UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DE PHARMACIE

ANNEE 2009 N°

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Mention : Ingénierie de la Santé Spécialité : Biophysique

Microsphères d'embolisation

pour la vectorisation de principes actifs :

Etude de la libération in vivo par microspectroscopies optiques

Soutenue publiquement le 16/12/2009

par

Julien NAMUR

Jury

Président : Pr Igor CHOURPA

Rapporteurs: Pr Patrice PROGNON

Dr Thierry DE BAERE

Directeurs de thèse : Dr Alexandre LAURENT

Pr Michel MANFAIT

A mes parents,

A ma sœur,

A Chloé.

A Monsieur le Professeur Michel Manfait, directeur du laboratoire MéDIAN au sein de l'unité MEDyC, UMR CNRS 6237, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir dirigé ce travail de recherche.

A Monsieur le Docteur Thierry De Baere et à Monsieur le Professeur Patrice Prognon, pour avoir accepté de juger la qualité scientifique de ces travaux en tant que rapporteurs.

A Monsieur le Professeur Igor Chourpa, pour son aimable participation en tant que président du jury de thèse.

A Monsieur le Docteur Michel Wassef, pour son implication, son enseignement, sa rigueur scientifique, et ses conseils toujours éclairés.

To Doctor Andrew Lewis, who has always supported our work and the publication of our results.

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre Pelage, pour sa contribution, son expertise clinique et ses recommandations judicieuses.

A Monsieur Cédric Poigneau, qui a rendu cette entreprise tellement plus facile au jour le jour.

A tous les membres de l'unité MEDyC, et plus particulièrement à Monsieur le Professeur Jean-Marc Millot, à Messieurs les Docteurs Ganesh Sockalingum, Olivier Piot, Cyril Gobinet, à Madame le Docteur Elodie Ly-Morin, à Hadrien D'inca, Valérie Untereiner, à leurs savoirs spontanément partagés. Ce travail est en partie le vôtre.

Enfin à Monsieur le Docteur Alexandre Laurent, pour m'avoir confié ce sujet et m'avoir dirigé tout au long de la thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance éternelle.

Sommaire

Résumé		8
Liste des p	roductions scientifiques	9
Liste des al	oréviations	13
Liste des fi	gures	14
Liste des ta	bleaux	16
Introducti	on générale	17
	Partie 1 - Présentation du sujet	
Chapitre 1	- Embolisation, Chimioembolisation, Chimiosphère	24
1.1 Em	bolisation et emboles	25
1.1.1	Principe de l'embolisation	25
1.1.2	Les agents d'embolisation	26
1.1.3	Particules d'embolisation non sphériques	28
1.1.4	Microsphères d'embolisation	
1.2 La	chimioembolisation	33
1.2.1	La chimioembolisation lipiodolée	33
1.2.2	Particules chargées pour la chimioembolisation	35
1.3 La	chimiosphère, agent d'embolisation et vecteur de principe actif	38
1.3.1	Présentation	38
1.3.2	Données précliniques et cliniques sur les chimiosphères	39
1.4 Pro	blématique des chimiosphères	42
-	2 - Techniques de détection et de quantification tissulaire – Intérêt des	
_	troscopies	
	hniques de détection et de quantification tissulaire	
2.1.1	Techniques pour le dosage point par point	
2.1.2	Techniques pour l'étude de la répartition tissulaire	
	hniques microspectroscopiques	
2.2.1	Généralités : interactions rayonnement / matière	
2.2.2	Microspectroscopie infrarouge	
2.2.3	Microspectrofluorimétrie	
2.2.4	Autres types de microspectroscopies	68

2.2.5	Interet des microspectroscopies pour notre etude	12
2.3 Pro	blématique de l'utilisation des microspectroscopies	73
	Partie 2 - Travaux personnels	
CI		
	- Chimiosphère d'ibuprofène	
	ntexte médical : l'embolisation de fibrome utérin	
1.1.1	Fibromes utérins	
1.1.2	Embolisation de fibromes utérins	
1.1.3	Douleurs post-embolisation.	
1.1.4	Apport d'une bille d'embolisation chargée en ibuprofène	
1.1.5	Ibuprofène	
	ération tissulaire dans un modèle expérimental d'utérus sain	
1.2.1	Travaux antérieurs sur la chimiosphère d'ibuprofène	
1.2.2	Objectif	
1.2.3	Matériel et méthodes	
1.2.4	Résultats	
1.2.5	Conclusions	
1.2.6	Perspectives pour les chimiosphères ibuprofène	92
	Publication	
Chapitre 2	2 - Chimiosphère de doxorubicine	107
_	ntexte médical : les tumeurs hépatiques	
2.1.1	Le foie	
2.1.2	Tumeurs hépatiques	113
2.1.3	Apport d'une bille d'embolisation chargée en doxorubicine	
2.1.4	Doxorubicine	
	de de libération dans un milieu liquide et dans un gel de collagène en	
	nétries de fluorescence	124
2.2.1	Travaux antérieurs sur la chimiosphère de doxorubicine	124
2.2.2	Objectif	125
2.2.3	Matériel et méthodes	126
2.2.4	Résultats	129
2.2.5	Conclusion	133
2.2.6	Perspectives	133
	-	

2.3 Lib	ération tissulaire dans un modèle expérimental de foie non tumoral	134
2.3.1	Travaux antérieurs sur la chimiosphère de doxorubicine	134
2.3.2	Objectif	135
2.3.3	Matériel et méthodes	135
2.3.4	Résultats	135
2.3.5	Conclusion	136
2.3.6	Perspectives	137
	Publication	
2.4 Lib	ération tissulaire dans des foies humains porteurs de CHC	154
2.4.1	Travaux antérieurs sur la chimiosphère de doxorubicine	154
2.4.2	Objectif	154
2.4.3	Matériel et méthodes	154
2.4.4	Résultats	155
2.4.5	Conclusion.	156
2.4.6	Perspectives	157
	Publication	
Chapitre 3	3 - Chimiosphère d'irinotécan	170
3.1 Cor	ntexte médical : les tumeurs pulmonaires	172
3.1.1	Le poumon	172
3.1.2	Tumeurs pulmonaires	174
3.1.3	Apport d'une bille charge en irinotécan	179
3.1.4	Irinotécan	181
3.2 Lib	ération tissulaire dans un modèle expérimental de poumon non tumoral	183
3.2.1	Travaux antérieurs	183
3.2.2	Matériel et méthodes	184
3.2.3	Résultats	186
3.2.4	Conclusion	189
3.2.5	Perspectives	189
Conclusion	ı générale	191
Références	S	196
Annexe 1 -	- Instrumentation	232
Anneve 7	- « Un nouveau chanitre de thèse ® »	236

Résumé

L'embolisation tumorale consiste à occlure sélectivement les vaisseaux sanguins irriguant la tumeur à l'aide de microsphères calibrées. Ces microsphères peuvent aujourd'hui être chargées de façon extemporanée avec différentes solutions injectables de médicament. On peut proposer le terme générique de "chimiosphère" pour désigner ces nouveaux vecteurs pour l'embolisation tumorale.

Notre travail vise à démontrer que les chimiosphères sont capables de libérer leur principe actif de façon prolongée et à des doses biologiquement actives *in situ* après embolisation.

Trois couples bille / médicament ont été étudiés : une première bille chargée en ibuprofène (anti-inflammatoire) et une deuxième bille chargée en doxorubicine ou en irinotécan (anticancéreux).

La microspectroscopie infrarouge a été utilisée pour mesurer, sur les trois chimiosphères, la quantité de principe actif toujours présent dans la microsphère à différents temps après embolisation. La microspectroscopie de fluorescence a permis d'évaluer la concentration et la distribution de la doxorubicine autour de la bille.

Il a été démontré que les chimiosphères fournissent une libération locale prolongée de médicament. La durée de l'élution varie de quelques heures à plusieurs mois selon la chimiosphère. Les concentrations tissulaires mesurées de principe actif, anti-inflammatoire ou antinéoplasique, induisent des modifications histologiques significatives. La pénétration tissulaire du principe actif depuis le bord de la bille est de l'ordre du millimètre.

Ces résultats permettent de formuler des hypothèses mécanistiques sur l'activité des chimiosphères sur la tumeur et sur le tissu sain. Ces éléments doivent être pris en compte dans l'interprétation des données des évaluations cliniques et dans l'éventuelle intégration des chimiosphères dans une stratégie thérapeutique.

Il est pertinent d'utiliser les microspectroscopies optiques pour évaluer la libération tissulaire d'un principe actif par un implant chargé.

Mots clefs: embolisation, microsphère, principe actif, tissu, concentration, distribution, microspectroscopie infrarouge, microspectroscopie de fluorescence.

Liste des productions scientifiques

Publications internationales dans des revues scientifiques à comité de lecture

- Namur J, Wassef M, Pelage J, Lewis A, Manfait M, Laurent L. Infrared microspectroscopy analysis of Ibuprofen release from drug eluting beads in uterine tissue. J Control Release 2009; 135:198-202.
- Namur J, Wassef M, Millot JM, Lewis A, Manfait M, Laurent L. Drug eluting beads for liver embolization: concentration of doxorubicin in tissue and in beads in a pig model. J Vasc Interv Radiol 2010; 21:259-267.
- Namur J, Citron SJ, Dupuis MH, Sellers MT, Manfait M, Wassef M, Laurent L. Drug eluting beads for the treatment of HCC: analysis of drug concentration and distribution in liver explants (en cours de rédaction).

Communications orales en congrès international

- Namur J., Wassef M., Pelage J.P., Lewis A.L., Taylor R.R., Manfait M., Laurent A. Reservoir function of IBU eluting beads: Quantification in sheep uterine model. 23rd Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Society of Europe, Athens, Greece, 8-12 September 2007.
- Namur J., Laurent A., Wassef M., Lewis A.L. Pelage J.P., Millot J.M., Manfait M. Tissular distribution and concentration of Doxorubicin in pig liver after embolisation with drug eluting beads. 33th Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology, Washington DC, USA, 15-20 March 2008.
- Namur J., Wassef M., Pelage, J.P., Lewis A.L., Taylor R.R., Manfait M., Laurent A. Reservoir function of IBU eluting beads: Quantification in sheep uterine model. 33th Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology, Washington DC, USA, 15-20 March 2008.
- Namur J., Wassef M., Millot J.M., Lewis A.L., Laurent A., Manfait M. Doxorubicin eluting beads for liver embolization: Pathological findings and correlation with drug distribution in tissue. 35th Annual Meeting and Exposition of Controlled Release Society, New York NY, USA, 12-17 July 2008.

- Namur J., Wassef M., Pelage J.P., Lewis A.L., Manfait M., Laurent A. Sustained release with ibuprofen eluting microspheres: In vivo quantification with infrared microspectroscopy. 35th Annual Meeting of Controlled Release Society, New York NY, USA, 12-17 July 2008.
- Namur J., Laurent A., Wassef M., Lewis A.L., Pelage J.P., Millot J.M., Manfait M. Doxorubicin eluting beads in hepatocellular carcinoma: Drug distribution and concentration in embolized liver. 14th Congress of the European Society of Surgical Oncology, The Hague, The Netherlands, 10-12 September 2008.
- Namur J., Pelage J.P., Wassef M., Lewis A.L., D'Inca H., Baylatry M.T., Manfait M., Laurent A. 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, Copenhagen, Denmark, 13-17 September 2008.
- Namur J., Millot J.M., Wassef M., Pelage J.P., Lewis A.L., Laurent A., Manfait M. Doxorubicin eluting beads in a pig liver embolization model: Drug distribution in tissue.
 24th Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Society of Europe, Copenhagen, Denmark, 13-17 September 2008.
- Namur J., D'Incà H., Baylatry M.T., Lewis A.L., Manfait M., Laurent A. Irinotecan concentration in drug eluting beads after 2 hours and 24 hours of loading. 34th Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology, San Diego, CA, USA, 7-12 March 2009.
- Namur J., Citron S.J., Dupuis M., Sellers M.T., Wassef M., Manfait M., Laurent A. Diffusion of Doxorubicin from drug eluting beads and tissular changes after embolisation of hepatocellular carcinoma. 34th Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology, San Diego, CA, USA, 7-12 March 2009.
- Namur J., D'Incà H., Lewis A.L., Manfait M., Laurent A. Interaction, distribution and concentration of the two drugs doxorubicin or irinotecan in drug eluting beads. 34th Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology, San Diego, CA, USA, 7-12 March 2009.
- Namur J., Citron S.J., Dupuis M., Sellers M.T., Wassef M., Manfait M., Laurent A. Doxorubicin drug eluting beads: Analysis of tissue release in patients with liver tumor. 36th Annual Meeting and Exposition of Controlled Release Society, Copenhagen, Denmark, 18-22 July 2009.

- Namur J., Wassef M., Heaysman C., Pelage J.P., Lewis A.L., Laurent A., Manfait M. Drug delivery rate of DOXO-DEB in non-tumorous pig liver embolisation model. 25th Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Society of Europe, Lisbon, Portugal, 19-23 September 2009.
- Baylatry M.T., Wassef M., Ghegediban S.H., Namur J., Lewis A.L., Joly A.C., Fernandez C., Pelage J.P., Laurent A. Irinotecan Eluting Beads for Lung Cancer Embolisation: Pharmacokinetics and Pathology in a Sheep Model. 25th Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Society of Europe, Lisbon, Portugal, 19-23 September 2009.

Communications par voie d'affiche en congrès international

- Namur J., Wassef M., Lewis A.L., Pelage J.P., Manfait M., Laurent A. Doxorubicin eluting beads for liver embolization: Pathological findings and correlation with drug distribution in tissue. 2nd Meeting of the Liver Cancer Association, Chicago, IL, USA 5-7 September 2008.
- Namur J., Citron S.J., Dupuis M., Wassef M., Manfait M., Laurent A. Doxorubicin tissue release from drug eluting beads in hepatocellular carcinoma. 2nd Meeting of the Liver Cancer Association, Chicago, IL, USA 5-7 September 2008.
- Namur J., Wassef M., Pelage J.P., Lewis A.L., Laurent A. Doxorubicin eluting beads in a pig liver embolization model: Pathological findings. 24th Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Society of Europe, Copenhagen, Denmark, 13-17 September 2008.
- 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.
- Baylatry M.T., Wassef M., Ghegediban S.H., Namur J., Lewis A.L., Joly A.C., Fernandez C., Pelage J.P., Laurent A. Irinotecan Eluting Beads for Lung Cancer Embolisation: Pharmacokinetics and Pathology in a Sheep Model. 36th Annual Meeting and Exposition of Controlled Release Society, Copenhagen, Denmark, 18-22 July 2009.

- Namur J., Wassef M., Citron S.J., Lewis A.L., Millot J.M., Manfait M., Laurent A. In vivo elution properties of doxorubicin loaded beads revealed by microspectroscopies. 13th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Palermo, Italy, 28 August 2 September 2009.
- Namur J., Citron S.J., Dupuis M., Sellers M.T., Manfait M., Wassef M., Laurent A. Doxorubicin eluting beads in 6 patients with HCC: tissue concentration and modifications.
 25th Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Society of Europe, Lisbon, Portugal, 19-23 September 2009.
- Rao P., ,Pascale F., Seck A., Teriitheau C., Dechamps F., <u>Namur J.</u>, Paci A., Willis A.L.,
 De Baere T. Evaluation of modes of irinotecan administration in a rabbit Vx-2 tumour model: early pharmacokinetics and tumour reponse. 25th Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Society of Europe, Lisbon, Portugal, 19-23 September 2009.
- Namur J., Pascale F., Rao R, Bonneau M., Manfait M., De Baere T., Laurent A. Evaluation of modes of irinotecan administration in a rabbit Vx-2 tumour model: Drug quantification in DEB. 25th Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Society of Europe, Lisbon, Portugal, 19-23 September 2009.

Conférence sur invitation dans des réunions internationales

 Namur J., Laurent A. Concentration of doxorubicin in tissue after chemoembolization with DC Bead: Preclinical and clinical data. 14th Congress of the European Society of Surgical Oncology, Biocompatibles UK Ltd Symposium, The Hague, The Netherlands, 10-12 September 2008.

