

COMMENT LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES AMELIORENT-ELLES LA MICROVASCULARISATION APRES UN ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL ?

MOISAN Anaïck^{1,2}; FAVRE Isabelle^{1,3}; ROME Claire⁴; NAEGELE Bernadette^{1,3}; BARBIER Emmanuel¹; REMY Chantal¹; DE FRAIPONT Florence⁵; RICHARD Marie-Jeanne^{2,4,5} et DETANTE Olivier^{1,3}

¹Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences/UJF; ²Unité Mixte de Thérapie Cellulaire, CHU de Grenoble / EFS Rhône Alpes ; ³Unité Neurovasculaire, CHU de Grenoble ; ⁴Inserm U823, Institut Albert Bonniot/UJF ; ⁵UM Biochimie des Cancers et Biothérapie, CHU de Grenoble

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la première cause de handicap chez l'adulte. Aujourd'hui, la thrombolyse est le seul traitement efficace mais doit être administré dans les 4h30 suivant les symptômes (phase aiguë) et ne permet donc la prise en charge de seulement 10% des patients. Hormis la rééducation, il n'existe, à ce jour, aucun traitement efficace administrable dans les semaines suivant l'AVC (phase subaiguë). Dans ce contexte, la thérapie cellulaire a émergé comme stratégie de réparation. Parmi les sources cellulaires disponibles, les cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) issues de moelle osseuse ont montré une bonne tolérance et un bénéfice fonctionnel après injection à la phase aiguë de l'infarctus cérébral (IC) chez l'animal. Cependant, leur mécanisme d'action et leur effet après une administration à la phase subaiguë de l'IC restent mal connus. Parmi les hypothèses de mécanisme d'action des CSMh, celle d'un effet paracrine sur l'angiogenèse et la microvascularisation cérébrale semble être une piste prometteuse. En effet, après un IC, le remodelage microvasculaire joue un rôle prépondérant pour favoriser la neurogenèse endogène et la migration des neuroblastes propices à la récupération fonctionnelle.

L'objectif de notre travail préclinique est donc d'évaluer si ces CSMh, injectées à la phase subaiguë de l'IC, modifient la microvascularisation cérébrale dans notre modèle transitoire d'ischémie chez le rat (oACM). L'identification de facteurs angiogéniques impliqués dans cet effet des CSMh permettra d'envisager une optimisation de la source thérapeutique.

Nous avons réalisé un suivi IRM *in vivo* de la microvascularisation cérébrale (volume sanguin cérébral, diamètre des vaisseaux et densité microvasculaire), un suivi comportemental *in vivo* (tests sensori-moteurs) et une analyse des facteurs angiogéniques par biologie moléculaire (RT-PCR et PCR quantitative : VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, Ang-1, Ang-2, Tie1, Tie2 et eNOs) durant 25 jours. Deux groupes de rats ayant subi une ischémie ont été suivis: l'un traité par injection IV de CSMh à J8 (oACM CSMh, n=9), et l'autre par injection IV de PBS (oACM PBS, n=8). La cinétique d'expression des facteurs angiogéniques a été réalisée par qPCR, à partir des cerveaux prélevés aux différents temps du suivi (J3, J7, J9, J16 et J21 ; n=3 par groupe et par temps).

Nos résultats montrent que les CSMh favorisent la formation de néo-vaisseaux et donc la densité vasculaire dès la première semaine suivant leur injection (oACM-CSMh vs oACM-PBS à J16: 162.4 ± 34.2 vs 111.0 ± 23.6 mm², p=0.003 ; à J25: 158.6 ± 19.9 vs 120.4 ± 8.3 mm², p=0.009). Nous avons mis en évidence une tendance à la diminution de la taille de la lésion dans le groupe traité par CSMh (oACM-CSMh vs oACM-PBS à J25 : 129.0 ± 27.3 mm³ vs 166.0 ± 27.3 mm³) sans effet délétère sur le comportement. L'analyse des facteurs angiogéniques est en cours de réalisation mais ceux identifiés comme étant à l'origine de l'effet microvasculaire observé en IRM pourraient nous permettre d'optimiser notre source thérapeutique.

HOW MESENCHYMAL STEM CELLS IMPROVE THE CEREBRAL MICROVASCULATURE AFTER STROKE?

MOISAN Anaïck^{1,2}; FAVRE Isabelle^{1,3}; ROME Claire⁴; NAEGELE Bernadette^{1,3}; BARBIER Emmanuel¹; REMY Chantal¹; DE FRAIPONT Florence⁵; RICHARD Marie-Jeanne^{2,4,5} et DETANTE Olivier^{1,3}

¹Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences/UJF; ²Unité Mixte de Thérapie Cellulaire, CHU de Grenoble / EFS Rhône Alpes ; ³Unité Neurovasculaire, CHU de Grenoble ; ⁴Inserm U823, Institut Albert Bonniot/UJF ; ⁵UM Biochimie des Cancers et Biothérapie, CHU de Grenoble

Stroke is the leading cause of adult disability. Today, intravenous (IV) thrombolysis is the only approved treatment to reduce the mortality and disability after a stroke. This treatment has to be applied before 4.5 hours after the onset of symptoms (acute phase). Because of this short time window, it is estimated that only 10% of patients receive this treatment. Beyond rehabilitation, no therapeutic treatment is available during the weeks following stroke (subacute phase). At the subacute phase of stroke, there is a strong need to stimulate brain plasticity in patients and cell therapy emerged as regenerative medicine. Mesenchymal stem cells (MSC), isolated from bone marrow, are well tolerated and beneficial when administered at the acute phase of stroke in animals. Their action mechanism is however not understood. A functional secretion of angiogenic factors from MSC could improve angiogenesis and microvasculature via paracrine mechanisms. Indeed, vascular remodeling occurring after stroke plays a key role in supporting endogenous neurogenesis and migration of neuronal precursors to promote functional recovery.

