre plus de 94% pour le produit B / péri-tumeur : 38% d'élution pour le produit A contre plus de 94% pour le produit B). La comparaison statistique n'est pas exprimée du fait des valeurs inférieures à la limite de quantification pour le produit B. L'analyse qualitative montre que la doxorubicine n'est pas décelable dans les microsphères du produit B, que ce soit dans le tissu péritumoral ou dans la tumeur, alors qu'elle est détectable dans 100% des microsphères du produit A au sein du tissu péritumoral (p<0,0001, chi²).

Quantification de la doxorubicine dans le tissu

Comparaison des produits A et B : tailles confondues

Nous avons analysé 28 vaisseaux occlus par des microsphères. Les concentrations tissulaires de DOX sont globalement plus élevées autour des vaisseaux occlus par le produit B. Néanmoins, la concentration au bord du vaisseau est significativement plus importante pour le produit A (MW, p=0,0031) (Tableau 18). Au-delà d'une distance de 520 μ m, nous ne détectons plus la DOX pour le produit A alors que la concentration de DOX pour le produit B est toujours au-dessus de la limite de quantification (0.29 μ mol/L).

Tableau 18: Concentration tissulaire de DOX (µmol/L) pour le produit A et le produit B en fonction de la distance du vaisseau

Distance du vaisseau	Produit A (μmol/L)	Produit B (µmol/L)	P (MW)
0 µm	3.24±2.53 med: 2.72	2.02±2.58 med: 1.50	0.0031
120 µm	1.57±1.74 med:0.89	1.95±2.56 med: 1.27	0.8352
520 µm	0.54±1.17 med < 0.29	1.31±1.52 med:0.89	0.0325
1000 µm	< 0.29	1.08±0.77 med:0.77	Non attribué
2000 µm	< 0.29	0.40±0.21 med < 0.29	Non attribué

En effet, quand nous observons le profil de diffusion de la DOX dans le tissu, la concentration pour le produit A est inférieure à la limite de quantification à partir de 760 μ m (Figure 52). Les profils de diffusion sont significativement différents (MW, P<0,05) à partir de 520 μ m. Au-delà de cette distance, la concentration tissulaire de DOX est plus importante avec le produit B, démontrant une pénétration plus importante dans le tissu.



Figure 52: Profils de diffusion tissulaire de la DOX pour le produit A et le produit B

Comparaison des produits A et B : à tailles équivalentes

La concentration tissulaire de DOX entre les tailles 1 des produits A et B est significativement plus importante au bord des vaisseaux pour le produit A. Cependant, elle décroît rapidement lorsqu'on s'éloigne du vaisseau et nous ne détectons plus de DOX au-delà de 520 μ m de distance (Figure 53). En contrepartie, le produit B montre des concentrations tissulaires de DOX globalement plus élevée et une distance de pénétration du principe actif plus importante puisque nous ne détectons plus la DOX à partir de 1800 μ m de distance (Figure 53).



Figure 53: Profils de diffusion et concentrations tissulaires de DOX entre les produits A et B pour la taille 1

La concentration tissulaire de DOX entre les tailles 2 des produits A et B est significativement plus importante au bord des vaisseaux pour le produit A. De même que pour la taille 1, elle décroît rapidement lorsqu'on s'éloigne du vaisseau mais le manque de mesures au-delà de 760 μ m ne permet pas de déterminer la distance maximale de pénétration du principe actif pour le produit A (Figure 54). En contrepartie, le produit B montre des concentrations tissulaires de DOX globalement plus élevée et une distance de pénétration du principe actif plus importante puisque nous ne détectons plus la DOX à partir de 1840 μ m de distance (Figure 54).



Figure 54: Profils de diffusion et concentrations tissulaires de DOX entre les produits A et B pour la taille 2

Comparaison des tailles par produits

Les profils de diffusion et les concentrations tissulaires de DOX mesurés ne présentent pas de différences significatives entre les tailles 1 et 2 du produit A (Figure 55).



Figure 55: Profils de diffusion et concentrations tissulaires de DOX entre les tailles 1 et 2 pour le produit A

Les profils de diffusion et les concentrations tissulaires de DOX mesurés ne présentent pas de différences significatives entre les tailles 1 et 2 du produit B (Figure 56).



Figure 56: Profils de diffusion et concentrations tissulaires de DOX entre les tailles 1 et 2 pour le produit B

Comparaison des profils de diffusion en fonction du type de tissu

Les profils de diffusion dans le tissu péri-tumoral et dans la tumeur ont une allure différente. La pénétration de la DOX est plus importante dans le tissu tumoral et les concentrations tissulaires sont également plus élevées que dans le tissu péri-tumoral (Figure 57).



Figure 57: Profils de diffusion et concentrations tissulaires de DOX en fonction de la zone de prélèvement par produit

Dans la tumeur, la concentration tissulaire moyenne de DOX sur la distance 0-760 μ m est significativement plus élevée avec le produit B (p<0,0001, MW). Nous détectons encore la DOX à une distance de 1560 μ m avec le produit B alors que nous sommes en dessous de la limite de quantification à 800 μ m pour le produit A (Figure 57).
E. Discussion

L'évaluation des modifications tissulaires en histopathologie montre qu'une chimioembolisation utilisant des microsphères chargées en DOX est plus agressive sur les tissus tumoraux (tissu cible) qu'une embolisation utilisant des microsphères non chargées. En effet, les tumeurs traitées avec les microsphères chargées en DOX présentent une nécrose quasi complète alors qu'il reste encore 20% de cellules tumorales viables avec la CHE utilisant des microsphères non chargées. Cependant, l'activité cytotoxique du traitement atteint également le parenchyme hépatique en périphérie de la tumeur. Par ailleurs, les résultats démontrent l'efficacité antitumorale d'une CHE, en mettant en évidence une réduction significative de la proportion de tumeur viable après traitement (microsphères chargées et non chargées) en comparaison des tumeurs CTRL. Nous n'avons pas trouvé d'influence de la taille sur l'efficacité antitumorale du traitement.

Les propriétés d'élution des deux produits étudiés sont très différentes mais n'ont pas de conséquence sur l'efficacité du traitement car en 3 jours, le produit A et le produit B ont tous deux relargués des concentrations de DOX cytotoxiques entrainant la nécrose des tumeurs (142-146). Néanmoins, nous avons mis en évidence un comportement différent de ces deux types de microsphères. Le produit B a relargué plus de 94% de la concentration initialement chargée, entrainant une quantité tissulaire de DOX et une distance de pénétration du principe actif plus importante que le produit A. En effet, le produit A se vide plus lentement et contient encore 40% de la concentration initiale de chargement à 3 jour, ce qui entraine moins de diffusion du principe actif et une concentration tissulaire de DOX plus importante aux abords des vaisseaux embolisés. Les mêmes résultats sont retrouvés lorsque les produits sont comparés à taille équivalente. D'autre part, la comparaison entre la taille 1 et la taille 2 pour chaque produit n'a pas montré de différences significatives quant aux propriétés d'élution du principe actif. Les résultats de quantification de la doxorubicine dans les microsphères obtenus pour le produit A sont cohérents avec ceux observés dans l'étude précédente.

En revanche, la localisation du vaisseau embolisé et donc les tissus à proximité des microsphères d'embolisation jouent un rôle dans la diffusion du principe actif. Les microsphères se vident plus rapidement quand elles occluent des vaisseaux situés dans la tumeur, favorisant ainsi la diffusion de la doxorubicine dans le tissu tumoral et une concentration tissulaire plus importante que dans le parenchyme hépatique situé en périphérie de la tumeur (147-149). La vascularisation plus importante de la tumeur VX2 en comparaison

du parenchyme hépatique peut favoriser la délivrance d'une quantité plus importante de doxorubicine dans le tissu tumoral (150). De plus, l'examen microscopique des coupes tissulaires colorées montre que la nécrose tumorale est un tissu plus « lâche » que le parenchyme hépatique. La densité cellulaire est moins élevée et les espaces interstitiels sont plus importants au sein du tissu tumoral nécrosé pouvant expliquer la meilleure diffusion de la doxorubicine (150).

F. Conclusions

Le produit A et le produit B analysés dans cette étude se distinguent par leur composition chimique et par leur propriété physicochimique ce qui influent directement sur les propriétés d'élution du principe actif hors des microsphères et donc sur sa diffusion tissulaire. La taille des microsphères ne joue pas un rôle significatif dans l'efficacité du traitement. En revanche, le site d'injection des microsphères doit être le plus ciblé possible car même si l'élution du principe actif est minime dans le tissu périphérique, les concentrations tissulaires sont cytotoxiques et provoquent une nécrose du parenchyme hépatique. Par ailleurs, la CHE avec des microsphères non chargées s'est avérée être efficace mais nettement moins agressive sur le tissu tumoral que la CHE utilisant des microsphères chargées en doxorubicine.

Les informations obtenues au cours de cette étude peuvent orienter le choix d'un type de microsphère selon que l'on désire un vecteur d'embolisation relarguant le principe actif de façon prolongée dans le temps (produit A) ou plutôt avoir une élution rapide (produit B).

Chapitre 3: Etude des propriétés d'élution des DC Bead M1 chargées à différentes concentration de doxorubicine

A. Travaux antérieurs

Il subsiste d'autres hétérogénéités majeures dans la procédure de la CHE : le choix de l'anticancéreux et sa concentration (Tableau 19). Il n'existe à ce jour aucun argument qui permette de recommander l'utilisation d'un agent anticancéreux plutôt qu'un autre.

Type de microsphère	Principe actif	Dose maximale de chargement (par mL ou par mg de microsphères)	Type d'évaluation	références
DC Beads [®]	doxorubicine	37,5 mg/mL	clinique	Varela 2007, Lammer 2010
	épirubicine	Dose de chargement non mentionée	clinique	Nicolini 2010
	mitoxantrone	20 mg/mL	In vitro Préclinique	Keese 2009
	irinotécan	50 mg/mL	clinique	Fiorentini 2007, Martin 2009
	topotécan	30 mg/mL	In vitro Préclinique (voie SC, rat)	Forster 2010
Hepaspheres®	doxorubicine	2 mg/mg	clinique	Grosso 2008
	épirubicine	1,2 mg/mg	clinique	Seki 2011a
	cisplatine	1 mg/mg	clinique	Seki 2011b
	oxaliplatine	8 mg/mg	clinique	Poggi 2008
	docétaxel	0,8 mg/mg	clinique	Seki 2011c

Tableau 19: Hétérogénéité dans le choix du principe actif

La doxorubicine est cependant l'agent anticancéreux le plus utilisé (15, 151). C'est un antibiotique antitumoral de la famille des anthracyclines dont la formule est $C_{27}H_{29}NO_{11}$ (poids moléculaire : 543 g/mol). La cytotoxicité des anthracyclines passe par 5 modes d'action principaux (152): c'est un agent intercalant ; un inhibiteur de la topoisomérase II ; elles sont capables de former des radicaux libres et des complexes organométalliques avec le fer susceptibles d'endommager les membranes cellulaires ; elles activent les mécanismes d'apoptose (à faible dose, < 1µM).

Influence sur le chargement

Il est possible de moduler la quantité chargée de principe actif dans la microsphère en faisant varier la concentration de la solution de chargement ou le temps de chargement (153, 154). La répartition du principe actif au sein de la microsphère n'est pas toujours homogène et

est en partie liée à la quantité chargée. Biondi *et al.* ont montré que la doxorubicine chargée à faible dose était répartie de façon homogène dans la microsphère (136) contrairement aux fortes doses dont l'accumulation était périphérique (Figure 58).



Figure 58: Images obtenues par microscopie confocale de microsphères chargées en doxorubicine (136)

La répartition dépend également des caractères physicochimiques du principe actif (structure, coefficient de diffusion dans la microsphère, phénomène d'empilement) et de la répartition des fonctions ioniques greffées dans la microsphère (130, 136). La vitesse de chargement est également influencée par la concentration en principe actif (Tableau 20) (78).

Bead Size Range (µm)	Doxorubicin Loading (mg/mL Beads)	Time to ≥99% Loading (min)
500-700	5	20
500-700	10	45
500-700	37.5	360
500-700	45	1440

Tableau 20: Influence de la concentration sur la vitesse de chargement des DC Bead™ (78)

Influence sur les propriétés d'élution

Les profils de libération sont différents en terme de vitesse de libération et de quantité de principe actif libérée pour un même type de microsphère (124, 125, 127). Gonzalez *et al.* ont démontré que les microsphères chargées à une plus faible concentration de doxorubicine se vidaient plus rapidement que celles chargées à une concentration plus élevées (Tableau 21).

	Slow release constant (mg \times h ^{-1/2})	Correlation factor or coefficient of determination (R^2)	Half life $(t_{1/2})$ (h)
Dose of 500-700	µm DC Bead loa	ded with dox (mg/mL)	
6.25	0.15-0.17	0.999	381
12.50	0.17-0.20	0.997	1082
18.75	0.18-0.21	0.995	2197
25	0.26-0.28	0.995	2403
37.50	0.28-0.31	0.999	3658

 Tableau 21: Vitesse d'élution en fonction de la concentration de doxorubicine (125)

Plusieurs études ont également montré que la doxorubicine avait la capacité de se réarranger et de former des empilements par liaisons hydrogènes à l'intérieur de la microsphère (phénomène de stacking) (155-157). La doxorubicine, présente alors sous une forme cristalline, nécessite une solubilisation pour être libérée. Ce phénomène pourrait expliquer sa cinétique de libération sur plusieurs semaines (79).

Etudes in vivo

Certaines études ont cherché à comparer l'efficacité de différents agents anticancéreux ou de déterminer l'effet de la concentration chargée sur la réponse tumorale et la tolérance du traitement. Par exemple, Eyol *et al.* ont comparé l'efficacité et la tolérance de microsphères (taille moyenne de 75 µm) chargées en doxorubicine et en irinotecan dans un modèle de métastase du foie chez le rat (158). L'activité antitumorale était similaire entre les deux agents anticancéreux cependant la tolérance du traitement était meilleure avec l'irinotecan. L'équipe de Klass *et al.* ont étudié la réponse tumorale chez 25 patients atteints d'un CHC après une CHE avec des Hepasphere[™] non chargées ou chargées à 25 mg, 50 mg et 75 mg de doxorubicine. Les microsphères chargées à 50 mg ont induit une réduction plus importante des cellules tumorales viables que les autres doses, mais aucune relation entre le taux de complication et la dose n'a été mise en évidence (159).

B. Objectifs

L'objectif de cette étude est de déterminer l'influence de la concentration chargée dans les microsphères DC Beads $M1^{TM}$ (70-150 µm) sur les propriétés d'élution de la doxorubicine.

C. Matériels et méthodes

Chargement des microsphères d'embolisation

Les DC Bead M1TM (Biocompatibles UK Ltd, Farnham) sont des microsphères d'embolisation calibrées de 70 à 150 μ m. Elles sont composées d'un polymère, le polyvinyl alcool, chargé négativement grâce à la greffe de groupes sulfonate (SO₃⁻). Cette opération permet de les charger, par interactions ioniques, en doxorubicine. Nous avons chargé des microsphères à une concentration de 18 mg DOX/mL de microsphères et préparé une autre solution à une concentration de 37 mg DOX/mL de microsphères.

Modèle animal

Cette étude inclus 12 lapins adultes (race : néo-zélandais) sans tumeurs hépatiques (foie sain). Un groupe de 6 lapins est embolisé avec les microsphères chargées à 18 mg/mL et l'autre groupe avec les microsphères chargées à 37 mg/mL. Ensuite pour chacun des groupes, 3 lapins sont sacrifiés après 1h d'embolisation et 3 lapins après 24h de traitement. Le choix de ces délais est basé sur une étude, publiée en 2012 sur les DC Beads M1TM, démontrant que la concentration tissulaire de DOX est maximale dans les premières heures suivant l'embolisant et diminue intensément après 24h (132) de traitement.

Prélèvements

Après le sacrifice des animaux, les foies sont analysés macroscopiquement. Des prélèvements tissulaires sont réalisés à différents niveaux du foie, inclus dans un milieu de cryosection et congelés rapidement en azote liquide. Deux coupes adjacentes sont effectuées à l'aide d'un cryomicrotome : la première coupe (8 μ m) est montée sur CaF₂ pour les acquisitions infrarouge et de fluorescence ; la 2^{ème} coupe (5 μ m) est montée sur lame de verre standard et colorée à l'hémalun-éosine (HE) afin de faciliter le repérage des microsphères sur les coupes non colorées et évaluer les modifications tissulaires.

Quantification de la doxorubicine dans les microsphères

La microspectroscopie infrarouge est utilisée pour quantifier la concentration de DOX retenue dans les microsphères à chaque délai de sacrifice. L'acquisition des images

infrarouge, l'extraction des spectres et les prétraitements des données sont identiques à l'étude présentée dans le chapitre 2.

Quantification de la doxorubicine dans le tissu

La microspectroscopie de fluorescence est utilisée pour quantifier la concentration tissulaire de DOX autours des vaisseaux occlus et pour établir les profils de diffusion en fonction de la concentration de chargement. L'acquisition des images de fluorescence, l'extraction des profils et les prétraitements des données sont identiques à l'étude présentée dans le chapitre 2.

D. Résultats

Analyses histopathologiques

L'examen microscopique des coupes colorées montrent une nécrose complète du tissu hépatique à 24h de traitement sans distinction entre les différentes concentrations de chargement utilisées.

Quantification de la doxorubicine dans les microsphères

Un total de 131 microsphères est analysé dans cette étude. Les pourcentages d'élution mesurés après 1h de traitement ne sont pas significativement différents entre les deux concentrations de chargement (MW, p=0,0894) (Figure 59). En revanche, après 24h de traitement, les microsphères chargées à 18 mg/mL présentent un pourcentage d'élution supérieur à celui des microsphères chargées à 37 mg/mL (87% versus 78% respectivement, p=0,0112) (Figure 59).

Chapitre 3: Etude des propriétés d'élution des DC Bead M1 chargées à différentes concentration de doxorubicine



Figure 59: Pourcentage d'élution des microsphères chargées à 18 mg/mL et à 37 mg/mL en fonction du délai

Quantification de la doxorubicine dans le tissu

Un total de 59 vaisseaux est analysé dans cette étude. Les profils de diffusion à 1h montrent une concentration tissulaire de DOX plus élevée avec les microsphères chargées à 18 mg/mL jusqu'à une distance de 200 μ m (MW, p<0,05) (Figure 60). Les concentrations tissulaires de DOX mesurées autour des vaisseaux occlus à 1h (moyennes par tranche de 80 μ m de distance) sont significativement supérieures avec les microsphères chargées à 18 mg/mL en comparaison des microsphères chargées à plus forte concentration (Figure 60). Les valeurs obtenues au-delà de 240 μ m de distance étant inférieures à la limite de quantification, nous n'avons pas pu comparer statistiquement les données.



Figure 60: Profil de diffusion et concentration tissulaire mesurés à 1h

Les profils de diffusion à 24h montrent une concentration tissulaire de DOX similaire jusqu'à une distance de 80μ m (p>0,05) puis plus élevée avec les microsphères chargées à 18 mg/mL jusqu'à une distance de 360 µm (MW, p<0,05) (Figure 61). Les concentrations tissulaires de DOX mesurées autour des vaisseaux occlus à 24h (moyennes par tranche de 80 µm de distance) sont significativement supérieures avec les microsphères chargées à 18 mg/mL en comparaison des microsphères chargées à plus forte concentration (Figure 61). Les valeurs obtenues au-delà de 360 µm de distance étant inférieures à la limite de quantification, nous n'avons pas pu comparer statistiquement les données.



Figure 61: Profil de diffusion et concentration tissulaire mesurés à 24h

E. Discussion

Ce travail démontre que des microsphères chargées à une plus faible concentration de DOX se vident plus rapidement à 24h de traitement que des microsphères chargées avec une concentration plus élevée. Ce phénomène peut s'expliquer par la capacité de la DOX à former des empilements par liaisons hydrogènes à l'intérieur de la microsphère en cas de forte concentration de chargement (phénomène de stacking) (155-157). La doxorubicine, présente alors sous une forme cristalline, nécessite une solubilisation pour être libérer diminuant ainsi sa cinétique d'élution hors des microsphères. La libération plus rapide de la DOX avec les microsphères chargées à 18 mg/mL induit des concentrations tissulaires significativement plus importantes et une meilleure diffusion de celle-ci dans le tissu. Le fait d'obtenir des concentrations tissulaires de doxorubicine plus importantes avec les microsphères les moins chargées est surprenant. De plus, l'évaluation de la nécrose sur les coupes tissulaires a montré une nécrose complète du tissu hépatique à 24h de traitement sans distinction entre les concentrations utilisées. Ces résultats inattendus sont intéressants dans un contexte clinique d'utilisation des microsphères car ils démontrent que ce n'est pas forcément en chargeant les microsphères avec des concentrations élevées que l'on induit des concentrations tissulaires plus importantes et une nécrose tissulaire supérieure.

Par ailleurs, nos résultats sont différents de l'étude publiée par Dreher *et al.* (132) qui décrit des concentrations tissulaires de DOX plus élevées à 1h qu'à 24h avec les DC Beads $M1^{TM}$. Leur étude a été réalisée dans le foie de porc et la quantification de la DOX a été effectuée de façon semi-quantitative à l'aide d'un microscope confocale. Cette technique présente une sensibilité inférieure à la microspectrofluorimétrie et le mode d'acquisition avec un microscope confocal mesure la fluorescence totale (tissu + DOX), ne permettant pas d'évaluer le signal de fluorescence spécifique de la DOX. Les différents modes opératoires pourraient expliquer ces résultats contradictoires.

F. Conclusions

Nous avons démontré que la concentration d'anticancéreux chargée dans les microsphères a une influence sur la vitesse d'élution *in vivo*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus *in vitro* sur d'autres tailles de microsphères et confirment que des microsphères moins chargées se vident plus rapidement que des microsphères chargées à plus forte concentration. Cependant, cette différence n'est pas extrêmement importante et c'est surtout sur les résultats de l'examen histopathologique et des quantifications tissulaires de doxorubicine que l'on peut dire qu'une concentration de chargement plus faible peut être aussi efficace qu'une concentration plus élevée.

Chapitre 4: Etude de l'élution de la doxorubicine hors des DC Bead 300-500 µm dans des pièces opératoires d'hépatectomie

A. Travaux antérieurs

Les résultats obtenus à partir de modèles expérimentaux sont limités par les différences majeures entre les modèles animaux et les patients ayant un CHC (architecture tissulaire, vascularisation). Récemment, une étude portant sur l'analyse d'explants de foie de patients atteints de CHC et ayant subi une transplantation a mesuré l'élution de la doxorubicine hors des DC BeadTM 100-300 μ m (96). Elle a démontré la présence de la doxorubicine dans le tissu tumoral plusieurs semaines après embolisation (36 jours) avec une distance de diffusion de l'ordre du millimètre. La concentration tissulaire diminuait au cours du temps (8 jours versus 36 jours).

B. Objectifs

L'hôpital Robert Debré de Reims participe à un essai clinique randomisé multicentrique de phase II/III évaluant l'apport du sunitinib par voie orale à la chimioembolisation utilisant des microsphères chargées. Les objectifs sont de vérifier la bonne tolérance du traitement et d'évaluer le taux de survie globale à 2 ans. Les DC-BeadTM 300-500 µm chargées en doxorubicine (37,5 mg DOX/mL de microsphères) sont utilisées afin de traiter des patients atteints d'un CHC. Dans le cadre de cet essai, 4 patients ont été traités par chimioembolisation puis hépatectomisés à différents délais après embolisation, allant de 2 mois à plus de 3 mois. La mise à disposition des 4 pièces opératoires d'hépatectomie est une opportunité pour suivre l'élution de la doxorubicine sur des délais prolongés et fournira des informations complémentaires sur le comportement de ces microsphères dans la tumeur en pathologie humaine. Les objectifs sont de déterminer s'il reste encore de la DOX à l'intérieur des microsphères et s'il y a toujours une élution du principe actif dans le tissu à des délais aussi étendus.

Cette étude est en cours de réalisation et nous présentons dans ce document les informations recueillies à ce jour, qui devront être complétées par des mesures supplémentaires.