Liste des abréviations

A: Absorbance

AINS: Anti-inflammatoire non steroïdien

CHC: Carcinome hépatocellulaire

CCR: Cancer colorectal

CPT11: Irinotécan

DEB: Drug eluting bead (bille à liberation prolongée)

DOXO: Doxorubicine

EC₅₀: Half Maximal Effective Concentration

FTIR-MS: Microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

IBU: Ibuprofène

IC₅₀: Half Maximal Inhibitory Concentration

IR: Infrarouge

IRI: Irinotecan

IRTF: Infrarouge à Transformée de Fourrier

IV: Intraveineux

KW: Test non paramétrique de Kruskal Wallis

LLOD : limite de détection basse

LLOQ: limite de quantification basse

MW: Test non paramétrique de Mann Whitney

NCLS: Nonnegatively Constrained Least Square

PBS: Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate + NaCl)

PVA: Alcool de polyvinyle

SNV: Normalisation vectorielle standard

TACE: Chimioembolisation transartérielle

u. a.: unité arbitraire

UFE: Embolisation de fibromes utérins

UV: Ultra-violet

Liste des figures

Figure 1 - Illustrations des trois principaux types d'agents d'embolisation et de leu	rs
applications2	27
Figure 2 – Résultats de Kato et al. sur des particules chargées en cisplatine	36
Figure 3 – Illustration de la microdissection laser sur coupe tissulaire	16
Figure 4 – Illustration du microprélèvement capillaire direct sur coupe tissulaire	16
Figure 5 – Schéma de la sonde de microdialyse et de son environnement.	17
Figure 6 – Résultats de Saltzman et al. sur un implant chargé en BCNU radiomarqué	51
Figure 7 – Résultats de Gao et al. sur un implant chargé en doxorubicine.	52
Figure 8 – Immunohistochimie avec un anticorps anti-ibuprofène.	53
Figure 9 – Spectre électromagnétique	56
Figure 10 – Valeurs respectives des contributions électroniques, vibrationnelles	et
rotationnelles d'une molécule.	57
Figure 11 – Diagramme de Jablonski.	58
Figure 12 – Modes de vibration moléculaire.	59
Figure 13 – Spectre infrarouge de l'ibuprofène.	50
Figure 14 – Spectres d'excitation de fluorescence et d'émission de fluorescence	54
Figure 15 – Localisation des fibromes utérins	30
Figure 16 – Schémas anatomiques de la vascularisation de l'utérus.	33
Figure 17 – Clichés artériographiques d'une embolisation de fibrome.	33
Figure 18 – Formule semi-développée de l'ibuprofène	37
Figure 19 – Principaux résultats des études antérieures sur les IBU-BB.	39
Figure 20 – Images infrarouges de IBU-BB sur un pic spécifique de l'ibuprofène) 1
Figure 21 – Schémas du lobule hépatique et de l'acinus de Rappaport	10
Figure 22 – Photographie d'une coupe histologique de foie de porc	10
Figure 23 – Schéma du lobule hépatique et de son organisation vasculaire	1
Figure 24 – Cartographie mondiale de l'incidence des cancers primitifs du foie 11	16
Figure 25 – Programme de traitement du CHC	18
Figure 26 – Formule semi-développée de la doxorubicine	22
Figure 27 – Cinétique d'élution des DOXO-DEB <i>in vitro</i> .	24
Figure 28 – Schémas des appareils de dissolution USP et appareil en T	25

Figure 29 – Schéma du dispositif expérimental pour l'étude de la libération d'une DOXO-
DEB en milieu liquide.
Figure 30 - Schéma du dispositif expérimental pour l'étude de la libération d'une DOXO-
DEB dans un gel de collagène
Figure 31 – Profils d'élution des DOXO-DEB en fonction de la concentration ionique 129
Figure 32 – Profils d'élution des DOXO-DEB en fonction de la taille de la bille et de la dose
de chargement
Figure 33 - Profils de concentration de la DOXO dans le collagène autour des billes à
différents temps et pourcentages cumulatifs de DOXO libérée
Figure 34 – Profils de distribution de la DOXO dans le tissu depuis le bord de la bille dans un
foie de porc sain
Figure 35 – Profils de distribution de la DOXO dans le tissu depuis le bord de la bille dans un
foie humain porteur de CHC
Figure 36 -Schéma du lobule pulmonaire et photographie d'une coupe histologique de
poumon de mouton
Figure 37 – Cartographie mondiale de l'incidence des cancers primitifs du poumon 176
Figure 38 – Formule semi-développée de l'irinotécan
Figure 39 – Spectres infrarouges de CPT11-DEB, de CPT11 et d'une DEB non chargée 187
Figure 40 – Corrélation entre l'absorbance sur une bande spécifique du CPT11 et la dose de
chargement dans la bille

Liste des tableaux

Tableau 1 – Principaux agents d'embolisation particulaires32
Tableau 2 – Principales études sur le développement et l'évaluation de particules
d'embolisation chargées en principe actif
Tableau 3 - Présentation des 3 chimiosphères disponibles commercialement en cours
d'évaluation préclinique et clinique41
Tableau 4 – Caractéristiques des techniques microspectroscopiques
Tableau 5 – Données cliniques sur les fibromes utérins et l'embolisation
Tableau 6 – Recommandations pour le traitement des fibromes utérins. 81
Tableau 7 – Données cliniques sur les tumeurs hépatiques et la chimioembolisation108
Tableau 8 – Incidence des cancers primitifs du foie
Tableau 9 – Photographies des DOXO-DEB des 3 groupes
Tableau 10 – Données cliniques sur les tumeurs pulmonaires et la chimioembolisation171
Tableau 11 – Incidence des cancers primitifs du poumon
Tableau 12 – Attribution des bandes d'absorption du spectre infrarouge de CPT11-DEB187
Tableau 13 - Valeurs d'absorbance sur les pics spécifiques de CPT11 dans les billes sur
coupes tissulaires à 4 jours et 4 semaines.

Embolisation et chimioembolisation

L'**embolisation** est une technique de radiologie interventionnelle mini-invasive apparue dans les années 1960, et qui consiste à injecter un agent d'occlusion vasculaire à travers un cathéter placé au niveau de la tumeur. La procédure a évolué en plusieurs étapes.

Elle visait initialement à occlure des vaisseaux de gros calibres pour stopper des hémorragies et traiter des malformations artério-veineuses. Elle utilisait une simple suspension de particules polymériques avec une taille très variable allant de quelques centaines de micromètres à plusieurs millimètres. Dans les années 1970, la technique a été proposée pour le traitement de tumeurs bénignes de l'utérus, les léiomyomes.

La **chimioembolisation** est apparue au début des années 1980 pour traiter les tumeurs malignes du foie. Elle consiste à injecter directement dans le cathéter une solution d'agent pharmaceutique puis un agent d'embolisation, l'idée étant d'augmenter la concentration et le temps de résidence du médicament anticancéreux dans la tumeur grâce à l'injection locale et grâce au ralentissement du flux sanguin par l'embole.

Aujourd'hui, la chimioembolisation est couramment utilisée pour le traitement palliatif des cancers du foie non opérables. La procédure a peu évolué depuis ses débuts.

La solution de principe actif se compose généralement d'une suspension aqueuse d'antinéoplasique et d'un agent de contraste huileux, le lipiodol. Le mélange forme une émulsion instable qui se dissocie en quelques minutes et dont la distribution dans le réseau vasculaire tumoral ne peut être contrôlée. L'agent d'embolisation consiste le plus souvent en des particules polymériques irrégulières et non calibrées qui induisent une occlusion proximale non ciblée.

La technique actuelle présente donc plusieurs limites et peut difficilement être standardisée.

De la particule non calibrée à la chimiosphère

Deux innovations récentes sur les produits d'embolisation conduisent à reconsidérer la procédure de chimioembolisation et ses applications potentielles.

Premièrement, des **particules d'embolisation sphériques et calibrées** ont été mises sur le marché dans les années 1990 pour l'embolisation des fibromes utérins.

Il a été montré que, par opposition aux particules non calibrées, le niveau d'occlusion et la répartition des microsphères dans le réseau vasculaire tumoral peuvent être contrôlés de façon précise par un choix approprié de la taille de la bille, de la dilution et la sélectivité du cathétérisme.

Les microsphères ont progressivement remplacé les particules non sphériques pour l'embolisation tumorale et six produits différents sont aujourd'hui disponibles sur les marchés européens et américains.

Deuxièmement, la microsphère associe aujourd'hui les fonctions d'agent d'embolisation et de vecteur de principe actif. En modulant la composition, les industriels ont pu synthétiser des billes d'embolisation capables d'absorber et de retenir des principes actifs dissous en solution aqueuse. Le chargement en extemporané peut être "passif" (absorption simple), "actif" (interactions ionique bille / médicament) ou une combinaison des deux.

Depuis 2003, trois produits ont été mis sur le marché. On peut choisir pour désigner cette nouvelle génération d'agent d'embolisation le terme générique de "chimiosphère".

L'intérêt des chimiosphères dans le cadre de la chimioembolisation est évident. Elles permettraient de standardiser la procédure, en contrôlant la distribution du vecteur et donc la distribution du médicament, en contrôlant la dose de médicament administrée localement et en contrôlant la durée de la libération dans le tissu cible.

Questions posées sur les chimiosphères

Les trois produits proposés remplissent-ils la double fonction d'embolisation et de vectorisation ?

La calibration, les propriétés mécaniques et la répartition des billes dans le réseau vasculaire ont été évaluées *in vitro* et *in vivo*. L'effet réservoir a été vérifié par des tests d'élution *in vitro* et par des dosages plasmatiques après injection.

Des études cliniques sont en cours pour confirmer l'efficacité des chimiosphères dans différentes pathologies.

De nombreuses questions subsistent sur l'intégration des chimiosphères dans une stratégie thérapeutique :

- Quelle doit être la dose de médicament administrée ? Le médicament étant injecté par voie locale via un implant chargé, il ne semble pas pertinent de se baser sur les doses recommandées pour les voies sanguines et per-os. Si on connaît les concentrations thérapeutiques plasmatiques pour ces deux modes d'administration, les concentrations tissulaires induisant un effet biologique significatif ne sont pas connues.
- A quel niveau et dans quelles zones du réseau vasculaire tumoral les billes doivent-elles être injectées? Le **territoire ciblé** par l'embolisation dépend de l'étendue de la zone d'imprégnation du tissu par le médicament. On ignore cependant jusqu'à quelle distance le principe actif peut diffuser après élution par la chimiosphère.
- Quels doivent être le nombre et la fréquence des séances de traitement ? On peut supposer qu'une nouvelle embolisation n'est pas nécessaire si la chimiosphère continue d'éluer localement son médicament. La durée de la libération des chimiosphères in situ après embolisation n'a jamais été étudiée.

Pour répondre à ces questions, il faut donc déterminer *in situ* après embolisation, la quantité de médicament toujours contenue dans la chimiosphère, la concentration tissulaire de la molécule et sa distribution dans le tissu cible autour de la bille.

Comment évaluer la libération tissulaire du principe actif par les chimiosphères ?

La quantification d'un principe actif dans un échantillon biologique est faisable.

Les **techniques analytiques** classiques (chromatographies, électrophorèses) ont été validées sur de nombreuses molécules médicamenteuses à partir de prélèvements sanguins ou tissulaires. Cependant elles utilisent soit des extractions soit des homogénats du prélèvement, ce qui nous prive de l'information spatiale. D'autre part, on ne peut distinguer dans la quantité de médicament récupérée, la fraction effectivement libérée dans le tissu et la fraction toujours présente dans la bille.

L'autoradiographie, la scintigraphie et la tomographie sont couramment utilisées pour tracer *in vivo* une **molécule radiomarquée**. Cependant, ces techniques sont contraignantes, chères et ne sont pas strictement quantitatives.

Les **microspectroscopies** représentent une approche séduisante pour évaluer à la fois les paramètres concentration et distribution

Les appareils de microspectroscopies sont basés sur le couplage d'un dispositif spectrométrique capable d'enregistrer un spectre de l'échantillon, et d'un dispositif d'imagerie permettant de relier le spectre mesuré à une position spatiale. Ils permettent d'effectuer une cartographie spectrale d'un prélèvement biologique, avec une résolution spatiale entre 1 et 10µm.

Si l'on possède un spectre de référence du principe actif, on peut théoriquement détecter et visualiser sa distribution à la fois dans la bille et dans le tissu autour. La plupart des techniques spectrométriques étant quantitatives, on peut également calculer sa concentration directement à partir de l'image spectrale.

Objectif du travail de thèse

L'objectif de ce travail est d'appliquer les techniques de microspectroscopie sur des prélèvements tissulaires contenant des chimiosphères, pour mesurer la quantité de médicament toujours contenue dans la bille, ainsi que sa concentration et sa distribution dans le tissu autour de la bille.

Plan de thèse

La première partie situe le sujet sur la base d'une revue bibliographique des travaux antérieurs.

Le premier chapitre expose **les concepts de la chimioembolisation** depuis les particules non calibrées et le lipiodol jusqu'aux microsphères calibrées et fonctionnalisées.

Le second chapitre compare les différentes **techniques permettant de quantifier un médicament dans un échantillon tissulaire** et montre l'intérêt des microspectroscopies pour notre problématique.

La seconde partie de ce mémoire présente l'ensemble des travaux personnels expérimentaux. Dans un premier chapitre, nous montrerons qu'il est possible d'utiliser la microspectroscopie infrarouge pour étudier la libération tissulaire d'une **chimiosphère chargée en ibuprofène**. Cette étude a été l'objet d'une première publication scientifique.

Le second chapitre constitue la partie la plus importante de ce travail. Nous présenterons successivement trois études, *in vitro*, précliniques et cliniques, sur une **bille chargée avec la doxorubicine**, un antinéoplasique. L'utilisation de la microspectroscopie infrarouge et la microspectrofluorimétrie y ont été validées. Ces travaux ont abouti à la rédaction de deux articles scientifiques.

Enfin le troisième chapitre décrit les résultats obtenus sur le même vecteur chargé en irinotécan, une autre molécule anticancéreuse.

Nous conclurons sur l'applicabilité des microspectroscopies et sur les différents points qu'elles ont permis de résoudre pour chaque chimiosphère étudiée.

Partie I
Présentation du sujet

Chapitre 1

Embolisation,
Chimioembolisation,
Chimiosphère

1.1 Embolisation et emboles

1.1.1 Principe de l'embolisation

L'embolisation est une technique médicale qui consiste à injecter dans un vaisseau de manière sélective un agent occlusif, ou embole, dans le but d'arrêter un flux sanguin, de ralentir ce flux et/ou de dévasculariser le tissu irrigué par ces vaisseaux.

C'est une procédure dite mini-invasive, par opposition aux techniques chirurgicales, car elle est en général moins agressive, réalisée sous simple anesthésie locale et nécessite une durée d'hospitalisation plus courte. L'embolisation est réalisée par un **radiologue**. Le médecin insère dans un vaisseau sanguin un tube creux, un cathéter, flexible et radio-opaque à son extrémité. Le cathéter est dirigé dans le réseau vasculaire, en temps réel sous contrôle radioscopique, jusqu'à l'endroit de la lésion. L'agent d'embolisation est alors injecté en flux libre à travers le cathéter. Le radiologue vérifie l'occlusion / le ralentissement du flux à l'aide d'un produit de contraste iodé injecté à la fin de la procédure.

Les premières études cliniques sur l'embolisation thérapeutique ont été publiées dans les années 1960s pour traiter des malformations artérioveineuses (Speakman 1964; Ishimori 1967). Actuellement, les indications principales sont :

- hémorragie. L'embole produit un effet mécanique immédiat, c'est à dire une baisse de pression intra-vasculaire en amont de la fuite, qui limite ou arrête le saignement. Un thrombus d'hémostase peut se former colmatant ainsi la fuite et favorisant la cicatrisation;
- tumeurs hypervasculaires. L'embole produit une fermeture des vaisseaux au niveau des afférences de la tumeur, du plexus péritumoral ou des vaisseaux intratumoraux. On peut s'en servir pour obtenir une ischémie puis une nécrose tumorale ou pour une dévascularisation préopératoire afin de faciliter la résection ;
- **shunt artério-veineux** (angiome et fistule artério-veineuse). L'embole, en amont ou dans le shunt, supprime le vol artériel et l'hyperpression veineuse ;
- anévrysme artériel intracrânien. L'embole remplit la poche anévrysmale, l'exclut du flux, et la protège d'une dilatation et rupture hémorragique, en diminuant sa pulsatilité et la compression sur les structures voisines.

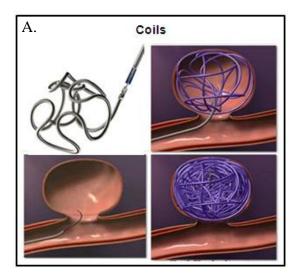
1.1.2 Les agents d'embolisation

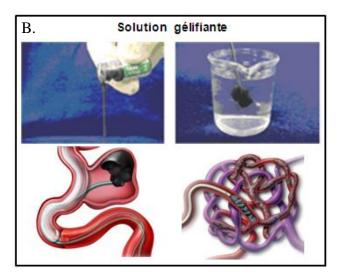
Différents dispositifs sont utilisés selon l'application clinique. On peut prendre comme définition d'un agent d'embolisation vasculaire « tout produit qui sous une forme quelconque (solide, liquide, suspension...) peut être largué dans un flux vasculaire pour se bloquer dans le vaisseau où il détermine mécaniquement et/ou biologiquement une occlusion temporaire ou durable» (Laurent 2006).

Cette définition s'applique aux **particules**, qui bouchent mécaniquement le vaisseau, aux **colles et solutions gélifiantes**, qui vont solidifier *in situ*, et à des produits divers comme l'éthanol et d'autres **agents sclérosants**, qui vont transformer le vaisseau et son contenu, aboutissant à une coagulation et à la formation d'un caillot occlusif (Figure 1). On inclut parfois sous le terme "agent d'embolisation" les autres agents que sont les ballons et les coils (spires métalliques en acier inoxydable, en platine ou en alliage de tungstène) bien qu'ils soient déposés *in situ* et non pas emportés par le flux.

Le choix de l'agent d'embolisation approprié par le clinicien dépend principalement de la taille de la lésion à occlure et du caractère temporaire ou permanent souhaité de l'occlusion.

Par exemple, les coils sont utilisés pour occlure les sections vasculaires de grande taille (plusieurs millimètres de diamètre) comme celles des afférences des fistules artério-veineuses ou les sacs des anévrysmes artériels. Les solutions gélifiantes sont employées pour le remplissage des cavités anévrysmales artérielles et en traitement des endofuites sur endoprothèses aortiques. Les particules de collagène sont utilisées dans les embolisations d'hémostase car elles sont résorbables en quelques jours/semaines. Enfin pour une embolisation distale, ciblée et durable, comme dans le cas des tumeurs hypervasculaires, le praticien utilise préférentiellement des particules calibrées.





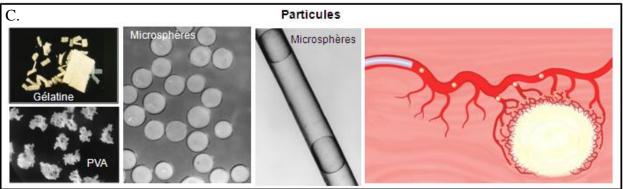


Figure 1 – Illustrations des trois principaux types d'agents d'embolisation et de leurs applications.

A) coils et anévrysme intra-crânien; B) solution gélifiante et anévrysme aortique, malformation artérioveineuse; C) particules et tumeur hypervasculaire

1.1.3 Particules d'embolisation non sphériques

Depuis les années 1960, début des embolisations à visée thérapeutique, jusque dans les années 1990, les embolisations ont été majoritairement réalisées avec des particules de gélatine, principalement pour l'embolisation d'hémostase, ou des particules non sphériques d'alcool polyvinylique (PVA), principalement pour l'embolisation des tumeurs (Laurent 2006).