The aim of this study was to follow the effect of MSC on the cerebral microvasculature when injected at the subacute phase of stroke in our rat model (middle cerebral artery occlusion, MCAo). Secreted factors identified as taking part of microvasculature improvement could then be used as therapeutic tools.

A 25 days-multimodal follow-up of animal was performed including *in vivo* MRI of the brain microvasculature (cerebral blood volume, vessel size index and vascular density), *in vivo* behavioral study (modified neurological severity score and adhesive removal test) and *ex vivo* analysis of angiogenic factors by quantitative PCR (VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, Ang-1, Ang-2, Tie1, Tie2 et eNOs).

Two groups of MCAo animals were followed. The MCAo-MSC group (n=9) received at day 8 (D8) an IV injection of 3×10^6 MSC; the MCAo-PBS group (n=8) received at D8 an IV injection of placebo. A kinetic of the angiogenic factor expressions was performed on frozen brains (3 rats per group and per time point) for each time of the follow-up (D3, D7, D9, D16 and D25). Our MRI results demonstrate a pro-angiogenic effect of MSC starting one week after their IV injection (MCAo-MSC vs MCAo-PBS at D16: 162.4 ± 34.2 vs 111.0 ± 23.6 mm², p=0.003 ; at D25: 158.6 ± 19.9 vs 120.4 ± 8.3 mm², p=0.009). We observed a downward trend of the lesion volume in the group treated by MSC (MCAo-MSC vs MCAo-PBS at D25 : 129.0 ± 27.3 mm³ vs 166.0 ± 27.3 mm³), without any deleterious effect on behavior. Biological analysis of angiogenic factors are still in progress. Those factors identified as initiating the observed microvascular effect could allow us to optimize MSC therapy in stroke.

IMAGERIE IN-VIVO ET EN 32 MINUTES DES PLAQUES AMYLOIDES PAR IRM MICROSCOPIQUE APRES ADMINISTRATION INTRA-VEINEUSE D'AGENTS DE CONTRASTE ET OUVERTURE DE LA BARRIERE HEMATOENCEPHALIQUE PAR ULTRASONS

Auteurs : SANTIN Mathieu D.^{1,2,3}, DEBEIR Thomas⁴, BRIDAL S. Lori⁵, ROONEY Thomas⁴, DHENAIN Marc^{2,3}

¹*Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM), Centre de NeuroImagerie de Recherche (CENIR) - Hôpital Pitié-Salpêtrière - 47/83 Boulevard de l'Hôpital - 75013 Paris*

²*URA 2210 CEA / CNRS Laboratoire des maladies neurodégénératives - 18 route du Panorama -BP6 - 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex*

³*CEA / I2BM / MIRCen - 18 route du Panorama -BP6 - 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex*

⁴*Sanofi-Aventis, Therapeutic Strategic Unit Aging - 1 avenue Pierre Brossolette – 91385 Chilly-Mazarin Cedex*

⁵*UMR CNRS 7623 – Laboratoire d'Imagerie Paramétrique – 15 rue de l'Ecole de Médecine – 75006 Paris*

Introduction

La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par l'accumulation cérébrale de deux lésions microscopiques complémentaires : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. Les plaques amyloïdes mesurent entre 20 et 100µm. Ces lésions apparaissent jusqu'à 20 ans avant les premiers signes cliniques de la maladie (Sperling et al., 2011). De nombreux traitements en cours de développement cherchent à supprimer ces lésions.

Plusieurs efforts visent à développer des méthodes pour détecter les plaques amyloïdes par imagerie par résonance magnétique (IRM) à haute résolution. Les approches basées sur l'utilisation d'agents de contraste RMN (Zaim Wadghiri et al., 2003) nécessitent l'ouverture de la barrière hématoencéphalique (BHE), un système spécialisé qui protège le cerveau des substances présentes dans le sang. L'ouverture de la BHE peut être réalisée avec des agents tels que le mannitol, mais cette approche entraîne une forte mortalité. Récemment, notre groupe a développé une méthode de marquage des plaques amyloïdes obtenue par l'utilisation d'un agent de contraste RMN à base de Gadolinium. Cet agent, une fois injecté dans le cerveau, permet de visualiser les plaques amyloïdes *ex vivo* (Dhenain et al., 2006) et *in vivo* (Petiet et al., In press).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré la faisabilité de l'ouverture de la BHE par l'utilisation d'ultrasons et d'agents de contraste ultrasonore (microbulles de gaz encapsulées) (Howles et al., 2010, Choi et al., 2008, McDannold et al., 2007). Sous l'action du faisceau ultrasonore, les microbulles se mettent à osciller en permettant le passage de l'agent de contraste RMN dans le parenchyme cérébral.

Le but de ce travail était de détecter les plaques amyloïdes en utilisant un protocole basé sur l'administration intraveineuse d'un agent de contraste RMN et l'ouverture de la BHE par ultrasons et microbulles.

Matériels et Méthodes

Cette étude a été réalisée sur 6 souris transgéniques APP/PS1 âgées de 8 à 17 mois et sur des souris contrôles dépourvues de plaques amyloïdes cérébrales. L'ouverture de la BHE a été réalisée au moyen d'un transducteur ultrasonore non focalisé (Imasonic) et de microbulles (Sonovue, Bracco) injectées par voie intraveineuse (IV). L'agent de contraste

RMN (Dotarem, Guerbet) a également été injecté par voie IV. Des images RMN en écho de gradient 3D (TR/TE=30/15ms, résolution de 29x29x117µm, temps d'acquisition : 32 min; 7T-Varian) ont été acquises.

Les souris ont ensuite été imagées par la technique basée sur l'injection *in situ* d'agent de contraste RMN avec la même séquence d'acquisition. Les souris ont ensuite été sacrifiées et leur cerveau prélevé afin de réaliser les IRM *ex vivo* des plaques amyloïdes.