C. Matériels et méthodes

Schéma thérapeutique

Les patients sont randomisés en 2 bras de traitement :

- Bras A : les patients reçoivent du sunitinib par voie orale, tous les jours pendant 4 semaines ; ce traitement est répété toutes les 6 semaines, jusqu'à 9 cures. Les patients ont également 1 à 3 séances de chimioembolisation transartérielle, à l'aide de microsphères chargées en doxorubicine (DC BeadTM 300-500 μm chargées à 37,5 mg DOX/mL de microsphères), espacées de 6 à 8 semaines. La première séance a lieu 7 à 10 jours après le début de la première cure de sunitinib et nécessite l'arrêt du traitement, la veille de la séance et jusqu'à 2 jours après.
- Bras B : les patients reçoivent le même traitement que dans le bras A, mais le sunitinib est remplacé par un placebo.

	Nombre d'embolisation	Date d'embolisation	Date de chirurgie	Délai entre la dernière embolisation et la chirurgie
Patient n°1	1	20/08/2013	16/10/2013	57 jours
Patient n°2	3	24/01/2012	12/07/2012	79 jours
		13/03/2012		
		24/04/2012		
Patient n°3	3	23/08/2012	22/02/2013	80 jours
		19/10/2012		
		04/12/2012		
Patient n°4	1	24/07/2012	06/11/2012	105 jours

Tableau 22: nombre d'embolisations réalisées et délai minimum entre la dernière CHE et l'opération chirurgicale

Nous avons travaillé à partir de blocs tissulaires paraffinés issus des pièces opératoires d'hépatectomie (Tableau 22). Deux coupes adjacentes sont effectuées grâce à un microtome : la première coupe (8 μ m) est montée sur CaF₂ pour les acquisitions infrarouge et de fluorescence ; la 2^{ème} coupe (5 μ m) est montée sur lame de verre standard et colorée à l'hématoxyline-éosine-safran (HES).

Quantification de la doxorubicine dans les microsphères

La quantification de la doxorubicine dans les microsphères est réalisée par microspectroscopie infrarouge. Les images des vaisseaux embolisés par des microsphères sont acquises sur la gamme spectrale 800-4000 cm⁻¹ avec une taille de pixel de 6,25 μ m² à une résolution spectrale de 4 cm⁻¹ et un nombre d'accumulations de 8. Les spectres IR sont analysés sur la gamme spectrale 900-1800 cm⁻¹, corrigés de la déformation de la ligne de base puis normalisés vectoriellement. Nous avons récupéré l'absorbance A sous le pic caractéristique de la doxorubicine (989 cm⁻¹) et converti l'aire en concentration grâce à une courbe étalon obtenue avec des DC Bead chargées avec des concentrations connues de doxorubicine (R²=0,98).

Quantification de la doxorubicine dans le tissu

La quantification de la doxorubicine dans le tissu autour des vaisseaux occlus est réalisée par microspectrofluorimétrie. Nous avons acquis des profils de fluorescence en s'éloignant progressivement du vaisseau et cela jusqu'à la disparition du signal de la doxorubicine. Nous avons utilisé un objectif x10, un temps de pause de 10s, 2 accumulations par point et une longueur d'onde excitatrice à 488 nm. Après une étape de déconvolution spectrale afin de supprimer la contribution de l'autofluorescence tissulaire, nous avons caractérisé le signal de la doxorubicine que nous avons ensuite convertit en concentration grâce à une courbe étalon obtenue à partir de gels de collagène chargés à des concentrations connues de doxorubicine (R^2 =0.99).

A l'heure actuelle, le nombre de vaisseaux analysés étant insuffisant, les calculs statistiques sont réalisés à partir des profils de diffusion mesurés et non pas sur les moyennes obtenues par vaisseau.

D. Résultats

Comparaison entre délais

La concentration de DOX à l'intérieur des microsphères diminue avec le temps (Figure 62). Les microsphères (n=38), chargées à une concentration initiale de 37,5 mg/mL, contiennent 6,47±4,9 mg DOX/mL de microsphères après 57 jours de traitement (médiane :

5,46 mg/mL). Cette concentration continue de diminuer après 79 et 80 jours de traitement (médiane : 1,7 mg/mL et 3 mg/mL respectivement) et se trouve inférieure à la limite de quantification après 105 jours (< 1 mg/mL). Après 57 jours de traitement, les microsphères contiennent encore 17,2% de la concentration initiale de chargement, 16,6% après 79 jours, 9% après 80 jours et moins de 2.6% après 105 jours.



Figure 62: Concentration de DOX dans les microsphères aux différents délais

Les profils de diffusion tissulaires montrent que la DOX est présente à des concentrations détectables à tous les délais sauf après 105 jours de traitement dont les valeurs sont en dessous de la limite de quantification (0,287 μ mol/L) (Figure 63). La diffusion de la DOX est différente en fonction du délai analysé. La concentration tissulaire moyenne de DOX à 57 jours (n=16 profils pour 6 vaisseaux) est de 1,57±2,6 μ mol/L (médiane : 0,83 μ mol/L) sur la distance 0-760 μ m. Elle est significativement plus importante qu'à 79 jours (n=66 profils pour 39 vaisseaux) qui est de 0,83±1,5 μ mol/L (médiane : 0,3 μ mol/L). Après 80 jours (n=26 profils pour 10 vaisseaux), la concentration tissulaire est significativement plus faible qu'à 79 jours (0,32±0,81 μ mol/L, P<0,0001) et se trouve en dessous de la limite de quantification au délai de 105 jours (n=16 profils pour 8 vaisseaux) après traitement (limite de quantification : 0,287 μ mol/L).

Chapitre 4: Etude de l'élution de la doxorubicine hors des DC Bead 300-500 µm dans des pièces opératoires d'hépatectomie



Figure 63: Profil de diffusion et concentration tissulaire de DOX aux différents délais

Quantification de la doxorubicine après 57 jours de traitement

Ce patient n'a reçu qu'une injection de microsphères par conséquent toutes les microsphères analysées (et donc les concentrations mesurées) correspondent à un seul délai après traitement. La concentration à l'intérieur des microsphères varient en fonction du nombre de billes agglomérées dans le vaisseau. Elle est significativement plus importante quand les microsphères se trouvent en amas dans le vaisseau (MW, p=0,0013) (Figure 64). Cette différence est évidente sur les photos des vaisseaux prises avant l'acquisition des images IR (Figure 64).

Chapitre 4: Etude de l'élution de la doxorubicine hors des DC Bead 300-500 µm dans des pièces opératoires d'hépatectomie



Figure 64: Concentration de DOX dans les microsphères. Illustration de vaisseaux analysés à 57 jours

Les profils de diffusion montrent que la DOX est présente à des concentrations détectables dans le tissu par microspectrofluorimétrie (limite de quantification : 0,287 μ mol/L). La diffusion de la DOX est également différente en fonction du nombre de billes agglomérées dans le vaisseau. Nous retrouvons plus de DOX autour des vaisseaux occlus par un grand nombre de microsphères (Figure 65).



Figure 65: Profil de diffusion et concentration tissulaire de DOX à 57 jours en fonction du nombre de microsphères occluant le vaisseau

Comme nous ne disposons pas des effectifs nécessaires pour réaliser une analyse statistique fiable sur les vaisseaux (n=6 vaisseaux), nous avons comparé les profils de diffusion (n=16 profils). La concentration tissulaire moyenne de DOX sur la distance 0-760 μ m est significativement plus importante quand les microsphères se trouvent en amas dans le vaisseau (MW, p<0,0001) (Figure 65).

Quantification de la doxorubicine après 79 jours de traitement

Ce patient a reçu trois injections de microsphères espacées de plusieurs semaines (Tableau 22) par conséquent les microsphères analysées (et donc les concentrations mesurées) peuvent correspondre à différents délais d'embolisation. Malgré ce paramètre, la DOX est détectable à l'intérieure des microsphères analysées (limite de quantification : 1 mg/mL). La concentration à l'intérieur des microsphères est significativement plus importante quand les microsphères se trouvent en amas dans le vaisseau (Figure 66). Cette différence est marquée quand le nombre de microsphères est supérieur à dix (10.5 mg/mL soit 28% de la concentration initialement chargée). Les microsphères en amas de plus de 80 contiennent encore 43% de la concentration initiale de chargement.



Figure 66: Concentration de DOX dans les microsphères. Illustration de vaisseaux analysés à 79 jours

Les profils de diffusion montrent que la DOX est présente à des concentrations détectables dans le tissu par microspectrofluorimétrie (limite de quantification : 0,287 μ mol/L). La diffusion de la DOX est également différente en fonction du nombre de billes agglomérées dans le vaisseau. Nous retrouvons plus de DOX autour des vaisseaux occlus par un grand nombre de microsphères. Cette différence est marquée quand le nombre de microsphères est supérieur à neuf (Figure 67).



Figure 67: Profil de diffusion et concentration tissulaire de DOX à 79 jours en fonction du nombre de microsphères occluant le vaisseau

La concentration tissulaire moyenne de DOX, autour des vaisseaux occlus (n=66 profils pour 39 vaisseaux), est de $0.83\pm1.5 \ \mu mol/L$ (médiane : $0.3 \ \mu mol/L$) sur la distance 0-760 μm . Elle est significativement plus importante quand les microsphères se trouvent en amas dans le vaisseau (MW, p<0.0001) (Figure 67).

Quantification de la doxorubicine après 80 jours de traitement

Ce patient a également reçu trois injections de microsphères espacées de plusieurs semaines (Tableau 22) par conséquent le même problème du délai d'origine des microsphères analysées se pose. La concentration à l'intérieur des microsphères isolées (de 1 à 4) est inférieure à la limite de quantification mais elle est encore détectable quand les microsphères sont en amas (4,5 mg/ml soit 11,5% de la concentration initiale de chargement) (Figure 68).





Figure 68: Concentration de DOX dans les microsphères. Illustration de vaisseaux analysés à 80 jours

Les profils de diffusion tissulaires montrent que la DOX est présente à des concentrations détectables autour des vaisseaux occlus par un nombre de microsphères supérieur à cinq (limite de quantification : 0,287 μ mol/L). La concentration tissulaire moyenne de DOX sur la distance 0-760 μ m est significativement plus importante autour du vaisseau embolisé par plus de dix microsphères (MW, p<0,0001) (Figure 69). L'analyse statistique est réalisée sur les profils de diffusion mesurés autour des vaisseaux occlus (n=26 profils pour 10 vaisseaux).

Chapitre 4: Etude de l'élution de la doxorubicine hors des DC Bead 300-500 µm dans des pièces opératoires d'hépatectomie



Figure 69: Profil de diffusion et concentration tissulaire de DOX à 80 jours en fonction du nombre de microsphères occluant le vaisseau

Quantification de la doxorubicine après 105 jours de traitement

Ce patient n'a reçu qu'une injection de microsphères par conséquent toutes les microsphères analysées correspondent au même délai. La concentration de DOX dans les microsphères (n=4) après 105 jours de traitement est inférieure à la limite de quantification (1 mg DOX/mL de microsphères) (Figure 70). Nous avons retrouvé essentiellement des microsphères isolées pour ce patient et les concentrations tissulaires autour de ces vaisseaux (n=16 profils pour 8 vaisseaux) sont inférieures à la limite de quantification (0,287 μ mol/L).



Figure 70: Concentration de DOX dans les microsphères. Illustration de vaisseau analysé à 105 jours

E. Discussion

À l'heure actuelle, cette étude comporte plusieurs limites. Premièrement, les multiples embolisations de deux patients sur quatre perturbent l'interprétation des mesures quantitatives du fait que les microsphères analysées peuvent être issues de sessions différentes d'injections. Deuxièmement, les effectifs sont encore trop faibles pour pouvoir comparer statistiquement les mesures de quantification de la DOX entre les délais à catégorie de vaisseau équivalente (caractérisée par le nombre de microsphères en amas).

Cependant, nous avons démontré qu'au-delà du facteur temps, le statut d'amas ou de microsphère isolée joue un rôle crucial sur les propriétés d'élution des microsphères. Les microsphères en amas « se protègent » du phénomène d'élution. Par conséquent, nous retrouvons des « points chauds » dans le tissu où les microsphères ont encore une activité d'élution après 79-80 jours de traitement. Ce phénomène est peut-être lié à la méthode d'injection des microsphères dans le système vasculaire ce qui pose une autre question concernant la meilleure procédure d'injection.

Par ailleurs, une étude publiée en 2010 (93) précisait que le taux de récurrence des tumeurs hépatiques après une CHE utilisant des microsphères chargées (DOX) était aux

alentours de 3 mois. Ce délai est peut-être lié à la fin de l'activité d'élution du vecteur après 3 mois de traitement.

D'autre part, si le tissu tumoral est nécrosé autour des vaisseaux, l'agression par le traitement n'est plus nécessaire et au contraire pourrait empêcher une réparation tissulaire. Il serait donc intéressant d'examiner les coupes colorées afin de définir la nature histologique des tissus entourant les vaisseaux embolisés.

F. Conclusions

Les résultats de cette étude sont prometteurs et mettent en exergue un autre aspect du comportement des microsphères *in vivo*. En plus des facteurs « type de produit, taille et concentration en principe actif » vient s'ajouter la notion d'amas dans les paramètres pouvant moduler les propriétés d'élution de la doxorubicine. Les microsphères en amas se vident moins rapidement que les microsphères isolées entrainant ainsi une élution tissulaire prolongée du principe actif.

Chapitre 5: Développement d'un modèle de reconnaissance tissulaire adapté à la tumeur VX2

Publication n°1 :

Histologie spectrale infrarouge : caractérisation et quantification tissulaire automatique sur des tumeurs hépatiques développées chez le lapin

H. D'Inca, M. Wassef, J. Namur, F. Pascale, A. Laurent et M. Manfait

A. Préambule de l'article 1

Introduction

Le modèle tumoral VX2 dérive d'un carcinome épidermoïde qui s'est développé chez le lapin. Cette tumeur est transplantable en série, peut se développer dans différents organes du lapin adulte et possède une croissance rapide. Ces caractéristiques en font un modèle expérimental de référence pour étudier l'efficacité des traitements anticancéreux. Ce modèle est notamment très utilisé en radiologie interventionnelle afin d'évaluer l'efficacité de la chimioembolisation dans le cadre du traitement du CHC.

En oncologie, l'efficacité d'un traitement est déterminée d'après différents critères comme l'augmentation du taux de survie des patients traités ou encore la diminution du volume tumoral mais aussi sur des critères fonctionnels comme la diminution de la viabilité tumorale. C'est lors d'un examen anatomopathologique que l'architecture tissulaire et la viabilité tumorale pourront être évalués à l'aide de colorations ou marquages spécifiques. À l'heure actuelle, cet examen est la méthode de référence pour identifier les modifications tissulaires induites par un traitement anticancéreux. Cependant, les techniques permettant de quantifier ces modifications tissulaires correspondent à des protocoles de préparation des échantillons particuliers, restent observateurs dépendants et nécessitent beaucoup de temps d'analyse.

La microspectroscopie infrarouge a déjà monté un fort potentiel comme outil complémentaire de l'examen histopathologique car elle permet d'obtenir des informations à l'échelle moléculaire sans coloration au préalable de l'échantillon. Lorsqu'elle est couplée avec des outils chimiométriques (comme la mise au point de modèle de prédiction), la microspectroscopie infrarouge permet de distinguer la signature spectrale des tissus sains et des tissus néoplasiques. De plus, de tels algorithmes visant à automatiser la reconnaissance de zones tissulaires sur coupe histologique présentent également l'avantage de pouvoir les quantifier. Basés sur l'analyse d'une quantité importante de spectres, les modèles de prédiction permettent d'identifier la signature spectrale d'un tissu d'intérêt puis de quantifier la proportion qu'occupe ce tissu sur une coupe tissulaire analysée en aveugle.

L'objectif de cette étude est dans un premier temps de valider l'utilisation de l'imagerie infrarouge pour discriminer les différents tissus de la tumeur VX2, puis dans un second temps, de développer un modèle de prédiction automatique, permettant d'identifier et de quantifier les tissus présents dans ce modèle de tumeur hépatique.

Matériels et méthodes

Les tumeurs sont développées suite à l'injection d'une suspension de cellules tumorales VX2 directement dans le foie des lapins (n=10). L'exérèse des tumeurs est pratiquée après un développement tumoral de 14 jours. Le diamètre moyen des tumeurs est de 2 cm. Les échantillons sont ensuite examinés macroscopiquement puis fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine. Deux coupes adjacentes, du même bloc de paraffine, sont réalisées avec un microtome à une épaisseur de 10 μ m. La première coupe est déposée sur une lame de CaF₂ nécessaire à l'analyse en infrarouge. La coupe adjacente est déposée sur une lame de verre standard puis colorée à l'hématoxyline-éosine-safran (HES). Cette coupe colorée en HES sert de référence pour la validation des résultats obtenus avec l'imagerie infrarouge. Parmi les dix tumeurs inclues dans cette étude, cinq tumeurs sont utilisées pour l'étape de caractérisation tissulaire et de construction du modèle de prédiction, les cinq autres comme échantillons tests servant à valider le modèle de prédiction.

L'acquisition de 22 images infrarouges (9 sur les cinq premières tumeurs et 13 sur les cinq autres) est réalisée avec le microspectromètre Spotlight 300 system de Perkin Elmer sur la gamme spectrale 800-4000 cm⁻¹ avec une taille de pixel de 25 μ m, une résolution spectrale de 4 cm⁻¹ et un nombre d'accumulations de 2. Les étapes de prétraitement des images infrarouges ont consisté à neutraliser l'influence de la paraffine (grâce à l'algorithme EMCS) puis à corriger la déformation de ligne de base des spectres, et enfin à réaliser une normalisation vectorielle de ces derniers sur la gamme spectrale 900-1800 cm⁻¹.

L'algorithme de classification utilisé dans un premier temps est le K-means (KM). La classification KM permet de regrouper les spectres présentant des similitudes au sein d'un même cluster. Le nombre de clusters étant déterminé empiriquement par l'utilisateur, différentes valeurs ont été testées dans cette étude. Après classification, une image pseudocouleur, appelée image KM, est reconstituée (une couleur différente par cluster) et est confrontée à la coupe histologique colorée correspondante. Pour valider la classification KM obtenue, un total de 195 zones de 200 µm² est sélectionné sur les coupes HES au sein de chaque structure d'intérêt identifiée avec l'anatomopathologiste (parenchyme hépatique, cellules tumorales viables, nécrose intratumorale et fibrose : 31, 59, 67 et 38 zones respectivement). Chaque zone est ensuite reportée sur les images KM afin de vérifier que chaque cluster correspond à une structure identifiée sur la coupe HES. Les spectres des clusters validés ont ensuite permis de construire une banque de données représentative des signatures spectrales propres à ces tissus d'intérêt. Les spectres obtenus ont ensuite été répartis pour deux tiers dans un jeu de spectres dit d'entrainement (317 886 spectres) et pour un tiers dans un jeu de spectres dit de validation (158 943 spectres).

Un modèle de prédiction a ensuite été construit en appliquant une analyse discriminante linéaire (ADL) au jeu de spectres d'entrainement. Ce modèle a été validé une première fois sur le jeu de spectres de validation (validation interne), puis une seconde fois en considérant les treize images IR enregistrées sur les cinq tumeurs n'ayant pas été utilisées pour construire la banque de données (validation externe). Les prédictions ADL obtenues en validation externe (se présentant également sous forme d'images pseudo-couleur notées images ADL) sont comparées aux coupes adjacentes colorées à l'HES : 219 zones d'intérêt sont ainsi reportées sur les images ADL pour valider les attributions du modèle de prédiction (32 zones pour le parenchyme hépatique, 101 pour les cellules tumorales viables, 62 pour la nécrose intratumorale et 24 pour la fibrose). L'identification automatique des tissus n'est pas le seul avantage que présente l'ADL. Le modèle de prédiction calcule également, et de façon automatique, la proportion qu'occupe chaque type de tissu sur l'image ADL, permettant ainsi de quantifier la viabilité tumorale.

Résultats

La comparaison entre les 9 images KM et les coupes adjacentes colorées en HES (obtenues sur les cinq premières tumeurs), montre qu'une classification en 8 clusters permet une bonne représentation des structures tissulaires de la tumeur VX2 (corrélation avec la coupe HES supérieure à 73% en fonction du type de tissu considéré). Notons qu'un nombre de classes plus faible ne révèle aucune structure ou ne permet pas de mettre en évidence les fines zones de fibrose.

La validation interne du modèle de prédiction ADL montre une sensibilité supérieure à 83% et une spécificité supérieure à 93% pour les quatre types de tissus étudiés. La validation externe sur les treize images IR non labellisées présente une corrélation supérieure à 88% pour le parenchyme hépatique, les cellules tumorales viables et la nécrose intratumorale. Cependant, seul 54% des zones de fibrose sont correctement identifiées par le modèle de prédiction.

L'évaluation de la viabilité tumorale montre que les tumeurs VX2 présentent en moyenne 73% de cellules tumorales viables et 20% de nécrose après 14 jours de développement. Les zones de fibrose représentent 7% de la surface tumorale.

Conclusion et perspectives

Ces résultats montrent que l'imagerie infrarouge, associée à des outils de classification spectrale, permet d'identifier et de quantifier automatiquement les différents types de tissus de la tumeur VX2. Cependant certaines améliorations et perspectives doivent être envisagées quant à l'identification de la fibrose d'une part et à l'application de ce modèle de prédiction à des tumeurs VX2 traitées par microsphères d'embolisation.

Histologie spectrale infrarouge: caractérisation et quantification tissulaire automatique sur des tumeurs hépatiques développées chez le lapin

H. D'Inca¹, M. Wassef², J. Namur³, F. Pascale⁴, A. Laurent^{4, 5}, M. Manfait¹

¹MéDIAN FRE CNRS, UFR de pharmacie, université Reims Champagne-Ardenne 3481 MEDyC, 51 rue Cognacq Jay 51096 Reims, France ²Laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique, APHP, hôpital Lariboisière, 2 rue Ambroise Paré 75475 Paris Cedex 10, France ³ArchimMed SARL, 12 rue Charles de Gaulle, 78350 Jouy en Josas, France ⁴CR2i, APHP-INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas, France ⁵Neuroradiologie, APHP, hôpital Lariboisière, 2 rue Ambroise Paré 75475 Paris Cedex

hadrien.dinca@etudiant.univ-reims.fr / michel.manfait@univ-reims.fr

Automated tissue characterization and quantification of a rabbit liver carcinoma model using infrared imaging

Our objective was to apply infrared imaging and chemometrics to quantify the percentages of viable and necrotic tumor in a rabbit liver cancer. On two consecutive sections of paraffin embedded Vx2 tumors (n=5), we performed haematoxylin-eosin-saffron staining and FTIR-imaging followed by K-means computing. Both images were superimposed and we verified on 195 randomly selected spots if each histological area was identified by one cluster: 95% necrotic and 89% viable tumor areas were correctly matched. A predictive model based on these clusters was created using linear discriminant analysis (LDA). Sensitivity and specificity of the model were greater than 91% and 93% for both tissues. LDA model was validated by five unknown Vx2 tumors. LDA model determined that the surface of viable tumor represented 72 % of the tumor and the necrotic tissue 19 %. We are currently using this approach to quantify the necrotic effect and the reduction of tumor viability induced by different anticancer therapies at the preclinical stage.

1. Introduction

En oncologie, l'efficacité d'un nouveau traitement anticancéreux est évaluée sur des critères généraux comme la survie, le développement de la tumeur (ex : volume tumoral, viabilité, dissémination) et sur des critères plus spécifiques à la modalité du traitement (ex : nécrose tumorale pour la radiofréquence ou la chimioembolisation, densité vasculaire pour les traitements anti-angiogéniques).

L'examen anatomopathologique permet d'apprécier la morphologie tissulaire et la viabilité cellulaire à l'aide de colorations ou de marquages spécifiques. Cet examen reste la méthode de référence pour identifier les modifications tissulaires induites par ces traitements. Mais les techniques histologiques ne sont pas toujours adaptées à la quantification de ces modifications. L'identification des éléments tissulaires et cellulaires nécessite l'expertise de l'anatomopathologiste. Une approche quantitative effectuée avec un microscope optique reste observateur-dépendant. Les outils permettant de numériser des lames colorées nécessitent toujours l'intervention d'un expert pour analyser les images et restent encore consommateur de temps.

A l'heure actuelle, la microspectroscopie vibrationnelle d'absorption infrarouge (MSIR) appliquée à des coupes de tissus est utilisée comme un outil de caractérisation des tissus physiologiques et pathologiques [1-3]. Elle ne nécessite aucune coloration et aucun déparaffinage chimique des coupes tissulaires au préalable et a une résolution spatiale de l'ordre de 10µm. Les données spectrales sont obtenues dans un format informatique ce qui facilite leurs traitements et l'utilisation d'outils statistiques pour leurs interprétations. De plus, grâce au développement de modèles de prédiction, les étapes de caractérisation et de quantification tissulaire sur une coupe histologique peuvent être automatisées [4].