Les particules de mousse de **gélatine** datent des années 1960. Elles sont toujours commercialisées aujourd'hui, sous forme de réglettes ou de plaques destinées à être découpées manuellement de façon extemporanée, ou sous forme de poudre sèche ou de particules en suspension (Spongel®, Gelfoam®) (Tableau 1).

Les particules obtenues sont très **irrégulières**. Selon la méthode de préparation (broyage, découpage, raclage), leurs dimensions peuvent varier de 500 à 2000 µm, avec parfois une fraction importante de microparticules avec un diamètre inférieur à 500µm (Katsumori 2006). Après injection, elles produisent une **occlusion mécanique incomplète** de la lumière vasculaire et une occlusion biologique par activation de la coagulation. Une réaction à corps étranger se développe secondairement qui aboutit à la dégradation de la particule en quelques jours ou semaines, contemporaine de la résorption du thrombus d'accompagnement. La **recanalisation** qui en résulte est en général effective en moins d'un mois (Laurent 2006).

Les **particules de PVA** ont été commercialisées au milieu des années 1970 et n'ont pratiquement pas évolué depuis (Ivalon®, Trufill®, Contour®) (Tableau 1).

Elles sont généralement présentées sous forme de flacons de poudre sèche ou de particules en suspension, calibrées par tranche de 100 ou 200 μm environ. Cependant les tailles annoncées sur l'étiquette ne sont pas fiables et on trouve par exemple dans un flacon avec une calibration de 200-600 μm , des particules allant de 10 à 1500 μm . Cette calibration peu précise rend le **ciblage de l'occlusion difficile**.

Les particules de PVA sont hydrophobes plutôt qu'hydrophiles, ce qui rend parfois difficile leur mise en suspension dans des solutés injectables, et favorise la **formation d'agrégats** de particules. Ces agrégats peuvent entraîner des blocages dans la lumière du cathéter. L'examen histologique a également révélé que les agglomérats de particules produisent des occlusions de vaisseaux dont la taille peut être 5 à 10 fois supérieure au diamètre vasculaire ciblé avec le calibre annoncé (Pelage 2002).

La séquence des évènements consécutifs à l'occlusion vasculaire par une particule de PVA suit globalement le même déroulement que pour une particule de gélatine : occlusion vasculaire mécanique et biologique par une stase sanguine et une thrombose, puis réaction inflammatoire localisée autour de la particule et enfin recanalisation. La recanalisation est cependant plus longue (plusieurs semaines) et utilise un mécanisme différent, le PVA étant un matériau non (ou lentement) résorbable. Il correspond à la migration transvasculaire de la particule depuis la lumière, accompagnée par l'apparition d'une néo-intima et d'une nouvelle lumière vasculaire fonctionnelle (Laurent 2009).

1.1.4 Microsphères d'embolisation

Dans les années 1970, différentes microsphères ont été injectées chez l'homme sans parvenir à une avancée thérapeutique significative : billes de plomb, d'acier inoxydable, silicone, de polystyrène ou de dextran. Les taux de complications étaient particulièrement élevés, en raison de la petite taille des billes et du reflux important dans des organes sains non ciblés (Kunstlinger 1981).

La première particule d'embolisation sphérique et calibrée a été mise sur le marché européen en 1993 et sur le marché américain en 2000, sous le nom commercial EmbosphereTM (Tableau 1). Le principal composant est un polymère, le trisacryl (N-acryloyl-2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3 diol), matériau initialement utilisé comme support dans les colonnes de chromatographie et dans les cultures cellulaires. C'est un matériau souple, hydrophile, biocompatible et non dégradable par l'organisme.

D'autres microsphères ont depuis été commercialisées, sans toutefois apporter de réelle innovation (Tableau 1). EmboGoldTM contient un colorant à base d'or colloïdal qui rend la microsphère visible à l'œil nu. Contour SE® utilise un autre polymère connu en embolisation, le PVA. Bead BlockTM implémente les deux modifications, coloration et base PVA.

Ces microsphères sont toutes constituées d'un hydrogel, c'est-à-dire essentiellement d'eau (95% masse) dans un réseau microporeux hydrophile polymérique (5% masse).

Leur fabrication utilise généralement un procédé de polymérisation radicalaire en suspension inverse. La solution aqueuse de monomère est émulsionnée dans une phase huileuse sous agitation. La taille des microgouttelettes de monomère est principalement déterminée par la vitesse d'agitation et la viscosité des phases. La polymérisation dans les microgouttelettes est un processus rapide (de l'ordre de la minute) initié dès le mélange des phases. Après la polymérisation et la séparation des phases a lieu l'étape de calibration. Elle correspond en fait à une simple opération de tamisage du vrac de polymérisation à travers des grilles de taille décroissante (900μm, 700μm, 500μm, 300μm, 100μm), aboutissant à des lots "calibrés" en tranches de granulométrie de 200μm (900-700μm, 700-500μm, etc.). L'utilisation de buses pour l'injection des phases augmente la précision de la calibration.

Les microsphères d'embolisation doivent présenter plusieurs caractéristiques pour une occlusion ciblée ((Laurent 2006) pour une revue récente) :

- 1. Elles doivent être **hydrophiles**, pour permettre leur transit à travers le cathéter, et éviter leur agglutination dans le réseau vasculaire.
- Elles doivent être calibrées, pour pouvoir contrôler le niveau d'occlusion et la répartition dans le réseau vasculaire. Une précision inférieure 100μm n'apporte pas d'amélioration significative sur le contrôle de l'occlusion compte tenu du diamètre des vaisseaux à boucher (Laurent 2008).
- 3. Les microsphères doivent également être **élastiques**, c'est-à-dire être déformables dans le cathéter tout en reprenant leur forme initiale à la sortie du cathéter (Laurent 2006). Une microsphère trop rigide ne pourra pas être injectée à travers un cathéter de faible diamètre. Une microsphère trop molle risque de se déformer sous la contrainte des parois et/ou du flux vasculaires, et d'occlure un vaisseau distal de section inférieure au diamètre de la bille. Les dévascularisations incomplètes et non ciblées obtenues avec les Contour SETM (Boston Scientific) ont été expliquées rétrospectivement par leur déformation excessive (Spies 2005; Golzarian 2006).
- 4. Enfin, les microsphères doivent être biocompatibles. Les critères de biocompatiblité d'un dispositif implantable sont explicités dans les directives européennes relatives aux dispositifs médicaux (CCE 1990; CCE 1993) et normes ISO associées (ISO 1993), et dans des guides édités par la FDA (FDA 1999). Nombre d'études ont également décrit la réaction inflammatoire typique à diverses particules d'embolisation (Castaneda-Zuniga 1978; Tomashefski 1988; Derdeyn 1997; Pelage 2002; Colgan 2003; Laurent 2004; Weichert 2005; Wassef 2008). Le contact du sang avec l'implant déclenche une série d'évènements interdépendants : adsorption de protéines, activation et adhésion des plaquettes et leucocytes, activation de la cascade du complément et de la coagulation. Ces évènements aboutissent à la formation d'un thrombus autour et entre les particules et au déclenchement d'une réaction inflammatoire locale. Si l'implant est bien toléré, elle débouche sur une réaction à corps étranger avec encapsulation de l'implant dans une fibrose. Si l'implant est mal toléré, elle peut aboutir à une réaction inflammatoire chronique ou, rarement, à une immunisation contre l'implant ou l'un de ses composants.

Tableau 1 – Principaux agents d'embolisation particulaires (d'après (Laurent 2006)).

Type d'embole	Non sphérique		Sphérique	
Matériaux	Gélatine	PVA	Acrylique	PVA
Noms commerciaux	Spongel® Gelfoam® Curaspon®	Ivalon® Contour®	Embosphere TM	Bead Block TM
Mise sur le marché	1960s	1975	1993	2003
Principales propriétés	Occlusion proximaleRésorbé jours/sem.	Occlusion proximaleRésorbé mois	Occlusion distaleNon résorbable	Occlusion distaleNon résorbable
Photographies des produits				
Photographies de coupes histologiques avec emboles (*)				

1.2 La chimioembolisation

La chimioembolisation consiste à injecter successivement ou simultanément à travers le cathéter, une solution d'un agent pharmacologique et un agent d'embolisation.

Par rapport à l'administration intraveineuse, l'idée est de :

- 1. limiter la circulation systémique et la distribution non spécifique de la molécule pour réduire ses effets indésirables,
- 2. augmenter la concentration locale et le temps de résidence du médicament dans le tissu cible pour augmenter ses effets thérapeutiques.

Historiquement, la technique a été développée pour le traitement des cancers. Deux approches ont été proposées : le chargement dans un vecteur s'accumulant spécifiquement dans les nodules tumoraux et le chargement du principe actif directement dans la particule d'embolisation.

1.2.1 La chimioembolisation lipiodolée

La technique de chimioembolisation lipiodolée s'est développée au Japon dans les années 1980 pour le traitement de tumeurs hépatiques non opérables (Sasaki 1987; Takayasu 1987; Shimamura 1988).

Le lipiodol est un agent de contraste huileux iodé utilisé initialement pour le diagnostic des tumeurs hépatiques. Injecté dans l'artère hépatique, il a la propriété de se fixer spécifiquement et de façon durable sur le tissu tumoral, rendant la tumeur détectable aux rayons X (Nakakuma 1985; Yumoto 1985). Plusieurs équipes ont alors proposé d'utiliser le lipiodol comme un vecteur pour les agents anticancéreux. Il a été démontré qu'en mélangeant une solution de chimiothérapie avec l'agent de contraste, la rémanence du principe actif dans la tumeur pouvait durer plusieurs mois (Sasaki 1987; Katagiri 1989; Konno 1990; Kan 1997).

La chimioembolisation lipiodolée a donné des résultats très variables en clinique, et ce n'est que récemment que deux méta-analyses et deux essais individuels ont pu démontrer un bénéfice significatif en termes de survie (Camma 2002; Llovet 2002; Lo 2002; Llovet 2003). La technique est aujourd'hui recommandée pour le traitement palliatif des carcinomes hépatocellulaires non opérables. Deux questions n'ont pas été élucidées à ce jour : les critères de sélection des patients et la technique utilisée pour réaliser la procédure.

L'utilisation du lipiodol comme vecteur de chimiothérapie est critiquée pour plusieurs raisons. Le mélange de la solution de chimiothérapie aqueuse et de l'agent de contraste huileux forme une émulsion. La préparation obtenue par agitation n'est pas stable, se séparant en 2 phases distinctes en quelques minutes (Nakamura 1989; Konno 1990). Plusieurs solutions ont été proposées afin d'augmenter la stabilité de l'émulsion et de prolonger la libération de la molécule : agitation en homogénéiseur (de Baere 1995) ou dans une cuve à ultrasons (Katagiri 1989; Horiguchi 1992), ajout de divers surfactants (Nakamura 1989; Konno 1990; Yi 1998; Hino 2000). Aucune de ces techniques n'a été implémentée en clinique. La méthode la plus répandue, dite par "pompage", consiste en des aspirations et rejets successifs entre 2 seringues. Elle est faiblement reproductible et ne garantit pas une libération prolongée (de Baere 1995; Hino 2000).

La nature de l'émulsion et la taille des gouttelettes formées déterminent la distribution dans le réseau vasculaire tumoral. Des émulsions eau/huile de plus de 30-120 µm s'accumulent spécifiquement dans le tissu tumoral, mais des émulsions huile/eau de 10-40 µm montrent une faible accumulation tumorale et un fort passage systémique (de Baere 1995; Cay 1996). Il semble difficile de contrôler aussi précisément la nature et la taille de l'émulsion par un simple mélange des deux produits au moment de l'injection.

Une fraction importante de la dose injectée (jusqu'à 49%) peut être retrouvée dans le poumon (Raoul 1988; Perring 1994; de Baere 1996), avec un risque d'embolie pulmonaire (Czauderna 2005; Shiah 2005).

Shiono et al. ont montré en mélangeant du lipiodol et un agent de contraste hydrosoluble, que les deux produits se séparent rapidement et que l'agent hydrosoluble est éliminé plus vite que l'agent huileux, suggérant que la détection du lipiodol sur les clichés radiologiques ne démontre pas la présence du médicament dans la tumeur (Shiono 1993). Quelques études ont pu démontrer la rémanence du principe actif dans la tumeur en mesurant quantitativement les niveaux de médicament retrouvés dans le tissu cible (Sasaki 1987; Katagiri 1989; Horiguchi 1992), cependant elles ont toutes utilisé des homogénats tissulaires, ce qui ne permet pas de distinguer la fraction de médicament toujours contenue dans des gouttelettes d'huile de celle effectivement délivrée au tissu.

Enfin il semble que l'utilisation du seul mélange lipiodol / chimiothérapie sans embolisation n'apporte pas de bénéfice pour la survie des patients (Marelli 2007).

1.2.2 Particules chargées pour la chimioembolisation

On trouve une littérature abondante sur des produits expérimentaux non commerciaux destinés à la chimioembolisation. Kato et al. ont publié au début des années 1980s les premières études sur le développement et l'utilisation de particules d'embolisation chargées avec un principe actif. Il s'agissait de microcapsules d'éthyle cellulose chargées en cisplatine (Okamoto 1985) ou mitomycine C (Kato 1981; Kato 1981) pour le traitement par voie artérielle de différents cancers. L'équipe a instauré les bases théoriques de la chimioembolisation en démontrant successivement (Figure 2):

- *in vitro*, une libération du principe actif sur plusieurs heures (Figure 2.4);
- *in vivo*, une diminution du pic plasmatique par rapport à une injection intra-artérielle ou intraveineuse (Figure 2.6);
- *in vivo*, une augmentation de la concentration intratumorale de l'anticancéreux par rapport à l'injection artérielle (Figure 2.7);
- *in vivo*, un effet significatif sur la réponse tumorale et sur la survie des patients par rapport aux chimiothérapies IV ou IA.

Au total, 1013 patients ont été traités, à titre de traitement palliatif ou au stade préopératoire, pour différents types de cancers (Kato 1996). A notre connaissance, aucun essai comparatif randomisé n'a été réalisé et ces travaux n'ont débouché sur aucun produit commercial.

Par la suite, de nombreuses études ont proposé diverses billes d'embolisation chargées en anticancéreux. Ces études ont mis en évidence l'effet du matériau composant la particule, de la taille de la particule ou encore du mode de chargement sur ses propriétés d'élution, sans toutefois parvenir à recueillir le même niveau de preuve que Kato et al. (Tableau 2).

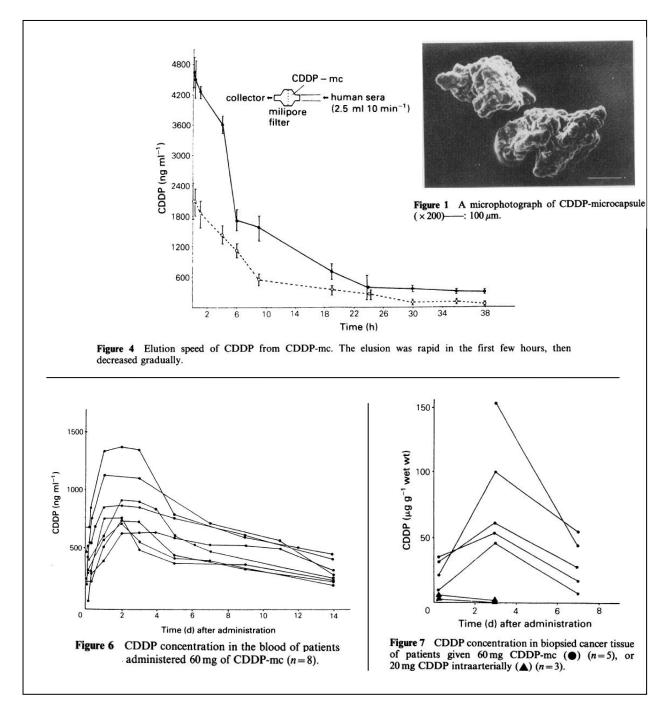


Figure 2 – Principaux résultats de l'équipe de Kato et al. sur des particules d'éthyle cellulose contenant du cisplatine.

(Figure 1) Photographie des particules, (Figure 4) profil d'élution *in vitro*, (Figure 6) profil d'élution plasmatique, (Figure 7) concentration intratumorale du médicament (Okamoto 1986).

Tableau 2 – Principales études sur le développement et l'évaluation de particules d'embolisation chargées en principe actif.

HCC : carcinome hépatocellulaire, MaxF : maxillofacial. Ethylcell. : éthyle cellulose, PLA : acide poly-lactique, PHB : polyhydroxybutyrate,. MMC : mitomycine C, 5-FU : 5-fluorouracil, ACR : aclarubicine, DOXO : doxorubicine, RIF : rifampicine. Release : cinétique de libération *in vitro*, CEA : antigène carcino-embryonnaire, α FP : alphafoetoprotéine, PK : pharmacocinétique plasmatique, PA : quantification tissulaire du principe actif, Anapat : analyse histologique des prélèvements.