Nous avons ensuite évalué la charge en plaques des animaux imagés par IRM et ouverture de BHE avec la charge en plaques obtenue par l'injection *in situ* ainsi qu'avec l'imagerie *ex vivo*.

Résultats

Nous avons pu observer la présence de dépôts de plaques amyloïdes sur tous les sujets imagés par IRM de contraste avec ouverture de BHE (Fig. 1a & 1b). Sur ces images, les signaux hypointenses présents dans le cortex traduisent la présence de plaques amyloïdes. Les lésions n'étaient pas visibles dans le cerveau des animaux contrôles. La comparaison des images *in vivo* et *ex vivo* a validé que les spots hypointenses détectés correspondaient aux plaques amyloïdes.

Discussion

Cette étude est à notre connaissance la première à montrer la faisabilité d'imager les plaques amyloïdes chez la souris par le biais d'un agent de contraste RMN injecté périphériquement. Ceci pose les bases de l'imagerie des plaques amyloïdes chez l'homme, notamment par l'utilisation d'agents ciblés franchissant la BHE. Cette technique devrait également permettre un meilleur suivi thérapeutique préclinique de nouvelles molécules ciblant l'amyloïde dans les modèles murins de la MA.

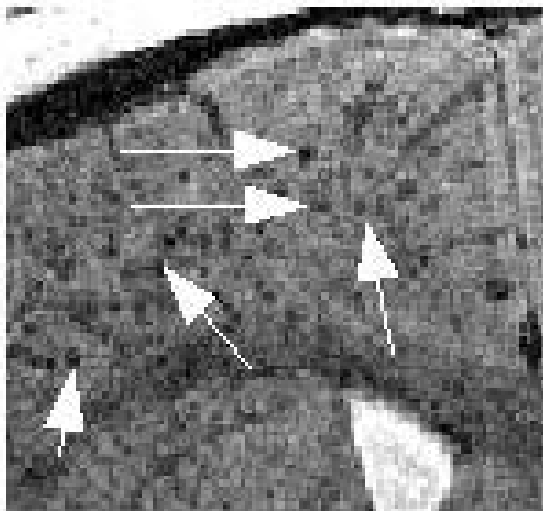


Fig 1a : Image RMN d'une coupe de cerveau de souris avec ouverture de BHE par ultrasons et injection périphérique d'agent de contraste RMN. Les spots hypointenses correspondent aux plaques amyloïdes. Les flèches blanches indiquent la présence de certains dépôts amyloïdes.

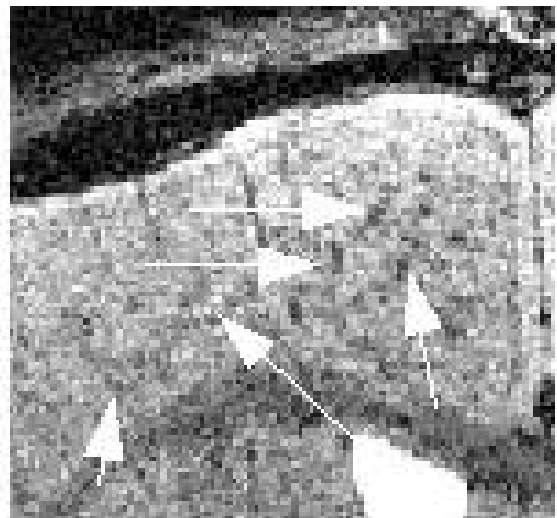


Fig 1b: Image RMN d'une coupe de cerveau de souris obtenue par injection *in situ* d'agent de contraste RMN. Les spots hypointenses correspondent aux plaques amyloïdes. Les flèches blanches indiquent la présence de certains dépôts amyloïdes.

IMAGERIE IN-VIVO ET EN 32 MINUTES DES PLAQUES AMYLOIDES PAR IRM MICROSCOPIQUE APRES ADMINISTRATION INTRA-VEINEUSE D'AGENTS DE CONTRASTE ET OUVERTURE DE LA BARRIERE HEMATOENCEPHALIQUE PAR ULTRASONS

Auteurs : SANTIN Mathieu D.^{1,2,3}, DEBEIR Thomas⁴, BRIDAL S. Lori⁵, ROONEY Thomas⁴, DHENAIN Marc^{2,3}

¹*Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM), Centre de NeuroImagerie de Recherche (CENIR) - Hôpital Pitié-Salpêtrière - 47/83 Boulevard de l'Hôpital - 75013 Paris*

²*URA 2210 CEA / CNRS Laboratoire des maladies neurodégénératives - 18 route du Panorama -BP6 - 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex*

³*CEA / I2BM / MIRCen - 18 route du Panorama -BP6 - 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex*

⁴*Sanofi-Aventis, Therapeutic Strategic Unit Aging - 1 avenue Pierre Brossolette – 91385 Chilly-Mazarin Cedex*

⁵*UMR CNRS 7623 – Laboratoire d'Imagerie Paramétrique – 15 rue de l'Ecole de Médecine – 75006 Paris*

Introduction

Alzheimer's disease is characterized by accumulation of two complementary microscopic brain lesions: amyloid plaques and neurofibrillary tangles. Amyloid plaque size is between 20 et 100µm. These lesions occur until 20 years before the first clinical signs of the disease (Sperling et al., 2011). Numerous treatments currently in progress try to suppress these lesions.

Several efforts aim at developing new methods for amyloid plaque detection with high-resolution magnetic resonance imaging (MRI). The approaches using NMR contrast agent need blood-brain barrier (BBB) opening, a specialized system which prevents certain substances from penetrating the brain via the blood stream. BBB opening can be achieved with agents such as mannitol but this approach leads to strong mortality. Recently our group developed a method based on amyloid plaque tagging obtained with the use of a Gadolinium-based NMR contrast agent. This agent, once injected within the brain, allows *ex-vivo* (Dhenain et al., 2006) and *in-vivo* (Petiet et al., In press) amyloid plaque visualization.