L'objectif de cette étude est de créer un model de prédiction dans le but de caractériser et de quantifier automatiquement le tissu tumoral et la nécrose intratumorale de la tumeur Vx2.

2. Matériels et méthodes

2.1 Model animal et prélèvements

La tumeur Vx2 dérive d'un carcinome épidermoïde qui s'est développé à partir d'un papillomavirus chez le lapin. Elle est transplantable en série chez le lapin adulte, facilement implantable dans différents organes (foie, utérus, rein, cerveau) et a une croissance rapide. Elle est fréquemment utilisée comme modèle de carcinome hépatique. Une suspension de cellules tumorales Vx2 a été directement injectée dans le foie des lapins à une concentration de 0,25x10⁶ cellules/ml. Une exérèse des tumeurs (n=10) a été pratiquée après quatorze jours de développement. Le diamètre moyen des tumeurs était de 2 cm.

Les échantillons de tissus ont été fixés au formaldéhyde puis inclus en paraffine. Deux coupes adjacentes du même bloc ont été réalisées avec un microtome à une épaisseur de 10 µm. Une coupe a été déposée sur une lame de fluorure de calcium (CaF₂) qui est un support transparent aux rayons infrarouges, pour l'analyse en MSIR. L'autre coupe a été

montée sur une lame de verre standard et colorée par hématoxyline-éosine-safran (HES). Cette seconde coupe a servi de contrôle pour la comparaison directe entre les résultats obtenus par MSIR et l'analyse histologique classique. Dix tumeurs Vx2 ont été analysées dans cette étude. Cinq de ces dix tumeurs nous ont servi à caractériser par MSIR les différentes structures histologiques de la tumeur Vx2 et à construire un modèle numérique d'identification de ces structures. Les cinq tumeurs restantes ont été utilisées pour valider le modèle de prédiction.

2.2 Imagerie infrarouge et traitements des images IR

Nous avons utilisé le microspectromètre Spotlight 300 system de Perkin Elmer pour réaliser les acquisitions infrarouges (IR). Nous avons fixé une résolution spatiale de 25 µm, une résolution spectrale de 4 cm⁻¹ et un nombre d'accumulation de 2 par pixel. Le temps d'acquisition pour une zone tissulaire d'environ 1 cm² est en moyenne de cinq heures et les images IR comprennent de 120 000 à 160 000 spectres acquis sur la gamme spectrale 800-2000 cm⁻¹.

2.2.1 Prétraitements

L'EMSC (Extended multiplicative signal correction) [5] est un algorithme qui se base sur la modélisation des données interférentielles (vapeur d'eau atmosphérique, paraffine, dispersion de la lumière IR) pour ensuite les soustraire des données spectrales.

2.2.2 Méthode de classification spectrale non supervisée : K-means (KM)

La classification KM [6] a été appliquée individuellement sur 9 images IR prétraitées. Cette méthode de classification statistique permet de regrouper en clusters les spectres présentant des similitudes spectrales. Le nombre de clusters est choisi empiriquement. Une couleur est attribuée de façon aléatoire à chaque cluster formant ainsi une image pseudo-couleur dite image K-means.

Pour chaque image IR, nous avons réalisé plusieurs classifications KM en augmentant progressivement le nombre de clusters. Ensuite chaque image KM a été superposée à la photo de la coupe adjacente colorée en HES. Pour valider la classification KM obtenue, un total de 195 zones de 200 μ m² a été sélectionné sur les coupes HES au sein de chaque structure d'intérêt identifiée avec l'anatomopathologiste (parenchyme hépatique, cellules tumorales viables, nécrose intratumorale et fibrose : 31, 59, 67 et 38 zones respectivement). Chaque zone a été ensuite reportée sur les images KM et nous avons pu vérifier que chaque cluster correspondait à une structure identifiée sur la coupe HES. Chaque structure pouvant être représentée par plusieurs clusters.

Nous avons utilisé les résultats de la classification KM pour construire « une banque » de spectres de référence. Nous avons récupéré les spectres de chaque cluster et leur avons attribué une classe histologique. Nous avons ainsi obtenu « une banque » de 476 829 spectres de référence.

2.2.3 Méthode de classification spectrale supervisée : Analyse discriminante linéaire (ADL)

Nous avons utilisé l'ADL pour créer un modèle de prédiction capable d'identifier automatiquement sur une coupe tissulaire inconnue les différents types de tissus en se référant à la « banque » de spectres de référence.

Le modèle de prédiction a subit deux étapes de validation. La première étape, dite de validation interne, consiste à confronter le modèle de prédiction créé à partir de 2/3 des spectres de la « banque » (jeu d'entrainement, 317 886 spectres) au 1/3 des spectres restant (jeu de validation, 158 943 spectres). Le résultat de la confrontation permet de calculer la sensibilité et la spécificité du modèle pour chaque type de tissu.

La deuxième étape de validation consiste à appliquer le modèle de prédiction aux treize images IR acquises sur les cinq tumeurs Vx2 inconnues du modèle. La méthode de comparaison des images ADL et HES est identique à celle utilisée pour la validation de la classification KM. Un total de 219 zones de 200 µm² a été sélectionné sur les coupes HES au sein du parenchyme hépatique, des cellules tumorales viables, de la nécrose intratumorale et de la fibrose (32, 101, 62 et 24 respectivement). Chaque zone a été ensuite reportée sur les images ADL pour vérifier l'attribution du modèle.

2.3 Quantification tissulaire

Le modèle ADL calcule automatiquement le pourcentage de la surface occupée par chaque classe tissulaire. Lors de la dernière étape de validation, nous avons utilisé ce moyen pour estimer le pourcentage moyen de la surface occupée par la nécrose intratumorale et par les cellules tumorales viables au sein de la tumeur Vx2.

3. Résultats

3.1 Méthode de classification spectrale non supervisée : K-means

La « Figure 1 » illustre les résultats d'une classification KM de deux à huit clusters (d-f) obtenus à partir d'une image infrarouge en absorbance totale (b).

Sur l'image KM en deux clusters (d), on ne distingue aucune structure histologique identifiée en HES (c). Lorsque nous augmentons le nombre de clusters de deux à cinq (e), des structures apparaissent. La comparaison entre les images KM en cinq clusters et les coupes colorées en HES montre une bonne corrélation pour le tissu tumoral et la nécrose (> 93 %) mais une mauvaise corrélation pour la fibrose intratumorale (44,8 %). Si nous augmentons le nombre de clusters jusqu'à huit, nous trouvons un cluster qui décrit 73,7 % des zones de fibrose. La corrélation entre les images KM en huit clusters et les coupes colorées en HES est alors de 90,3 % pour le parenchyme hépatique, de 89, 8% pour les cellules tumorales viables et de 95,5 % pour la nécrose intratumorale. Nous avons retenu la classification KM en huit clusters pour construire la « banque » de spectres de référence.



Figure 1 : Classification K-means. (a) Photo d'une coupe tissulaire de tumeur Vx2 non colorée.
(b) Image spectrale sans traitement. (c) Coupe adjacente colorée en HES montrant : (1) les cellules tumorales viables, (2) la nécrose intratumorale, (3) la fibrose intratumorale et (4) le parenchyme hépatique. (d-f) Images KM en 2, 5 et 8 clusters. La meilleure reproduction de la morphologie tissulaire a été obtenue avec une classification en 8 clusters. Echelle : 1 mm.

3.2 Méthode de classification spectrale supervisée : ADL

La matrice de corrélation obtenue par la confrontation des jeux d'entrainement et de validation du modèle ADL montre une sensibilité supérieure à 90% pour le parenchyme hépatique, les cellules tumorales et la nécrose intratumorale et de 83 % pour la fibrose. La spécificité est supérieure à 93 % pour les quatre types de tissus.

La « Figure 2 » illustre le type d'image obtenue par le modèle ADL. On observe cinq classes au total : quatre classes correspondant aux quatre types de tissus identifiés sur la coupe HES et une cinquième classe regroupant les spectres qui n'ont pas pu être classés par le modèle.

La comparaison entre les images ADL et les coupes colorées en HES montre une bonne corrélation. Pour le parenchyme hépatique, 87,5 % des zones identifiées sur l'HES étaient correctement classées par le modèle, 88,1 % pour les cellules tumorales viables et 95,2 % pour la nécrose intratumorale. Pour la fibrose intratumorale, seules 54,2 % des zones étaient correctement classées par le modèle.



Figure 2 : Classification ADL.

Gauche : photo HES d'une coupe de tissu. Droite : image ADL de la coupe de tissu. Rose : cellules tumorales viables (1), Jaune : nécrose intratumorale (2), Vert : fibrose (3), Noir : parenchyme hépatique (4), Bleu : spectres non classés. Echelle : 1 mm.

3.3 Quantification tissulaire

Le pourcentage moyen de la surface occupée par les cellules tumorales viables représente 72,9±13 % de la surface tumorale totale. Les zones nécrosées représentent 19,7±8 % de la surface tumorale tandis que les zones de fibrose représentent 7,4±6 %. Le pourcentage moyen de la surface occupée par la classe des spectres non classés est de 12,2±6 % sur les images ADL.

4. Discussion

Nous avons démontré que la MSIR associée au KM pouvait discriminer les types de tissus de la tumeur Vx2 avec une bonne sensibilité. Nous avons observé sur certaines images KM que les cellules tumorales viables étaient représentées par plusieurs clusters. Une étude du carcinome développé dans le colon a démontré que la zone de tissu tumoral identifiée en HES comportait trois clusters différents [7]. Les auteurs ont suggéré la présence d'une hétérogénéité tumorale non visible en coloration HES. Cette hétérogénéité tumorale reste à démontrer sur le modèle Vx2 à l'aide de techniques complémentaires (colorations spécifiques, marquages, protéomique).

Sur la base des résultats du KM, nous avons établi un modèle de prédiction de l'histologie IR en utilisant l'ADL. Nous avons suivi une validation en deux étapes alors que les études antérieures se limitent en général à l'étape de validation interne. La validation

interne de notre modèle montre une sensibilité supérieure à 90 % et une spécificité supérieure à 93 % pour le parenchyme hépatique, les cellules tumorales viables et la nécrose. La sensibilité et la spécificité sont de 83 % et 98 % pour la fibrose. Des résultats similaires ont été obtenus sur d'autres types de tissus : distinction du cerveau intact et du gliome avec une sensibilité supérieure à 74 % [4], de la muqueuse gastrique normale et pathologique avec une sensibilité de 95,2 % et une spécificité de 90,9 %. Certaines études vont jusqu'à l'étape de validation du modèle sur des échantillons inconnus. Mais elles considèrent le plus souvent la classification de spectres inconnus et non d'images IR dans leur totalité. Les valeurs de sensibilité et de spécificité sont généralement supérieures à 70 % [8]. Lors de l'application du modèle LDA sur les échantillons inconnus, une sensibilité supérieure à 86 % a été trouvée pour le parenchyme hépatique, les cellules tumorales viables et la nécrose montrant la bonne identification de ces trois structures par le modèle.

La mauvaise sensibilité du modèle pour le tissu fibreux (54 %) peut s'expliquer par l'origine histologique complexe de ce tissu. La fibrose peut être issue du stroma constitutif de la tumeur ou encore d'un processus de cicatrisation associé à la nécrose intratumorale. Nous émettons l'hypothèse que les variations de la composition biochimique du tissu fibreux ne sont pas prises en compte par le modèle à l'heure actuelle.

Les résultats de la quantification tissulaire ont montré que la tumeur Vx2 était majoritairement composée de cellules tumorales viables (73 %) et de nécrose (20 %). Ces proportions sont retrouvées dans des études antérieures qui ont utilisées d'autres outils de quantification [9-11].

Si le traitement et l'analyse d'une image spectrale ne prend pas plus d'une minute, le temps d'acquisition des images IR reste le principal inconvénient de cette méthode. Ce temps sera considérablement réduit prochainement grâce à l'acquisition d'un Spotlight 400 au sein de notre laboratoire.

5. Conclusion

La MSIR associée à l'analyse statistique multivariée permet d'identifier et de quantifier automatiquement les types de tissus d'une coupe histologique sans réaliser de coloration ou de marquage.

Actuellement nous évaluons le modèle ADL sur des tumeurs traitées par des particules chargées en antinéoplasique pour quantifier les surfaces de tumeur viable et les surfaces de nécrose associées au traitement.

Remerciements

Je remercie la société ArchimMed SARL pour avoir soutenue financièrement ce projet et M. Gobinet Cyril pour l'aide aux traitements informatiques.

Bibliographie

- [1] Diem M, Romeo M, Boydston-White S et al. A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994-2004). Analyst 2004; 129 (10):880-5.
- [2] Krafft C, Steiner G, Beleites C et al. Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy. J Biophotonics 2009; 2 (1-2):13-28.
- [3] Ly E, Piot O, Durlach A et al. Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared spectral micro-imaging combined with pattern recognition. Analyst 2009; 134 (6):1208-14.
- [4] Krafft C, Sobottka SB, Geiger KD et al. Classification of malignant gliomas by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis. Anal Bioanal Chem 2007; 387 (5):1669-77.
- [5] Martens H, Stark E. Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: new preprocessing methods for near infrared spectroscopy. J Pharm Biomed Anal 1991; 9 (8):625-35.
- [6] Lasch P, Haensch W, Naumann D et al. Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis. Biochim Biophys Acta 2004; 1688 (2):176-86.
- [7] Wolthuis R, Travo A, Nicolet C et al. IR spectral imaging for histopathological characterization of xenografted human colon carcinomas. Anal Chem 2008; 80 (22):8461-9.
- [8] Gazi E, Dwyer J, Lockyer N et al. The combined application of FTIR microspectroscopy and ToF-SIMS imaging in the study of prostate cancer. Faraday Discuss 2004; 126:41-59; discussion 77-92.
- [9] Geschwind JF, Artemov D, Abraham S et al. Chemoembolization of liver tumor in a rabbit model: assessment of tumor cell death with diffusion-weighted MR imaging and histologic analysis. J Vasc Interv Radiol 2000; 11 (10):1245-55.
- [10] Hong K, Khwaja A, Liapi E et al. New intra-arterial drug delivery system for the treatment of liver cancer: preclinical assessment in a rabbit model of liver cancer. Clin Cancer Res 2006; 12 (8):2563-7.
- [11] Vossen JA, Buijs M, Geschwind JF et al. Diffusion-weighted and Gd-EOB-DTPA-contrastenhanced magnetic resonance imaging for characterization of tumor necrosis in an animal model. J Comput Assist Tomogr 2009; 33 (4):626-30.

Publication n°2:

Infrared imaging as a novel method to evaluate the efficacy of a locoregional treatment in a Vx2 liver tumor model

H. D'inca, S.H. Ghegediban, M. Wassef, C. Gobinet, J. Namur, F. Pascale, A. Laurent and M. Manfait

Publication n°3: Soumission le 06/11/2014 dans "the American journal of pathology"

Automated quantification of tumor viability in a rabbit liver tumor model after chemoembolization: Infrared imaging

H. D'inca, J. Namur, SH. Ghegediban, M. Wassef, F. Pascale, A. Laurent and M. Manfait
B. Préambule de l'article 2 et de l'article 3

Introduction

La chimioembolisation transartérielle est une technique mini-invasive de radiologie actuellement recommandée pour le traitement des tumeurs hépatiques interventionnelle malignes non opérables. Elle consiste à injecter à travers un cathéter, directement dans les vaisseaux irriguant la tumeur, un médicament et un agent occlusif. Les microsphères d'embolisation (MS) sont un des produits ayant reçu la norme CE et l'approbation de l'organisation américaine FDA (Food and Drug Administration) pour être utilisé chez les patients souffrant d'un CHC non opérable. Ce traitement, apparu dans les années 2000, soulève encore plusieurs interrogations notamment sur le type de microsphères à utiliser, leur taille et la concentration de chargement en anticancéreux. Dans le but d'optimiser l'utilisation des microsphères d'embolisation, et par là proposer aux patients un traitement mieux adapté, des études précliniques doivent être réalisées en amont sur un modèle de tumeur de référence pour le CHC, comme la tumeur VX2. Pour cela, il est important de disposer d'une technique d'analyse objective et précise afin d'évaluer les effets anticancéreux induits par ce traitement, et ainsi déterminer l'influence de chacun de ses paramètres (types de MS, taille des MS ou concentration en anticancéreux) sur l'efficacité antitumorale.

Comme décrit précédemment dans l'article 1, la microspectroscopie infrarouge permet d'identifier les différents types de tissus de la tumeur VX2 grâce à leurs signatures spectrales. Lors de cette première étude, la construction d'un modèle de prédiction à partir d'une banque de données de référence a permis d'automatiser l'identification et la quantification de la viabilité tumorale sur coupes tissulaires de tumeurs VX2 contrôles.

L'objectif de ces deux études est donc d'étendre l'application du modèle de prédiction à des tumeurs VX2 traitées par des microsphères d'embolisation chargées en anticancéreux, afin de mettre en évidence les effets tissulaires du traitement, et notamment l'évolution de la viabilité tumorale. Dans un premier temps, l'article 2 tend à montrer que l'imagerie IR couplée à un modèle de prédiction ADL est également capable de distinguer et de quantifier les différentes structures tissulaires dans de telles conditions ; et dans un second temps, l'article 3 tend à confirmer le potentiel de cet outil sur une plus grande cohorte d'échantillon.

Matériels et méthodes

L'étude de faisabilité présentée dans l'article 2 inclue 12 lapins porteurs d'une tumeur VX2 au niveau du foie. L'article 3 inclus les 12 lapins de l'article 2 plus 15 autres lapins augmentant le nombre total d'animaux à 27. Dans l'article 2, un groupe de 3 lapins (16 dans l'article 3) est soumis à une chimioembolisation transartérielle avec des microsphères chargées en doxorubicine. Un second groupe, composé des 9 animaux restant (respectivement 11 lapins dans l'article 3), constitue le groupe témoin.

Le temps de traitement des tumeurs VX2 est différent dans les deux études. Les animaux traités dans l'article 2 ont été sacrifiés 24 heures après chimioembolisation alors que ceux inclus dans l'article 3 ont été sacrifiés après 3 jours de traitement. Dans les 2 études, les prélèvements tissulaires, l'acquisition des données IR ainsi que leurs prétraitements sont réalisés dans les mêmes conditions que pour l'étude précédente. De la même manière, une banque de données spectrale a été construite en extrayant des résultats de classification KM les signatures spectrales des différents tissus d'intérêt, avec cette fois ci inclusion d'une classe tissulaire supplémentaire, le parenchyme hépatique nécrosé (relatif à l'utilisation de l'anticancéreux).

À la différence de la première étude, la construction des modèles de prédiction est ici réalisée après avoir appliqué une analyse en composante principale (ACP) sur les spectres de la banque de données. L'ACP permet de considérablement réduire la dimension des données tout en conservant un maximum de variance entre elles. De la même manière que dans l'article 1, le modèle de prédiction a été validé à partir du jeu de validation établit avec un tiers des spectres de référence de la banque de données. Le modèle de prédiction est ensuite validé une seconde fois avec les images IR n'ayant pas servi à construire cette banque.

La quantification de la viabilité tumorale a ensuite été calculée par le modèle de prédiction et les données obtenues sur les tumeurs témoins et les tumeurs traitées ont pu être statistiquement comparées (méthode de Mann Whithney). Dans l'article 3, cette technique de quantification *via* un modèle ACP-ADL a été confrontée aux mesures de quantification tissulaires obtenues en histopathologie sur des coupes HES numérisées et provenant des mêmes blocs paraffinés (corrélation de Spearman). De plus, une étude des différences spectrales existant entre les tissus de la tumeur VX2 a été réalisée (algorithme randfeatures, The MathWorks). Le but de cette étude étant de rapporter un autre avantage de l'imagerie infrarouge qui est, en plus de mettre en avant l'organisation morphologique des tissus d'une

coupe tissulaire, l'obtention de la composition biochimique de ces tissus et cela sans coloration ni marquage des échantillons.

Résultats

La comparaison entre les images KM en 8 clusters et les coupes adjacentes colorées en HES a montré une corrélation de plus de 73% dans l'article 2 et de plus de 80% dans l'article 3 (du fait d'un nombre d'images analysées différent).

Les modèles de prédiction construits avec 20 composantes principales présentent pour les deux études une sensibilité supérieure à 86% et une spécificité supérieure à 96% pour les différents tissus d'intérêts (tumeur viable, tumeur nécrosée, fibrose, parenchyme hépatique et parenchyme hépatique nécrosé). La comparaison entre les images ADL et les coupes HES correspondantes n'a pas été effectué dans l'article 2. Néanmoins, cette étape a été réalisée dans l'article 3 et a montré une corrélation supérieure à 79%, confirmant la robustesse du modèle de prédiction.

L'évaluation de la viabilité tumorale montre que les tumeurs VX2 traitées par chimioembolisation présentent plus de nécrose que les tumeurs CTRL. Après 24h de traitement, la surface de nécrose tumorale est de 66% contre 18% chez les tumeurs CTRL (MW, P<0.0001). La proportion de tumeur viable correspondant à 0,2% chez les tumeurs traitées, atteint plus de 55% chez les tumeurs CTRL (MW, P<0.0001).

Après 3 jours de traitement, la surface de nécrose tumorale atteint 92% contre 33% chez les tumeurs CTRL. La proportion de tumeur viable représente quant à elle 3% des tumeurs traitées et plus de 62% des tumeurs CTRL. On notera que les pourcentages complémentaires correspondent à la fibrose tumorale ainsi qu'aux spectres non attribués par le modèle. Dans l'article 3 (après 3 jours de traitement), les résultats obtenus en IR apparaissent corrélés avec les mesures histopathologiques pour la nécrose tumorale (*rho*= 0,827, P<0.0001) et pour la tumeur viable (*rho*= 0,840, P<0.0001).

Conclusion et perspectives

L'article 2 représente une première étape dans l'application du modèle de prédiction à des tumeurs traitées par chimioembolisation. L'introduction de l'ACP avant l'ADL permet d'améliorer la sensibilité et la spécificité du modèle qui était insatisfaisante concernant le tissu fibreux (voir article 1). D'autre part, les comparaisons réalisées avec les analyses histopathologiques permettent d'une part, de renforcer la robustesse de la méthode, et d'autre

part, de valider la microspectroscopie infrarouge comme outil précis et objectif pour évaluer l'efficacité de la chimioembolisation sur la tumeur VX2. Il est donc possible d'utiliser ce modèle de prédiction afin de déterminer l'influence que peut avoir le choix de la taille des MS ou encore la dose de chargement en anticancéreux sur l'effet antitumoral du traitement.

Infrared imaging as a novel method to evaluate the efficacy of a locoregional treatment in a Vx2 liver tumor model

H. D'inca^{a,*}, S.H. Ghegediban^b, M. Wassef^b, C. Gobinet^a, J. Namur^c, F. Pascale^d, A. Laurent^{d,e,f} and M. Manfait^a

^a MéDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR CNRS 7369, Unité MEDyC, Reims, France

^bAPHP – Lariboisiere Hospital, Department of Pathology, Paris, France

^c ArchimMed SARL, Jouy-En-Josas, France

^d Centre de Recherche en Imagerie Interventionnelle, APHP – INRA, Jouy-En-Josas, France

^e APHP – Lariboisiere Hospital, Department of Interventional Neuroradiology, Paris, France

^fLaboratoire Matières et Systèmes Complexes, CNRS 7057, Paris, France

Abstract.

BACKGROUND: The rabbit Vx2 liver tumor is a fast-growing carcinoma model commonly used to study tumor behaviours under cancer treatments. The reduction of tumor viability and the degree of induced necrosis are the common criteria to evaluate the efficacy of cancer treatments. Currently, it is not easy to perform a rapid and reproducible tissue quantification by histopathological analysis.

OBJECTIVE: Our objective was to use infrared-imaging combined with linear-discriminant-analysis model (LDA) to automatically quantify the necrotic effect induced by doxorubicin-eluting-implants (DEI) on a Vx2 liver tumors model.

METHODS: Three rabbits were subjected to DEI treatment and compared to a control group (CTRL) of nine rabbits. Tumor bearing livers were resected, fixed in formalin and embedded in paraffin. On two consecutive sections, we performed hematoxylin–eosin–saffron (HES) staining and infrared-imaging. Infrared-images were then subjected to the LDA-model analysis.