Equipe	Stade	Application	Principe actif	Composition particules	Diamètre particules	Paramètres évalués	Références
Kato et al	Clinique	Tumeurs du foie, rein, poumon, vessie	CDDP MMC	Ethylcell.	225µm	PK, PA Réponse, taille, effets 2 ^{aire} , survie	(Kato 1981; Kato 1981; Okamoto 1985; Kato 1996)
Ichihara et al.	Clinique	НСС	ACR	PLA	200µm	αFP, taille, survie PK, PA Anapat	(Juni 1985; Ichihara 1989; Beppu 1991)
Fujimoto et al	Clinique	Tumeurs 1 ^{aire} / 2 ^{aire} du foie	MMC	Albumine	45µm	CEA, αFP, survie	(Fujimoto 1983; Fujimoto 1984; Fujimoto 1985)
Wallace et al.	Clinique	Tumeurs 2 ^{aire} du foie	CDDP	PLA	100µm	Release Réponse, enzyme, effets 2 ^{aire} , survie	(Bechtel 1986; Wright 1988; Li 1994; Diamandidou 1998)
Gray et al.	Animal (T)	Tumeur 2 ^{aire} du foie	DOXO	Albumine Résine	32µm	Release PK, PA, taille	(Jones 1989; Jones 1989; Chen 1992; Napoli 1992; Codde 1993)
Nishioka et al.	Animal (Vx2)	Tumeur du foie	CDDP	Albumine	<20μm 20-40μm	Release PK, PA Anapat	(Nishioka 1990; Kyotani 1992; Nishioka 1993; Nishioka 1994)
McArdle et al.	Animal (no T)	Rein	DOXO	Albumine	15-40µm	PK Anapat	(Kerr 1988; McArdle 1988; Goldberg 1992)
Yang et al.	Animal (noT)	MaxF	CDDP	Ethylcell.	200-440μm	PK quantif	(Yang 1995)
Denkbas et al.	In vitro		RIF, 5-FU MMC	PHB, chitosan Alginate	5-100μm 100-200μm	Release	(Kassab 1997; Denkbas 1999; Misirli 2005)
Benoit et al.	In vitro		5FU, CDDP DOXO	Cire, PLA Albumine		Release	(Benita 1986; Spenlehauer 1986; Sawaya 1988)

1.3 La chimiosphère, agent d'embolisation et vecteur de principe actif

1.3.1 Présentation

Trois nouveaux vecteurs de chimioembolisation ont été développés récemment et ont reçu le marquage CE (Tableau 3). L'avantage de ces produits est qu'ils ont profité de l'expérience clinique de l'embolisation aux microsphères calibrées des dix dernières années. Ils ont basé leur conception sur la fonction d'embolisation de la particule, reprenant le cahier des charges des microsphères calibrées. Le second intérêt de ces produits est que le chargement est effectué par le clinicien juste avant la procédure, en mélangeant une solution de principe actif et un flacon de microsphères. L'opérateur peut par conséquent choisir le médicament à charger et la concentration de chargement.

On peut proposer le terme générique de **chimiosphère** pour désigner ces nouveaux vecteurs de chimioembolisation.

Les trois produits se différencient par le principe de chargement de la molécule active :

- 1. les "éponges", qui absorbent la substance en solution de façon purement "passive". Ce sont les microsphères Bead BlockTM en PVA et chargées avec l'anti-inflammatoire non-stéroïdien ibuprofène (Biocompatibles UK Ltd) proposées pour la réduction des douleurs post-embolisation dans les fibromes utérins. Le chargement s'effectue en réhydratant une poudre lyophilisée de microsphères avec une solution de médicament. Il ne dépend pas de l'affinité entre la bille et la molécule, mais simplement de la limite de solubilité dans la solution aqueuse de chargement. L'élution se fait par diffusion simple dès que la bille est placée dans un milieu plus faiblement concentré en médicament.
- 2. les microsphères "fonctionnalisées", capables de fixer des molécules par interactions ioniques. Les billes DC BeadTM (Biocompatibles UK Ltd) ont une base de PVA modifiée par des groupements sulfonate SO₃ chargés négativement, et peuvent fixer des molécules chargées positivement (Lewis 2009). Deux anticancéreux sont actuellement à l'essai, la doxorubicine (Lewis 2006; Gonzalez 2008) et l'irinotecan (Tang 2006; Taylor 2007). Dans ce cas, le chargement et la libération dépendent de l'affinité du couple bille/principe actif, de la charge de la molécule (pKa), et de la concentration ionique et du pH du milieu environnant.

3. les microsphères combinant les deux modes de chargement. Il s'agit des billes commercialisées sous le nom HepaSphere® (Biosphere Medical), faites d'un copolymère PVA / acrylique. Des groupements carboxylate COO permettent de fixer des molécules chargées positivement. Le médicament est libéré en 2 phases, la fraction absorbée étant éluée rapidement dès l'injection, et la fraction liée sur une période plus longue. Des essais ont été initiés avec deux anticancéreux, la doxorubicine (Grosso 2008) ou l'oxaliplatine (Poggi 2008).

1.3.2 Données précliniques et cliniques sur les chimiosphères

Différentes études, *in vitro*, précliniques et cliniques, ont évalué les chimiosphères disponibles sur le marché en termes de tolérance et d'efficacité (Tableau 3).

La tolérance repose essentiellement sur la biocompatibilité des matériaux utilisés et sur la dose de médicament injectée. Les chimiosphères sont synthétisées à partir de matériaux largement utilisés dans le domaine biomédical et dont la tolérance est connue. Les essais précliniques et cliniques ont montré que les doses recommandées en administration IV ou per-os pouvaient être injectées avec les chimiosphères sans toxicité majeure.

L'efficacité du traitement repose sur les propriétés des chimiosphères en tant qu'agent d'embolisation et en tant que vecteur pharmaceutique.

La fonction d'embolisation a été évaluée selon le cahier des charges défini précédemment pour un agent occlusif sphérique et calibré (voir section I.1.1.4 p31), en mesurant la granulométrie, les propriétés mécaniques, les modifications éventuelles de taille et de compressibilité liées au chargement et la distribution dans le réseau vasculaire.

Pour la fonction de vecteur, les différents points étudiés par Kato et al. ont été repris :

• les taux de chargement en principe actif. Les études de chargement doivent déterminer quels sont les principes actifs chargeables dans les chimiosphères, à quelle dose et à quelle vitesse. Pour les billes utilisant un chargement ionique, il s'agit également de démontrer que le taux de chargement concorde avec le nombre de groupements fonctionnels greffés dans la bille.

- la cinétique d'élution *in vitro*. Elle doit montrer que la chimiosphère fournit une libération prolongée du médicament et donner une estimation la durée de la libération.
- la pharmacocinétique plasmatique. L'effet réservoir du vecteur de chimioembolisation doit conduire à une diminution de la concentration plasmatique du médicament par rapport à l'injection systémique.

Plusieurs paramètres susceptibles d'influencer l'efficacité du traitement n'ont pas été étudiés :

- la durée de l'effet réservoir in vivo. Il est établi que le temps d'incubation d'un agent anticancéreux avec des cellules tumorales influence son effet cytotoxique (Bailey-Wood 1984; Le Bot 1988).
- la **répartition des particules dans la tumeur**. Emerich et al. ont montré que des microsphères chargées en anticancéreux injectées autour de la tumeur permettent de ralentir la croissance tumorale de façon significative tandis que l'injection de la même dose avec les mêmes microsphères au centre de la tumeur n'a aucun impact sur la croissance de la tumeur (Emerich 2000). L'expérience répétée avec plusieurs anticancéreux (DOXO, CDDP, 5-FU) et plusieurs types de tumeurs (adénocarcinome mammaire, gliome) donne les mêmes résultats (Emerich 2002).
- la distribution du médicament autour de l'implant. Sur la base d'études de modélisation, certains auteurs ont suggéré que l'efficacité des principes actifs libérés par des stents chargés dépend des gradients de concentration et de l'homogénéité de la distribution dans la paroi vasculaire plutôt que de la concentration tissulaire moyenne (Lincoff 1997; Hwang 2001).

Tableau 3 – Présentation des 3 chimiosphères disponibles commercialement en cours d'évaluation préclinique et clinique.

Nom commercial	Bead Block TM	DC Bead™ LC Bead™	HepasSphere [™] QuadraSphere [™]	
Fabricant	Biocompatibles Ltd Farnham, UK	Biocompatibles Ltd Farnham, UK	BioSphere Medical Rockland MA, USA	
Marquage CE	2003	2004	2006	
Principe(s) actif(s)	Anti-inflammatoire Ibuprofène	Anticancéreux Doxorubicine Irinotécan	Anticancéreux Doxorubicine	
Mode de chargement	Absorption	Ionique (SO ₃)	Absorption Ionique (COO ⁻)	
Application(s) proposée(s)	Réduction des douleurs après embolisation de fibromes utérins	Traitement des tumeurs primaires et secondaires du foie et du poumon	Traitement des tumeurs primaires et secondaires du foie	
Travaux antérieurs	in vitro : (Borovac 2006; Lewis 2006) préclinique : (Borovac 2006; Wassef 2008)	in vitro :(Lewis 2006; Lewis 2006; Tang 2006; Lewis 2007; Taylor 2007; Gonzalez 2008; Jordan 2009; Lewis 2009)	in vitro : (Jordan 2009) clinique : (Grosso 2008; Poggi 2008)	
		préclinique :(Hong 2006; Lewis 2006; Taylor 2007)		
		clinique : (Varela 2007; Aliberti 2008; de Baere 2008; Malagari 2008)		

1.4 Problématique des chimiosphères

Les chimiosphères disponibles sur le marché sont actuellement sont en phase d'évaluation clinique pour différentes applications. Plusieurs questions se posent dans le cadre de ces essais :

Pendant combien de temps la chimiosphère libère-t-elle son contenu médicamenteux ?

Quelles sont les doses locales de principes actifs libérées par la chimiosphère dans les tissus ?

Quelle est la zone de tissu imprégnée par le médicament ?

L'utilisation des tests d'élution *in vitro* pour prédire le comportement de la bille *in vivo* est limitée. Plusieurs appareils de dissolution ont été utilisés pour étudier les chimiosphères. La durée de libération pour une même chimiosphère varie de quelques minutes à plusieurs mois selon le type d'appareil employé (Gonzalez 2008). D'autre part, les tests *in vitro* sont réalisés en milieu liquide, sur des billes en suspension, conditions qui ne peuvent rendre compte de la situation *in vivo* dans un tissu. Jain et al ont démontré les effets de la composition de la matrice extracellulaire, la densité et les interactions cellulaires, ou encore la pression interstitielle intratissulaire sur le transport d'un principe actif dans un tissu (Jain 1987; Jain 1999). Ces paramètres ne peuvent être reproduits par aucun dispositif *in vitro*.

Les études précliniques sur les chimiosphères ont mesuré les concentrations de principe actif dans le compartiment plasmatique, mais pas les concentrations au niveau tissulaire.

En pharmacologie classique, la concentration sanguine sert de référence pour prédire l'efficacité du traitement. Cependant dans le cas d'une administration locale par les chimiosphères, ces concentrations ne reflètent absolument pas les doses atteintes au site de la lésion autour des billes. Aucun modèle pharmacocinétique ne décrit exactement la situation présente.

On ne dispose ni des données expérimentales ni des données théoriques permettant de répondre à ces questions. Il faut donc déterminer *in situ* après embolisation par les produits disponibles, la quantité de médicament libérée par la bille, la concentration et la distribution du principe actif dans le tissu embolisé.

Chapitre 2

Techniques de détection et de quantification tissulaire

Intérêt des microspectroscopies

2.1 Techniques de détection et de quantification tissulaire

La technique employée doit répondre aux critères suivants :

- être applicable sur des échantillons biologiques ;
- être quantitative ;
- permettre de mesurer séparément les fractions de médicament toujours contenue dans le vecteur et libérée dans le tissu ;
- fournir une cartographie tissulaire du médicament, avec une résolution spatiale de l'ordre de la dizaine de micromètre, compte tenu de la taille des chimiosphères ;
- et, dans la mesure du possible, être applicable facilement et à un coût d'analyse raisonnable.

Les études rapportant la détection et quantification de principes actifs dans un échantillon tissulaire peuvent être séparées en deux, selon qu'elles cherchent à effectuer un dosage point par point de la molécule à l'aide de techniques analytiques, ou à obtenir la répartition dans l'espace de la molécule par une méthode d'imagerie.

2.1.1 Techniques pour le dosage point par point

Cette approche consisterait à prélever une zone de tissu autour des billes, puis à séparer et quantifier la substance d'intérêt par une technique analytique adaptée.

i. Prélèvement

Différentes méthodes de prélèvement sont rapportées selon le niveau d'analyse requis : organe, tissu, cellule. La plupart des études de quantification tissulaire de médicaments se situe au niveau des principaux organes ou tissus, et utilise des prélèvements disséqués manuellement puis homogénéisés.

Le tape "stripping" est parfois employé pour étudier la pénétration de substances endogènes ou exogène à travers la peau (Touitou 1998). La méthode consiste à prélever des couches successives de tissu par applications répétées de bandes adhésives, couches ensuite analysées séparément. On peut également obtenir des coupes jointives de tissu à l'aide d'un microtome, permettant un contrôle plus précis de la zone de tissu prélevé. Wientjes et al. ont ainsi étudié la pénétration d'un anticancéreux (mitomycine C) dans la paroi de la vessie à partir de coupes de tissu de 40 µm d'épaisseur (Wientjes 1991).

Les méthodes de **microdissection tissulaire** permettent de sélectionner une zone d'intérêt sur une coupe histologique après étalement sur une lame de verre.

La microdissection laser est la technique la plus courante (Figure 3) (Erickson 2008). Elle permet un prélèvement au niveau de la cellule unique, et elle est couramment utilisée pour la caractérisation d'ADN (Bazan 2005), d'ARN (Fend 1999) ou de protéines (Kwapiszewska 2004). Drexler et al. ont employé la technique pour la quantification d'un pro-médicament dans différents tissus. La méthode rapportée est cependant très fastidieuse, car 20 à 30 prélèvements d'un diamètre de 10 – 25 μm chacun sont nécessaires pour obtenir une quantité détectable de médicament (Drexler 2007).

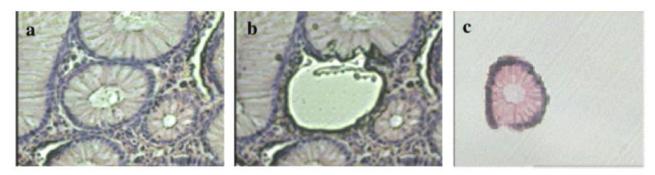


Figure 3 – Illustration de la microdissection laser sur coupe tissulaire (Bazan 2005). (a) coupe avant dissection, (b) coupe après dissection, (c) glande épithéliale récupérée.

Wang et al. ont récemment mis au point le "microprélèvement capillaire direct" pour la quantification d'un anticancéreux libéré par des microsphères (Wang 2009). La méthode utilise un capillaire d'un diamètre interne d'environ 50 µm, appliqué directement sur la coupe histologique, et ensuite analysé par électrophorèse capillaire (Figure 4). Elle présente la même limite que la microdissection laser, à savoir de faibles volumes de tissu récupérés dans le capillaire, imposant de très nombreux prélèvements pour pouvoir détecter la molécule par la suite.

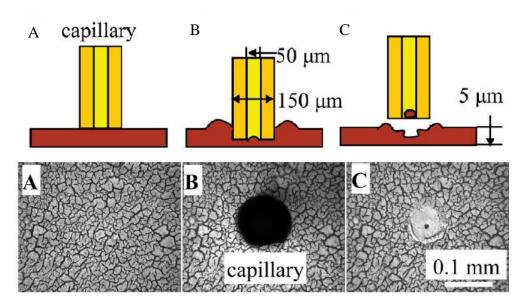


Figure 4 – Illustration du microprélèvement capillaire direct sur coupe tissulaire (Wang 2009). A) avant, B) pendant, C) après prélèvement.

Quelques études de dosage tissulaire de principes actifs ont utilisé des prélèvements obtenus par **microdialyse** (Elmquist 1997; Davies 1999; Chu 2000). La méthode a notamment été employée pour suivre la concentration dans le foie d'un anticancéreux (étoposide) libéré par un patch déposé à la surface de l'organe (Sato 1996) et pour quantifier dans le muscle un anesthésique chargé dans des microsphères biodégradables (McDonald 2002).

La technique consiste à implanter dans le tissu à étudier une sonde comportant une membrane de dialyse cylindrique semi-perméable, et à perfuser un liquide hypo-osmotique permettant de récupérer les molécules présentes dans le milieu extracellulaire (Figure 5). L'implantation-perfusion peut durer plusieurs heures à plusieurs jours (10 j chez McDonald).

Plusieurs contraintes sont à prendre en compte. Tout d'abord seule la fraction circulant librement dans le milieu interstitiel peut être récupérée. Le nombre de sondes implantable est limité, en général à une seule, et la qualité du site d'implantation ne peut être contrôlée qu'*a posteriori*. Il est difficile d'établir la relation entre la concentration mesurée dans le dialysat et la concentration réelle au site d'implantation, car les étapes de calibration sont très complexes. Enfin, la réaction inflammatoire générée par la sonde est susceptible de modifier la diffusion du principe actif.

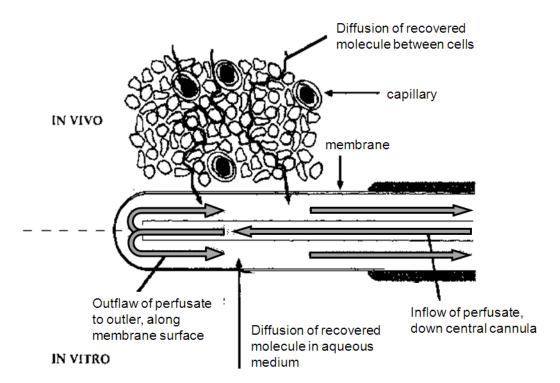


Figure 5 – Schéma de la sonde de microdialyse et de son environnement (Elmquist 1997).

ii. Analyse

L'analyse du prélèvement procède par deux étapes : la séparation de la molécule d'intérêt de la matrice biologique, puis sa détection/quantification. Dans la pratique, les deux dispositifs instrumentaux sont généralement couplés.

Deux types de techniques de séparation sont fréquemment retrouvés pour le dosage de principes actifs dans des échantillons biologiques : les méthodes de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et les méthodes d'électrophorèse capillaire (CE). Le choix du procédé de séparation dépend de la structure, de la masse molaire, des propriétés physicochimiques et du caractère ionique de la molécule à séparer (Burgot 2006).

L'électrophorèse capillaire est généralement moins sensible que la CLHP, et la précision en matière de détermination quantitative est inférieure à celle des méthodes chromatographiques (CLHP et CG) (Burgot 2006). Quelques études comparatives ont confirmé ces appréciations, notamment sur l'ibuprofène, montrant une meilleure sensibilité en chromatographie (10⁻⁸ M pour la CLHP versus 10⁻⁶ M pour la CE) mais un temps d'analyse plus court en électrophorèse (Kang 1998; Makino 2004).