Besides, some studies showed the feasibility of BBB opening with the use of ultrasound and ultrasound contrast agents (encapsulated gas microbubbles) (Howles et al., 2010, Choi et al., 2008, McDannold et al., 2007). Under the action of ultrasound beam, microbubbles start to oscillate and allow NMR contrast agent transiting with brain parenchyma.

The aim of this work was to detect amyloid plaques using a protocol based on intravenous injection of NMR contrast agent and BBB opening with ultrasound and microbubbles.

Materials et Methods

This study was done using 6 APP/PS1 transgenic mice aged from 8 to 17 months-old and on control mice free from cerebral amyloid plaques. BBB opening was obtained by means of an unfocalized ultrasound transducer (Imasonic) and microbubbles (Sonovue, Bracco) injected intra-venously (IV). RMN contrast agent (Dotarem, Guerbet) was also IV-injected. 3D Gradient-echo NMR images (TR/TE=30/15ms, resolution: 29x29x117µm, scan time: 32 min; 7T-Varian) were acquired.

Mice images were then obtained with the technique based on *in-situ* injection of NMR contrast agent with the same imaging protocol. Mice were then sacrificed and their brain was

extracted in order to obtain *ex-vivo* amyloid plaques MRI.

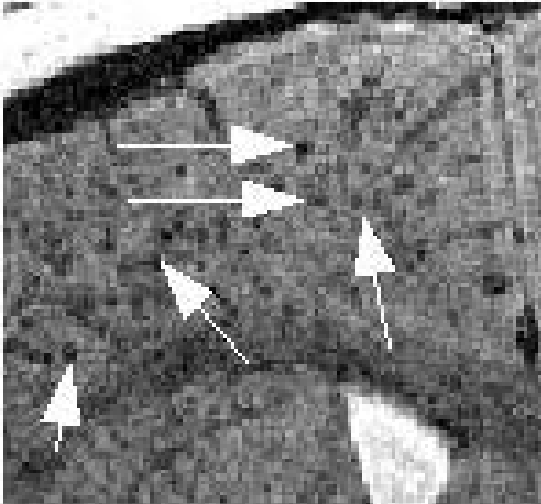
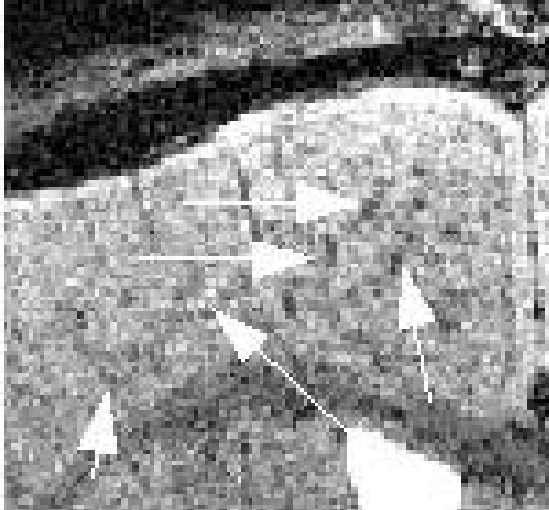
We then evaluated the plaque load of animals imaged with MRI and BBB opening with plaque load obtained with *in-situ* injection and *ex-vivo* imaging.

Results

We were able to observe amyloid plaques deposits in all the subjects imaged with contrast-MRI and BBB opening (Fig.1a & 1b). On these images, hypointense spots within the cortex indicate the presence of amyloid plaques. These lesions were not detected on control mice's brain. Comparison between *in-vivo* and *ex-vivo* images validated that hypointense detected spots corresponded to amyloid plaques.

Discussion

To our knowledge this is the first study showing the feasibility of amyloid plaque imaging in mouse with a peripheric injection of NMR contrast agent. This gives the basis for human plaques imaging, especially with the use of contrast agents crossing the BBB. This technique should also permit a better preclinical therapeutic follow-up of new molecules targeting amyloid in the murine models of AD.

	
<p>Fig 1a : NMR image of a mouse brain slice with BBB opening with ultrasound and peripheric injection of NMR contrast agent. Hypointense spots correspond to amyloid plaques. White arrows indicate the presence of some amyloid deposits.</p>	<p>Fig 1b: NMR image of a mouse brain slice obtained with <i>in situ</i> injection of NMR contrast agent. Hypointense spots correspond to amyloid plaques. White arrows indicate the presence of some amyloid deposits.</p>

Quantification des propriétés viscoélastiques de cisaillement de tumeurs cancéreuses avant et après traitement par chimiothérapie ou anti-vasculaire sur souris.

J.L. Gennisson¹, H. Latorre-Ossa¹, F. Chamming's², J. Seguin³, L. Fournier², N. Mignet³, O. Clément², M. Tanter¹.

¹Institut Langevin- Ondes et Images, ESCPI ParisTech, CNRS UMR 7587, INSERM U979, Paris, France.

²Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de radiologie, Paris, France.

³Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie, CNRS UMR 8151, INSERM U1022, Faculté de pharmacologie, Paris, France.

Il est communément admis que le développement des tumeurs cancéreuses et de leur réponse à la chimiothérapie ou aux drogues anti-vasculaires est très lié aux variations de la viscoélasticité des tissus et à leur vascularisation. La surveillance par imagerie élastographique ultrasonore de la réponse tumorale précoce pour la chimiothérapie néo-adjuvante serait fondamentale pour éviter les effets indésirables causés par la prolongation de traitements inefficaces et permettrait passer directement à la chirurgie. Le but de ce travail est d'effectuer une analyse quantitative du comportement d'un modèle humain de cancer du sein et de cancer du côlon implantés sur des souris, avant et après chimiothérapie ou traitement anti-vasculaire en utilisant une technique récente: le Supersonic Shear Imaging (SSI).