RESULTS: The LDA and HES images strongly correlated for viable and necrotic tumor tissues. For the DEI group, the model determined that the surface of viable tumor represented $0.24 \pm 5\%$ of the tumor (CTRL: $55.71 \pm 17\%$, P < 0.0001) and the necrotic tissue $66.46 \pm 20\%$ of the tumor (CTRL: $18.45 \pm 12\%$, P < 0.0001).

CONCLUSIONS: Our results showed that infrared-imaging coupled with LDA-model analysis could be a helpful to easily and objectively assess the treatment efficacy.

Keywords: Automatic tissue quantification, infrared-imaging, Vx2 tumor, tumor viability, chemometrics

1. Introduction

The rabbit Vx2 liver tumor is a fast-growing carcinoma model which originates from a squamous cell carcinoma that developed as a result of malignant changes in the cells of a Shope virus-induced skin

2212-8794/14/\$27.50 © 2014 - IOS Press and the authors. All rights reserved

^{*}Corresponding author: Hadrien D'inca, URCA, faculté de pharmacie, Unité MéDIAN, UMR CNRS n°7369 MEDyC, 51 rue Cognacq Jay, 51095 Reims cedex, France. Tel.: +33 3 26 91 81 29; Fax: +33 3 26 91 35 50; E-mail: hadrien.dinca@ etudiant.univ-reims.fr.

papilloma in a domestic rabbit [5]. It is commonly used to study different aspects of tumor behaviours under new therapeutic devices such as drug eluting implants [9] which is the recommended treatment for inoperable HCC [12]. Doxorubicin is the most common anticancer drug loaded in these implants [12].

The reduction of tumor viability and the degree of induced necrosis are the most common criteria to evaluate the efficacy of anticancer treatments [1]. Currently, histopathological examination remains the reference method to assess and quantify such tissue modifications. However, it is not easy to perform a rapid and reproducible quantification by conventional histopathological analysis.

Infrared spectral imaging (IRSI) of tissue sections has been recently described as an accurate tool to characterize the tumor tissues [2]. Furthermore, since IRSI is a computer-aided technique, the procedure of tissue evaluation can be automated and unsupervised [6]. Based on validated databases of tissue spectra, this would permit to objectively diagnose histopathological states of tissues.

Our objective was to use IRSI to quantify the necrotic effect and the reduction of tumor viability induced by DEI treatment in a rabbit Vx2 liver tumor model.

2. Materials and methods

2.1. Animal model and samples preparation

In this work, we included 12 rabbits with Vx2 liver tumor at the same developing stage (17 days). A pool of 3 rabbits were subjected to doxorubicin eluting implant (DEI) treatment and compared to a control (CTRL) pool of 9 rabbits. After 24 h DEI treatment, tumor bearing livers were resected, fixed in formalin and finally embedded in paraffin. Two adjacent sections were cut from each sample using a microtome. The first section (10 μ m thick) was mounted on a calcium fluoride (CaF₂) window suitable for infrared microspectroscopy (IRMS). The second section (5 μ m thick) was put on a standard glass slide and stained with HES to serve as a control for infrared imaging. Several tissue sections could originate from the same tumor but at different level. The total number of tissue sections analysed with IRMS was 24, corresponding to 10 tissue sections obtained from 3 rabbits treated by DEI and to 14 tissue sections obtained from 9 control non-treated rabbits.

2.2. Infrared imaging and pre-treatments of spectral images

Infrared spectral images were collected with an infrared microscope (Spectrum Spotlight 300 Imaging System, Perkin Elmer Sciences) coupled to a Spectrum One FT-IR spectrometer using the image mode. All spectral measurements were recorded using a pixel size of 25 μ m², a spectral resolution of 4 cm⁻¹ and 2 scans per pixel. Infrared images contained around 120.000 spectra spanning the spectral range of 800–4000 cm⁻¹. One IR image per tissue section was acquired (total 24 infrared images). IR images were divided in two pools: 10 images (7 from control non-treated tumors and 3 from DEI treated tumors) were subjected to K-means (KM) classification for the construction of the reference spectral database and 14 images (7 from control non-treated tumors and 7 from DEI treated tumors) were used to test the predictive model obtained by linear discriminant analysis (LDA).

2.2.1. Pre-treatments

Pre-processing, processing and analysis of the IR spectra were carried out on spectral images in the IR absorption range of 900–1800 cm⁻¹ considered as the most informative region. FT-IR spectra of paraffinized tissue sections showed absorption bands of paraffin at 1378 cm⁻¹ and around 1467 cm⁻¹.

To correct the contribution of paraffin in FT-IR spectra, we used an automated pre-processing method based on Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC). The EMSC does not remove the paraffin spectrum but neutralizes the paraffin contribution in each recorded spectrum. Briefly the EMSC algorithm constrains the bands of paraffin at the same intensity on all tissue spectra. The variations of the paraffin bands intensity are eliminated from tissue spectra. Consequently, the result of classification process (KM and LDA) is only base on the spectral differences between each type of tissue. The spectra were paraffin and baseline corrected in the same step and finally they were vector-normalized on the 900–1800 cm⁻¹ spectral range. For a more comprehensive description of the EMSC method, the reader should refer to previous articles [8,14].

2.2.2. Unsupervised K-means classification to reproduce the histology and to construct the reference spectral database

The KM classification method gathered spectra which show similar spectral characteristics in "clusters" whose number is determined by the operator [7]. The result of the KM analysis is a false color image where each color corresponds to a cluster. The accurate number of clusters was chosen with the pathologist. To confirm the KM clustering results, a total of 195 areas measuring 200 μ m² each were selected on HES tissue sections in zones of normal liver parenchyma, viable tumor, tumor necrosis and fibrosis (31, 59, 67 and 38 areas respectively). Each area was then located on KM image to determine if each cluster color corresponded to a particular tissue. The spectra of validated KM clusters were used to create a database containing thousands of spectra assigned to a specific type of tissue: tumor necrosis, viable tumor, fibrosis, liver parenchyma and liver parenchyma necrosis.

2.2.3. Supervised linear discriminant analysis classification to automatically recognize tissue types

A predictive model based on the spectral database was created using LDA [3]. To evaluate the LDA model, the database was randomly divided into two uneven sets of spectra: a training set corresponding to 2/3 or 264.859 spectra and a validation set corresponding to 1/3 or 132.420 spectra. The training dataset was used to establish and optimize the LDA parameters that would provide the best possible classification. The validation dataset, which is labelled with the correct answer, was used to test the accuracy of LDA model. The confrontation between the training set and the validation set gives the confusion matrix of the prediction model. The sensitivity of each class is calculated by dividing the number of spectra labelled as true positives by the sum of the number of spectra labelled as true negatives. The sum of true negatives and false positives.

Once the model validated, we empirically attributed the dark blue color to represent tumor necrosis, the yellow for viable tumor, the blue for the fibrosis, the green for liver parenchyma and the orange for liver parenchyma necrosis. Once the model set up, it can be applied to a new infrared image in only one minute. The result of the LDA model analysis is a false color image where each color corresponds to a type of tissue. When the maximum probability for a pixel was below 0.75, the tissue assignment was considered ambiguous by the model and the pixel was colored in black (Fig. 1).

2.3. Automatic tissue quantification using the predictive LDA model

The percentage of pixels corresponding to each color is automatically recorded when applying the LDA model to an infrared image. We used this advantage to calculate the mean percentages of surface occupied by viable and necrotic tumor on the 9 CTRL tumors and the 3 DEI treated tumors.



Fig. 1. LDA false color images and HES stained sections from Vx2 tumors non-treated (top of panel) and from another rabbit treated with DEI treatment (bottom of panel). The histological morphology identified on the LDA images strongly correlated with the HES stained tissue sections. The percentages of pixels assigned to the viable tumor (yellow) and the necrotic tissue (dark blue) were automatically calculated on LDA images. The viability of Vx2 tumors, non-treated or treated with DEI, can thus be easily evaluated by using this method. Scale bar, 1 mm. (The colors are visible in the online version of the article; http://dx.doi.org/10.3233/BSI-140074.)

3. Results

3.1. K-means classification

The KM clustering images in 8 clusters reproduce the histological structures of Vx2 liver tumors. The correlation between KM images in 8 clusters and HES stained sections were 89.8% for viable tumor cells, 95.5% for the tumor necrosis, 90.3% for the liver parenchyma and 73.7% for the fibrosis. We chose the KM classification into eight clusters to build the database of reference spectra.

3.2. LDA model validation

The LDA false color images reproduced the histological structures of Vx2 liver tumors (Fig. 1). The confusion matrix, obtained by the confrontation of the training set and the validation set, showed a sensitivity greater than 94% for the viable tumor, tumor necrosis, liver parenchyma and fibrosis. The specificity was greater than 98% for the 4 types of tissue (Table 1). As for KM images, the correlation between LDA false color images and HES stained ones still needs to be evaluated.

		Table 1		
Sen	sitivity and specificit	y obtained from	the LDA model	
	Liver parenchyma	Viable tumor	Tumor necrosis	Fibrosis
Sensitivity (%)	96.6	98.3	94.6	96.2
Specificity (%)	99.1	99.6	98.6	98.9

3.3. Vx2 tumor viability quantification

For the DEI group, the LDA model determined that the surface of the necrotic tissue represented $66.46 \pm 20\%$ of the tumor (CTRL group: $18.45 \pm 12\%$, Mann–Whitney: P < 0.0001) and the viable tumor represented 0.24 \pm 5% of the tumor (CTRL group: 55.71 \pm 17%, Mann–Whitney: P < 0.0001). The remaining percentages corresponded to tumor stroma, fibrosis capsule surrounding the tumor and unclassified spectra (Fig. 1).

4. Discussion

The comparison between the KM processed images and the HES stained sections suggests that the structures identified by the classification method correspond to the tissue types of our Vx2 tumor model. To confirm this, we selected areas in each of the tissue type on the control HES and assessed which class they were assigned to on the infrared image. We obtained a correspondence greater than 73% with an eight clusters classification and increase the number of clusters above eight do not improve this result. This methodology allowed the construction of a robust spectral database representative of each tissue type.

The sensitivity and the specificity of the LDA model are good compared to the values reported in studies of IRMS using the same type of predictive model. Ly et al. measured a sensitivity varying between 74% and 98% in cutaneous carcinoma according to tissue type [6]. Teh et al. found a sensitivity of 95%and a specificity of 90% to identify dysplasic gastric tissue [11]. Salman et al. showed that the normal and malignant cells from colonic tissue could be identified with about 86% of sensitivity [10]. While the confrontation between the training set and the validation set is routinely performed to evaluate the performances of the predictive model, very few studies have verified the accuracy of their model on a set of new test samples. The visual correspondence between HES and LDA images of new samples though not quantified is encouraging to say our model is robust.

The automatic quantification of tissue surface on the infrared images of non-treated Vx2 tumors shows that viable and necrotic tumor surface percentages were respectively $55.71 \pm 17\%$ and $18.45 \pm 12\%$ of the total tumor surface. During its rapid growth, the Vx2 tumor necrotized spontaneously due to a flawed vasculature system. The necrosis corresponds to an ischemia necrosis. Previous studies on non-treated Vx2 liver tumors estimated viable tumor and necrotic tumor areas by visual inspection and estimation. Geschwind et al. described that the mean fraction of viable tumor was about 55% of the whole tumor surface at 17–18 days after tumor implantation [4]. Another study delineated regions of interest around the entire tumor and around the necrotic part of the tumor by using digitalized images. They showed that mean percentage of necrosis at 14–21 days after tumor implantation was 36% (range, 11%–80%) [13]. Our findings are consistent with the latter figures and further confirm the accuracy of IRSI to quantify areas of viable and necrotic tumor.

The next step will be to increase the number of Vx2 tumors treated by DEI and to compare the efficacy of different embolic agents or drugs. It would also be interesting to investigate if IRSI can discriminate 270 H. D'inca et al. / Infrared imaging as a novel method to evaluate the efficacy of a locoregional treatment

between the spontaneous necrosis of Vx2 tumors and the necrosis induced by anticancerous treatments which is not possible by HES staining.

5. Conclusion

Our results showed that IRSI in combination with LDA model analysis automatically allows to characterize and quantify the Vx2 liver tumor viability without and with DEI treatment. It could be helpful to easily and objectively assess the treatment efficacy.

Acknowledgements

This study was supported by ArchimMed SARL. We would like to thank Cyril Gobinet for analytical help.

References

- [1] J. Bruix et al., Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the study of the liver, *J. Hepatol.* **35** (2001), 421–430.
- [2] L. Chiriboga et al., Infrared spectroscopy of human cells and tissue. Part VI: A comparative study of histopathology and infrared microspectroscopy of normal, cirrhotic, and cancerous liver tissue, *Appl. Spectrosc.* **54** (2000), 1–8.
- [3] R. Fisher, Linear discriminant analysis, Ann. Eugenics 7 (1936), 179-188.
- [4] J.F. Geschwind et al., Chemoembolization of liver tumor in a rabbit model: assessment of tumor cell death with diffusionweighted MR imaging and histologic analysis, J. Vasc. Interv. Radiol. 11 (2000), 1245–1255.
- [5] J.G. Kidd and P. Rous, A transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form, *J. Exp. Med.* **71** (1940), 813–838.
- [6] E. Ly et al., Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared spectral micro-imaging combined with pattern recognition, *Analyst* **134** (2009), 1208–1214.
- [7] J. MacQueen, Some methods for classification and analysis of multivariate observations, in: *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*, Vol. 1, 1967, p. 14.
- [8] H. Martens and E. Stark, Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: new preprocessing methods for near infrared spectroscopy, J. Pharm. Biomed. Anal. 9 (1991), 625–635.
- [9] N. Nitta et al., A combination of cisplatin-eluting gelatin microspheres and flavopiridol enhances anti-tumour effects in a rabbit VX2 liver tumour model, Br. J. Radiol. 83 (2010), 428–432.
- [10] A. Salman et al., FT-IR microscopic characterization of normal and malignant human colonic tissues, *Cell Mol. Biol.* 47 (2001), OL159–OL166.
- [11] S. Teh et al., Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue, *British Journal of Cancer* **98** (2008), 457–465.
- [12] T.J. Vogl et al., Review on transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: palliative, combined, neoadjuvant, bridging, and symptomatic indications, *Eur. J. Radiol.* **72** (2009), 505–516.
- [13] J.A. Vossen et al., Diffusion-weighted and Gd-EOB-DTPA-contrast-enhanced magnetic resonance imaging for characterization of tumor necrosis in an animal model, J. Comput. Assist. Tomogr. 33 (2009), 626–630.
- [14] R. Wolthuis et al., IR spectral imaging for histopathological characterization of xenografted human colon carcinomas, *Anal. Chem.* 80 (2008), 8461–8469.

1	Automated quantification of tumor viability in a rabbit liver tumor model
2	after chemoembolization: Infrared imaging
3	
4	Dunning title: Infrared imaging to quantify tymer visbility
5	<u>Running title</u> . Infrared infaging to quantify tunior viability
07	
8	Authors: Hadrien D'inca ¹ Julien Namur ² Saida Homayra Ghegediban ^{2,3}
9	Michel Wassef ^{2, 3} , Florentina Pascale ⁴ , Alexandre Laurent ^{4, 5, 6} and Michel
10	Manfait ¹
11	
12	¹ MéDIAN, UMR CNRS n°7369 MEDyC, Reims
13 14	ArchimMed SARL, Jouy en Josas ³ APHP Lariboisiere Hospital Pathology Dpt Paris
15	⁴ CR2i APHP-INRA, Jouv-En-Josas
16	⁵ AP-HP hôpital Lariboisère, Neuroradiology Dpt, Paris
17	⁶ Laboratoire Matières et Systèmes Complexes, CNRS n°7057, Paris
18	
19	
20	Corresponding authors:
21	
22	D'inca Hadrien
23 24	URCA, Faculté de Pharmacie
25	51 rue Cognacq Jay
26	51095 REIMS CEDEX
27	Work Telephone Numbers: 03 26 91 34 97
29	hadrien.dinca@etudiant.univ-reims.fr
30	
31	Sources of support.
32	
33	ArchimMed SARL
34	
35	
55	
36	Number of text pages: 18
37	Word counts in the text: 5481
57	
38	Word counts in the abstract: 219
39	Number of figures and tables: 7 figures and 1 table
10	
40	

<u>Abstract</u>

41

The rabbit VX2 tumor is a fast-growing carcinoma model commonly used to study new therapeutic devices such as catheter-based therapies used to treat patients with inoperable Hepatocellular carcinoma. The evaluation of tumor viability after this kind of locoregional therapies is essential in directing management for HCC. We used infrared microspectroscopy imaging for the automatic characterization and quantification of the VX2 liver tumor viability after a transarterial-chemoembolization with drug-eluting-beads (DEB-TACE).

The protocol consisted of K-means (KM) clustering followed by principal-component and linear-discriminant-analysis (PCA-LDA). The KM clustering was used to classify the spectra from the infrared images of control (CTRL) or treated tumors and to build a data base containing a large number of tissue spectra. Based on this reference library, the PCA-LDA analysis was used to build a predictive model able to identify and quantify automatically tumor viability on unknown tissue sections (CTRL: n=7; DEB: n=17).

For DEB group, the LDA model determined that the surface of tumor necrosis represented 91.6±8.9% (CTRL group: 33.1±19.6% Mann Whitney: P=0.0004) and the viable tumor 2.6±4% (CTRL group: 62.2±15.2% MW: P=0.0004). Tissue quantification performed by PCA-LDA model and HES measurements were well correlated for tumor necrosis (r=0.827, P<0.0001) and for viable tumor (r=0.840, P<0.0001).

Our results show that IR imaging in combination with PCA-LDA analysis could be ahelpful to easily assess tumor viability.

62	List of abbreviations
63	CaF2: Calcium fluoride
64	DEB: Drug eluting beads
65	EMSC: Extended multiplicative signal correction
66	FPA: Focal plan array
67	FTIR: Fourier transformed infrared spectroscopy
68	HCC: Hepatocellular carcinoma
69	HE: Haematoxylin-eosin
70	HES: Haematoxylin-eosin-saffron
71	IR: Infrared
72	IRMS: Infrared microspectroscopy
73	KM: K-means
74	LDA: Linear discriminant analysis
75	PC: Principal component
76	PCA: Principal component analysis
77	TACE: Transarterial chemoembolization
78	
79	Keywords:
80	Automatic tissue quantification, Infrared-imaging, VX2 tumor, Tumor viability,
81	Chemometrics, Drug eluting beads, Transarterial-chemoembolization

Introduction

84 The VX2 tumor model originates from a squamous cell carcinoma that developed as a result of malignant changes in the cells of a Shope virus-induced skin papilloma in a domestic 85 rabbit^{1, 2}. This tumor model is serially transplantable in allogenic adult rabbits, easily 86 implantable and grows quickly in many types of organs such as lungs ³, liver ⁴ or rectum ⁵. 87 Therefore, the VX2 tumor blood supply is almost entirely from the hepatic artery, similar to 88 that of humans⁶, and rabbit hepatic arteries are large enough to permit hepatic artery 89 catheterization ⁷. This makes the VX2 tumor a common animal model for the preclinical 90 evaluation of new anticancer treatments ⁸⁻¹¹ and for new therapeutic devices such as catheter-91 92 based therapies for patients with inoperable Hepatocellular carcinoma (HCC).

The evaluation of tumor response after locoregional therapies is essential in directing management for HCC. An understanding of the various therapeutic strategies and their posttherapy imaging appearance is essential for accurately assessing treatment response. The evaluation of tumor response should include not only anatomic imaging, such as reduction in tumor size, but also the reduction of tumor viability, the degree of induced necrosis ¹²⁻¹⁴ and the biochemical changes that occur inside tumor tissues.

99 Since the past decade, there is a considerable interest in spectroscopy based 100 microscopies which use the intrinsic optical properties of the tissues to produce histological 101 images without staining or exogenous markers. It was first demonstrated in the 1950s that neoplastic and normal tissues could be discriminated based on their infrared absorption 102 spectra^{15, 16}, due to the differences in their biochemical composition. The coupling of the 103 104 infrared spectrometer with an imaging system (microspectroscopy) further permitted to 105 combine the measured spectrum to a spatial position on the sample and to record infrared 106 images directly on thin tissue sections. The most recent developments in IRMS aimed at

107 automating the procedure of tissue recognition and quantification by using statistical methods and prediction algorithms¹⁷⁻²². These methodologies are based on the measurement of a large 108 109 number of tissue specimens. The information gathered from this large data set is used to 110 produce a reference spectral library of each tissue type. Based on this spectral library, a 111 predictive model is elaborated and validated. Applying model to a new tissue section 112 generates a false colored image in which each color correspond to a type of tissue and where 113 the surface of each tissue is automatically calculated. Once the model set up and validated, it 114 can be applied to a new infrared image in only one minute. The infrared imaging technique is 115 a solution to visualise on the same image the morphological information and the molecular 116 composition of tissues. It appears to be a helpful technique for studying objectively and 117 quantitatively tumor response.

118 In this study, our aim was to validate the use of infrared microspectroscopy to 119 automate the recognition and the quantification of VX2 liver tumor viability after a 120 doxorubicin eluting beads transarterial chemoembolization treatment (DEB-TACE). We 121 worked on a pool of untreated VX2 tumors and a pool of DEB-TACE treated tumors. First, 122 the infrared spectra characteristics of each tissue of interest were recorded and a prediction 123 model of tissue types was developed. Then, the model was applied to a set of new test VX2 124 samples to assess the surface of viable and necrotic tumor. A validation procedure was 125 included at each step of the data processing. Infrared results were correlated by 126 histopathology as standard of reference.

129

Materials and Methods

1. Animal model and tissue samples

130 This study was approved by the Animal Care Committee and was performed in 131 accordance with our institutional guidelines. Adult New Zealand white rabbits weighing 6-8 132 lbs underwent implantation of rabbit VX2 tumor in the liver. The tumors were induced by an injection of a VX2 cells suspension $(0.25 \times 10^6 \text{ cells/mL})$ directly in the liver. We included 27 133 134 rabbits with VX2 liver tumors: 16 rabbits were subjected to a DEB-TACE treatment and 135 compared to a control (CTRL) group of 11 rabbits. Animals from DEB-TACE group were 136 treated after 12 days of tumor development and were euthanized 3 days after the embolization 137 procedure (15 days of tumor development). In the same model, one study on our laboratory 138 demonstrated that 3 days post-embolization corresponded to a significant increase of tumor 139 necrosis compared to untreated tumors. Animals from CTRL group were euthanized after 14 140 days of tumor development. Then, tumor bearing livers were resected and samples were 141 formalin fixed and paraffin embedded. Two adjacent sections were cut from each sample 142 using a microtome. The first section (10µm thick) was mounted on a calcium fluoride (CaF2) 143 window suitable for infrared microspectroscopy. The second section (5µm thick) was put on a 144 standard glass slide, dewaxed and rehydrated by means of successive baths of xylene and 145 alcohol and stained with HES to serve as a control for infrared imaging.

146

2. Fourier Transform Infrared Imaging Spectroscopy

147 Infrared spectral images were collected with an infrared microscope (Spectrum 148 Spotlight 300 Imaging System, Perkin Elmer Sciences, Courtaboeuf, France) coupled to a 149 Spectrum One FTIR spectrometer using the image mode. The device is equipped with a 150 nitrogen-cooled mercury cadmium telluride 16-pixel-line detector for imaging and a 151 computer-controlled stage to collect large spectroscopic images from a sample. The 152 microscope was isolated in a venting Plexiglas housing to enable purging with dry air and to eliminate atmospheric interferences. Prior to acquisition, a visible image of the sample was recorded and the area of interest was selected by comparison to the corresponding HES stained adjacent section.

156 In this study, 38 spectroscopic images were recorded from VX2 liver tumors and could vary in size from 8 mm² to 10 mm². Each pixel sampled a $25\mu m \times 25\mu m$ area at the sample 157 158 plane, providing images that contained between 120,000 and 160,000 individual infrared 159 spectra (depending on the size of the image). Spectral data were acquired in transmission mode. All spectral measurements were recorded using a spectral resolution of 4 cm⁻¹ and 2 160 161 scans per pixels, each spectrum containing 801 values of absorbance, spanning the spectral range of 800-4000 cm⁻¹. A background spectrum was collected (75 accumulations, 4 cm⁻¹ 162 163 resolution) outside the sample (on the CaF2 window area) to ratio against the single beam 164 spectra. The resulting spectra were then automatically converted into absorbance.