Le choix du détecteur varie également avec la molécule étudiée et avec la technique de séparation employée. Pour l'HPLC et la CE, il s'agit le plus souvent de détecteurs à absorptiométrie dans l'UV/visible, spectromètres de masse ou fluorimètre (Burgot 2006).

Diverses publications recensent de façon exhaustive les protocoles les plus récents pour l'analyse des médicaments (Lunn 2000; Stewart 1998; How-Yan Wong 1985; Ahuja 2008; Smyth 2006; Lin 2003). On trouve également dans la littérature des études rapportant plus spécifiquement la mise au point de techniques de HPLC et CE pour les molécules chargées dans les chimiosphères : ibuprofène (Dominkus 1996, Kunsman 1993, Shihabi 1996), doxorubicine (Shinozawa 1980, Rose 1988, van Asperen 1998, Alvarez-Cedron 1999, Arnold 2004) et irinotécan (Bardin 2005).

Pour suivre la libération tumorale de la doxorubicine depuis un hydrogel, Konishi et al. ont choisi une méthode HPLC/absorptiométrie. La molécule a été détectée dans le tissu pendant une semaine à des concentrations comprises entre 10^{-5} et 10^{-4} M (Konishi 2005). Dans le domaine de la chimioembolisation, Wang et al ont validé une technique de CE/fluorimétrie pour la quantification tissulaire de la doxorubicine (Wang 2009) et mesuré des concentrations tumorales de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-6} M.

iii. <u>Intérêt des techniques de dosage point par point pour notre problématique</u>

Les méthodes de dosage point par point sont applicables à des échantillons biologiques. Elles permettent généralement une quantification nanomolaire. En utilisant une méthode de microdissection, on peut récupérer séparément la bille et le tissu, et obtenir une cartographie tissulaire du médicament avec une résolution spatiale de l'ordre de 100 µm. La principale limite de cette approche tient au temps d'analyse et au fait que deux techniques différentes doivent être validées, l'une pour le prélèvement, l'autre pour la séparation/quantification.

2.1.2 Techniques pour l'étude de la répartition tissulaire

Trois méthodes différentes ont été retrouvées pour évaluer la distribution tissulaire d'une substance active.

i. Radiomarquage

La première méthode consiste à utiliser des **molécules marquées par un atome radioactif**. Il s'agit d'isotopes émetteurs β ou γ à durée de vie longue (mois, années) tels le tritium ³H, le carbone ¹⁴C, ou l'iode ¹²⁵I, ou éventuellement courte (heures, jours) avec le carbone ¹¹C ou le fluor ¹⁸F. La sensibilité est excellente, jusqu'à 10^{-12} M (Langer 2004).

Différentes méthodes de visualisation sont utilisées : autoradiographie et micro-autoradiographie, imageur, tomographie par émission de positons (TEP). L'autoradiographie consiste à exposer un film ou un gel photographique à un échantillon radioactif. La micro-autoradiographie est la même opération réalisée directement sur une lame histologique. Dans les imageurs scintigraphiques, une substance sensible au rayonnement ionisant réémet un photon capté par une cellule photoélectrique et donne une image digitale en 3D sur un tissu ou sur un sujet entier. La TEP détecte spécifiquement les photons d'énergie 511 KeV issus de l'annihilation d'un positon avec un électron. Cette dernière méthode connaît un essor important du fait qu'elle peut être couplée à un appareil de scanner ou d'IRM pour une imagerie anatomique et fonctionnelle.

Le radiomarquage est, avec les techniques de CLHP, la méthode la plus utilisé dans les étapes préliminaires du développement d'un médicament, notamment pour les études de distribution et métabolisme (Touitou 1998; Stumpf 2005). Les études de distribution à partir d'implants chargés sont plus rares. Saltzman et al. ont publié un travail très intéressant sur la pénétration d'un anticancéreux (³H carmustine) dans des tumeurs gliomales depuis des pastilles polymériques (Figure 6), montrant que les taux de diffusion et d'élimination tissulaires de la molécule variaient au cours du temps (Fung 1996).

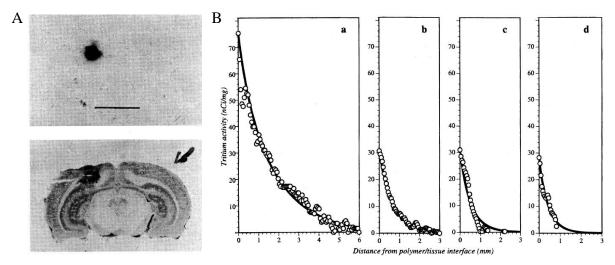


Figure 6 – Principaux résultats de Saltzman et al. sur un implant chargé en BCNU radiomarqué (Fung 1996).

A) Cliché autoradiographique et photographie d'une coupe de cerveau de rat implanté avec une pastille chargée en BCNU tritiée, B) profils de distribution de BCNU depuis le bord de l'implant à 1, 3,7 ou 14 jours.

L'utilisation d'un isotope radioactif est cependant extrêmement contraignante dans l'expérimentation animale, particulièrement pour des modèles de grande taille et des durées d'implantation de plusieurs semaines (protection des personnels, gestion des animaux et des efflux). Piemi et al. ont suggéré que le radiomarquage d'une molécule peut modifier sa pénétration tissulaire et ses interactions avec sa cible (Piemi 1999). Enfin, aucune méthode de détection n'est parfaitement adaptée à notre problématique : l'autoradiographie requiert un temps d'exposition très long (typiquement plusieurs semaines) et la résolution spatiale des caméras à scintillation et de la TEP est de l'ordre de 1 mm (Langer 2004).

ii. Microscopie de fluorescence

La **microscopie de fluorescence** se base sur les caractéristiques spectroscopiques particulières de certaines molécules qui permettent de les différencier des structures biologiques. La fluorescence observée peut avoir plusieurs origines : la fluorescence naturelle d'une substance ou l'utilisation d'une substance fluorescente se fixant spécifiquement (DAPI sur l'ADN) ou non spécifiquement (fluorescéine, rhodamine) sur une structure. La sensibilité pour les molécules ayant un rendement de fluorescence élevé est typiquement de 10^{-7} M.

Peu de médicaments sont naturellement fluorescents dans des gammes spectrales différentes de celles des composants biologiques. On peut toutefois citer la famille des anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine, épirubicine...), ou encore la mitoxantrone et le topotécan (Minchinton 2006). Cette propriété a été exploitée dans de nombreuses études sur la distribution des anthracyclines (Decorti 2000; Zheng 2001; Harris 2003; Van Ruth 2003). Elle a également permis d'étudier la libération de ces anticancéreux par des implants chargés, à la fois *in vitro* (Omelyanenko 1998; Jeong 1999) et *in vivo* (Gao 2002; Qian 2003; Blanco 2004). Gao et al. ont publié une élégante série de travaux sur la libération de doxorubicine par des bâtonnets en PLGA implantés dans le foie. En comparant les résultats de l'imagerie de fluorescence et de l'examen histologique, l'équipe a pu évaluer les effets des modifications tissulaires (sain, tumoral, nécrotique, capsule fibreuse) sur la diffusion du médicament (Figure 7). Plus récemment, ces auteurs ont modélisé le transport de la molécule à partir des profils de distribution expérimentaux et de modèles de diffusion de la matière pour déterminer quantitativement les vitesses de libération, diffusion et élimination du principe actif dans le tissu cible et optimiser les propriétés d'élution de l'implant.

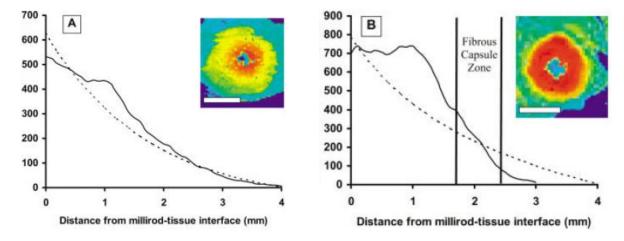


Figure 7 – Principaux résultats de Gao et al. sur un implant chargé en doxorubicine (Blanco 2004). Profils de concentration du médicament depuis le bord de l'implant à 4 j (A) et 8 j(B).

Quelques équipes ont greffé des fluorophores sur des agents pharmaceutiques : paclitaxel (Rao 1998; Baloglu 2001) et docétaxel (Dubois 1995) marqués par la fluorescéine et par la rhodamine. Cependant le couplage d'un fluorochrome à une molécule médicamenteuse pose plusieurs problèmes. Il requiert la maîtrise de la chimie correspondante et une connaissance du métabolisme de la molécule synthétisée. Les propriétés d'élution et de diffusion de la molécule peuvent être modifiées (Rao 1998), d'autant plus que les deux molécules ont un poids moléculaire proche (e.g. : MW_{ibuprofène} : 206 g/mol, MW_{fluorescéine} : 332 g/mol).

iii. <u>Immunohistochimie</u>

La dernière méthode retrouvée consiste à détecter la molécule médicamenteuse à l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre elle.

Une méthode immunologique a été mise au point directement sur coupe histologique pour la détection de la gentamicine sur des coupes de tissu (Mihelic-Rapp 1996; Imamura 2003). Plus récemment, Wassef et al. ont utilisé un anticorps anti-ibuprofène pour détecter le médicament directement sur des coupes de tissu (anticorps IgG M51 anti-ibuprofen chez AbKem Iberia, Espagne) (Wassef 2008). La sensibilité de l'anticorps est très élevée (10⁻⁷ M). L'équipe a ainsi déterminé le pourcentage de surface marquée par l'anticorps sur une chimiosphère chargée en ibuprofène (Figure 8). La technique n'a pu être validée pour détecter le médicament dans les tissus autour de l'implant, en raison d'un fort marquage non spécifique des structures biologiques.

Peu d'anticorps dirigés contre des médicaments sont actuellement disponibles. La synthèse de nouveaux anticorps est un protocole long, cher et complexe voire impossible pour certaines molécules considérés par l'organisme comme des haptènes (Watanabe 1993).

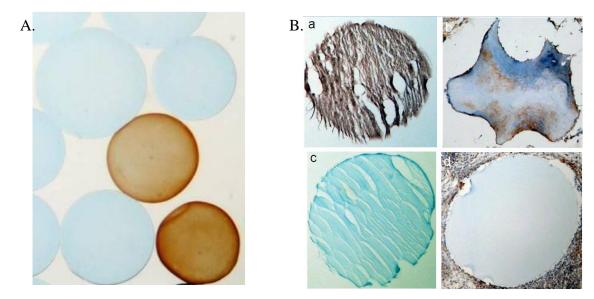


Figure 8 – Immunohistochimie avec un anticorps anti-ibuprofène (Wassef 2008).

A) Photographie de billes entières chargées / non chargées en ibuprofène marquées par l'anticorps. B) Photographies de coupes de bille / tissu marquées par l'anticorps et montrant une bille chargée en ibuprofène à t=0 (a) ou 1 semaine (b) et des billes contrôle non chargées aux mêmes délais (c et d).

iv. <u>Intérêt des techniques d'étude de la répartition pour notre problématique</u>

Les trois méthodes décrites peuvent être appliquées à des échantillons biologiques. Elles donnent la distribution de la molécule avec une résolution spatiale allant jusqu'à la centaine de nanomètres pour les méthodes optiques, ce qui permet de distinguer visuellement l'implant et le tissu environnant. Elles permettent de quantifier le médicament jusqu'à des concentrations de 10^{-7} voire 10^{-12} M pour une molécule radiomarquée. L'intensité du signal mesuré dépend des effets de matrice (état de la molécule, environnement, signal du tissu,...) et la calibration n'est pas toujours évidente. L'utilisation d'un marqueur externe est soumise à la disponibilité des réactifs ou à la possibilité d'en synthétiser.

2.2 Techniques microspectroscopiques

Le terme de microspectroscopie désigne de façon schématique un appareillage couplant un spectromètre et un système d'imagerie. Le dispositif spectrométrique permet de mesurer un spectre de l'échantillon et le dispositif microscopique permet de relier le spectre mesuré à une position spatiale. Le résultat de l'analyse est donc une cartographie chimique 2D du spécimen. Si l'on dispose d'un spectre de référence d'une molécule d'intérêt, on peut ainsi établir à partir de l'image spectrale la distribution de cette substance. Les techniques de spectroscopie sont pour la plupart quantitatives, on peut donc relier l'intensité du signal sur le spectre à la concentration de l'élément mesuré.

On parle de microspectroscopie optique dans le cas où le faisceau incident est un rayonnement électromagnétique situé dans le domaine UV, visible ou encore infrarouge. Dans cette gamme du spectre électromagnétique, les interactions rayonnement / matière se situent au niveau des couches les plus externes du nuage électronique et conduisent généralement à une identification au niveau moléculaire. Il s'agit principalement des spectrométries infrarouges, Raman et de fluorescence.

D'autres dispositifs microspectroscopiques d'intérêt utilisent des spectromètres de fluorescence X ou des spectromètres de masse. Les phénomènes physiques étudiés et les informations fournies par ces méthodes sont différents. Utilisant des sources énergétiques plus puissantes, généralement particulaires, ces méthodes conduisent généralement à une identification élémentaire. Nous présenterons plus brièvement leur principe et leurs applications rapportées ou potentielles.

2.2.1 Généralités: interactions rayonnement / matière

Le rayonnement électromagnétique présente une double nature : ondulatoire et corpusculaire. Il peut tout d'abord être décrit comme la propagation d'énergie grâce aux variations périodiques, à la fréquence v, d'un champ électrique et d'un champ magnétique. Le rayonnement peut aussi être considéré comme un flux de particules : les photons, possédant une masse au repos nulle et se déplaçant à une vitesse égale à celle de la lumière dans le vide. Ainsi, de manière générale, une onde peut être indifféremment caractérisée par sa périodicité spatiale (longueur d'onde λ), sa périodicité temporelle (fréquence v) ou par l'énergie E des photons qui lui sont associés, selon la relation :

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

avec h constante de Planck (6,626 10^{-34} J·s) c vitesse de la lumière dans le vide (3. 10^{8} m.s⁻¹)

On définit aussi le nombre d'onde k ou \bar{v} exprimé en cm⁻¹, tel que : $\bar{v} = 1/\lambda$

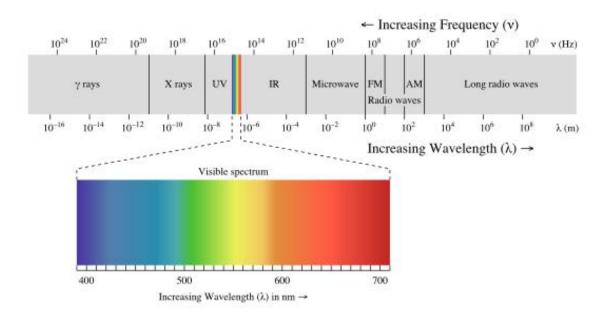


Figure 9 – Spectre électromagnétique (http://www.wikipedia.fr)

D'autre part, l'énergie d'une molécule (à l'exception de son énergie cinétique) est **quantifiée**, c'est-à-dire qu'elle ne peut pas prendre n'importe quelle valeur. Cette énergie peut s'écrire de façon approximative sous la forme de la somme d'un terme électronique *Ee* dû à l'énergie des électrons, d'un terme *Ev* dû à l'énergie vibrationnelle des noyaux et d'un terme rotationnel *Er* dû à la rotation de la molécule :

$$E = Ee + Ev + Er$$

avec $Ee \gg Ev \gg Er$

La figure 10 donne schématiquement les gammes d'énergie correspondant à ces différentes contributions.

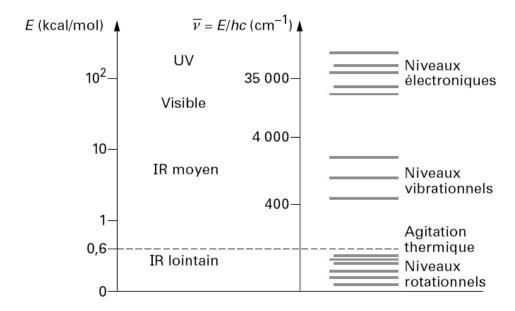


Figure 10 – Valeurs respectives des contributions électroniques, vibrationnelles et rotationnelles d'une molécule (Dalibart 2000).

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 du matériau. Le diagramme des niveaux d'énergie ou diagramme de Jablonski (Figure 11) distingue trois types d'interactions : absorption, diffusion et émission.

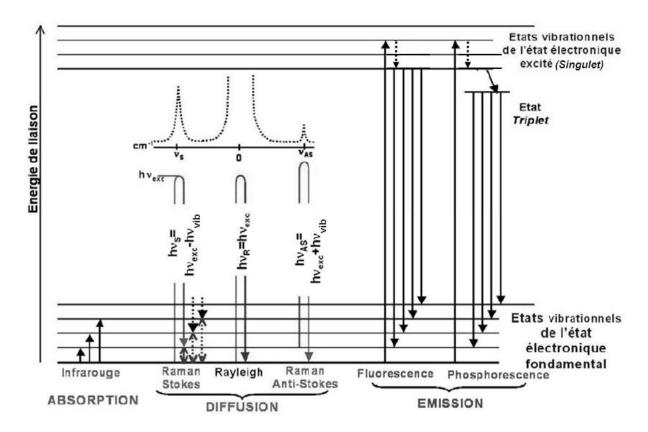


Figure 11 – Un exemple de diagramme de Jablonski (d'après (Breuzard 2006)).

Si l'énergie du rayonnement incident correspond à une différence entre deux niveaux énergétiques d'une molécule de l'échantillon, alors il pourra y avoir **absorption** des photons de la fréquence correspondante, c'est-à-dire passage de la molécule d'un état d'énergie fondamental vers un état excité d'énergie supérieure. La **diffusion** rassemble l'ensemble des phénomènes par lesquels le rayonnement change de direction de propagation à la traversée d'un milieu. La diffusion peut être avec (diffusion inélastique) ou sans (diffusion élastique) changement de longueur d'onde. L'absorption et la diffusion contribuent à l'affaiblissement de l'énergie du faisceau incident. Enfin l'**émission** est le résultat d'une transition de l'atome ou de la molécule d'un état excité à l'état fondamental.