La technique SSI est basée sur la combinaison de la force de radiation induite par un faisceau ultrasonore (15 MHz) et une séquence d'imagerie ultrarapide (5000 images/s) capable de capturer en temps réel la propagation des ondes de cisaillement résultantes. Un algorithme de temps de vol est utilisé pour calculer les cartes d'élasticité. La large bande passante des ondes de cisaillement (de 150 à 1000 Hz) permet de remonter aux propriétés visqueuses du milieu. Pour le modèle de cancer du sein, une xénogreffe humaine est implanté sur 26 souris. Les souris sont surveillées tous les 7 jours dès que les tumeurs sont mesurables. La chimiothérapie commence lorsque les tumeurs atteignent un diamètre d'au moins 10 mm. Les mesures de viscoélasticité sont effectuées chaque semaine et mis en corrélation avec les résultats histopathologiques (deux souris sont sacrifiées chaque semaine). Par ailleurs une imagerie IRM (4,7 T) est également utilisée afin d'obtenir le coefficient de diffusion (ADC) liée à la cellularité. Pour le modèle de cancer du côlon, 20 souris ont été implantées. Les souris ont été suivies tous les 2 jours pendant la croissance de la tumeur. Dès que les tumeurs atteignent 1 cm de diamètre, l'anti-vasculaire est injecté. Le suivi des propriétés viscoélastiques et des mesures Doppler a été réalisé toutes les 5 min pendant 2 heures après l'injection et répété pendant 3 jours consécutifs.

Concernant le cancer du sein, des images mode-B et cartes d'élasticité sont obtenues pour chaque souris avec une bonne reproductibilité (pour la souris #2, l'élasticité est de $7,6 \pm 0,8$ kPa avec un diamètre tumoral de 3,5 mm). Les diamètres des tumeurs à 2 et 5 semaines ont été en moyenne de 6 mm et 10 mm respectivement. Les valeurs d'élasticité moyenne après le même nombre de semaines augmentent de manière significative (de $15,6 \pm 3,9$ kPa à $46,9 \pm 4,7$ kPa, respectivement pour la souris #7). La viscosité ne change pas significativement au cours de la croissance des tumeurs. La chimiothérapie en cours semble montrer une décroissance des valeurs d'élasticité après quelques semaines d'expériences. En

parallèle, pour le cancer du côlon, la montée d'élasticité avec la croissance tumorale est de $5,0 \pm 1,7$ kPa à $11,8 \pm 1,2$ kPa sur les jours 12 suivant la greffe. Après l'injection de l'anti-vasculaire, l'élasticité ne change pas tandis que les mesures Doppler diminuent significativement dans l'heure.

Cette étude montre que l'augmentation de la taille tumorale est reliée à l'élasticité. La diminution de l'élasticité montre l'efficacité de la chimiothérapie dans le cancer du sein au cours des semaines de traitement, tandis que la diminution significative de la mesure Doppler sur le cancer du côlon montre l'efficacité des médicaments anti-vasculaires dans les minutes suivantes, sans changement d'élasticité. La corrélation de ces résultats aux mesures histopathologiques explique le lien entre les propriétés mécaniques et la physiologie des tumeurs. Par ailleurs, les résultats de ce travail ouvrent la voie pour de futures études afin d'évaluer la contribution de l'élastographie et des mesures Doppler dans la détection des résidus tumoraux chez des patients souffrant de cancer du sein ou du côlon traités par chimiothérapie, anti-vasculaire, ou médicaments combinés.

Shear viscoelasticity quantification of cancerous tumors before and after chemotherapy or anti-vascular treatment in mice.

J.L. Gennisson¹, H. Latorre-Ossa¹, F. Chamming's², J. Seguin³, L. Fournier², N. Mignet³, O. Clément², M. Tanter¹.

¹Institut Langevin- Ondes et Images, ESCPI ParisTech, CNRS UMR 7587, INSERM U979, Paris, France.

²Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de radiologie, Paris, France.

³Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie, CNRS UMR 8151, INSERM U1022, Faculté de pharmacologie, Paris, France.

It is believed that tumor development and its response to chemotherapy or anti-vascular are highly linked to variations in the tissue viscoelasticity and vascularization. The monitoring through ultrasound-elastography imaging of the tumor early response to neo-adjuvant chemotherapy would be fundamental to avoid unwanted effects caused by the prolongation of ineffective treatments which intend to preserve the organ, and proceed directly to the surgery. The aim of this work is to perform a quantitative analysis of the behavior of a human model of breast cancer and colon cancer implanted on mice, before and after neo-adjuvant chemotherapy or anti-vascular treatment using Supersonic Shear Imaging (SSI) technique.

The SSI technique is based on the combination of radiation force induced by an ultrasonic beam (15 MHz) and an ultrafast imaging sequence (5000 frames/s) capable of catching in real time the propagation of the resulting shear waves. A time of flight algorithm is employed to retrieve the elasticity maps. The large bandwidth of the shear waves (between 150 and 1000 Hz) allows also the retrieval of viscous properties. For the breast cancer model, a xenograft of a human breast cancer is implanted on the 26 mice aged 4-6 weeks. The mice are monitored every 7 days from the day the tumors are measurable. The neo-adjuvant chemotherapy treatment begins when tumors reach a diameter of at least 10 mm. Viscoelasticity measurements are performed longitudinally for each mouse every week and correlated with histopathological results (two mice are sacrificed each week). Moreover MRI (4.7 T) is also used in order to get apparent diffusion coefficient (ADC) linked to cellularity. For the colon cancer model, 20 mice were implanted. The mice were monitored every 2 days during the growing of the tumor. After the tumors reach almost 1 cm diameter, the anti-vascular was injected. Then monitoring of viscoelastic properties and Doppler measurements were performed every 5 min during 2 hours right after injection and repeated during 3 consecutive days.