165

3. Infrared images pre-treatments and construction of a predictive model

All subsequent data treatment protocols were performed with Spectrum image-Spotlight 300 (PerkinElmer), Opus 5.5 (Bruker Optik) and Matlab 7.12 (Mathworks, Natick, MA) softwares using protocols validated in our laboratory. All data pre-processing and processing were carried out directly on spectral images in the IR absorption range of 900-1800 cm⁻¹ (451 values of absorbance) considered as the most informative region.

171

• Numerical dewaxing and poor quality spectra elimination

Paraffin exhibits strong absorption bands at 1368 cm⁻¹ and 1467 cm⁻¹. To correct the contribution of paraffin in FTIR spectra, we used an automated processing method based on extended multiplicative signal correction (EMSC) validated and commonly used in our laboratory ^{23, 24}.It is a numerical dewaxing without xylene treatment (chemical dewaxing). Briefly the EMSC algorithm constrains the bands of paraffin at the same intensity on all tissue

spectra. The variations of the paraffin bands intensity are eliminated from tissue spectra.
EMSC method was also used for eliminating the IR spectra with low signal-to-nose ratio²⁵

179 Consequently, the result of classification process (K-means and linear discriminant 180 analysis) is only base on the spectral differences between each type of tissue. The spectra 181 were paraffin and baseline corrected in the same step and finally they were vector-normalized 182 on the 900-1800 cm⁻¹ spectral range. For a more comprehensive description of the EMSC 183 method, the reader should refer to previous articles^{24, 26}.

184

Construction of a spectral database by unsupervised K-means classification

On a first series of 14 IR images (Table 1), we performed a K-means (KM) 185 186 classification. This statistical classification method gathered spectra that show similar spectral characteristics in "clusters" whose number is determined by the operator ^{20, 23, 27, 28}. Then, the 187 188 pixel on infrared (IR) image (coordinates x,y) corresponding to the spectrum is colored with 189 the same color as the cluster. The color is randomly attributed to each cluster by the software. 190 The result of the KM analysis is a false color image where each color corresponds to a cluster. 191 All the eliminated spectra by EMSC algorithm were colored as white pixels in the KM 192 clustered images (spectra with low signal-to-nose ratio). Each image was analyzed 193 independently thus colors between different KM images were not comparable. The number of 194 clusters varied from 2 to 10. The accurate number of clusters was chosen with the pathologist 195 in such a way that each tissue type identified on HES section was represented by at least one 196 cluster. Each cluster had a unique histological assignment.

197 To confirm the KM clustering, a total of 255 areas measuring 200 μ m² each were 198 selected on HES tissue sections in zones of viable tumor, tumor necrosis, fibrosis, normal 199 liver parenchyma and liver parenchyma necrosis (65, 75, 45, 40 and 30 areas respectively). 200 Each area was then located on the 14 KM images to determine if each cluster color, 201 corresponded to a particular tissue. Areas containing multiple clusters were considered as

"unallocated areas". We calculated the sensitivity of each cluster by dividing the number of areas correctly matched by the sum of true positives and false negatives. Then, we calculated the specificity of each cluster by dividing the number of areas correctly matched by the sum of true negatives and false positives. The spectra of validated KM clusters were used to create a database containing thousands of spectra assigned to a specific type of tissue: viable tumor, tumor necrosis, fibrosis, liver parenchyma and liver parenchyma necrosis.

208

209

• <u>Construction of a predictive model by combining principal component analysis</u> and linear discriminant analysis

210 Based on the tissue spectral database, LDA looks for the variables containing both the 211 greatest interclass variance and the smallest intraclass variance. Because we analysed a huge 212 quantity of spectra in the same time (about 430,000), we choose to apply a principal 213 component analysis (PCA) before the linear discriminant analysis (LDA). The PCA is one of 214 the commonly employed spectral data processing method which reduces the size of the data 215 still retaining the variance. This variance is represented by principal components (PCs). The 216 resulting scores were then used as inputs for LDA. The PCA-LDA model obtained is a linear 217 combination of the variables to discriminate between the classes.

218 To evaluate the accuracy of PCA-LDA model, the database was randomly divided into 219 two uneven sets of spectra: a training set corresponding to 2/3 of spectra and a validation set 220 corresponding to 1/3 of spectra. The training dataset was used to establish and optimize the 221 PCA and LDA parameters that would provide the best possible classification. The validation 222 dataset, which is labelled with the correct answer, was used to test the accuracy of LDA 223 model. The confrontation between the training set and the validation set gives the confusion 224 matrix of the prediction model. The sensitivity of each class is calculated by dividing the 225 number of spectra labelled as true positives by the sum of the number of true positives and 226 false negatives. The specificity of each class is calculated by dividing the number of spectra 227 labelled as true negatives by the sum of true negatives and false positives. We chose the PCA-

LDA model which displayed the best sensitivity for the 5 tissue types of interest.

229

230 <u>Table 1</u>: Samples repartition in each study group

- 231
- 232

233

4. Application of the predictive model on test samples and tissues surface quantification

Once the model validated, it can be applied to new test samples ^{17, 20, 21}. In this study, 234 235 the predictive model was applied to infrared images of 24 new test tumor sections (table 1) 236 from the 20 remaining tumors. Unidentified test spectra were analyzed by the PCA-LDA 237 model which identified their tissue classes and colored them in accordance with their class 238 color (the dark blue color to represent tumor necrosis, the yellow for viable tumor, the blue 239 for the fibrosis, the green for liver parenchyma and the orange for liver parenchyma necrosis). 240 When the maximum probability for a pixel was below 0.75, the tissue assignment was 241 considered ambiguous by the model and the pixel was colored in black. The result of the 242 PCA-LDA model analysis is a false color image where each color corresponds to a type of 243 tissue. The LDA images obtained were quantitatively compared again to control HES-stained adjacent section as for KM images validation step. A total of 300 areas measuring 200 μ m² 244 245 each were selected on HES tissue sections in zones of, viable tumor, tumor necrosis, fibrosis, 246 normal liver parenchyma and liver parenchyma necrosis (69, 77, 58, 51 and 45 areas 247 respectively).

The number of pixels corresponding to each tissue on LDA images was automatically recorded by the algorithm and used to calculate the percentage of tumor surface occupied by viable tumor or necrotized areas. The values obtained on LDA images were compared to histological measurements previously obtained on digitalised stained sections from the same paraffinized samples (NanoZoomer 2.0 HT slide scanner at a x20 objective, Hamamatsu,
Hamamatsu City, Japan). Measurements were performed with ICS FrameWork® (Tribvn,
Châtillon, France). We calculated correlations between the PCA-LDA model tissues
quantification and histopathological measurements using Spearman's coefficient (*r*) for non
parametric correlation. A P value of less 0.05 was regarded as significant.

257

5. VX2 tissues biochemical analysis

258 Because the spectral absorption bands are correlated to biochemical tissue 259 composition, it is possible to determine which biomarkers varied according to the tissue type. 260 The Matlab randfeatures function (available in MatLab Statistics Toolbox and MatLab 261 Bioinformatics Toolbox) was used to identify the most discriminant infrared wavenumbers 262 between our 5 populations of spectra (tumor necrosis, viable tumor, fibrosis, liver parenchyma and liver parenchyma necrosis)^{29, 30}. The randfeatures function randomly selects 263 264 a subset of 15 wavenumbers and reduces all the spectra from 451 wavenumbers to the 15 265 selected. The mean spectrum of each category was subtracted from the corresponding spectra. 266 The resulting spectra were then classified using a linear discriminant analysis. After LDA 267 classification, each spectrum gets percentages of belonging to each category. It is considered 268 as well predicted if the percentage of belonging to the correct category is over a confidence 269 threshold fixed to 95%. Then a performance threshold, fixed here to 95%, is used to calculate 270 the number of spectra correctly predicted. If this threshold is exceeded, the subset of 15 271 wavenumbers is retained and a new iteration starts with 15 other wavenumbers. Note that a 272 wavenumber can be chosen several times. The randfeatures algorithm stops when 2000 273 subsets of 15 wavenumbers are retained. The cardinality of each wavenumber, also called 274 score, permits to determine its relevancy in the classification. The wavenumbers are sorted 275 following their score in order to determine the most discriminant ones.

Results

278

1. Construction of the predictive model

279

K-means classification

280 KM was applied to 14 IR images from seven different VX2 tumors. KM clustering 281 with two clusters number did not show evidence of any clear histological structure (figure 282 1A). For 5 clusters images, structures appeared. The areas corresponding to viable and 283 necrotic tissues within the tumor were highlighted (figure 1B). When comparing KM images 284 to HES staining, the sensitivity was higher than 93% for viable tumor, tumor necrosis, liver 285 parenchyma and liver parenchyma necrosis but was only 44% for fibrosis. With 8 clusters, the 286 correlation between HES staining and KM images was good for the 5 types of tissue (figure 287 1C). We found 86.1 % of matching areas for viable tumor (56/65), 94.6% for tumor necrosis 288 (71/75), 80% for fibrosis (36/45), 92.5% for liver parenchyma (36/40) and 90% for liver 289 parenchyma necrosis (27/30). Increasing the number of clusters above 8 did not increase the correspondence between K-means images and HES images and increase the number of 290 291 unallocated areas (from 7.2% with 8 clusters to 12.3% with 10 clusters). Based on KM images 292 in 8 clusters, spectra assigned to histological structures were included into a reference spectral 293 database. The database contained a number of 436.180 spectra.

294

295 <u>Figure 1</u>: VX2 histological sections analyzed by IR imaging and K-means clustering (A-C) or
296 stained with HES (D).

(A-C) IR images computed by K-means analysis in 2, 5 and 8 clusters respectively. The color
was arbitrary attributed to each cluster. All the eliminated spectra by EMSC algorithm were
colored as white pixels in the KM images. (D) Tissue section stained with HES. The tissue
section comprises a large region of viable tumor tissue (1), intratumoral necrosis (2),
intratumoral fibrosis (3) and liver parenchyma (4). Scale bar, 1 mm.

• <u>The PCA-LDA model</u>

304	We calculated the PCA-LDA models with the training set by varying the number of
305	PCs (2/3 of spectra from the database or 290.786 spectra: 6.268 spectra for viable tumor,
306	124.463 for tumor necrosis, 32.259 for fibrosis, 33.621 for liver parenchyma and 36.175 for
307	liver parenchyma necrosis) and we tested them on the same validation set $(1/3 \text{ of spectra from})$
308	the database or 145.394 spectra: 32.134 spectra for viable tumor, 62.232 for tumor necrosis,
309	16.129 for fibrosis, 16.811 for liver parenchyma and 18.088 for liver parenchyma necrosis).
310	The PCA-LDA model established with 20 PCs was chosen for the following of the study. It
311	showed, for the 5 tissues of interest, sensitivity and specificity greater than 86.7% and 96.7%
312	respectively.
313	
314	Figure 2: Mean sensitivity of PCA-LDA model according to the number of PCs
315	
515	
316	2. Application of the predictive model
316317	 <i>Application of the predictive model</i> <u>VX2 tumors CTRL versus DEB-TACE tumors</u>
316317318	 <i>Application of the predictive model</i> <u>VX2 tumors CTRL versus DEB-TACE tumors</u> The LDA model was then applied to 24 spectral images collected from the 20
315316317318319	 <i>Application of the predictive model</i> <u>VX2 tumors CTRL versus DEB-TACE tumors</u> The LDA model was then applied to 24 spectral images collected from the 20 remaining VX2 tumors that were not included into the spectral database (figure 3). The
 316 317 318 319 320 	 Application of the predictive model <u>VX2 tumors CTRL versus DEB-TACE tumors</u> The LDA model was then applied to 24 spectral images collected from the 20 remaining VX2 tumors that were not included into the spectral database (figure 3). The correlation between the 24 LDA images and HES staining was satisfactory for the five tissue
 315 316 317 318 319 320 321 	 <i>Application of the predictive model</i> <u>VX2 tumors CTRL versus DEB-TACE tumors</u> The LDA model was then applied to 24 spectral images collected from the 20 remaining VX2 tumors that were not included into the spectral database (figure 3). The correlation between the 24 LDA images and HES staining was satisfactory for the five tissue types. We found 92.9% (52/56) of the areas sampled in normal liver parenchyma on HES
 316 317 318 319 320 321 322 	Description Description Description
 316 317 318 319 320 321 322 323 	2. Application of the predictive model <u>VX2 tumors CTRL versus DEB-TACE tumors</u> The LDA model was then applied to 24 spectral images collected from the 20 remaining VX2 tumors that were not included into the spectral database (figure 3). The correlation between the 24 LDA images and HES staining was satisfactory for the five tissue types. We found 92.9% (52/56) of the areas sampled in normal liver parenchyma on HES stained section that correctly matched with the green class assigned to liver parenchyma. In viable tumor 89.4% (59/66) of the areas selected on HES stained section were present within
 316 317 318 319 320 321 322 323 324 	2. Application of the predictive model • <u>VX2 tumors CTRL versus DEB-TACE tumors</u> The LDA model was then applied to 24 spectral images collected from the 20 remaining VX2 tumors that were not included into the spectral database (figure 3). The correlation between the 24 LDA images and HES staining was satisfactory for the five tissue types. We found 92.9% (52/56) of the areas sampled in normal liver parenchyma on HES stained section that correctly matched with the green class assigned to liver parenchyma. In viable tumor 89.4% (59/66) of the areas selected on HES stained section were present within the yellow class assigned to viable tumor and in tumor necrosis 94.8% (73/77) of the areas
 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 	2. Application of the predictive model • <u>VX2 tumors CTRL versus DEB-TACE tumors</u> The LDA model was then applied to 24 spectral images collected from the 20 remaining VX2 tumors that were not included into the spectral database (figure 3). The correlation between the 24 LDA images and HES staining was satisfactory for the five tissue types. We found 92.9% (52/56) of the areas sampled in normal liver parenchyma on HES stained section that correctly matched with the green class assigned to liver parenchyma. In viable tumor 89.4% (59/66) of the areas selected on HES stained section were present within the yellow class assigned to viable tumor and in tumor necrosis 94.8% (73/77) of the areas were in the dark blue class assigned to tumor necrosis. In fibrosis 79.2% (42/53) of the areas

necrosis 83.3% (40/48) of the areas were assigned by the model to the orange class attributed
to liver parenchyma necrosis.

329

330 Figure 3: LDA and HES stained images of unknown VX2 tumor sections

Top of panel: LDA images of VX2 tissue sections. Yellow: viable tumor, Dark blue: tumor
necrosis, Blue: fibrosis, green: liver parenchyma, orange: liver parenchyma necrosis and
black: unclassified spectra. Bottom of panel: HES images of adjacent VX2 tissue sections.
Scale bar, 1 mm.

335

The percentage of spectra assigned to each LDA class was automatically calculated by the model (figure 4). For the DEB-TACE group, the LDA model determined that the surface of the necrotic tissue represented 91.6 \pm 9% of the tumor whereas for the CTRL group it was 339 33.1 \pm 19.6% (Mann Whitney: P=0.0004) (figure 5A). Concerning the viable tumor, LDA model calculated 2.6 \pm 4% of the tumor for the DEB-TACE group and 62.2 \pm 15.2% for the CTRL group (Mann Whitney: P=0.0004) (figure 5B). The remaining percentages corresponded to fibrosis and unclassified spectra.

343

344 Figure 4: Automatic tissue surface quantification by PCA-LDA model

Example of tumor viability quantification on a VX2 CTRL tumor section. Surface is expressed as the percentage of pixels on images which are assigned to the viable tumor (yellow) and the necrotic tumor (dark blue) inside the tumor area.

348

The histopathological measurements showed also a complete tumor necrosis in the DEB-TACE group (99.4 \pm 1.6 %) whereas for the CTRL group it was 35.8 \pm 15.1% (Mann Whitney: P< 0.0001). For the viable tumor, histopathological measurements showed also a fewer quantity of viable tumor in the DEB-TACE group (0.57±1.6 %) than in the CTRL
group (64.2±15.1%) (Mann Whitney: P< 0.0001).

354

355 <u>Figure 5</u>: Proportion of necrotic and viable tumor evaluated by PCA-LDA model and 356 correlation plots with histopathological measurements

357 The linear regression is represented with 95% confidence for the mean.

358

The correlation between the both techniques was calculated by using Spearman's coefficient. We found a significant correlation between the PCA-LDA model tissues quantification and histopathological measurements for tumor necrosis (r= 0.827, P<0.0001) and for viable tumor (r= 0.840, P<0.0001). The correlation plots between values obtained with histopathology and PCA-LDA model give a R² of 0.943 for tumor necrosis (figure 5C) tissue and a R² of 0.984 for viable tumor tissue (figure 5D).

- 365
- 366

3. VX2 tissues biochemical analysis

The statistical comparison between mean spectra of each tissue types allowed identifying the biochemical differences. The main spectral differences between the 5 tissue types of VX2 tumor were found in the IR regions specific to protein (Amide I at 1600-1700 cm^{-1} , Amide II at 1490-1575 cm⁻¹ and Amide III at 1250-1350 cm⁻¹), glycogen (1154 cm⁻¹, 1080 cm⁻¹, 1025 cm⁻¹), sugar (1000-1200 cm⁻¹) and nucleic acid (1100-1080 cm⁻¹)³¹ (figure 6).

373

374 Figure 6: Main relevant infrared wavenumbers to discriminate VX2 tumor tissues

375 Average class spectra and standard deviation (grey) for viable tumor (yellow), fibrosis (blue),

376 liver parenchyma (green), liver parenchyma necrosis (orange) and tumor necrosis (dark blue).

377 Offsets as marked were introduced for clarity. Vertical bars represent the most discriminant378 21 wavenumbers.

379

The application of the randfeatures function on two groups of spectra from two tissue 380 381 types permitted to identify the biochemical changes involved in their discrimination. For 382 example between viable tumor and necrotic tumor tissues, we found a higher intensity of the IR bands at 1538 cm⁻¹ (amide II) and at 1628 cm⁻¹ (amide I) in necrotic tumor spectra. We 383 also observed, on necrotic tumor spectra, a shift from 1658 cm⁻¹ to 1648 cm⁻¹ of the amide I 384 385 maximum intensity (figure 7A). The differences between viable tumor and liver parenchyma tissues were due to the presence of strong absorption bands of glycogen (1154 cm⁻¹, 1080 cm⁻¹ 386 387 ¹, 1025 cm⁻¹) in liver parenchyma spectra whereas there was a higher intensity of nucleic acids bands in viable tumor spectra (1240 cm⁻¹, 1080 cm⁻¹, 968 cm⁻¹) (figure 7B). 388

389

390 <u>Figure 7</u>: Main biochemical differences between viable tumor and necrotic tumor or liver
 391 parenchyma tissues

Average class spectra and standard deviation (grey) for viable tumor (yellow), tumor necrosis(dark blue) and liver parenchyma (green).

Discussion

Infrared microspectroscopy of tissue sections has been used to characterize a variety of neoplastic or disease states with the aim of helping pathologists for diagnosis^{32, 33}. In this study, our aims were to validate the use of infrared imaging to automatically quantify the VX2 tumor viability after DEB-TACE treatment which is the recommended treatment against inoperable HCC. IRMS could provide a better understanding of post-therapy imaging appearance that is essential for accurately assessing treatment response and choose the best treatment option for patients.

403

1. Construction of the reliable and predictive model based on references samples

404 The first step consisted in determining whether the main tissues composing the tumor 405 and the host organ could be accurately differentiated with IRMS. Infrared images of unstained 406 VX2 tissue sections were recorded and spectral data from these acquisitions were analyzed 407 with the KM classification method. The method is unsupervised which means that the 408 classification of the data is not determined by operator and solely depends on the similarities 409 between the spectra. The comparison between the KM images processed in 8 clusters and the 410 HES stained section suggests that the structures identified by the classification method 411 correspond to the viable tumor, tumor necrosis, fibrosis, liver parenchyma and liver 412 parenchyma necrosis. To confirm this, we selected areas in each of the tissue type on the 413 control HES and assessed which class they were assigned to on the infrared image. We 414 obtained a correspondence greater than 80% with an 8 clusters classification and increase the 415 number of clusters above 8 do not improve this result. This methodology allowed the 416 construction of a robust spectral database representative of each tissue type and was never 417 done by authors who simply used a visual comparison.

418 Based on KM images in 8 clusters, spectra assigned to histological structures were 419 included into a reference spectral database. We included 436.180 spectra in our database 420 which represent a huge dataset compare to other studies. We reduced the size of dataset by 421 using PCA analysis. The PCA-LDA model calculated with 20 PCs showed a good power of 422 tissues identification (average model sensitivity: 94.5%). The 20 first principal components 423 were sufficient to explain the variability of our dataset and to go beyond could be a risk to include variability due to noise ³⁴. The PCA-LDA model showed sensitivity greater than 424 425 86.7% for the viable tumor, tumor necrosis, fibrosis, liver parenchyma and liver parenchyma necrosis. The specificity was greater than 96.7% for the 5 types of tissue. These percentages 426 427 are good compared to the values reported in studies of IRMS using the same type of 428 predictive model. Ly et al. measured a sensitivity varying between 74% and 98% in cutaneous carcinoma according to tissue type 20 . Teh et al. found a sensitivity of 95% and a specificity of 429 90% to identify dysplasic gastric tissue ³⁵. Salman et al. showed that the normal and 430 malignant cells from colonic tissue could be identified with about 86% of sensitivity ²². 431 432 Nallala et al. measured a sensitivity varying between 77% and 98% in colon carcinoma according to tissue type 21 . 433

434

2. Application of the PCA-LDA model on test samples and tissue quantification

435

• External validation of the PCA-LDA model

While the use of an internal validation set is routinely performed to evaluate the 436 performances of the predictive model, very few studies have verified the accuracy of their 437 438 model on a set of new test samples and compared the results with a reference technique. To 439 our knowledge, this correlation step was never done quantitatively on new infrared images but only on a new pool of infrared spectra ³⁶⁻³⁸. We only found two studies in which the authors 440 441 applied their model to new tissue sections that have been used neither for model construction nor model internal validation^{20, 21}. The different structures of their samples could be identified 442 443 on the IR processed image and the visual comparison to a control HES stained section showed good resemblance between the two images but it was not assessed quantitatively. In the 444

445 present study, we compared quantitatively the PCA-LDA images with adjacent HES stained 446 sections as described in the methodology part. We measured prediction accuracy from 79.2% 447 to 94.8% depending on the tissues. These results reaffirm the potential of infrared imaging to 448 automatically identify different tissue types only based on their infrared absorption spectra.

- 449
- 450

Effect of the DEB-TACE treatment

Tissues quantification

0

451 The automatic quantification of viable and necrotic tumor surface on the PCA-LDA 452 images showed a significant decrease of VX2 tumor viability after DEB-TACE treatment compare to the group of CTRL tumors. After 3 days of treatment, the DEB loaded with 453 454 doxorubicin induced a nearly complete necrosis (91.6±8.9%) of the tumor with very few 455 viable tumor areas (2.6±4%). In the CTRL tumors group, we found a major proportion of 456 viable tumor (62.2±15.2%) with few necrotic areas (33.1±19.6%) after 14 days of tumor 457 development. Basically, during its rapid growth the VX2 tumor necrotized spontaneously due 458 to a flawed vasculature system. The necrosis corresponds to an ischemia necrosis.

459 Hong et al. showed that tumor necrosis in DEB-TACE group reached 90% in the 460 animals sacrificed 3 days post treatment and estimated that tumor necrosis did not exceed 35% after 14 days of development in CTRL group ^{39, 40}. Geschwind et al. described that the 461 mean fraction of viable tumor was about 55% of the whole tumor surface at 17 days after 462 tumor implantation without treatment ⁷. Our findings were in a good accordance with later 463 studies using the VX2 tumor model and further confirm the accuracy of IRMS to quantify 464 465 objectively the antitumor effect after a DEB-TACE treatment.

466

Correlation between IRMS and histopathological methodology 0

467 We found a significant correlation between the PCA-LDA model tissues quantification 468 and histopathological measurements for viable tumor (r= 0.840, P<0.0001) and for tumor 469 necrosis (r= 0.827, P<0.0001). The infrared imaging technique is a good tool to characterize 470 and quantify automatically the tissue types from unstained tissue sections. It is a 471 complementary technique of histopathological analysis and it could be very helpful to 472 quantify precisely the viability of the Vx2 tumor with a resolution close to cellular level. This 473 study demonstrates a novel application of infrared imaging and provides a great solution to 474 understand the tumor behaviour under anticancer treatment.