La spectroscopie désigne l'ensemble des techniques permettant d'étudier ces interactions. Selon le type de phénomène que l'on souhaite étudier, on utilise différents types de dispositifs spectroscopiques.

2.2.2 Microspectroscopie infrarouge

i. Principe physique (Dalibart 2000)

La spectroscopie infrarouge étudie les transitions entre niveaux vibrationnels d'un même état électronique. Les deux principaux modes vibrationnels sont les suivants (Figure 12) :

- l'élongation : mouvement rythmique le long de l'axe de la liaison ;
- la déformation angulaire : variation de l'angle formé entre deux liaisons successives.

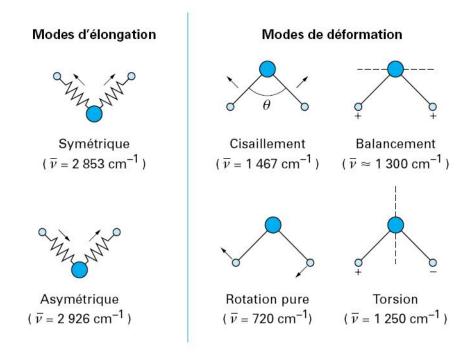


Figure 12 – Modes de vibration moléculaire : exemple du groupement CH₂ (Dalibart 2000).

ii. Un spectre infrarouge

Si le faisceau lumineux incident a une énergie correspondant à l'énergie de vibration des liaisons de la molécule, le rayonnement va être absorbé et on enregistrera une diminution de l'intensité. Le spectre infrarouge représente l'absorption de l'énergie du faisceau incident en fonction de la longueur d'onde (Figure 13).

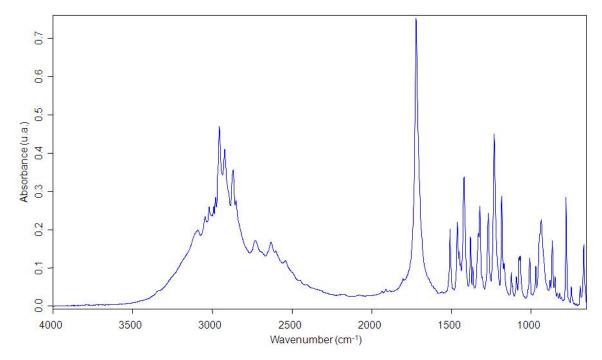


Figure 13 – Spectre infrarouge de l'ibuprofène.

iii. Aspect qualitatif (Dalibart 2000)

L'apparition d'une bande d'absorption sur le spectre infrarouge d'une molécule est soumise à des règles de sélection. Ces règles ont été établies pour des molécules simples, di- ou tri- atomiques, pour lesquelles il est possible de prédire quels sont les modes de vibrations qui conduiront à une absorption infrarouge. Il est difficile de transposer ces règles à des molécules complexes telles celles étudiées ici. On retiendra simplement que seules les vibrations induisant une variation du moment dipolaire de la molécule sont associées à une bande infrarouge.

L'étude qualitative des spectres infrarouges porte sur la position des pics et leur déplacement, leur intensité ou encore leur largeur. Du fait de la multiplicité des pics, la combinaison des bandes infrarouges est spécifique d'une molécule et permet donc de l'identifier de façon précise et certaine. Le déplacement des bandes vers des longueurs d'onde plus faibles ou plus élevées par rapport à un spectre contrôle démontre les interactions de la molécule avec son environnement : cristallisation de la substance, établissement de liaisons covalentes avec une matrice, de liaisons ioniques ou liaisons H avec le solvant, ...

iv. Aspect quantitatif (Dalibart 2000, Burgot 2006)

La loi de Beer-Lambert donne l'intensité résultante I en fonction de l'intensité initiale I_0 , de la concentration C du milieu en substance absorbante, de la longueur I du trajet optique dans le milieu absorbant et du coefficient d'extinction moléculaire ε dépendant de la substance absorbante.

$$I = I_0 * e^{-\varepsilon C l}$$

d'où l'on déduit l'absorbance A :

$$A = -\log \left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon C l$$

La proportionnalité entre l'absorbance et la concentration d'une substance permet d'utiliser les spectroscopies d'absorption comme méthode d'analyse quantitative, du moins dans la limite de linéarité de la loi de Beer-Lambert (typiquement pour des absorbances < 2). La loi est additive, ce qui permet le dosage des mélanges.

v. <u>Résolution latérale</u> (Essendoubi 2007)

Selon la théorie de la diffraction, la résolution spatiale en *x* est limitée par la longueur d'onde de la source incidente. D'après le critère de Rayleigh, on peut distinguer deux points A et B si

$$AB > 0.61 \ ^{\lambda}/_{ON}$$

avec λ : longueur d'onde

ON: ouverture numérique de l'objectif.

En pratique, les objectifs de microscopes IR ont des ouvertures numériques comprises entre 0,5 et 0,7 donnant des résolutions latérales de l'ordre de quelques microns à quelques dizaines de microns pour une illumination dans l'infrarouge moyen.

vi. Applications biomédicales

Dans la recherche et l'industrie pharmaceutique, la spectroscopie infrarouge est une méthode de routine dans l'analyse de molécules thérapeutiques depuis la caractérisation de matières premières jusqu'au contrôle de process. L'imagerie infrarouge connaît actuellement une forte expansion en chimie analytique. On peut citer les **travaux réalisés par Kazarian et Chan sur des formulations polymères/ibuprofène, et qui ont évalué** *in vitro* la distribution, la cristallisation, ou encore l'imprégnation et la dissolution du médicament dans la matrice

(Kazarian 2002; Chan 2003; Chan 2005; Chan 2006). A notre connaissance, aucune application *in vivo / ex vivo* pour l'étude de formulations pharmaceutiques n'a été rapportée.

La spectroscopie infrarouge intéresse aujourd'hui beaucoup les biologistes et les médecins comme outil d'aide au diagnostic en cancérologie. Cette approche repose sur la reconnaissance de marqueurs spectroscopiques fonctionnels, c'est-à-dire la présence ou l'absence de bandes infrarouges qui permettent de discriminer tissu cancéreux et tissu sain. Le nombre d'études portant sur ce sujet augmente très rapidement, et quasiment tous les types de cancers ont maintenant été caractérisés en microspectroscopie infrarouge : cancers de la peau (Lasch 1998; Tfayli 2005; Ly 2008; Ly 2009), du sein (Malins 1996; Gao 1999; Fabian 2006), du colon (Rigas 1990; Lasch 2004; Krafft 2008; Wolthuis 2008), du cerveau (Lee 1998; Amharref 2006; Krafft 2006), du col (Romeo 2002; Walsh 2007), du poumon (Wang 1997; Yano 2000; Yang 2005), du foie (Diem 2000), de l'ovaire (Krishna 2007).

Si cette application sort du champ d'étude de notre travail, il est intéressant de noter que la même technique utilisée pour quantifier le release de principe actif peut servir à caractériser la tumeur. On peut imaginer dans la suite de ce travail faire de la microspectroscopie infrarouge une technique d'imagerie multimodale, où la même analyse donnera les cartographies superposées de la distribution tissulaire du médicament et de l'architecture tissulaire, voire également de ses effets sur le tissu.

2.2.3 Microspectrofluorimétrie

i. Principe physique (Burgot 2006, Breuzard 2006)

L'absorption de lumière UV-visible par des molécules génère une population d'espèces dans des états électroniques excités d'énergie supérieure (Figure 11). Le retour au niveau fondamental se fait alors par différents processus compétitifs :

- soit par émission de photons, c'est la fluorescence ;
- soit par un processus non radiatif où l'énergie est abandonnée aux molécules du solvant (conversion interne);
- soit encore il y a passage transitoire à un niveau excité triplet intermédiaire (conversion intersystème), à parti duquel les molécules retournent à l'état fondamental soit par une émission de photons (phosphorescence), soit par dissipation non radiative de l'énergie restante.

La compétition entre phénomènes de fluorescence et de conversion interne se chiffre par le rendement quantique de fluorescence ϕ qui est le rapport entre le nombre de photons absorbés et le nombre de photons émis.

ii. <u>Un spectre de fluorescence</u> (Burgot 2006, Breuzard 2006, Lakowicz 2006)

Chaque molécule fluorescente est caractérisée par des spectres d'excitation et des spectres d'émission (Figure 14).

Un spectre d'excitation représente la variation de l'intensité de rayonnement de fluorescence en fonction de la longueur d'onde du rayonnement d'excitation, pour une transition d'émission fixée. Le spectre d'excitation est en principe identique au spectre d'absorption du composé étudié. Une différence entre ces spectres peut être attribuée à la présence d'impuretés, qui modifieront plus facilement le spectre d'excitation.

Pour le spectre d'émission, on enregistre la variation de l'intensité du rayonnement de fluorescence en fonction de la longueur d'onde pour une longueur d'onde d'excitation fixée (source monochromatique). 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.

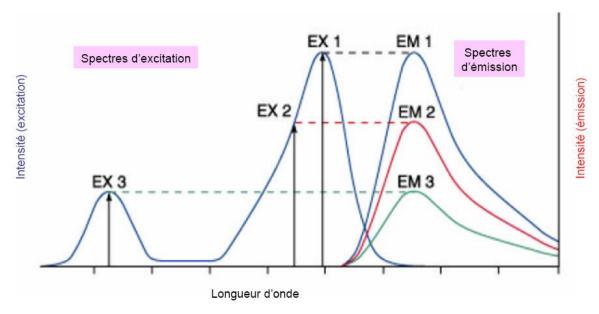


Figure 14 – Spectres d'excitation de fluorescence et d'émission de fluorescence (Aït-Slimane 2007).

On observe tout d'abord sur la figure 13 que la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence est plus élevée que la longueur d'onde d'excitation qui lui a donné naissance. Ce décalage, dit décalage de Stokes, s'explique par le fait que la molécule excitée perd généralement son énergie vibrationnelle avant de redescendre au niveau électronique fondamental. D'autre part la molécule retombe le plus souvent dans l'état fondamental à un niveau vibrationnel plus élevé qu'avant excitation, contribuant à la diminution de l'énergie émise. On note également sur la figure 13 que le profil d'émission est identique quelle que soit la longueur d'onde choisie pour l'excitation (règle de Kasha), car la relaxation vibrationnelle est généralement plus rapide (10^{-12} s) que l'émission de fluorescence (10^{-8} s). Enfin l'intensité d'émission dépend de la longueur d'onde d'excitation, l'intensité de la fluorescence étant maximale à la longueur d'onde d'excitation maximale.

Ces règles décrivent le comportement le plus fréquent des molécules fluorescentes. Des exceptions existent telles que la résonance de fluorescence (FRET), où il y a superposition des spectres d'absorption et d'émission.

iii. Aspect qualitatif (Burgot 2006)

Toutes les molécules ne fluorescent pas. Pour que le phénomène se manifeste, plusieurs conditions doivent être remplies, bien qu'il n'existe pas de règles permettant de le prévoir. La longueur d'onde d'excitation doit être supérieure à 250 nm, les rayonnements de plus faible

longueur d'onde étant trop énergétiques et risquant de provoquer des ruptures de liaisons. L'électron qui subit la transition ne doit pas être dans une orbitale liante σ . Les molécules les plus fluorescentes contiennent un ou plusieurs noyaux aromatiques, des groupements donneurs d'électrons et possèdent une structure rigide.

L'étude qualitative des spectres porte notamment sur les écarts éventuels entre les spectres d'absorption et d'excitation de fluorescence. Une différence entre ces spectres peut être attribuée à la présence d'impuretés dans l'échantillon.

L'étude des maxima d'intensité des spectres d'excitation et d'émission de fluorescence peut permettre d'identifier une molécule, bien que cette identification reste moins précise qu'en spectroscopie infrarouge.

Comme sur un spectre infrarouge, des modifications du profil ou de l'intensité de fluorescence suggèrent une modification de l'environnement de la substance. Une augmentation de la fluorescence peut être due à la formation d'un chélate entre la substance fluorescente et un cation métallique (Ca²⁺, Zn²⁺, ...) qui augmente la rigidité du système moléculaire. A l'inverse, une diminution de la fluorescence (ou quenching) peut s'expliquer par l'interaction d'une molécule excitée avec un agent quenchant (e.g. un groupement halogéné ou oxygéné) qui la rend inapte à la fluorescence, par une modification acido-basique avec le pH qui change ses propriétés de fluorescence ou encore par une augmentation de la température qui favorise les chocs entre molécules et la dissipation thermique. La mesure des rendements quantiques de fluorescence de la molécule dans différentes conditions peuvent aider à comprendre ces interactions.

iv. Aspect quantitatif (Burgot 2006, Breuzard 2006)

La loi de Beer-Lambert s'applique à l'intensité lumineuse transmise par une solution :

$$I = I_0 * e^{-\varepsilon C l}$$

Dans le cas des substances fluorescentes, cette relation n'est pas exploitable car la lumière émise se superpose à celle transmise. Par contre il est possible d'exprimer l'intensité de fluorescence F, parfois appelée brillance, en fonction de l'intensité du rayonnement incident I_0 , selon la relation :

$$F = \varphi (I_0 - I) = \varphi I_0 (1 - e^{-\varepsilon C l})$$

où ϕ est le rendement quantique de fluorescence, tel que défini précédemment. ϕ est caractéristique de la substance étudiée, et défini pour une température et un solvant donné.

En général : $\varepsilon C l < 0.02$, donc on peut faire l'approximation : $e^{-\varepsilon C l} \approx 1 - \varepsilon C l$

D'où l'on déduit :

$$F = \varphi I_0 \varepsilon C l$$

L'intensité du rayonnement de fluorescence est directement proportionnelle à la concentration de la substance fluorescente présente dans la solution ainsi qu'à l'intensité de l'excitation.

Cette relation souffre les mêmes limites d'applications que la loi de Beer-Lambert sur laquelle elle s'appuie. En pratique, on observe que l'intensité de fluorescence varie linéairement avec la concentration en fluorophore dans le cas de solutions diluées. Pour des concentrations élevées, l'intensité de fluorescence n'est plus proportionnelle à la concentration et peut même décroître quand on augmente la concentration de fluorophore, en raison des phénomènes de quenching dynamique (le fluorophore à l'état excité est désactivé en subissant un contact avec une autre molécule) ou statique (le fluorophore établit un complexe stable et non fluorescent avec une deuxième molécule fluorescente).

La spectroscopie de fluorescence se révèle beaucoup plus sensible que les spectroscopies vibrationnelles, car les coefficients d'extinction molaire observés pour les transitions électroniques sont en général supérieurs d'un facteur 10 à 100 à ceux rencontrés dans les transitions vibrationnelles. Les meilleurs fluorophores peuvent être détectés jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10⁻⁹ M. La spectrofluorimétrie est également plus sélective car toutes les substances qui absorbent ne fluorescent pas obligatoirement.

v. Résolution latérale

La résolution latérale en microspectrométrie de fluorescence est soumise au même critère qu'en infrarouge. Par conséquent pour des illuminations dans le domaine du visible, la résolution latérale maximale est de l'ordre de 250 nm. En pratique, les objectifs utilisés ayant une d'ouverture numérique de 0,25, la résolution spatiale est plutôt de l'ordre du micromètre.

vi. Applications biomédicales

La spectroscopie de fluorescence est proposée comme outil de diagnostic dans les explorations endoscopiques ou per-opératoires (Liu 1992; DaCosta 2007; Han 2009). Elle

utilise l'autofluorescence des tissus et permet, comme la spectroscopie infrarouge, la discrimination entre des spectres "pathologiques" et des spectres "sains".

La microspectrofluorimétrie, également appelée microspectroscopie de fluorescence ou imagerie spectrale confocale, **a révélé la distribution subcellulaire de différentes molécules anticancéreuses**: doxorubicine (Gigli 1988; Millot 1989; Morjani 1992; Morjani 1997; Fourre 2006), pirarubicine (Belhoussine 1998) et mitoxantrone (Feofanov 1997; Feofanov 1999; Breuzard 2006; Vibet 2007).

2.2.4 Autres types de microspectroscopies

i. <u>Microspectroscopie Raman</u>

Tout comme la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman étudie les transitions vibrationnelles des molécules et apporte des informations sur les liaisons chimiques présentes dans un échantillon. Basées sur des règles de sélection différentes, les deux types de spectroscopie apportent des informations complémentaires (Dalibart 2006). Les solutions aqueuses sont par exemple couramment étudiées en spectroscopie Raman, car le signal de l'eau est faible.

Les deux méthodes vibrationnelles ont des sélectivités globalement similaires. La spectroscopie Raman classique (c'est-à-dire ne combinant pas des techniques d'exaltation du signal : Raman de résonance, SERS...) est en général moins sensible que l'infrarouge (Dalibart 2006). L'utilisation de la spectroscopie Raman à des fins quantitatives est possible (De Beer 2006; Strachan 2007).

La microspectroscopie Raman donne une meilleure résolution spatiale que l'infrarouge car elle utilise des rayonnements de plus faibles longueurs (visible ou proche IR). Ainsi avec une source à 785 nm, on peut avoir une résolution latérale comprise entre 400 nm et 1 µm.

En biologie, les applications de la spectroscopie Raman sont assez proches de celles de la spectroscopie infrarouge. Elles ont principalement un but diagnostic dans le domaine du cancer, avec la différence que la spectroscopie Raman peut être entreprise *in vivo* sur sujet vivant du fait de sa non-sensibilité au contenu en eau (Choo-Smith 2002; Eikje 2005; Owen 2006; Krafft 2009). Ont notamment été étudiés les cancers de la peau (Nijssen 2002; Sigurdsson 2004; Ly 2008), du cerveau (Koljenovic 2002; Amharref 2007; Krafft 2007), du poumon (Huang 2003; Yamazaki 2003; Draux 2009), du foie (Hawi 1996), du colon (Molckovsky 2003; Krafft 2008), de la prostate (Crow 2003; Taleb 2006), des voies génitales (Liu 1992; Mahadevan-Jansen 1998; Krishna 2007), du sein (Frank 1994; Henry 1996; Manoharan 1998). Elle a été utilisée pour la caractérisation biochimique de plaques d'athérome dans les artères (Baraga 1992; Romer 1998; Van de Poll 2003), de caroténoïdes dans l'œil (Bernstein 2004), de calculs rénaux (Paluszkiewicz 1998).