Regarding breast cancer, B-mode images and their corresponding elasticity maps are obtained for each mouse with a good reproducibility and accuracy (as an example, over 5 measurements, the elasticity is 7.6 ± 0.8 kPa for mouse #2 with a tumor diameter of 3.5 mm). The average tumor diameters 2 and 5 weeks after being implanted were about 6 mm and 10 mm respectively. The mean elasticity values after the same number of weeks increase significantly (as an example from 15.6 ± 3.9 kPa to 46.9 ± 4.7 kPa respectively for mouse #7). Viscosity does not change significantly during tumors growth. Chemotherapy is currently under investigation and elasticity values seem to show a progressive decrement after some weeks of experiments. In parallel, on colon cancer measurement, elasticity rise with tumor growth from 5.0 ± 1.7 kPa to 11.8 ± 1.2 kPa during the 12th days after the graft. After injection of the anti-vascular, elasticity does not changes while Doppler measurement significantly decrease within the hour.

This study shows that the tumor increment in size is directly proportional to its elasticity values. The progressive decrease in elasticity let think about the effectiveness of the chemotherapy treatment in breast cancer over weeks of treatments; while the significant decrease in Doppler measurement over the colon cancer let also think about the effectiveness of the anti-vascular drugs within the following minutes without changes in elasticity. Correlation of these results and histopathological measurement explain the link between mechanical properties and tumors physiology. Moreover, the results of this work open the way for future studies to evaluate the contribution of transient elastography or Doppler measurements in the detection of tumoral residues in patients suffering from locally advanced breast cancer or colon cancer treated by chemotherapy, anti-vascular, or combined drugs.

Evaluation par imagerie de bioluminescence de l'inflammation induite par le plasma froid en utilisant une souris transgénique NF-kB-luc

Marc VANDAMME^{1,2,3}, Eric ROBERT³, Julien SOBILO², Vanessa SARRON³, Sébastien DOZIAS³, Delphine RIES³, Stéphanie LERONDEL², Jean-Michel POUVESLE³, Alain LE PAPE^{2,5}.

1. Gernitec SAS, Clichy
2. TAAM-CIPA, UPS44 – CNRS, Orléans
3. GREMI, UMR6606 – Université-CNRS, Orléans
4. Inserm U618, Université François Rabelais, Tours

Introduction

Le plasma froid à pression atmosphérique est un gaz ionisé par apport d'énergie à un gaz neutre. Il contient de nombreuses charges (électrons, ions), des radicaux libres, des molécules excitées et génère des champs électriques transitoires. Avec les espèces actives en présence et la faible élévation de température du tissu traité, les plasmas froids paraissent prometteurs dans le traitement de nombreuses pathologies et en particulier en cancérologie. Des études récentes ont montré un effet anti-tumoral du plasma froid *in vitro* et nous avons rapportés un effet anti-tumoral du plasma *in vivo* sur tumeurs xénogreffées [1].

L'objectif de ce projet est d'utiliser cet effet anti-tumoral sur des tumeurs bronchiques *in situ*. Cela nécessite au préalable une étude de la tolérance du tissu pulmonaire à ce traitement. Pour cela l'imagerie de bioluminescence couplée à l'utilisation d'un modèle de souris transgénique dont le gène de la luciférase et sous la dépendance du facteur de transcription NF-kB apparaît comme un outil innovant.

Méthodes

L'ensemble de l'étude a été réalisé en utilisant le plasma gun qui est une variante de jet plasma. Il possède la particularité de générer du plasma à la fin de capillaire de très faible diamètre en utilisant un flux de gaz très faible.

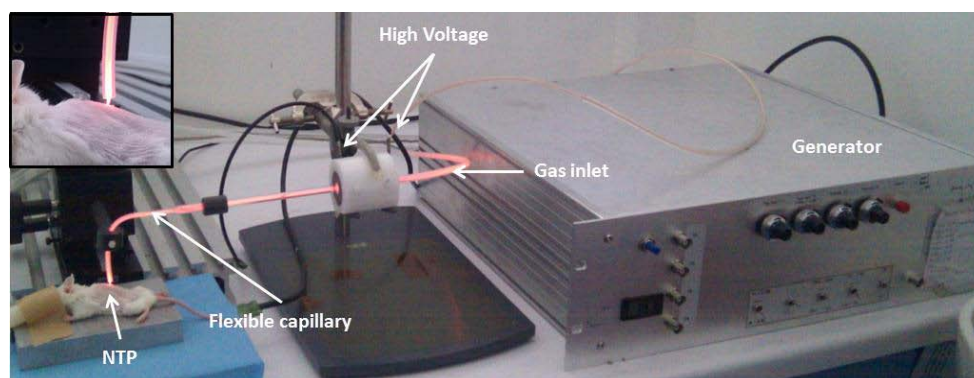


Figure 1: Dispositif expérimental permettant le traitement par plasma des souris

L'évaluation de l'inflammation induite est requise afin de déterminer les doses maximales tolérées par la souris. Le traitement a d'abord été réalisé au niveau de la peau puis dans les poumons. Pour cela, une intubation avec un capillaire de faible diamètre a été réalisée et l'inflammation du tissu a été évaluée en utilisant une souris transgénique NF-kB-luc (Caliper®, USA). En effet, NF-kB est un facteur de transcription impliqué dans les processus inflammatoires et l'imagerie de ce facteur par BLI permet ainsi le suivi de l'inflammation.