475

3. VX2 tissues biochemical analysis

The majority of the spectral differences between liver parenchyma and viable tumor 476 arise in the low-frequency region between 1200 and 900 cm⁻¹ in which the glycogen and the 477 478 skeletal vibrations of nucleic acids are observed. As previously reported, we observed an 479 increase of nucleic acids absorption in cancerous tissues characterized by a broad band centred at 1080 cm^{-1 41, 42}. This observation could be explained by the highest degree of 480 cellular activity inside cancerous tissue such as cells division and proliferation ⁴². We detected 481 several bands attributed to glycogen absorption (1150, 1080 and 1028 cm⁻¹) in liver 482 483 parenchyma spectra which were not present in cancerous tissue spectra. The glycogen is 484 stored in the liver by hepatocytes and could be metabolized in glucose during the 485 glycogenolysis process. The absence of glycogen bands in the viable tumor tissue spectra 486 indicated that tumor cells depleted their glycogen or they lost this storage function during malignancy ⁴³. 487

The differences between necrotic and viable tumor spectra result from a decrease in nucleic acid and an increase of protein signals that was also demonstrated by Beljebbar *et al.* $^{44, 45}$. We also observed a shift of the amide I band from 1658 cm⁻¹ to 1648 cm⁻¹ in the necrotic tumor spectra that suggested a change in configuration of proteins. The higher intensity at 1628 cm⁻¹ and the lower intensity at 1658 cm⁻¹ in necrotic tumor spectra compared to viable tumor spectra revealed an increase of B-sheet structure and a decrease of α -helix structure in the necrotic areas 46 .

4. Limits

496 IR images acquisition is still time-consuming (on average 3h per slide) however the 497 new generation of infrared microspectrometers is very promising. The coupling of focal plan 498 array (FPA) detectors to conventional FTIR systems and recent technical advances in FPA 499 technology have allowed the concurrent rapid collection of thousands of infrared spectra over 500 large areas of a sample ⁴⁷.

501

5. Perspectives

502 DEB-TACE showed a good tumor response and an improved survival rate in patients who are not eligible for other treatments ⁴⁸. Despite important advances in the field, DEB-503 504 TACE suffers from a lack of standardization in the selection of the type of DEB, the size of DEB and the choice of chemotherapeutic agent ⁴⁹. In this context, the next step will be to 505 506 apply infrared imaging technique on VX2 tumors after different kind of DEB-TACE 507 treatments. The automatic tissues characterization and quantification on these samples will 508 help to assess the efficacy of these therapies and to determine the impact of each parameter .It 509 may serve in the testing and implementation of novel combinatorial treatment strategies and 510 in the determination of the best treatment option for patients.

Moreover, it is possible to detect the infrared signal of different molecules used in DEB treatment such as Doxorubcin ^{50, 51} or Iburpofen ⁵². The intensity of infrared signal obtained from a molecule is directly proportional to the concentration of this molecule as described by the Beer's law. This mean could be use to quantify the drug concentration inside the DEB at different time points and determine the elution kinetic of the drug ⁵¹. IRMS could permit to quantify on the same image the drug inside the beads, tissue damages and biochemical changes induced by the treatment ^{31, 53}.

518 Another perspective would be to use IRMS to characterize other tissues of interest 519 such as inflammatory tissue or vascular tissue which have demonstrated a specific infrared spectral signature ⁵⁴⁻⁵⁶. It would be also interesting to investigate if IRMS can discriminate
between the spontaneous necrosis of VX2 tumors and the necrosis induced by anticancerous
treatments which is not possible by HE or HES staining.

523

6. Conclusion

524 IRMS coupled with predictive model analysis allows automatically identifying and 525 quantifying the surface of the main tissue types on histology sections of rabbit VX2 liver 526 tumor before and after DEB-TACE treatment. IRMS is able to provide, on the same image, 527 biochemical and morphological information that are essential for accurately assessing 528 treatment response and to understand post-therapy imaging appearance. IRMS could play an 529 important role in the preclinical field, where current imaging tools suffer from bad resolution 530 (PET scan is sensitive but works at the millimeter scale) and/or poor sensitivity (MRI needs 531 contrast agents to highlight changes in molecular concentrations). The ideal technique does 532 not exist, but all have distinct advantages and their association could provide a great overview 533 of tumor behaviours under anticancer treatments.

534

7. Acknowledgements

535 This study was supported by ArchimMed SARL. We are thankful to Cyril Gobinet for 536 analytical help and Saida Homayra for histopathological examination. The PICT-IBiSA 537 technological platform Imagerie Cellulaire et Tissulaire is gratefully acknowledged.

539 References 540 1. Kidd JG, Rous P: A Transplantable Rabbit Carcinoma Originating in a Virus-Induced 541 Papilloma and Containing the Virus in Masked or Altered Form, J Exp Med 1940, 71:813-838 542 2. Rous P, Kidd JG, Smith WE: Experiments on the cause of the rabbit carcinomas 543 derived from virus-induced papillomas. II. Loss by the Vx2 carcinoma of the power to 544 immunize hosts against the papilloma virus, J Exp Med 1952, 96:159-174 Tu M, Xu L, Wei X, Miao Y: How to establish a solitary and localized VX2 lung 545 3. 546 cancer rabbit model? A simple and effective intrapulmonary tumor implantation technique, J 547 Surg Res 2009, 154:284-292 548 4. Ke S, Ding XM, Kong J, Gao J, Wang SH, Cheng Y, Sun WB: Low temperature of 549 radiofrequency ablation at the target sites can facilitate rapid progression of residual hepatic VX2 carcinoma, J Transl Med 2010, 8:73 550 551 5. Liang XM, Tang GY, Cheng YS, Zhou B: Evaluation of a rabbit rectal VX2 552 carcinoma model using computed tomography and magnetic resonance imaging, World J 553 Gastroenterol 2009, 15:2139-2144 554 6. Ramirez LH, Juliéron M, Bonnay M, Koscielny S, Zhao Z, Gouyette A, Munck J-N: 555 Stimulation of tumor growthin vitro and n vivo by suramin on the VX2 model, Investigational 556 new drugs 1995, 13:51-53 557 7. Geschwind JF, Artemov D, Abraham S, Omdal D, Huncharek MS, McGee C, Arepally A, Lambert D, Venbrux AC, Lund GB: Chemoembolization of liver tumor in a 558 559 rabbit model: assessment of tumor cell death with diffusion-weighted MR imaging and histologic analysis, J Vasc Interv Radiol 2000, 11:1245-1255 560 561 8. Zheng LF, Li YJ, Wang H, Zhao JL, Wang XF, Hu YS, Zhang GX: Combination of 562 vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide therapy and radiotherapy

increases the curative effects against maxillofacial VX2 tumors in rabbits, Eur J Radiol 2011,
78:272-276

565 9. Han K, Wang Z, Peng X, Chen B, Wen X, Dong Y, Wu C: Transarterial 566 chemoembolization using docetaxel-loaded phytantriol cubic phase precursor for the 567 treatment of hepatocellular carcinoma, J Pharm Sci 2010, 100:2240-2247

Kang J, Wu X, Wang Z, Ran H, Xu C, Wu J, Wang Z, Zhang Y: Antitumor effect of
docetaxel-loaded lipid microbubbles combined with ultrasound-targeted microbubble
activation on VX2 rabbit liver tumors, J Ultrasound Med 2010, 29:61-70

571 11. Nitta N, Sonoda A, Seko A, Ohta S, Nagatani Y, Tsuchiya K, Otani H, Tanaka T,
572 Kanasaki S, Takahashi M, Murata K: A combination of cisplatin-eluting gelatin microspheres
573 and flavopiridol enhances anti-tumour effects in a rabbit VX2 liver tumour model, Br J Radiol
574 2010, 83:428-432

575 12. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK,
576 Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodes J: Clinical management of hepatocellular
577 carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for
578 the Study of the Liver, J Hepatol 2001, 35:421-430

579 13. Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, Meloni F, Ierace T, Solbiati L, Gazelle GS:
580 Hepatocellular carcinoma: radio-frequency ablation of medium and large lesions, Radiology
581 2000, 214:761-768

582 14. Yan K, Chen MH, Yang W, Wang YB, Gao W, Hao CY, Xing BC, Huang XF:
583 Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: long-term outcome and prognostic
584 factors, Eur J Radiol 2008, 67:336-347

585 15. Cook ES, Jansen CH, Kreke CW, Motzel W: A new tool for cancer investigation:
586 qualitative and quantitative infrared spectroscopy of proteins and enzymes, Acta Unio Int
587 Contra Cancrum 1956, 12:503-507

588 16. Fong CT, Lippincott SW, Eriksen N: Infrared spectroscopy of crystalline albumin in
589 human neoplasia, J Natl Cancer Inst 1957, 18:271-275

590 17. Gaigneaux Anthoula J-MRaEG: Infrared spectroscopy as a tool for discrimination
591 between sensitive and multiresistant K562 cells, Eur J Biochem 2002, 269:1968-1973

592 18. Gazi E, Dwyer J, Lockyer N, Gardner P, Vickerman JC, Miyan J, Hart CA, Brown M,

593 Shanks JH, Clarke N: The combined application of FTIR microspectroscopy and ToF-SIMS

imaging in the study of prostate cancer, Faraday Discuss 2004, 126:41-59; discussion 77-92

595 19. Krafft C, Sobottka SB, Geiger KD, Schackert G, Salzer R: Classification of malignant
596 gliomas by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis, Anal Bioanal
597 Chem 2007, 387:1669-1677

598 20. Ly E, Piot O, Durlach A, Bernard P, Manfait M: Differential diagnosis of cutaneous
599 carcinomas by infrared spectral micro-imaging combined with pattern recognition, Analyst
600 2009, 134:1208-1214

801 21. Nallala J, Diebold M-Dl, Gobinet C, Bouché O, Sockalingum GD, Piot O, Manfait
802 M: Infrared spectral histopathology for cancer diagnosis: a novel approach for automated
803 pattern recognition of colon adenocarcinoma, Analyst 2014, 139:4005-4015

Salman A, Argov S, Ramesh J, Goldstein J, Sinelnikov I, Guterman H, Mordechai S:
FT-IR microscopic characterization of normal and malignant human colonic tissues, Cell Mol
Biol 2001, 47:OL159-166

Ly E, Piot O, Wolthuis R, Durlach A, Bernard P, Manfait M: Combination of FTIR
spectral imaging and chemometrics for tumour detection from paraffin-embedded biopsies,
Analyst 2008, 133:197-205

610 24. Wolthuis R, Travo A, Nicolet C, Neuville A, Gaub MP, Guenot D, Ly E, Manfait M,

611 Jeannesson P, Piot O: IR spectral imaging for histopathological characterization of

612 xenografted human colon carcinomas, Anal Chem 2008, 80:8461-8469

Kohler A, Kirschner C, Oust A, Martens H: Extended multiplicative signal correction
as a tool for separation and characterization of physical and chemical information in Fourier
transform infrared microscopy images of cryo-sections of beef loin, Applied spectroscopy
2005, 59:707-716

617 26. Martens H, Stark E: Extended multiplicative signal correction and spectral
618 interference subtraction: new preprocessing methods for near infrared spectroscopy, J Pharm
619 Biomed Anal 1991, 9:625-635

620 27. Lasch P, Haensch W, Naumann D, Diem M: Imaging of colorectal adenocarcinoma
621 using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis, Biochim Biophys Acta 2004, 1688:176622 186

Travo A, Piot O, Wolthuis R, Gobinet C, Manfait M, Bara J, Forgue-Lafitte ME,
Jeannesson P: IR spectral imaging of secreted mucus: a promising new tool for the
histopathological recognition of human colonic adenocarcinomas, Histopathology 2010,
56:921-931

627 29. Nguyen TT, Happillon T, Feru J, Brassartâ€Passco S, Angiboust JFo, Manfait M,

Piot O: Raman comparison of skin dermis of different ages: focus on spectral markers of
collagen hydration, Journal of Raman Spectroscopy 2013, 44:1230-1237

630 30. Poplineau M, Trussardi-Régnier Al, Happillon T, Dufer J, Manfait M, Bernard P,

631 Piot O, Antonicelli F: Raman microspectroscopy detects epigenetic modifications in living

632 Jurkat leukemic cells, Epigenomics 2011, 3:785-794

633 31. Bellisola G, Sorio C: Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and
634 diagnosis, American journal of cancer research 2012, 2:1

635 32. Kendall C, Isabelle M, Bazant-Hegemark F, Hutchings J, Orr L, Babrah J, Baker R,
636 Stone N: Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnostics, Analyst 2009,
637 134:1029-1045
- 638 33. Krafft C, Steiner G, Beleites C, Salzer R: Disease recognition by infrared and Raman
 639 spectroscopy, J Biophotonics 2009, 2:13-28
- 640 34. Cangelosi R, Goriely A: Component retention in principal component analysis with
 641 application to cDNA microarray data, Biology direct 2007, 2:1-21
- 642 35. Teh S, Zheng W, Ho K, Teh M, Yeoh K, Huang Z: Diagnostic potential of near-643 infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue,
- 644 British Journal of Cancer 2008, 98:457-465
- 36. Bergner N, Romeike BF, Reichart R, Kalff R, Krafft C, Popp J: Tumor margin
 identification and prediction of the primary tumor from brain metastases using FTIR imaging
 and support vector machines, Analyst 2013, 138:3983-3990
- 648 37. Gazi E, Dwyer J, Gardner P, Ghanbari-Siahkali A, Wade AP, Miyan J, Lockyer NP,
- 649 Vickerman JC, Clarke NW, Shanks JH, Scott LJ, Hart CA, Brown M: Applications of Fourier
- 650 transform infrared microspectroscopy in studies of benign prostate and prostate cancer. A
- 651 pilot study, J Pathol 2003, 201:99-108
- 652 38. Lecellier A, Mounier J, Gaydou V, Castrec L, Barbier G, Ablain W, Manfait M,
- 653 Toubas D, Sockalingum GD: Differentiation and identification of filamentous fungi by high-
- throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia, Int J Food Microbiol 2014, 168-169:32-41
- 39. Hong K, Khwaja A, Liapi E, Torbenson MS, Georgiades CS, Geschwind JF: New
 intra-arterial drug delivery system for the treatment of liver cancer: preclinical assessment in a
 rabbit model of liver cancer, Clin Cancer Res 2006, 12:2563-2567
- 40. Lee K-H, Liapi EA, Cornell C, Reb P, Buijs M, Vossen JA, Ventura VP, Geschwind JFH: Doxorubicin-loaded QuadraSphere microspheres: plasma pharmacokinetics and
 intratumoral drug concentration in an animal model of liver cancer, Cardiovascular and
 interventional radiology 2010, 33:576-582

663 41. Benedetti E, Bramanti E, Papineschi F, Rossi I, Benedetti E: Determination of the
664 relative amount of nucleic acids and proteins in leukemic and normal lymphocytes by means
665 of Fourier transform infrared microspectroscopy, Applied spectroscopy 1997, 51:792-797

666 42. Chiriboga I, Yee H, Diem M: Infrared Spectroscopy of Human Cells and Tissue. Part
667 VI: A Comparative Study of Histopathology and Infrared Microspectroscopy of Normal,
668 Cirrhotic, and Cancerous Liver Tissue, Appl Spectrosc 2000, 54:1-8

43. Mehrotra R, Gupta A, Kaushik A, Prakash N, Kandpal H: Infrared spectroscopic
analysis of tumor pathology, Indian journal of experimental biology 2007, 45:71

44. Beljebbar A, Amharref N, Leveques A, Dukic S, Venteo L, Schneider L, Pluot M,
Manfait M: Modeling and quantifying biochemical changes in C6 tumor gliomas by Fourier
transform infrared imaging, Anal Chem 2008, 80:8406-8415

674 45. Beljebbar A, Dukic S, Amharref N, Manfait M: Screening of biochemical/histological
675 changes associated to C6 glioma tumor development by FTIR/PCA imaging, Analyst 2010,
676 135:1090-1097

677 46. Yamada T, Miyoshi N, Ogawa T, Akao K, Fukuda M, Ogasawara T, Kitagawa Y,

678 Sano K: Observation of molecular changes of a necrotic tissue from a murine carcinoma by

679 Fourier-transform infrared microspectroscopy, Clinical cancer research 2002, 8:2010-2014

680 47. Dorling KM, Baker MJ: Rapid FTIR chemical imaging: highlighting FPA detectors,

681 Trends in biotechnology 2013, 31:437-438

682 48. Muros-Ortega M, Diaz-Carrasco MS, Capel A, Calleja MA, Martinez F: Effectiveness

and safety of doxorubicin loaded beads in hepatocellular carcinoma, Int J Clin Pharm 2013,

49. Marelli L, Stigliano R, Triantos C, Senzolo M, Cholongitas E, Davies N, Tibballs J,

685 Meyer T, Patch DW, Burroughs AK: Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma:

686 which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies,

687 Cardiovasc Intervent Radiol 2007, 30:6-25

50. Namur J, Citron SJ, Sellers MT, Dupuis MH, Wassef M, Manfait M, Laurent A:
Embolization of hepatocellular carcinoma with drug-eluting beads: doxorubicin tissue
concentration and distribution in patient liver explants, J Hepatol 2011, 55:1332-1338

691 51. Namur J, Wassef M, Millot JM, Lewis AL, Manfait M, Laurent A: Drug-eluting beads
692 for liver embolization: concentration of doxorubicin in tissue and in beads in a pig model, J
693 Vasc Interv Radiol 2010, 21:259-267

52. Namur J, Wassef M, Pelage JP, Lewis A, Manfait M, Laurent A: Infrared
microspectroscopy analysis of ibuprofen release from drug eluting beads in uterine tissue, J
Control Release 2009, 135:198-202

697 53. Derenne A, Verdonck M, Goormaghtigh E: The effect of anticancer drugs on seven
698 cell lines monitored by FTIR spectroscopy, Analyst 2012, 137:3255-3264

54. Diem M, Chiriboga L, Yee H: Infrared spectroscopy of human cells and tissue. VIII.
Strategies for analysis of infrared tissue mapping data and applications to liver tissue,
Biopolymers 2000, 57:282-290

702 55. Qing-Bo Li X-JS, Yi-Zhuang Xu, Li-Min Yang, Yuan-Fu Zhang, Shi-Fu Weng, Jing-

Sen Shi, Jin-Guang Wu: Use of Fourier-transform infrared spectroscopy to rapidly diagnose
gastric endoscopic biopsies, World J Gastroenterol 2005, 11:3842-3845

56. Wehbe K, Pineau R, Eimer S, Vital A, Loiseau H, Deleris G: Differentiation between
normal and tumor vasculature of animal and human glioma by FTIR imaging, Analyst 2010,

707 135:3052-3059

708

710 Figure 1: VX2 histological sections analyzed by IR imaging and K-means clustering (A-C) or







(A-C) IR images computed by K-means analysis in 2, 5 and 8 clusters respectively. The color
was arbitrary attributed to each cluster. All the eliminated spectra by EMSC algorithm were
colored as white pixels in the KM images. (D) Tissue section stained with HES. The tissue
section comprises a large region of viable tumor tissue (1), intratumoral necrosis (2),
intratumoral fibrosis (3) and liver parenchyma (4). Scale bar, 1 mm.

719 Figure 2: Mean sensitivity of PCA-LDA model according to the number of PCs





722 Figure 3: LDA and HES stained images of unknown VX2 tumor sections.

723

Top of panel: LDA images of VX2 tissue sections. Yellow: viable tumor, Dark blue: tumor
necrosis, Blue: fibrosis, green: liver parenchyma, orange: liver parenchyma necrosis and
black: unclassified spectra. Bottom of panel: HES images of adjacent VX2 tissue sections.
Scale bar, 1 mm.

729 <u>Figure 4</u>: Automatic tissue surface quantification by PCA-LDA model.



730

Fixample of tumor viability quantification on a VX2 CTRL tumor section. Surface is
expressed as the percentage of pixels on images which are assigned to the viable tumor
(yellow) and the necrotic tumor (dark blue) inside the tumor area.

Figure 5: Proportion of necrotic and viable tumor evaluated by PCA-LDA model and
 correlation plots with histopathological measurements



737

The linear regression is represented with 95% confidence for the mean.





742 Average class spectra and standard deviation (grey) for viable tumor (yellow), fibrosis (blue),

743 liver parenchyma (green), liver parenchyma necrosis (orange) and tumor necrosis (dark blue).

744 Offsets as marked were introduced for clarity. Vertical bars represent the most discriminant



747 Figure 7: Main biochemical differences between viable tumor and necrotic tumor or liver



748 parenchyma tissues



751 (dark blue) and liver parenchyma (green).

<u>Tables</u>

755 <u>Table 1</u>: Samples repartition in each study group

	KM followed by PCA-LDA		Test samples		
	CTRL	DEB-TACE	CTRL	DEB-TACE	TOTAL
Tumors	4	3	7	13	27
Tissue sections / IR images	7	7	7	17	38

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions

A. Paramètres influençant les propriétés d'élution d'embolisation

Les microspectroscopies infrarouge et de fluorescence sont complémentaires pour l'étude du comportement *in vivo* des microsphères chargées en doxorubicine. La microspectroscopie infrarouge permet de quantifier la doxorubicine à l'intérieur des microsphères avec une limite de quantification de l'ordre d'un milligramme de DOX par millilitre de microsphères représentant environ 4 à 6% de la concentration de chargement utilisé habituellement en clinique (de 25 mg/mL à 37,5 mg/mL). La microspectroscopie de fluorescence permet de quantifier la doxorubicine dans le tissu et d'établir les profils de diffusion autour des vaisseaux occlus avec une limite de quantification de 0,3 μ mol/L correspondant à un seuil inférieur à l'IC50 et l'EC50 de la doxorubicine DOX qui sont déterminés autour de 0,97 et 3,06 μ mol/L respectivement (143).

L'étude des propriétés d'élution est une étape cruciale dans le développement et l'amélioration des vecteurs de principe actif comme les microsphères d'embolisation. Nos travaux démontrent l'intérêt des microspectroscopies optiques pour la caractérisation des propriétés d'élution des microsphères et la quantification des effets tissulaires. Les différentes études réalisées visent à fournir des informations pertinentes pour aider la définition d'une procédure d'embolisation standardisée et optimale.

Premièrement, nous confirmons que différentes propriétés physicochimiques, résultant directement de la composition des microsphères, induisent des comportements *in vivo* différents. À concentration de chargement identique, la doxorubicine peut être éluée beaucoup plus rapidement par un type de microsphère qu'un autre. Ce constat pose la question de la durée optimale de contact entre le principe actif et le tissu cible. Faut-il plutôt une microsphère qui se vide rapidement et libère une concentration importante d'anticancéreux dans le tissu tumoral ou préférer une élution plus lente favorisant le temps de résidence du médicament dans la tumeur ?

Deuxièmement, nous observons qu'une microsphère de petite taille a tendance à se vider plus rapidement qu'une microsphère plus large. La surface d'échange avec le milieu est plus importante avec les petites microsphères, favorisant l'élution du principe actif. À concentration de chargement identique, les microsphères plus larges, donc de capacité de chargement plus importante, contiennent généralement une quantité supérieure de principe actif entrainant une élution prolongée par rapport aux microsphères plus petites.

Troisièmement, nous démontrons qu'une microsphère chargée à plus faible concentration se vide plus vite, améliore la diffusion tissulaire du principe actif et induit le même taux de nécrose qu'une microsphère chargée à concentration élevée. Ces résultats inattendus sont intéressants dans un contexte clinique d'utilisation des microsphères car ils démontrent que ce n'est pas forcément en chargeant les microsphères avec des concentrations élevées que l'on induit des concentrations tissulaires plus importantes et une nécrose tissulaire supérieure.

Quatrièmement, nous avons mis en évidence que les microsphères en amas se vident moins rapidement que les microsphères isolées entrainant ainsi une élution tissulaire prolongée de la doxorubicine. Nous avons mesuré des concentrations tissulaires cytotoxiques encore 80 jours après le traitement.