En pharmacologie, spectroscopie et imagerie Raman ont été utilisées pour la caractérisation *in vitro* de médicaments sous forme solide dans des comprimés, gélules ou matrices (Breitenbach 1999; Bugay 2001; Treado 2001). La technique a également été appliquée pour la quantification de substances actives dans des implants (Milne 1997; Geze 1999).

L'imagerie Raman a permis d'étudier *in vitro* sur des cultures cellulaires la distribution de principes actifs à l'échelle subcellulaire : antinéoplasique (paclitaxel (Ling 2002), mitoxantrone (Breuzard 2004)), testostérone (Coutts-Lendon 2003). **Tfayli et al. ont suivi ex vivo la pénétration d'un antibiotique à travers des échantillons de peau excisée** jusqu'à une profondeur de 40 µm (Tfayli 2007). Enfin la technique a été appliquée *in vivo* à l'étude de la distribution d'antibiotique/antifongique dans l'œil (Hosseini 2003).

ii. Spectrométries de fluorescence X

La spectrométrie de fluorescence X étudie les transitions électroniques des couches internes des atomes. Elle donne des informations sur la composition élémentaire d'un prélèvement, indépendamment de tout effet de son environnement chimique : un faisceau incident de rayons X arrivant sur un échantillon ionise un atome dans une couche profonde (K, L, M). La lacune ainsi créée est comblée par un électron d'une couche supérieure. La descente de l'électron vers un niveau énergétique moins élevé provoque l'émission d'un photon situé dans la gamme des rayons X sur le spectre électromagnétique et dont l'énergie est caractéristique de la transition. Aujourd'hui un faisceau incident de noyaux H⁺ remplace souvent le faisceau de rayons X (PIXE, particule induced X ray emission) (Moretto 2004). Dernièrement se sont développées des méthodes de focalisation des faisceaux d'ions, qui permettent la mise en œuvre de la méthode PIXE à l'échelle microscopique. Il est alors possible, en balayant l'échantillon, d'obtenir une analyse point par point et donc une cartographie chimique élémentaire (méthode micro-PIXE) (Moretto 2004; Berger 2005).

La méthode est quantitative avec une assez bonne sensibilité (entre 10 ppb et 1 ppm) (Petibois 2008). Une quantification absolue peut être obtenue par un couplage RBS (rétrodiffusion Rutherford) réalisé au cours de la même analyse. Les sondes les plus performantes donnent une résolution spatiale de l'ordre de 300 nm, avec une zone d'analyse allant jusqu'à 2 x 2 mm² (Moretto 2004).

En biologie, l'imagerie de fluorescence X a principalement servi à établir des cartographies cellulaires de différents éléments endogène, tels K, Ca, Mg, Fe, etc (Lyaruu 1990; Moreton 1994; Mauro 1998; Yun 1998; Michelet-Habchi 2003; Guiet-Bara 2004; Abnet 2005), ou exogènes, tels que le plomb (Lindh 1989), le chrome (Dillon 1998), le titane (Taira 2006) ou encore le cadmium (Nagamine 2007).

En pharmacologie, elle a permis à Los et al. de démontrer une différence de concentration et de répartition du cisplatine dans des tumeurs intrapéritonéales expérimentales après une administration intraveineuse ou intrapéritonéale (Los 1990). D'autres études ont par la suite repris la technique pour évaluer la distribution et la concentration tissulaire de différents anticancéreux dérivés du platine (Mauthe 1998; Duvillard 1999; Sakurai 2008).

iii. Spectrométries de masse

Différents dispositifs instrumentaux utilisent la spectrométrie de masse pour réaliser des images spectrales. Dans le domaine de la biologie, les deux plus connues sont la spectrométrie de masse à ionisation secondaire (**SIMS**) et la désorption / ionisation laser assistée par matrice (**MALDI**) (Todd 2001).

La SIMS est une technique d'analyse de surface utilisée pour faire des cartographies de la composition élémentaire, isotopique ou moléculaire d'un échantillon. Elle repose sur l'émission de particules secondaires à partir des premières couches d'atomes d'un échantillon solide sous l'effet du bombardement d'un faisceau d'ions primaires très énergétiques (souvent Cs⁺, Ar⁺ ou Ga⁺). Sous l'impact, les liaisons chimiques sont rompues, et les atomes ou des combinaisons d'atomes sont libérés, soit sous forme neutre, soit sous forme chargée (ions). Par un jeu de lentilles électromagnétiques, le faisceau d'ions secondaires est amené dans un spectromètre de masse. Chaque ion est sélectionné en fonction de son rapport masse/charge tout en conservant l'information topologique de l'origine de l'émission. Les ions sélectionnés sont ensuite soit comptés pour quantification, soit guidés par des lentilles de projection sur un écran de visualisation pour l'imagerie (Clerc 1997, Darque-Ceretti 1998, Todd 2001).

La MALDI utilise un procédé différent pour générer des espèces ioniques. L'échantillon, inclus dans une matrice cristalline, est irradié par des photons émis par un laser dont la longueur d'onde est située dans la bande d'absorption de la matrice. L'irradiation du mélange cristallin donne lieu à la désorption d'ions caractéristiques de l'échantillon ensuite analysés par spectrométrie de masse. La méthode est plus spécifiquement dédiée à l'analyse des molécules de haut poids moléculaires (>1000 Da), peptides et protéines (Todd 2001).

En SIMS, on peut théoriquement détecter tous les éléments de la classification périodique. Le seuil de détection des ions étudiés dépend principalement de leur nature. La sensibilité est de l'ordre de 0,1 ppb (Petibois 2008). L'analyse quantitative par comptage des ions secondaires sélectionnés est possible. Cependant dû à des effets de matrice importants, la quantification absolue reste difficile. La concentration de l'élément recherché doit préférentiellement être faible (typiquement < 1%) pour que la relation entre le signal détecté et la concentration soit linéaire (Darque-Ceretti 1998).

La résolution latérale est inférieure à 100 nm, la meilleure pour les techniques microspectroscopiques présentées ici (Petibois 2008). A noter cependant que la taille maximale du champ d'acquisition est d'environ 400x400 µm² (Clerc 1997).

Les méthodes d'imagerie par spectrométrie de masse ont été utilisées pour l'analyse de la distribution au niveau cellulaire de différents composés endogènes : protéines (Todd 2001; Chaurand 2003) ou cholestérol (Nygren 2004). Si l'analyse est effectuée dans des conditions contraignantes (sous vide, très haute pression), des techniques de préparation ont adaptées et validées pour l'analyse d'échantillons biologiques (Fragu 1997; Todd 2001).

Plusieurs études pharmacologiques ont évalué la distribution tissulaire / cellulaire soit de **médicaments possédant un élément halogéné facilement ionisable**, tels le 5-fluorouracil (Fragu 1997) la clofazimine (Cliff 2003), la clozapine (Todd 2001) ou la mefloquine (Adovelande 1994), soit de médicaments marqués par un isotope stable de concentration physiologique faible (²H, ¹³C, ¹⁵N) (Guerquin-Kern 1997) ou par un isotope radioactif à longue durée de vie (³H, ¹⁴C) (Hindie 1989)

2.2.5 Intérêt des microspectroscopies pour notre étude

Toutes les techniques microspectroscopiques répondent aux critères définis pour l'étude des chimiosphères.

Elles sont applicables sur des échantillons biologiques et des coupes de tissus, elles fournissent une cartographie moléculaire quantitative et elles ont une résolution spatiale très inférieure à la taille de la bille.

Le choix de la technique à utiliser dépend de la molécule à étudier, ou plus précisément de ses propriétés spectroscopiques par rapport à celles de la bille et du tissu.

Les techniques utilisant les spectromètres de fluorescence X ou spectromètres de masse pourraient être employées pour des principes actifs contenant un atome présent à faible concentration dans les milieux biologiques (fluor, platine). Ce n'est pas le cas des molécules actuellement chargées dans les chimiosphères.

La microspectrofluorimétrie est la méthode à privilégier pour les molécules naturellement fluorescentes du fait de son excellente sensibilité.

Les microspectroscopies vibrationnelles peuvent potentiellement servir pour toutes les substances, excepté peut-être les molécules de la biothérapie dont le spectre est sans doute proche de celui des molécules endogènes.

	Microspectro. de fluorescence	Microspectro. infrarouge	Microspectro. Raman	Spectro. de masse	Spectro. de fluorescence X
Sensibilité (LLOD/LLOQ)	10 ⁻⁷ M	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁵ M
Résolution spatiale	250 nm	10 μm	250 nm	100 nm	300 nm
Principes actifs étudiés en microspectroscopie	anthracyclines mitoxantrone	ibuprofène	paclitaxel mitoxantrone testostérone	5-fluorouracil clofazimine mefloquine	cisplatine

Tableau 4 – Principales caractéristiques des techniques microspectroscopiques.

2.3 Problématique sur l'utilisation des microspectroscopies

Deux techniques microspectroscopiques ont été rapportées pour l'étude *in vitro* de deux des principes actifs chargeables dans les chimiosphères : la microspectroscopie infrarouge pour évaluer l'imprégnation d'une matrice polymérique par l'ibuprofène et la microspectroscopie de fluorescence pour la localisation intracellulaire de la doxorubicine.

Aucune de ces techniques n'a été utilisée *ex vivo* sur des échantillons tissulaires. Aucune n'a été validée pour la quantification de principes actifs.

On ignore également si les performances des différentes microspectroscopies sont compatibles avec les concentrations de médicament présentes dans la chimiosphère ou dans le tissu autour de la bille.

En pratique, il a fallu démontrer la faisabilité d'une utilisation des microspectroscopies pour détecter et quantifier sur prélèvement tissulaire, les différents principes actifs libérés par les chimiosphères, et définir pour chaque médicament quelle technique utiliser pour répondre à quelle question et dans quelles limites.

Partie II
Travaux personnels

Objectifs généraux du travail de thèse

Les "chimiosphères" sont de nouvelles microsphères d'embolisation synthétiques et calibrées, qui peuvent être chargées avec des solutions de principes actifs. En tant que vecteur pharmaceutique, elles doivent fournir une libération contrôlée du médicament.

Trois chimiosphères sont actuellement disponibles sur le marché, en phase d'évaluation clinique pour différentes applications :

- une chimiosphère de PVA chargeable en ibuprofène (Bead BlockTM, Biocompatibles UK Ltd) pour la réduction des douleurs dans l'embolisation de fibromes utérins ;
- une chimiosphère de PVA modifiée par des groupements sulfonate, chargeable en doxorubicine ou en irinotécan (DC BeadTM, Biocompatibles UK Ltd), pour le traitement des tumeurs hépatiques et des tumeurs pulmonaires non opérables ;
- une chimiosphère de PVA/acrylate modifiée par des groupements carboxylate, chargeable en doxorubicine ou en oxaliplatine (HepaSphereTM, Biosphere Medical Inc), pour les mêmes applications en oncologie.

Il n'a jamais été démontré pour aucun de ces produits que le médicament est effectivement libéré dans le tissu cible, à quelle dose, pendant combien de temps et jusqu'à quelle distance de la bille.

Ces questions ont été étudiées séparément pour chaque couple bille / médicament, car les critères d'efficacité dépendent de l'application médicale.

Les microspectroscopies sont une approche intéressante pour évaluer ces paramètres. Elles sont applicables directement sur une coupe de tissu contenant l'implant, et elles pourraient fournir une cartographie quantitative de la molécule à la fois dans la bille et dans le tissu environnant. Les caractéristiques spectroscopiques de la substance d'intérêt déterminent le choix de la technique. On doit donc définir pour chaque couple bille / médicament quel(s) type(s) de microspectroscopie peut (peuvent) être utilisé(s).

Plan des études et objectifs particuliers

Trois couples bille / médicament ont été étudiés au cours de ce travail :

- 1. la chimiosphère de PVA chargée en ibuprofène. Nous avons cherché à mesurer par microspectroscopie infrarouge la concentration du médicament dans la bille et dans le tissu. Nous avons utilisé des échantillons d'une étude préclinique sur un modèle d'utérus de brebis, prélevés à différents délais après embolisation. Les résultats ont été comparés rétrospectivement aux résultats de l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire des chimiosphères réalisée sur les mêmes prélèvements.
- 2. la chimiosphère de PVA modifiée par des groupements sulfonate et chargée en doxorubicine. Les objectifs ont été d'appliquer à nouveau la microspectroscopie infrarouge pour quantifier le médicament dans la bille et de valider la microspectroscopie de fluorescence pour mesurer les concentrations dans le tissu autour de la bille. Trois études ont été réalisées : in vitro, sur un modèle de diffusion dans un gel de collagène ; préclinique, sur un modèle de foie de porc sain non-tumoral ; clinique, sur des prélèvements de patients cirrhotiques porteurs de carcinome hépatocellulaire. Les résultats de la quantification de l'antinéoplasique ont été comparés aux lésions tissulaires évaluées en histologie lors de notre étude.
- 3. la chimiosphère de PVA modifiée par des groupements sulfonate chargée en irinotécan. Notre objectif était de valider la microspectroscopie infrarouge pour quantifier le médicament dans la bille. Ce travail s'inscrit dans une étude plus large de toxicité dans un modèle non tumoral d'embolisation de l'artère pulmonaire chez le mouton.

Chapitre 1

Chimiosphère d'ibuprofène

Tableau 5 – Données cliniques sur les fibromes utérins et l'embolisation.

Incidence	20-50 % des femmes10-20 % de fibromes symptomatiques
Traitements	 médicamenteux (analogues progestérone ou GnRH) chirurgie (myomectomie, hystérectomie) embolisation (UFE)
Indications UFE	fibromes symptomatiques
Nombre de femmes traitées par UFE	 13.000 à 14.000 aux USA en 2004 croissance annuelle de 5 à 10%
Résultats à long terme	 amélioration des symptômes : 90% à 1 an, 80% à 4 ans taux de récurrence : entre 5 et 29%
Complications (douleurs)	 92% des patientes bi-phasiques : intenses pendant les premières 24 h et modérées sur la première semaine.
Intérêt d'une chimiosphère d'ibuprofène	Réduction des douleurs post-embolisation

1.1 Contexte médical : l'embolisation de fibrome utérin

1.1.1 Fibromes utérins

i. Incidence, étiologie et pathogénie

Le léiomyome ou fibrome utérin est une tumeur bénigne, fibreuse et nodulaire développée à partir des fibres musculaires de l'utérus. L'incidence réelle du fibrome n'est pas connue, car la maladie est dans la majorité des cas asymptomatique et ne nécessite aucun traitement. Des études après autopsies rapportent que **20 à 50% des femmes** en post mortem ont des fibromes, tandis que des examens pathologiques sur spécimens chirurgicaux suggèrent une incidence de près de 77% (Rongieres 1999; Stewart 2001; Okolo 2008).

Les facteurs épidémiologiques démontrés sont l'**âge** (probabilité d'apparition plus élevée entre 40 et 50 ans), le **groupe ethnique** (femmes noires), le **poids** (obésité), les **antécédents de grossesse** (nulliparité) et l'**historique familial** (antécédents) (Rongieres 1999; Okolo 2008).

Les mécanismes d'apparition et de croissance des fibromes ne sont pas complètement élucidés. Il a été démontré que chaque nodule tumoral se développe à partir d'une cellule unique, même si le facteur déclenchant la transformation tumoral n'est pas connu (Okolo 2008). Le taux de corrélation de survenue d'une hystérectomie étant plus élevé parmi les jumelles monozygotes que parmi les jumelles dizygotes, une origine génétique des fibromes a été suspectée (Christin-Maitre 1999). Les études de clonalité ont démontré le caractère monoclonal des fibromes. Les aberrations cytogénétiques surviennent secondairement à l'expansion initiale du clone de cellules tumorales. Cependant ces anomalies ne sont pas constantes (40 % à 50 % des fibromes) et sont très hétérogènes. Les hormones (œstrogènes et progestérone) jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la croissance des fibromes, comme suggéré par diverses observations cliniques : les fibromes sont présents chez des femmes cyclées, ils régressent après la ménopause dans un climat d'hypoestrogénie; les agonistes de la progestérone ou de la GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) diminuent la taille de ces tumeurs. Les effets des hormones pourraient être soit directs, soit indirects via certains facteurs de croissance tels que le facteur de croissance épidermique (EGF). Il n'y a jamais d'évolution cancéreuse de la maladie.

ii. <u>Diagnostic, classification, traitement</u> (Stewart 2001; Evans 2007)

Le diagnostic du fibrome utérin est souvent suggéré par la palpation d'un contour utérin augmenté et irrégulier lors de l'examen pelvien. Une échographie est alors prescrite pour confirmer le diagnostic et éliminer la possibilité d'un néoplasme ovarien. L'IRM permet de compléter le bilan en cas de doute diagnostique (fibrosarcome, adénomyose), d'établir une cartographie précise dans le cas d'un utérus polymyomateux et permet de mesurer la vascularisation du fibrome, un facteur pronostique.

Près de 80 à 90% des fibromes sont asymptomatiques et ne doivent faire l'objet d'aucun traitement. Les symptômes correspondent principalement à des ménorragies (augmentation de la durée et de l'abondance des règles), métrorragies (survenue de saignement en dehors de la période de règles), douleurs pelviennes et compression des organes de voisinage (vessie, uretère, rectum). Le fibrome utérin peut également être responsable d'infertilité par obstruction des trompes ou obstacle à l'implantation.