Résultats et discussion

Concernant l'inflammation de la peau, le plasma induit une activation de NF-kB dans les 2h post traitement reflétant un processus inflammatoire bien qu'aucun effet ne soit visible sur la peau. Au niveau pulmonaire, une intubation avec un cathéter de faible diamètre a été réalisée sous contrôle radiologique du positionnement (MX-20, Faxitron X-ray Corporation, USA). Comme contrôle positif de l'inflammation, un dépôt de LPS couplé à un fluorochrome (DID) a été réalisé dans le poumon en utilisant le même cathéter. 6h après, les poumons ont été excisés et imagés par BLI et par fluorescence. Une augmentation localisée de la BLI est observée dans le poumon traité reflétant la mise en place de phénomène inflammatoire et donc la validité de l'approche dans le cadre de cette étude. L'évaluation de l'effet du flux de gaz a ensuite été évaluée en utilisant la même procédure. Ce flux est bien toléré par la souris et seule une légère modification du rythme respiratoire de la souris a été observée. De plus, 6 h après le traitement, aucun site d'inflammation dans le poumon n'a été observé par BLI. Ensuite le traitement plasma a été réalisé en utilisant différentes doses. Aucun effet secondaire n'a été observé lors de ces essais. Les résultats de l'imagerie de BLI montrent une induction localisée de NF-kB dose dépendante dans le poumon montrant la mise en place de processus inflammatoire.

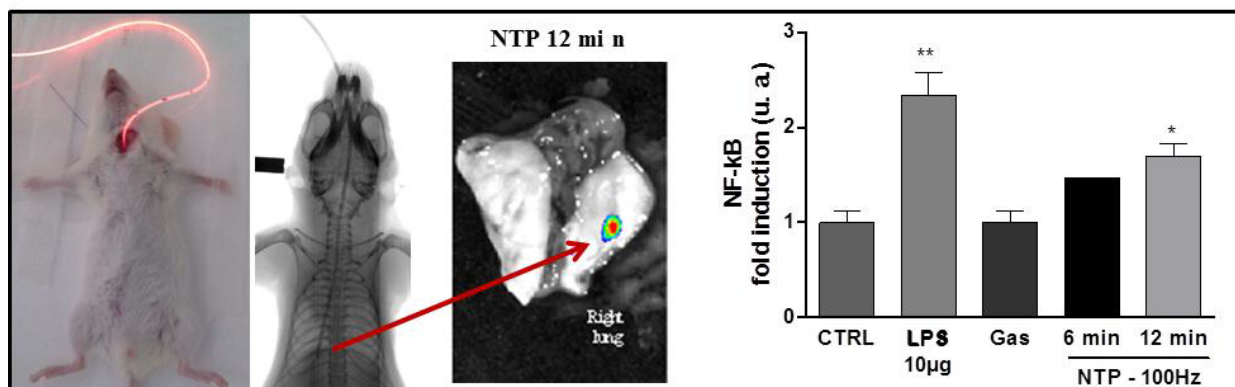


Figure 2: Traitement plasma dans le poumon et imagerie de BLI afin d'évaluer l'activation de NF- κ B.

L'effet anti-tumoral du plasma froid couplé à la possibilité de réaliser des traitements *in situ* semble prometteur dans le cadre du traitement de petites tumeurs bronchiques.

1. Vandamme, M., et al., *ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma*. International Journal of Cancer, 2011.

Assessment of non-thermal plasma induced inflammation using transgenic NF- κ B luc mice and bioluminescence imaging

Marc VANDAMME^{1,2,3}, Eric ROBERT³, Julien SOBILO², Vanessa SARRON³, Sébastien DOZIAS³, Delphine RIES³, Stéphanie LERONDEL², Jean-Michel POUVESLE³, Alain LE PAPE^{2,5}.

1. Gernitec SAS, Clichy
2. TAAM-CIPA, UPS44 – CNRS, Orléans
3. GREMI, UMR6606 – Université-CNRS, Orléans
4. Inserm U618, Université François Rabelais, Tours

Background

Non-thermal plasma (NTP) is an excited gas generated with a supply of energy to neutral gas molecules/atoms leading to a highly reactive gas at ambient temperature containing excited molecules, reactive species and generating transient electric fields. Given its potential to interact with tissues without a significant temperature increase, NTP appears as a promising approach for the treatment of various diseases including cancer. Recent studies have demonstrated an antitumor effect of plasma treatment on various cancer cell lines *in vitro* and we reported an antitumor effect of NTP *in vivo* on a subcutaneous xenografted tumor [1].

The main goal of this project is to exploit the *in vivo* antitumor activity of NTP on *in situ* lung tumor. Prior, a characterization of plasma tolerance on lung tissue is required. For such a goal, bioluminescence imaging (BLI) is a unique resource when exploited in association with a transgenic mouse that expresses a luciferase reporter whose transcription is dependent upon NF- κ B.

Methods

The experiments were performed using NTP generated with the plasma gun device. This plasma gun is characterized by a long distance plasma generation (a few tens of centimetres) through flexible capillary of various diameters with a moderate neon gas flow rate.

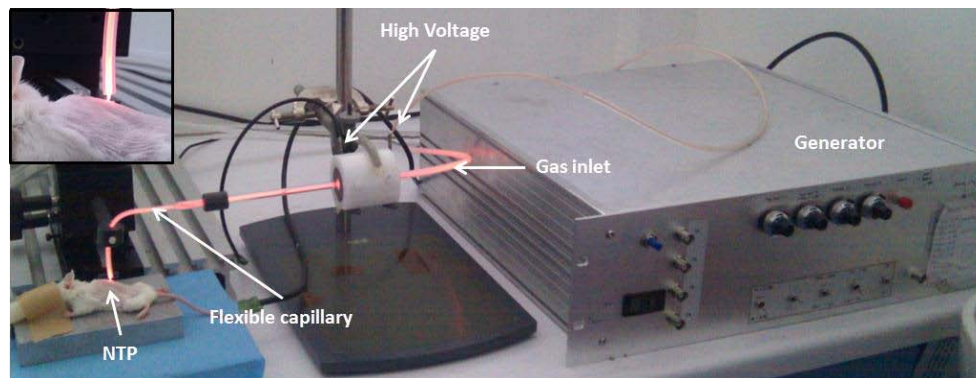


Figure 1: Experimental devices used for NTP treatment of mice

The evaluation of inflammation is required to determine the maximum tolerated doses which can be applied. It was first performed on mouse skin, then in the mouse lung. Evaluation of plasma tolerance on tissue was done using NF- κ B-luc transgenic mice (Caliper[®], USA). NF- κ B is a transcription factor implied in the induction of inflammation process and imaging of these reported mice by bioluminescence imaging (BLI) allows the monitoring of inflammation.