B. Evaluation de la viabilité tumorale après traitement

Le second avantage de la microspectroscopie infrarouge est la possibilité de réaliser des images spectrales morphologiques et fonctionnelles des coupes tissulaires déjà utilisées pour la quantification de DOX dans les microsphères et le tissu. Couplée à des analyses chimiométriques (création de modèle de prédiction), cette technologie est capable d'identifier automatiquement les types de tissus présents sur une coupe tissulaire non colorée en se basant sur leur signature spectrale. Nous avons développé un modèle de prédiction applicable au model tumoral VX2 du lapin qui est un modèle expérimental de CHC largement utilisé en radiologie interventionnelle pour tester l'efficacité de traitement ciblé comme la chimioembolisation. Ce nouvel outil, capable de quantifier automatiquement la viabilité tumorale sur une coupe tissulaire avec une résolution spatiale de l'ordre de la cellule, fournit une méthode de quantification tissulaire objective, précise et opérateur indépendante. Il est possible d'utiliser ce modèle de prédiction afin de déterminer l'influence que peut avoir le choix de la taille des MS ou encore la dose de chargement en anticancéreux sur l'effet antitumoral du traitement. Du fait que les analyses de quantification de la doxorubicine sont réalisées à partir de la même coupe tissulaire, nous pouvons imaginer superposer sur le même échantillon, la distribution du médicament et ses effets sur le tissu cible. D'autre part, l'information spectrale contenue en chacun des pixels des images infrarouge reflète la composition biochimique de l'échantillon et permet d'identifier les composés moléculaires caractéristiques de tissus d'intérêts.

C. Pertinence clinique des résultats

À l'heure actuelle, la technique optimale de chimioembolisation utilisant des microsphères n'est pas établie. Les recommandations cliniques se dirigent plutôt vers l'utilisation de microsphères de petites tailles car elles ont une distribution plus distale induisant une couverture du territoire tissulaire par l'anticancéreux plus importante (129, 132). Les outils développés peuvent apporter des précisions sur ces questions et orienter le choix d'un type ou d'une taille de microsphères pour réaliser une chimioembolisation chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire non opérables.

Perspectives

La stratégie d'étude des microsphères chargées en doxorubicine est potentiellement transposable à d'autres types d'implants et de molécules anticancéreuses. Il serait intéressant de comparer l'efficacité antitumorale des microsphères chargées avec différentes molécules comme par exemple le sunitinib (160), le sorafenib (161), l'idarubicine (162) ou l'imatinib (163) et de déterminer leur répartition tissulaire après injection. D'autres techniques d'embolisation sont en développement comme la TARE (radioembolisation transartérielle). Pour la TARE, l'embolisation est pratiquée avec des microsphères de verre (TheraSphere) ou de résine (SIR Spheres) contenant de l'yttrium-90, un élément radioactif émettant des particules et ayant une demi-vie de 64,1 heures (164, 165). L'efficacité de la TARE n'est pas encore établie et nécessite des études comparatives afin de valider ce dispositif médical et d'en prouver les bénéfices par rapport aux techniques actuelles. Il serait possible d'adapter nos protocoles d'analyses à ce type de produit pour comparer leur efficacité par rapport à d'autres types de microsphères dans le modèle de tumeur VX2. D'autre part, d'autres stratégies thérapeutiques se développent pour traiter les carcinomes hépatocellulaire, notamment les nanovecteurs de molécules anticancéreuses (166). Il pourrait être intéressant d'évaluer la cytotoxicité des nanovecteurs et visualiser à l'échelle tissulaire et cellulaire leur répartition et la distribution du principe actif. Il est également possible d'apprécier sur les spectres infrarouge la réponse cellulaire à un type de molécule (167) ou encore de discriminer les cellules résistantes des cellules sensibles à une thérapie (168) ce qui représente des avantages certains pour l'étude de nouvelles thérapies.

Le modèle de prédiction développé au cours de ce travail de thèse peut faire l'objet de plusieurs améliorations. Il pourrait être pertinent d'appliquer des tests de qualité (169) avant

la sélection des spectres pour construire la base de données (par exemple, évaluer le rapport signal sur bruit). D'autre part, il serait intéressant d'identifier la signature moléculaire de l'inflammation (170) et d'ajouter une classe « inflammation » dans notre modèle de prédiction. En effet, le tissu inflammatoire est présent suite à l'injection d'un corps étranger dans le système et fait partie de la réaction au traitement (78). Enfin, la différenciation de la nécrose spontanée du modèle VX2 et de la nécrose induite par le traitement, non réalisable avec les techniques d'histologie classiques, pourrait également être pertinente pour l'évaluation de l'impact tissulaire du traitement.

Bibliographie

- 1 Ishimori S, Hattori M, Shibata Y, *et al.* Treatment of carotid-cavernous fistula by gelfoam embolization. *Journal of neurosurgery* 1967;27(4):315-319.
- 2 Speakman TJ. Internal Occlusion of a Carotid-Cavernous Fistula*. *Journal of neurosurgery* 1964;21(4):303-305.
- 3 Worthington-Kirsch RL, Popky GL, Hutchins Jr FL. Uterine arterial embolization for the management of leiomyomas: quality-of-life assessment and clinical response. *Radiology* 1998;208(3):625-629.
- 4 Konno T, Maeda H, Iwai K, *et al.* Effect of arterial administration of high-molecularweight anticancer agent SMANCS with lipid lymphographic agent on hepatoma: a preliminary report. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 1983;19(8):1053-1065.
- 5 Sasaki Y, Imaoka S, Kasugai H, *et al.* A new approach to chemoembolization therapy for hepatoma using ethiodized oil, cisplatin, and gelatin sponge. *Cancer* 1987;60(6):1194-1203.
- 6 Shimamura Y, Gunvén P, Takenaka Y, *et al.* Combined peripheral and central chemoembolization of liver tumors. Experience with lipiodol-doxorubicin and gelatin sponge (L-TAE). *Cancer* 1988;61(2):238-242.
- 7 Takayasu K, Shima Y, Muramatsu Y, *et al.* Hepatocellular carcinoma: treatment with intraarterial iodized oil with and without chemotherapeutic agents. *Radiology* 1987;163(2):345-351.
- 8 Hong K, Kobeiter H, Georgiades CS, *et al.* Effects of the type of embolization particles on carboplatin concentration in liver tumors after transcatheter arterial chemoembolization in a rabbit model of liver cancer. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2005;16(12):1711-1717.
- 9 Nakamura H, Hashimoto T, Oi H, *et al.* Transcatheter oily chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Radiology* 1989;170(3):783-786.
- 10 Raoul J, Heresbach D, Bretagne J, *et al.* Chemoembolization of hepatocellular carcinomas a study of the biodistribution and pharmacokinetics of doxorubicin. *Cancer* 1992;70(3):585-590.
- 11 Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Seminars in liver disease*, Vol. 19: © 1999 by Thieme Medical Publishers, Inc., 1999, p. 329-338.
- 12 Liver EAfSo. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 2012;48(5):599.

- 13 Nakakuma K, Tashiro S, Hiraoka T, *et al.* Hepatocellular carcinoma and metastatic cancer detected by iodized oil. *Radiology* 1985;154(1):15-17.
- 14 Yumoto Y, Jinno K, Tokuyama K, *et al.* Hepatocellular carcinoma detected by iodized oil. *Radiology* 1985;154(1):19-24.
- 15 Marelli L, Stigliano R, Triantos C, *et al.* Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies. *Cardiovascular and interventional radiology* 2007;30(1):6-25.
- 16 Kan Z, Wright K, Wallace S. Ethiodized oil emulsions in hepatic microcirculation: in vivo microscopy in animal models. *Academic radiology* 1997;4(4):275-282.
- 17 Katagiri Y, Mabuchi K, Itakura T, *et al.* Adriamycin-Lipiodol suspension for ia chemotherapy of hepatocellular carcinoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1989;23(4):238-242.
- 18 Konno T. Targeting cancer chemotherapeutic agents by use of lipiodol contrast medium. *Cancer* 1990;66(9):1897-1903.
- 19 Ohishi H, Uchida H, Yoshimura H, *et al.* Hepatocellular carcinoma detected by iodized oil. Use of anticancer agents. *Radiology* 1985;154(1):25-29.
- 20 Cammà C, Schepis F, Orlando A, *et al.* Transarterial Chemoembolization for Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials 1. *Radiology* 2002;224(1):47-54.
- 21 Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003;37(2):429-442.
- 22 Llovet JM, Real MI, Montaña X, *et al.* Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *The Lancet* 2002;359(9319):1734-1739.
- 23 Lo CM, Ngan H, Tso WK, *et al.* Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35(5):1164-1171.
- 24 Cay O, Kruskal J, Thomas P, *et al.* Targeting of Different Ethiodized Oil–Doxorubicin Mixtures to Hypovascular Hepatic Metastases with Intraarterial and Intraportal Injections. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 1996;7(3):409-417.
- 25 De Baere T, Dufaux J, Roche A, *et al.* Circulatory alterations induced by intra-arterial injection of iodized oil and emulsions of iodized oil and doxorubicin: experimental study. *Radiology* 1995;194(1):165-170.

- 26 Lee JK, Chung YH, Song BC, *et al.* Recurrences of hepatocellular carcinoma following initial remission by transcatheter arterial chemoembolization1. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2002;17(1):52-58.
- 27 Poyanli A, Rozaneş I, Acunaş B, *et al.* Palliative treatment of hepatocellular carcinoma by chemoembolization. *Acta Radiologica* 2001;42(6):602-607.
- 28 Van Beers B, Cauquil P, Jamart J, *et al.* Transcatheter arterial chemotherapy using doxorubicin, iodized oil and Gelfoam embolization in hepatocellular carcinoma. *Acta Radiologica* 1989;30(4):415-418.
- 29 Kato T, Nemoto R, Mori H, *et al.* Arterial chemoembolization with microencapsulated anticancer drug: an approach to selective cancer chemotherapy with sustained effects. *Jama* 1981;245(11):1123-1127.
- 30 Kato T, Nemoto R, Mori H, *et al.* Transcatheter arterial chemoembolization of renal cell carcinoma with microencapsulated mitomycin C. *The Journal of urology* 1981;125(1):19-24.
- 31 Okamoto Y, Konno A, Togawa K, *et al.* Microcapsule chemoembolization for head and neck cancer. *Archives of oto-rhino-laryngology* 1985;242(1):105-111.
- 32 Kato T, Nemoto R, Mori H, *et al.* Sustained-release properties of microencapsulated mitomycin C with ethylcellulose infused into the renal artery of the dog. *Cancer* 1980;46(1):14-21.
- 33 Okamoto Y, Konno A, Togawa K, *et al.* Arterial chemoembolization with cisplatin microcapsules. *British journal of cancer* 1986;53(3):369.
- 34 Goldberg JA, Pettit L, McArdle CS, *et al.* Mitomycin C-loaded microcapsules in the treatment of colorectal liver metastases. Pharmacokinetics of regionally administered particulate chemotherapy. *Cancer* 1991;67(4):952-955.
- 35 Kato T, Sato K, Sasaki R, *et al.* Targeted cancer chemotherapy with arterial microcapsule chemoembolization: review of 1013 patients. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1996;37(4):289-296.
- 36 Bastian P, Bartkowski R, Köhler H, *et al.* Chemo-embolization of experimental liver metastases. Part I: distribution of biodegradable microspheres of different sizes in an animal model for the locoregional therapy. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 1998;46(3):243-254.
- 37 Lewis A. Drug device combination products. *Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC* 2010(VII):154-189.
- 38 Kunstlinger F, Brunelle F, Chaumont P, *et al.* Vascular occlusive agents. *American Journal of Roentgenology* 1981;136(1):151-156.
- 39 Laurent A. Radiodiagnostic-Principes et techniques d'imagerie-Agents d'embolisation. Paris: EMC (Elsevier Masson SAS), 2006.

- 40 Hepatocellulaire GdEedTdC. A comparison of lipiodol chemoembolization and conservative treatment for unresectable hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1995;332(19):1256-1261.
- 41 Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Seminars in liver disease*, Vol. 30: © Thieme Medical Publishers, 2010, p. 052-060.
- 42 Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, *et al.* New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92(3):205-216.
- 43 Bruix J, Sherman M, Llovet JM, *et al.* Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. *Journal of hepatology* 2001;35(3):421-430.
- 44 Miller A, Hoogstraten B, Staquet M, *et al.* Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981;47(1):207-214.
- 45 Eisenhauer E, Therasse P, Bogaerts J, *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer* 2009;45(2):228-247.
- 46 Therasse P, Eisenhauer E, Verweij J. RECIST revisited: a review of validation studies on tumour assessment. *European journal of cancer* 2006;42(8):1031-1039.
- 47 Delumeau S, Lebigot J, Ridereau-Zins C, *et al.* Aspects et évaluation postthérapeutiques des lésions du foie après traitement non chirurgical. *Journal de radiologie* 2011;92(7):632-658.
- 48 Riaz A, Miller FH, Kulik LM, *et al.* Imaging response in the primary index lesion and clinical outcomes following transarterial locoregional therapy for hepatocellular carcinoma. *Jama* 2010;303(11):1062-1069.
- 49 Pauwels X, Azahaf M, Lassailly G, *et al.* Drug-Eluting Beads Loaded With Doxorubicin (DEBDOX) Chemoembolisation Before Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: An Imaging/Histologic Correlation Study. *Clinical investigation* 2014.
- 50 Duke E, Deng J, Ibrahim SM, *et al.* Agreement between competing imaging measures of response of hepatocellular carcinoma to yttrium-90 radioembolization. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2010;21(4):515-521.
- 51 Nassar A, Cohen C, Agersborg SS, *et al.* A multisite performance study comparing the reading of immunohistochemical slides on a computer monitor with conventional manual microscopy for estrogen and progesterone receptor analysis. *American journal of clinical pathology* 2011;135(3):461-467.

- 52 Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2006;25(1):118-145.
- 53 Braren R, Altomonte J, Settles M, *et al.* Validation of preclinical multiparametric imaging for prediction of necrosis in hepatocellular carcinoma after embolization. *Journal of hepatology* 2011;55(5):1034-1040.
- 54 Krajewska M, Smith LH, Rong J, *et al.* Image analysis algorithms for immunohistochemical assessment of cell death events and fibrosis in tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2009;57(7):649-663.
- 55 Beer S, Zetterberg A, Ihrie RA, *et al.* Developmental context determines latency of MYC-induced tumorigenesis. *PLoS biology* 2004;2(11):e332.
- 56 Kim Y, Sills RC, Houle CD. Overview of the molecular biology of hepatocellular neoplasms and hepatoblastomas of the mouse liver. *Toxicologic pathology* 2005;33(1):175-180.
- 57 Li X, Zheng C-S, Feng G-S, *et al.* An implantable rat liver tumor model for experimental transarterial chemoembolization therapy and its imaging. *World J Gastroenterol* 2002;8(6):1035-1039.
- 58 Rous P, Beard J. A virus-induced mammalian growth with the characters of a tumor (the shope rabbit papilloma) I. The growth on implantation within favorable hosts. *The Journal of experimental medicine* 1934;60(6):701-722.
- 59 Li X, Zhou X, Guan Y, *et al.* N-nitrosodiethylamine-induced pig liver hepatocellular carcinoma model: radiological and histopathological studies. *Cardiovascular and interventional radiology* 2006;29(3):420-428.
- 60 Aravalli RN, Golzarian J, Cressman EN. Animal models of cancer in interventional radiology. *European radiology* 2009;19(5):1049-1053.
- 61 Pascale F, Ghegediban S-H, Bonneau M, *et al.* Modified model of VX2 tumor overexpressing vascular endothelial growth factor. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2012;23(6):809-817. e802.
- 62 Kidd JG, Rous P. A transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form. *The Journal of experimental medicine* 1940;71(6):813-838.
- 63 Kreider JW, Bartlett GL. The Shope papilloma-carcinoma complex of rabbits: a model system of neoplastic progression and spontaneous regression. *Advances in cancer research* 1981;35:81-110.
- 64 Weisbroth SH, Flatt RE, Kraus AL. *The biology of the laboratory rabbit*: Academic Press, Inc., 1974.

- 65 van Es RJJ. The rabbit Vx2 auricle carcinoma: an animal model for development of new locoregional treatment strategies against squamous cell carcinoma of the head and neckIne. Utrecht, 2001.
- 66 Stewart EE, Chen X, Hadway J, *et al.* Correlation between Hepatic Tumor Blood Flow and Glucose Utilization in a Rabbit Liver Tumor Model 1. *Radiology* 2006;239(3):740-750.
- 67 Vossen JA, Buijs M, Geschwind J-FH, *et al.* Diffusion-Weighted and Gd-EOB-DTPA-Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging for Characterization of Tumor Necrosis in an Animal Model. *Journal of computer assisted tomography* 2009;33(4):626.
- 68 Deng G, Zhao D-L, Li G-C, *et al.* Combination therapy of transcatheter arterial chemoembolization and arterial administration of antiangiogenesis on VX2 liver tumor. *Cardiovascular and interventional radiology* 2011;34(4):824-832.
- 69 Geschwind J-FH, Artemov D, Abraham S, *et al.* Chemoembolization of liver tumor in a rabbit model: assessment of tumor cell death with diffusion-weighted MR imaging and histologic analysis. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2000;11(10):1245-1255.
- 70 De Baere T, Zhang X, Aubert B, *et al.* Quantification of tumor uptake of iodized oils and emulsions of iodized oils: experimental study. *Radiology* 1996;201(3):731-735.
- 71 Ramirez LH, Juliéron M, Bonnay M, *et al.* Stimulation of tumor growthin vitro andin vivo by suramin on the VX2 model. *Investigational new drugs* 1995;13(1):51-53.
- 72 Wang D, Bangash AK, Rhee TK, *et al.* Liver Tumors: Monitoring Embolization in Rabbits with VX2 Tumors—Transcatheter Intraarterial First-Pass Perfusion MR Imaging 1. *Radiology* 2007;245(1):130-139.
- 73 Maeda N, Osuga K, Shimazu K, *et al.* In Vivo Evaluation of Cisplatin-loaded Superabsorbent Polymer Microspheres for Use in Chemoembolization of VX2 Liver Tumors. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2012;23(3):397-404. e391.
- 74 Gupta S, Wright KC, Ensor J, *et al.* Hepatic arterial embolization with doxorubicinloaded superabsorbent polymer microspheres in a rabbit liver tumor model. *Cardiovascular and interventional radiology* 2011;34(5):1021-1030.
- 75 Lee K-H, Liapi EA, Cornell C, *et al.* Doxorubicin-loaded QuadraSphere microspheres: plasma pharmacokinetics and intratumoral drug concentration in an animal model of liver cancer. *Cardiovascular and interventional radiology* 2010;33(3):576-582.
- 76 Hong K, Khwaja A, Liapi E, *et al.* New intra-arterial drug delivery system for the treatment of liver cancer: preclinical assessment in a rabbit model of liver cancer. *Clinical Cancer Research* 2006;12(8):2563-2567.

- 77 Rao PP, Pascale F, Seck A, *et al.* Irinotecan loaded in eluting beads: preclinical assessment in a rabbit VX2 liver tumor model. *Cardiovascular and interventional radiology* 2012;35(6):1448-1459.
- 78 Lewis AL, Gonzalez M, Lloyd AW, *et al.* DC bead: in vitro characterization of a drug-delivery device for transarterial chemoembolization. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2006;17(2):335-342.
- 79 Namur J, Wassef M, Millot J-M, *et al.* Drug-eluting beads for liver embolization: concentration of doxorubicin in tissue and in beads in a pig model. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2010;21(2):259-267.
- 80 Lilienberg E, Ebeling Barbier C, Nyman R, *et al.* Investigation of hepatobiliary disposition of Doxorubicin following intrahepatic delivery of different dosage forms. *Molecular pharmaceutics* 2013;11(1):131-144.
- 81 Osuga K, Anwar Khankan A, Hori S, *et al.* Transarterial embolization for large hepatocellular carcinoma with use of superabsorbent polymer microspheres: initial experience. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2002;13(9):929-934.
- 82 Osuga K, Hori S, Hiraishi K, *et al.* Bland embolization of hepatocellular carcinoma using superabsorbent polymer microspheres. *Cardiovascular and interventional radiology* 2008;31(6):1108-1116.
- 83 Grosso M, Vignali C, Quaretti P, *et al.* Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma with drug-eluting microspheres: preliminary results from an Italian multicentre study. *Cardiovascular and interventional radiology* 2008;31(6):1141-1149.
- 84 Poggi G, Quaretti P, Minoia C, *et al.* Transhepatic arterial chemoembolization with oxaliplatin-eluting microspheres (OEM-TACE) for unresectable hepatic tumors. *Anticancer research* 2008;28(6B):3835-3842.
- 85 Seki A, Hori S. Switching the loaded agent from epirubicin to cisplatin: salvage transcatheter arterial chemoembolization with drug-eluting microspheres for unresectable hepatocellular carcinoma. *Cardiovascular and interventional radiology* 2012;35(3):555-562.
- 86 Seki A, Hori S, Kobayashi K, *et al.* Transcatheter arterial chemoembolization with epirubicin-loaded superabsorbent polymer microspheres for 135 hepatocellular carcinoma patients: single-center experience. *Cardiovascular and interventional radiology* 2011;34(3):557-565.
- 87 van Malenstein H, Maleux G, Vandecaveye V, *et al.* A randomized phase II study of drug-eluting beads versus transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Onkologie* 2011;34(7):368-376.
- 88 Malagari K, Pomoni M, Moschouris H, *et al.* Chemoembolization of Hepatocellular Carcinoma with Hepasphere 30–60 μm. Safety and Efficacy Study. *Cardiovascular and interventional radiology* 2014;37(1):165-175.

- 89 Varela M, Real MI, Burrel M, *et al.* Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *Journal of hepatology* 2007;46(3):474-481.
- 90 Poon RT, Tso WK, Pang RW, *et al.* A phase I/II trial of chemoembolization for hepatocellular carcinoma using a novel intra-arterial drug-eluting bead. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2007;5(9):1100-1108.
- 91 Malagari K, Chatzimichael K, Alexopoulou E, *et al.* Transarterial chemoembolization of unresectable hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: results of an openlabel study of 62 patients. *Cardiovascular and interventional radiology* 2008;31(2):269-280.
- 92 Lammer J, Malagari K, Vogl T, *et al.* Prospective randomized study of doxorubicineluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovascular and interventional radiology* 2010;33(1):41-52.
- 93 Malagari K, Pomoni M, Kelekis A, *et al.* Prospective randomized comparison of chemoembolization with doxorubicin-eluting beads and bland embolization with BeadBlock for hepatocellular carcinoma. *Cardiovascular and interventional radiology* 2010;33(3):541-551.
- 94 Reyes DK, Vossen JA, Kamel IR, *et al.* Single-center phase II trial of transarterial chemoembolization with drug-eluting beads for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: initial experience in the United States. *The Cancer Journal* 2009;15(6):526-532.
- 95 Osuga K, Maeda N, Higashihara H, *et al.* Current status of embolic agents for liver tumor embolization. *International journal of clinical oncology* 2012;17(4):306-315.
- 96 Namur J, Citron SJ, Sellers MT, *et al.* Embolization of hepatocellular carcinoma with drug-eluting beads: doxorubicin tissue concentration and distribution in patient liver explants. *Journal of hepatology* 2011;55(6):1332-1338.
- 97 Song MJ, Chun HJ, Song DS, *et al.* Comparative study between doxorubicin-eluting beads and conventional transarterial chemoembolization for treatment of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 2012;57(6):1244-1250.
- 98 Golfieri R GE, Renzulli M, Cioni R,Bargellini I, Bartolozzi C, Breatta AD, Gandini G, Nani R, Gasparini D, Cucchetti A, Bolondi L, Trevisani F. Randomised controlled trial of doxorubicin-eluting beads vs conventional chemoembolisation for hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* 2014;111:255-264.
- 99 Namur J, Wassef M, Pelage J, *et al.* Infrared microspectroscopy analysis of Ibuprofen release from drug eluting beads in uterine tissue. *Journal of Controlled Release* 2009;135(3):198-202.