Results and Discussion

NTP treatment was performed on mouse skin to determine whether plasma induces an activation of NF- κ B. A dose of 6 min at 200 Hz induced an activation of NF- κ B in the treated zone as soon as 2h after the treatment reflecting an induction of the inflammatory process despite the fact that no visible damage could be observed. Concerning lung tolerance, a tracheal intubation was performed on anesthetized mice with a small flexible catheter. The

position of the catheter was monitored using high resolution radiological imaging (MX-20, Faxitron X-ray Corporation, USA). As a positive control with the same catheter, an induction of NF- κ B was performed with LPS (Lipopolysaccharide) together with a fluorescent localization using a DID fluorescent dye. 6h after treatment, lungs were excised and bioluminescence/fluorescence imaging was performed. A localized induction of BLI intensity was observed in the treated lung reflecting an induction of NF- κ B following LPS application. Our results showed the relevance of this approach to evaluate the effect of NTP in lung tissue. As a negative control, mice receiving only catheter and gas flow were used. In these mice, the low gas flow was well tolerated and only a slight modification of the mouse breath was observed, moreover 6h after, no site of inflammation was observed in the lung. Then NTP treatment in the lung was performed using different treatment doses, no visible side effect was observed. Lungs were excised and bioluminescence imaging was performed. Results showed an induction of NF- κ B in a localized region of the lung suggesting the induction of an inflammatory process (figure 2).

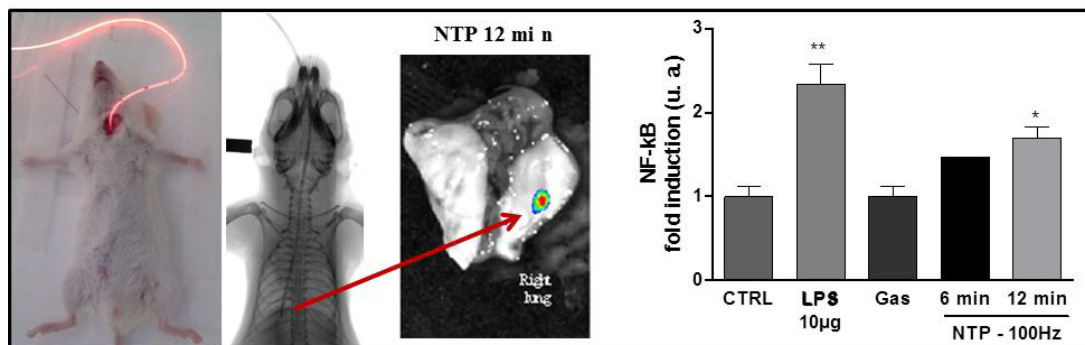


Figure 2: NTP treatment in the lung and BLI imaging of excised lung to evaluate NF- κ B induction

Considering the antitumor activity of NTP on tumor cells together with the ability to perform *in situ* treatment using plasma, NTP appears to be a promising tool for lung tumor treatment.

1. Vandamme, M., et al., *ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma*. International Journal of Cancer, 2011

EVALUATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES EFFICACY BY PRECLINICAL MULTIMODALITY IMAGING

BUSSON Muriel, LARBOURET Christel, KOTZKI Pierre-Olivier, POUGET Jean-Pierre, PELEGRIN André

Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), Unité 896/INSERM ; Parc Euromédecine - CRLC Val d'Aurelle 208, rue des Apothicaires 34298 MONTPELLIER Cedex 5 France

After a decade of scepticism due to the disappointing results of the first clinical studies, the interest for monoclonal antibodies in cancerology is now increasing. Many antibodies today present an increasing part of cancer therapy and are FDA approved recognised drugs. Discovery and validation of these therapies need to validate their biodistribution, uptake by the tumour and efficacy in preclinical studies.

The combined nanoSPECT/CT (Bioscan®) system allowed acquisition and superposition of molecular and morphological images. By SPECT/CT imaging, we were able to follow biodistribution of antibodies for several days and even weeks. Comparison with clinically used therapeutics antibodies, labelled with ¹²⁵I, allowed us to detect and characterize the uptake of several antibodies by pancreatic tumors. We then compared the uptake of bispecific antibodies and monoclonal antibodies by the tumor. Several antibodies directed against the same target injected to animals bearing tumors expressing the same receptor rate *in vitro* allowed the evaluation of tumors architecture. Last, we compared the fixation kinetics of these radiotracers.

A multimodal approach permitted the evaluation of our antibodies effect. By non-invasive imaging, we visualized mouse peritoneal carcinomatosis or SC xenografts proliferation using cancer cells expressing luciferase gene. Luciferase activity expression was monitored in intact animals with a CCD camera (Caliper®) and allowed us to follow tumour formation, proliferation rate and metastases location, and also to evaluate radioimmunotherapy and immunotherapy strategies in these animals. A double labelling with bioluminescent and fluorescent reporters permitted the evaluation of biological activities on one hand and proliferation rate on the other hand. Last, tumour vascularisation could be evaluated by non-invasive echography.

In conclusion, our multimodal imaging allowed a rapid detection of tumor growth and evaluation of radioimmunotherapy strategies, avoiding sacrificing numerous animals. CT allowed the anatomical localisation of the radiopharmaceuticals, which were imaged by SPECT technology. In combination with optical (bioluminescence and fluorescence) imaging, these models constitute a powerful tool to evaluate cancer immunotherapies efficiencies.