- 100 Ly E, Piot O, Wolthuis R, *et al.* Combination of FTIR spectral imaging and chemometrics for tumour detection from paraffin-embedded biopsies. *Analyst* 2008;133(2):197-205.
- 101 Nallala J. Molecular characterization of tumoral lesions by infrared spectral imaging: implementation of a new concept based on spectral histopathology for colon cancer diagnosis. Reims: Université de Reims Champagne-Ardenne, 2012, p. 181.
- 102 Travo A, Piot O, Wolthuis R, *et al.* IR spectral imaging of secreted mucus: a promising new tool for the histopathological recognition of human colonic adenocarcinomas. *Histopathology* 2010;56(7):921-931.
- 103 Lecellier A. Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Reims: Université de Reims Champgne-Ardenne, 2013, p. 195.
- 104 Breuzard G. Mise en évidence de l'intégration membranaire de la mitoxantrone à l'échelle de la cellule vivante par spectroscopie Raman SERS et transfert d'énergie de fluorescence. Université de Reims Champagne Ardennes, 2006, p. 196.
- 105 Dalibart M. Spectroscopie Dans l'infrarouge: Ed. Techniques Ingénieur, 2000.
- 106 Mohlenhoff B, Romeo M, Diem M, *et al.* Mie-type scattering and non-Beer-Lambert absorption behavior of human cells in infrared microspectroscopy. *Biophysical journal* 2005;88(5):3635-3640.
- 107 Wu W, Guo Q, Jouan-Rimbaud D, *et al.* Using contrasts as data pretreatment method in pattern recognition of multivariate data. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 1999;45(1):39-53.
- 108 Bylesjö M, Cloarec O, Rantalainen M. Normalization and closure. 2009.
- 109 Scharf LL. *Statistical signal processing*: Addison-Wesley Reading, MA, 1991.
- 110 Comon P. Independent component analysis, a new concept? *Signal processing* 1994;36(3):287-314.
- 111 Hyvarinen A. Survey on independent component analysis. *Neural computing surveys* 1999;2(4):94-128.
- 112 Hyvärinen A, Oja E. Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural networks* 2000;13(4):411-430.
- 113 Ly E, Piot O, Durlach A, *et al.* Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared spectral micro-imaging combined with pattern recognition. *Analyst* 2009;134(6):1208-1214.
- 114 Sebiskveradze D, Gobinet C, Ly E, *et al.* Effects of digital dewaxing methods on Kmeans-clusterized IR images collected on formalin-fixed paraffin-embedded samples

of skin carcinoma. *BioInformatics and BioEngineering*, 2008. *BIBE 2008*. 8th IEEE International Conference on: IEEE, 2008, p. 1-6.

- 115 Untereiner V, Dhruvananda Sockalingum G, Garnotel R, *et al.* Bile analysis using high-throughput FTIR spectroscopy for the diagnosis of malignant biliary strictures: a pilot study in 57 patients. *Journal of biophotonics* 2014;7(3-4):241-253.
- 116 Kohler A, Kirschner C, Oust A, *et al.* Extended multiplicative signal correction as a tool for separation and characterization of physical and chemical information in Fourier transform infrared microscopy images of cryo-sections of beef loin. *Applied spectroscopy* 2005;59(6):707-716.
- 117 Martens H, Nielsen JP, Engelsen SB. Light scattering and light absorbance separated by extended multiplicative signal correction. Application to near-infrared transmission analysis of powder mixtures. *Analytical Chemistry* 2003;75(3):394-404.
- 118 Nallala J, Piot O, Diebold MD, *et al.* Infrared imaging as a cancer diagnostic tool: introducing a new concept of spectral barcodes for identifying molecular changes in colon tumors. *Cytometry Part A* 2013;83(3):294-300.
- 119 Khanmohammadi M, Ansari M, Garmarudi AB, *et al.* Cancer diagnosis by discrimination between normal and malignant human blood samples using attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy. *Cancer investigation* 2007;25(6):397-404.
- 120 Burgot GBaJ. *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications*. Paris: Lavoisier, 2006.
- 121 Lakowicz J. Principles of fluorescence spectroscopy. New York, 2006.
- 122 Fourre N. Microenvironnement cellulaire et réponse de la cellule tumorale au médicament : Impact du microenvironnement sur les propriétés anti-migratoires des anthracyclines. Reims: Université de Reims Champagne-Ardenne, 2007, p. 196.
- 123 Guiu B, Schmitt A, Reinhardt S, *et al.* Idarubicin-Loaded ONCOZENE Drug-Eluting Embolic Agents for Chemoembolization of Hepatocellular Carcinoma: In Vitro Loading and Release and In Vivo Pharmacokinetics. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2014.
- 124 Jordan O, Denys A, De Baere T, *et al.* Comparative study of chemoembolization loadable beads: in vitro drug release and physical properties of DC bead and hepasphere loaded with doxorubicin and irinotecan. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2010;21(7):1084-1090.
- 125 Gonzalez MV, Tang Y, Phillips GJ, *et al.* Doxorubicin eluting beads—2: methods for evaluating drug elution and in-vitro: in-vivo correlation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2008;19(2):767-775.

- 126 Blümmel J, Reinhardt S, Schäfer M, *et al.* Drug-eluting beads in the treatment of hepatocellular carcinoma and colorectal cancer metastases to the liver. *European Oncology & Haematology* 2012;3:162-166.
- 127 Taylor RR, Tang Y, Gonzalez M, *et al.* Irinotecan drug eluting beads for use in chemoembolization:< i> In vitro</i> and< i> in vivo</i> evaluation of drug release properties. *european journal of pharmaceutical sciences* 2007;30(1):7-14.
- 128 D'inca H, Ghegediban S, Wassef M, *et al.* Infrared imaging as a novel method to evaluate the efficacy of a locoregional treatment in a Vx2 liver tumor model. *Biomedical Spectroscopy and Imaging* 2014;3(3):265-270.
- 129 Martin R, Irurzun J, Munchart J, *et al.* Optimal technique and response of doxorubicin beads in hepatocellular cancer: bead size and dose. *The Korean journal of hepatology* 2011;17(1):51-60.
- 130 Lewis AL, Gonzalez MV, Leppard SW, *et al.* Doxorubicin eluting beads– 1: Effects of drug loading on bead characteristics and drug distribution. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2007;18(9):1691-1699.
- 131 Lee K-H, Liapi E, Vossen JA, *et al.* Distribution of iron oxide–containing Embosphere particles after transcatheter arterial embolization in an animal model of liver cancer: evaluation with MR imaging and implication for therapy. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2008;19(10):1490-1496.
- 132 Dreher MR, Sharma KV, Woods DL, *et al.* Radiopaque drug-eluting beads for transcatheter embolotherapy: experimental study of drug penetration and coverage in swine. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2012;23(2):257-264. e254.
- 133 Tang Y, Czuczman PR, Chung ST, *et al.* Preservation of the active lactone form of irinotecan using drug eluting beads for the treatment of colorectal cancer metastases. *Journal of Controlled Release* 2008;127(1):70-78.
- 134 Padia SA, Shivaram G, Bastawrous S, *et al.* Safety and efficacy of drug-eluting bead chemoembolization for hepatocellular carcinoma: comparison of small-versus medium-size particles. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2013;24(3):301-306.
- 135 Takasaka I, Kawai N, Sato M, *et al.* A new soluble gelatin sponge for transcatheter hepatic arterial embolization. *Cardiovascular and interventional radiology* 2010;33(6):1198-1204.
- 136 Biondi M, Fusco S, Lewis AL, *et al.* New insights into the mechanisms of the interactions between doxorubicin and the ion-exchange hydrogel DC Bead[™] for use in transarterial chemoembolization (TACE). *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2012;23(1-4):333-354.
- 137 Liu DM, Kos S, Buczkowski A, *et al.* Optimization of doxorubicin loading for superabsorbent polymer microspheres: in vitro analysis. *Cardiovascular and interventional radiology* 2012;35(2):391-398.

- 138 Bilbao JI, de Luis E, García de Jalón JA, *et al.* Comparative study of four different spherical embolic particles in an animal model: a morphologic and histologic evaluation. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2008;19(11):1625-1638.
- 139 Verret V, Ghegediban SH, Wassef M, *et al.* The arterial distribution of Embozene and Embosphere microspheres in sheep kidney and uterus embolization models. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2011;22(2):220-228.
- 140 Lee K-H, Liapi E, Buijs M, *et al.* Considerations for implantation site of VX2 carcinoma into rabbit liver. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2009;20(1):113-117.
- 141 Virmani S, Harris KR, Szolc-Kowalska B, *et al.* Comparison of two different methods for inoculating VX2 tumors in rabbit livers and hind limbs. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2008;19(6):931-936.
- 142 Carr BI, Laishes BA. Carcinogen-induced drug resistance in rat hepatocytes. *Cancer research* 1981;41(5):1715-1719.
- 143 Chuu J-J, Liu JM, Tsou M-H, *et al.* Effects of paclitaxel and doxorubicin in histocultures of hepatocelular carcinomas. *Journal of biomedical science* 2007;14(2):233-244.
- 144 Le Bot MA, Bégué JM, Kernaleguen D, *et al.* Different cytotoxicity and metabolism of doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, esorubicin and idarubicin in cultured human and rat hepatocytes. *Biochemical pharmacology* 1988;37(20):3877-3887.
- 145 Luo D, Cheng SC-S, Xie H, *et al.* Effects of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma HepG2 cell line. *Biochemistry and Cell Biology* 2000;78(2):119-126.
- 146 Yuan S, Zhang X, Lu L, *et al.* Anticancer activity of methoxymorpholinyl doxorubicin (PNU 152243) on human hepatocellular carcinoma. *Anti-cancer drugs* 2004;15(6):641-646.
- 147 Au J-S, Jang S, Zheng J, *et al.* Determinants of drug delivery and transport to solid tumors. *Journal of Controlled Release* 2001;74(1):31-46.
- 148 Gao J, Qian F, Szymanski-Exner A, *et al.* In vivo drug distribution dynamics in thermoablated and normal rabbit livers from biodegradable polymers. *Journal of biomedical materials research* 2002;62(2):308-314.
- 149 Zheng JH, Chen C-T, Au JL, *et al.* Time-and concentration-dependent penetration of doxorubicin in prostate tumors. *Aaps Pharmsci* 2001;3(2):69-77.
- 150 Jang SH, Wientjes MG, Lu D, *et al.* Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharmaceutical research* 2003;20(9):1337-1350.

- 151 Tam K. The Roles of Doxorubicin in Hepatocellular Carcinoma. *ADMET and DMPK* 2013;1(3):29-44.
- 152 Page CP. *Pharmacologie intégrée*: De Boeck Supérieur, 1999.
- 153 Chen Y, Burton MA, Codde JP, *et al.* Evaluation of Ion-exchange Microspheres as Carriers for the Anticancer Drug Doxorubicin: In-vitro Studies. *Journal of pharmacy and pharmacology* 1992;44(3):211-215.
- 154 Liu Z, Wu XY, Bendayan R. In vitro investigation of ionic polysaccharide microspheres for simultaneous delivery of chemosensitizer and antineoplastic agent to multidrug-resistant cells. *Journal of pharmaceutical sciences* 1999;88(4):412-418.
- 155 Agrawal P, Barthwal SK, Barthwal R. Studies on self-aggregation of anthracycline drugs by restrained molecular dynamics approach using nuclear magnetic resonance spectroscopy supported by absorption, fluorescence, diffusion ordered spectroscopy and mass spectrometry. *European journal of medicinal chemistry* 2009;44(4):1437-1451.
- 156 Eksborg S. Extraction of daunorubicin and doxorubicin and their hydroxyl metabolites: Self-association in aqueous solution. *Journal of pharmaceutical sciences* 1978;67(6):782-785.
- 157 Menozzi M, Valentini L, Vannini E, *et al.* Self-association of doxorubicin and related compounds in aqueous solution. *Journal of pharmaceutical sciences* 1984;73(6):766-770.
- 158 Eyol E, Boleij A, Taylor RR, *et al.* Chemoembolisation of rat colorectal liver metastases with drug eluting beads loaded with irinotecan or doxorubicin. *Clinical & experimental metastasis* 2008;25(3):273-282.
- 159 Klass D, Owen D, Buczkowski A, *et al.* The Effect of Doxorubicin Loading on Response and Toxicity with Drug-eluting Embolization in Resectable Hepatoma: A Dose Escalation Study. *Anticancer research* 2014;34(7):3597-3606.
- 160 Fuchs K, Bize PE, Dormond O, *et al.* Drug-eluting beads loaded with antiangiogenic agents for chemoembolization: in vitro sunitinib loading and release and in vivo pharmacokinetics in an animal model. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2014;25(3):379-387. e372.
- 161 Fu Q-H, Zhang Q, Bai X-L, *et al.* Sorafenib enhances effects of transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a systematic review and metaanalysis. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2014:1-12.
- 162 Boulin M, Hillon P, Cercueil J, *et al.* Idarubicin-loaded beads for chemoembolisation of hepatocellular carcinoma: results of the IDASPHERE phase I trial. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2014;39(11):1301-1313.
- 163 Lin AY, Fisher GA, So S, *et al.* Phase II study of imatinib in unresectable hepatocellular carcinoma. *American journal of clinical oncology* 2008;31(1):84-88.

- 164 Kulik LM, Carr BI, Mulcahy MF, *et al.* Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *Hepatology* 2008;47(1):71-81.
- 165 Meza-Junco J, Montano-Loza AJ, Liu DM, *et al.* Locoregional radiological treatment for hepatocellular carcinoma; Which, when and how? *Cancer treatment reviews* 2012;38(1):54-62.
- 166 Wang B, Yuan Y, Han L, *et al.* Recombinant lipoproteins reinforce cytotoxicity of doxorubicin to hepatocellular carcinoma. *Journal of drug targeting* 2013;22(1):76-85.
- 167 Derenne A, Verdonck M, Goormaghtigh E. The effect of anticancer drugs on seven cell lines monitored by FTIR spectroscopy. *Analyst* 2012;137(14):3255-3264.
- 168 Zwielly A, Gopas J, Brkic G, *et al.* Discrimination between drug-resistant and nonresistant human melanoma cell lines by FTIR spectroscopy. *Analyst* 2009;134(2):294-300.
- 169 Lasch P. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 2012;117:100-114.
- 170 Diem M, Chiriboga L, Yee H. Infrared spectroscopy of human cells and tissue. VIII. Strategies for analysis of infrared tissue mapping data and applications to liver tissue. *Biopolymers* 2000;57(5):282-290.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications internationales dans des revues à comité de lecture

D'inca, H., Ghegediban, S.H., Wassef, M., Gobinet, C., Namur, J., Pascale, F., Laurent, A., Manfait, M. Infraed imaging as a novel method to evaluate the treatment efficacy of a locoregional treatment in a Vx2 liver tumor model. Biomedical Spectroscopy and Imaging, 5 pages, IOS press, 2014. (http://iospress.metapress.com/content/g96741855064t17n/)

Soumission le 06 novembre 2014:

<u>Hadrien D'inca</u>, Julien Namur, Saida Homayra Ghegediban, Michel Wassef, Florentina Pascale, <u>Alexandre Laurent and Michel Manfait</u>. Automated quantification of tumor viability in a rabbit liver tumor model after chemoembolization: Infrared imaging. The American journal of pathology.

PUBLICATIONS DANS DES OUVRAGES SCIENTIFIQUES

<u>D'inca, H., Wassef, M., Namur, J., Pascale, F., Laurent, A., Manfait, M</u>. Histologie spectrale infrarouge: caractérisation et quantification tissulaire automatique sur des tumeurs hépatiques développées chez le lapin. Biophotonique générale : optique & imageries pour le diagnostic dans les sciences du vivant et en médecine. 1 volume (556 p), pages 343-350, 2012.

COMMUNICATIONS ORALES

\rightarrow DANS DES REUNIONS INTERNATIONALES

<u>J. Namur</u>, J.P. Pelage, M. Wassef, A.L. Lewis, H. D'inca, M.T. Baylatry, M. Manfait, A. Laurent. Irinotecan concentration in chemoembolization beads: Comparison after 2 hours and 24 hours of loading by microspectroscopy. 24th Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Society of Europe, 13-17 September 2008, Copenhagen, Denmark.

<u>J. Namur</u>, H. D'incà, M.T. Baylatry, A.L. Lewis, M. Manfait, A. Laurent. Irinotecan concentration in drug eluting beads after 2 hours and 24 hours of loading. 34th Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology, 7-12 March 2009, San Diego, CA, USA.

<u>J. Namur</u>, H. D'incà, A.L. Lewis, M. Manfait, A. Laurent. Interaction, distribution and concentration of the two drugs doxorubicin or irinotecan in drug eluting beads. 34th Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology, 7-12 March 2009, San Diego, CA, USA.

<u>H. D'inca</u>, M. Wassef, J. Namur, F. Pascale, A. Laurent and M. Manfait. Infrared imaging and chemometrics to quantify viable/necrotized tumor in animal model. SPEC 2010, 26 June-1 July 2010, Manchester, UK.

J. Namur, M. Wassef, P. Floch, H. D'inca, A. Laurent and M. Manfait. Cutaneous wound repair studied by FTIR microspectroscopy.SPEC 2010, 26 June-1 July 2010, Manchester, UK.

J. Namur, H. D'inca, A. Lewis, M. Wassef, M. Manfait and A. Laurent. FTIR imaging as a quantification method of drug eluting speed in vivo. SPEC 2010, 26 June-1 July 2010, Manchester, UK.

H. D'inca, J.P. Pelage, M.T. Baylatry, S.H. Ghegediban, F. Pascale, M. Manfait, M. Wassef, A. Laurent, <u>J. Namur</u>. Why do small size doxorubicin-eluting microspheres induce more tissue necrosis than larger ones? A comparative study in healthy pig liver. CIRSE 2012, 15-19 September, Lisbon, Portugal.

J. Namur, F. Pascale, H. D'inca, S.H Ghegediban, J.P. Saint Maurice, M. Noboru, V. Verret, M. Manfait, M. Wassef, A. Laurent. Doxorubicin eluting microsphere: Is there a size effect ? Comparison of two sizes in VX2 tumor model. SIR 2014, 22-27 March, San Diego, USA.

<u>J. Namur</u>, F. Pascale, H. D'inca, S.H Ghegediban, J.P. Saint Maurice, V. Verret, M. Noboru M. Manfait, M. Wassef, A. Laurent. Safety and efficacy compared for two Doxorubicin loaded microspheres in liver VX2 model. SIR 2014, 22-27 March, San Diego, USA.

DANS DES REUNIONS NATIONALES

<u>D'inca, H., Wassef, M., Namur, J., Pascale, F., Laurent, A., Manfait, M</u>. Histologie spectrale infrarouge: caractérisation et quantification tissulaire automatique sur des tumeurs hépatiques développées chez le lapin. OPTDIAG, Paris, France, 9-12 mai 2012.

D'inca, H., Namur, J., Pascale, F., Saint-Maurice J.P., Maeda, N., Ghegediban, S.H., Wassef, M., Laurent, A., Manfait, M. Performance comparison of two types of drug loaded implants in a liver tumor model. Oncotrans, Reims, France, 27-28 juin 2013.

COMMUNICATIONS PAR VOIE D'AFFICHE

\rightarrow DANS DES REUNIONS INTERNATIONALES

Namur, J., D'incà, H., Heaysman, C., Manfait, M., Lewis, A.L., Laurent, A. Drug eluting beads analyzed with Infrared Imaging : Concentration, Distribution and Interactions. 36th Annual Meeting and Exposition of Controlled Release Society, Copenhagen, Denmark, 18-22 July 2009.

<u>D'inca, H., Wassef, M., Namur, J., Pascale, F., Ly, E., Manfait, M., Laurent, A.</u> Unsupervised tissue characterization of a rabbit liver Vx2 carcinoma model using infrared imaging. 13th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Palermo, Italia, 28 August-2 September 2009.

<u>Floch, P., Namur, J., Wassef, M., D'inca, Manfait, M., Laurent, A.</u> Study of porcine cutaneous wound healing by Fourier Transform infrared microspectroscopy. 13th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Palermo, Italia, 28 August-2 September 2009.

<u>D'inca, H., Pascale, F., Wassef, M., Namur, J., Travo, A., Manfait, M., Laurent, A.</u> Automated quantification of tissular changes in Vx2 liver tumor for chemoembolization. Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe, Lisbon, Portugal, 19-23 September 2009.

D'inca, H., Ghegediban, S.H., Wassef, M., Gobinet, C., M., Namur, J., Pascale, F, Laurent, A., <u>Manfait, M.,</u> Infrared imaging as a novel method to evaluate the efficacy of a locoregional treatment in a Vx2 tumor model. 15th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Oxford, England, 25-30 August 2013.

D'inca, H., Pascale, F. Ghegediban, S.H., Wassef, M., Gobinet, C., Namur, J., Laurent, A., Manfait, <u>M.,</u>Fast and automated assessment of tumor response: infrared imaging. American association for cancer research, San Diego, California, US, 05-09 April 2014.

<u>D'inca, H., Pascale, F, Ghegediban, S.H., Wassef, M., Gobinet, C., Namur, J., Laurent, A., Manfait,</u> <u>M.</u> Fast and automated assessment of tumor response: infrared imaging. 12th European Congress on Digital Pathology, Paris, France, 18-21 June 2014.

\rightarrow DANS DES REUNIONS NATIONALES

<u>D'inca, H., Namur, J., Wassef, M., Pascale, F., Laurent, A., Manfait, M.</u> Microspheres d'embolisation pour la vectorisation de principes actifs : influence de la taille des microspheres et de la dose de principe actif sur la liberation et les effets tissulaires. Journée des jeunes chercheurs de la SFR CAP-SANTE, Reims, 28 mars 2013.

D'inca, H., Ghegediban, S.H., Wassef, M., Gobinet, C., M., Namur, J., Pascale, F, Laurent, A., <u>Manfait, M.,</u> Infrared imaging as a novel method to evaluate the efficacy of a locoregional treatment in a Vx2 tumor model. 7^{ème} Forum du Cancéropôle du Grand-Est, Strasbourg, 25-26 Novembre 2013.

RESUME en français

Les microsphères d'embolisation, apparues dans les années 2000, sont des dispositifs médicaux dirigées contre les tumeurs hépatiques non opérables. Elles sont calibrées et peuvent être chargées en anticancéreux. Ces avancées majeures permettent de contrôler le niveau d'occlusion et la concentration en principe actif à injecter dans la tumeur. Cependant, le type, la taille des microsphères ou encore la concentration en anticancéreux varient d'un centre à un autre et d'un pays à un autre. Notre travail vise à comparer, sur des modèles de tumeurs hépatiques, les propriétés d'élution et l'efficacité antitumorale de différentes préparations de microsphères. La microspectroscopie infrarouge est utilisée pour mesurer la quantité de doxorubicine présente dans les microsphères à différents délais alors que la microspectrofluorimétrie permet d'évaluer la concentration et la distribution de la doxorubicine autour des billes. L'évaluation de l'activité antitumorale du traitement est mesurée sur les images spectrales infrarouge grâce à un modèle de prédiction et confirmée par un examen histopathologique. Les résultats ont montré que la vitesse d'élution dépend des propriétés physicochimiques de la microsphère, de sa taille et de la concentration de chargement. Les concentrations tissulaires de doxorubicine mesurées induisent une réduction significative de la viabilité tumorale. Le modèle de prédiction est un outil robuste et précis pour évaluer les modifications tissulaires. Ces résultats permettent de formuler des hypothèses mécanistiques sur l'activité antitumorale de différentes préparations de microsphères afin d'optimiser leur utilisation dans une stratégie thérapeutique clinique.

TITRE en anglais

Drug eluting beads loaded with doxorubicin: Contributions of optical microspectroscopy to study the effect of beads size and amount of drug loaded on release properties and tissue damages.

RESUME en anglais

Transarterial chemoembolization is the most common treatment for patients with unresectable liver tumors. Calibrated drug eluting beads offer the advantages of controlling the level of occlusion, the amount of drug delivered, and the duration of drug delivery to the tumor. However, optimal procedure still remains unanswered and treatments differ through the use of various beads sizes or dose of loading. Our work is to compare, on experimental liver tumor model, the release properties and antitumor effects for different preparations of doxorubicin eluting beads. The amount of drug retained inside the beads, at different time point, is assessed by infrared microspectroscopy. Doxorubicin concentration and distribution in the tissue are determined by microspectrofluorimetry. Tissue modifications are quantified by a prediction model on infrared images and compared with the conventional pathological examination of stained tissue sections. Results show that elution rate of doxorubicin depend on the beads composition, the size and the loaded concentration. The doxorubicin tissue concentration induces a significant decrease of tumor viability. The prediction model established by infrared microspectroscopy is an accurate and robust tool to quantify tissue modifications. These results allow the formulation of mechanistic hypotheses on antitumor activity of different preparations of beads to optimize their use in a clinical therapeutic strategy.

DISCIPLINE

Biologie-Biophysique

<u>Mots clés:</u> microsphère, chimioembolisation, microspectroscopie infrarouge, tumeur VX2, microspectrofluorimétrie, doxorubicine, concentration, tissu, distribution.

<u>Keywords:</u> drug eluting beads, chemoembolization, infrared microspectroscopy, VX2 tumor, microspectrofluorimetry, doxorubicin, concentration, tissue, distribution.

INTITULE ET ADRESSE DE L'UNITE DE RECHERCHE

MéDIAN, Biophotonique et Technologies pour la santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR CNRS n°7369 MEDyC, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 REIMS cedex, France