Un fibrome peut être unique ou multiple (jusqu'à plusieurs dizaines). La taille est variable, allant de quelques millimètres à plusieurs dizaines de centimètres. De même leur poids peut varier de quelques grammes à plusieurs kilogrammes. Les fibromes sont souvent classifiés en fonction de leur siège anatomique qui est le premier facteur pronostique. On distingue, depuis la cavité utérine, les fibromes sous-muqueux, interstitiel ou intramural et sous séreux (Figure 15).

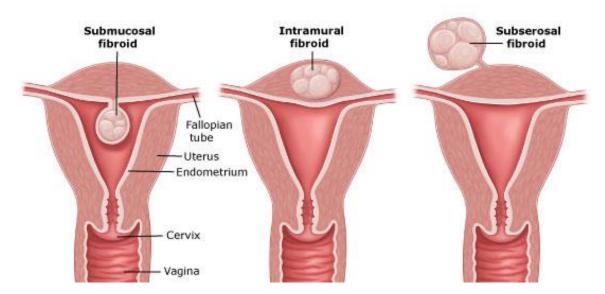


Figure 15 – Localisation des fibromes utérins (http://www.uptodate.com).

Les facteurs déterminant le type de thérapie sont la localisation et la taille des fibromes, les symptômes, l'âge et le désir de grossesse de la patiente (Tableau 6).

Le traitement médicamenteux usuel utilise des agonistes de la progestérone ou de la GnRH. L'efficacité de ce traitement est le plus souvent transitoire.

La résection chirurgicale est dans la plupart des cas nécessaire pour les symptomatologies invalidantes. Elle correspond soit à une myomectomie, résection des seuls fibromes, soit à une hystérectomie totale, selon le nombre, la taille et la position des tumeurs.

L'embolisation (ou uterin fibroid embolization UFE) peut être proposée dans certains cas alternativement à la chirurgie.

En 2004, on estimait aux USA à 200.000 le nombre d'hystérectomies pratiquées pour le traitement de fibromes utérins. En comparaison, le nombre de procédures d'UFE était compris entre 13.000 et 14.000 (SIR 2009). La même année, une étude française estimait que 50.000 femmes au total avaient été traitées dans le monde par cette technique (Le Dref 2004).

Patient characteristics	Treatment options
Asymptomatic women	Observation
Symptomatic women who desire fertility preservation	Nonsurgical treatment or myomectomy
Symptomatic women who do not desire future fertility but wish to preserve the uterus	Nonsurgical treatment or myomectomy, myolysis, or uterine artery embolization
Women who desire fertility preservation and have had a pregnancy complicated by uterine fibroid tumors	Myomectomy
Infertile women with distortion of uterine cavity	Myomectomy
Women with severe symptoms who desire definitive treatment	Hysterectomy

Tableau 6 – Recommandations pour le traitement des fibromes utérins (Evans 2007).

1.1.2 Embolisation de fibromes utérins

i. <u>Principe</u>

La première embolisation de fibrome utérin fut réalisée en 1974 par le Dr Jean-Jacques Merland chez une patiente présentant un fibrome hémorragique non opérable afin de stopper les saignements qui menaçaient la vie de la patiente (Spies 2005). Les premiers résultats d'une série de 16 patientes traitées par cette technique n'ont été rapportés que 20 ans plus tard, par la même équipe de neuroradiologie (Ravina 1995). L'embolisation a non seulement permis l'arrêt du saignement mais aussi une diminution de la taille des fibromes.

La procédure s'appuie sur la vascularisation préférentielle du fibrome à partir de l'artère utérine. L'irrigation de l'utérus est principalement assurée par l'artère utérine, branche de l'artère iliaque interne (hypogastrique) (Figure 16) (Pelage 1999; Pelage 2000). Le diamètre physiologique de l'artère utérine peut varier de façon importante, entre 2 et 5 mm. Il n'existe habituellement pas de pédicule artériel assurant spécifiquement la vascularisation du fibrome. L'artère utérine, présentant un calibre augmenté, donne directement naissance à un réseau périphérique qui entoure le fibrome et envoie lui-même de petites branches centripètes vers le centre de la tumeur.

La technique consiste, sous simple anesthésie locale et après avoir cathéterisé l'artère utérine par voie fémorale, à injecter les emboles jusqu'à un point d'arrêt ou "endpoint". Ce point d'arrêt angiographique correspond à la disparition de l'hypervascularisation du fibrome utérin (Figure 17). Le régime des résistances artérielles est abaissé dans la tumeur, ce qui explique l'existence d'un flux préférentiel et donc la tendance des emboles, pourtant injectés en flux libre, à se diriger préférentiellement vers le fibrome plutôt que vers le tissu sain.

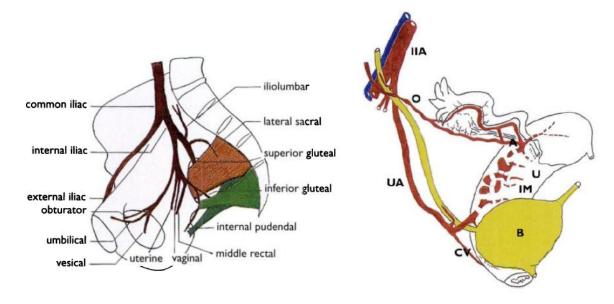


Figure 16 – Schémas anatomiques de la vascularisation de l'utérus (Pelage 1999).

U : utérus, B : vessie, IIA : artère iliaque interne, O : artère ovarienne, UA : artère utérine, CV : artère cervico-vaginale, IM : branches intra-murales, A : anastomoses entre les artères utérines et ovariennes.

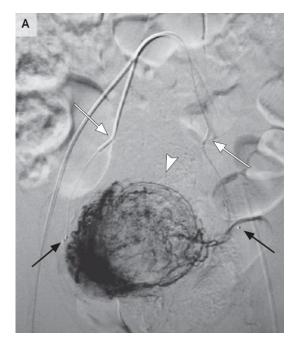




Figure 17 – Clichés artériographiques d'une embolisation de fibrome : A) avant et B) après occlusion vasculaire (Goodwin 2009).

La pointe de flèche montre le fibrome et sa vascularisation "chevelue" typique. Les flèches blanches et noires montrent respectivement l'extrémité des cathéters et microcathéters.

ii. Résultats

L'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) a récemment conclu, avec un niveau de preuve A, que "UFE is a safe and effective option for appropriately selected women who wish to retain their uteri" (ACOG 2008). Les chiffres clefs sur les résultats cliniques de l'UFE sont rapportés dans de nombreux registres ou revues (Joffre 2004; Lalonde 2005; Spies 2005; Worthington-Kirsch 2005; White 2006; Edwards 2007; Goodwin 2008; Hehenkamp 2008; Morris 2008):

- réalisation de la procédure : 98 100% ;
- complications majeures (embolie pulmonaire, sepsie, pneumonie ou formation d'une fistule vésicovaginale) : 5%;
- amélioration des symptômes : 90% à 1 an, 80% à 4 ans ;
- taux de récurrence : entre 5 et 29%, ce qui semble plus faible qu'après une myomectomie ;
- durée de l'hospitalisation : entre 6 et 48 h après la procédure. Les patientes sont aptes à reprendre le travail après une à deux semaines de convalescence.

Les indications, la prise en charge et le suivi des patientes sont clairement établis et la technique d'embolisation est relativement standardisée.

Les enjeux de l'UFE sont maintenant :

- 1. l'évaluation de l'impact de la procédure sur la fertilité et l'adoption du traitement pour les femmes avec désir de grossesse,
- 2. le traitement des douleurs post-embolisation pour une prise en charge en ambulatoire.

1.1.3 Douleurs post-embolisation

Des douleurs pelviennes modérées à sévères de type crampe sont souvent rapportées (Siskin 2002; Worthington-Kirsch 2002; Pron 2003). Ces douleurs se distribuent schématiquement de manière biphasique. Durant les premières heures (6 à 10 heures), on observe souvent une première phase de douleurs, vraisemblablement dues à la nécrose du (des) fibrome(s) ainsi qu'à l'œdème consécutif à l'ischémie au niveau du tissu sain. Des douleurs résiduelles peuvent ensuite survenir pendant 7 à 10 jours, liées principalement à la nécrose du fibrome. La diminution des douleurs au cours de cette période tient probablement au développement d'une circulation utérine collatérale.

Les douleurs liées à l'ischémie et à la nécrose tissulaire sont typiquement liées à un excès de nociception : les modifications physiologiques induites par l'occlusion vasculaire entraînent diminution du seuil d'activation des récepteurs à la douleur (nocicepteurs), activation des nocicepteurs habituellement silencieux et stimulation prolongée des nocicepteurs par les molécules localement présentes telles les prostaglandines, la bradykinine et l'histamine. Les mécanismes responsables des douleurs post-embolisation sont essentiellement locaux.

Tout comme la survenue des douleurs, **leur traitement est en général biphasique**. Différentes approches sont utilisées pour soulager les patientes pendant les premières heures suivant l'embolisation : anesthésie générale, épidurale, pompe à morphine, anti-inflammatoires, lidocaïne intra-artériel ou sédation intraveineuse (Worthington-Kirsch 2002; Spies 2005). La pompe à morphine contrôlée par la patiente associée à des antiémétiques et l'administration d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) dès la phase pré-opératoire, paraît être une méthode efficace (Siskin 2002). L'ordonnance de sortie des patientes comprend habituellement des AINS oraux tel que le kétoprofène ou l'ibuprofène (IBU) ainsi que des antalgiques en cas de douleur (Siskin 2002). La dose recommandée pour l'ibuprofène est de 600-800 mg par prise, 5 à 6 fois par jour. La durée moyenne de prise du traitement est de 7 jours (Pron 2003).

1.1.4 Apport d'une bille d'embolisation chargée en ibuprofène

L'administration locale d'un anti-inflammatoire pour la réduction des douleurs postembolisation présente un double intérêt :

- 1. une prévention des effets secondaires liés à la prise orale ou à la circulation systémique de l'AINS,
- 2. une libération du principe actif directement au lieu de l'inflammation, là où sont initiés les mécanismes de la douleur.

L'administration d'anesthésiques directement dans le cathéter avant la séance d'embolisation semble diminuer les douleurs au cours des 24 premières heures après la procédure (Keyoung 2001). L'injection d'un mélange de particule et d'une solution de kétoprofène, un autre AINS, permet de réduire les douleurs pendant les 8 premières heures, mais pas au-delà (Pisco 2008).

Le chargement de l'ibuprofène directement dans l'agent d'embolisation permettrait un contrôle de la durée et de la dose délivrée au tissu cible pour un effet analgésique prolongé.

1.1.5 Ibuprofène

i. *Chimie* (BIAM 2005)

L'ibuprofène est un anti-inflammatoire non stéroïdien. Sa formule est C₁₃H₁₈NO₂, son poids moléculaire est de 206 g/mol et son pKa est autour de 4.4. L'énantiomère de configuration S de la molécule possède une activité anti-inflammatoire significativement plus élevée que la forme R.

Figure 18 – Formule semi-développée de l'ibuprofène

ii. Pharmacocinétique (BIAM 2001)

L'ibuprofène est administré par voie orale ou rectale. De rares formulations pour application locale (crème, gel) ont également été développées.

Après administration par voie orale, l'ibuprofène est bien absorbé par le tube digestif et le taux sanguin maximum est atteint en 1 à 3 h, avec une demi-vie d'environ 2 h. Dans le liquide synovial, il peut atteindre des concentrations supérieures aux concentrations sériques. La liaison aux protéines plasmatiques est très élevée (99% chez le sujet normal) et la diffusion tissulaire peu intense.

La molécule est métabolisée pour 90% de la dose au niveau hépatique, en 2 composés inactifs par hydroxylation ou oxydation de la chaîne isobutyle. Elle est largement éliminée par les urines sous forme métabolisée. Une faible fraction est éliminée par les fèces. L'élimination est totale en 24 heures.

iii. Mode d'action

L'action antalgique des AINS est importante quand les douleurs sont dues à un excès de nociception, comme les douleurs ischémiques, où les prostaglandines jouent un rôle pathogène (Offermanns 2003). Les AINS ont en effet la propriété d'inhiber les enzymes

cyclo-oxygénases (COX) responsables de la production des prostaglandines (PGD2, PGE2, PGF2a, prostacycline, Thromboxane A2) (BIAM 2001; Lullmann 2003). La diminution de la synthèse des prostaglandines par les AINS provoque : 1) une diminution de la sensibilisation et de la stimulation des nocicepteurs (effet direct), 2) une diminution de la synthèse des autres médiateurs pro-inflammatoires de la douleur (bradykinine, histamine, sérotonine) (effet indirect) et 3) une inhibition de l'augmentation de la perméabilité capillaire et de la migration leucocytaire, induisant une diminution de la vasodilatation, de l'œdème et finalement de la douleur. Les mécanismes d'action du médicament sont donc essentiellement locaux, contrairement aux analgésiques opiacés (pompe à morphine) inhibant la transmission du message nociceptif au niveau du système nerveux central (Lullmann 2003).

L'ibuprofène agit sur les 2 isoformes des COX ce qui explique à la fois ses effets thérapeutiques et ses effets secondaires. Les effets indésirables sont généralement dose-dépendants. Ils sont liés à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines dont certaines ont un rôle protecteur de l'estomac et des reins (BIAM 2005). Ainsi les principaux effets indésirables des AINS sont des douleurs épigastriques et une insuffisance rénale. Certains rares cas d'hypersensibilité à l'ibuprofène ont été rapportés et il est déconseillé d'absorber cette molécule si le patient présente des antécédents d'hypersensibilité à l'aspirine.

1.2 Libération tissulaire dans un modèle expérimental d'utérus sain

Article n°1: Infrared microspectroscopy analysis of Ibuprofen release from drug eluting beads in uterine tissue. J. Namur, M. Wassef, J.P. Pelage, A. Lewis, M. Manfait, A. Laurent. *J Control Release* 2009; 135 (3): 198-202.

1.2.1 Travaux antérieurs sur la chimiosphère d'ibuprofène

Deux études ont été menées préalablement par l'équipe de Laurent et al. sur les billes chargées en ibuprofène (IBU-BB). Une première étude sur leur cinétique d'élution *in vitro* a suggéré que les IBU-BB libèrent la quasi-totalité de leur contenu médicamenteux en quelques heures (Figure 19A) (Borovac 2006). Une seconde étude a montré à l'aide d'un anticorps anti-IBU, que le médicament était toujours présent dans la bille une semaine après embolisation (Figure 19B), suggérant que la libération de l'AINS peut être prolongée *in vivo* par rapport aux prédictions du modèle *in vitro* (Wassef 2008). La même étude a montré que les billes IBU-BB sont associées à une diminution locale de la réaction à corps étranger à une semaine.

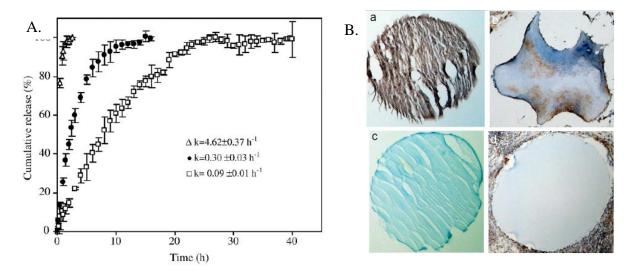


Figure 19 – Principaux résultats des études antérieures sur les IBU-BB.

A) Pourcentages cumulatifs de libération d'ibuprofène par des IBU-BB *in vitro* dans trois appareils de dissolution (Borovac 2006). B) Photographies de coupes de bille marquées par un anticorps anti-IBU et montrant des IBU-BB à t=0 (a) ou 1 semaine (b) et des billes contrôle non chargées aux mêmes délais (c et d).

1.2.2 Objectif

Notre travail avait un double objectif. Il s'agissait tout d'abord d'apporter la preuve jusqu'alors incertaine d'une libération prolongée du médicament *in vivo* en quantifiant le médicament dans la bille à différents temps après implantation. Cette étude devait également permettre de valider l'utilisation de la microspectroscopie infrarouge pour un vecteur de chimioembolisation chargé avec une substance non toxique.

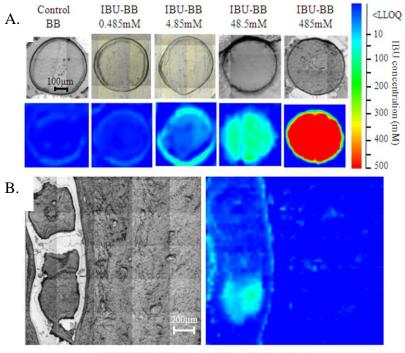
1.2.3 Matériel et méthodes

L'embolisation bilatérale des artères utérines a été réalisée chez douze brebis avec des microsphères chargées en ibuprofène (IBU-BB, chargement 485 mM, 6 animaux) ou des microsphères contrôle non chargées (BB, salin, 6 animaux). Les animaux ont été sacrifiés 24 heures ou 1 semaine après embolisation. Des coupes fines de prélèvements utérins congelés ont été effectuées et analysées par microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR-MS). Sur les images infrarouges enregistrées, nous avons récupéré des spectres au niveau des billes et au niveau du tissu autour des billes, puis mesuré l'absorbance sur les pics caractéristiques du médicament. Enfin la concentration d'ibuprofène a été calculée à partir d'une courbe-étalon établie avec des billes chargées avec des concentrations connues d'ibuprofène.

1.2.4 Résultats

Le signal infrarouge de l'ibuprofène est détecté *in vitro* dans les billes chargées à 485, 48.5 et 4.85 mM. La corrélation entre l'absorbance et la concentration de chargement est élevée sur le pic à 1512 cm⁻¹ correspondant à la vibration des liaisons C-C du noyau aromatique (coefficient de corrélation de Spearman Rho = 0.949, p < 0.0001).

La concentration à l'intérieur des billes est de 18.6 mM à 24 heures et 4.9 mM à 1 semaine. La concentration de médicament au niveau de la paroi vasculaire est de 8 mM à 24 heures et n'est pas détectable à une semaine.



IBU-BB 485mM in tissue (24 hour implantation)

Figure 20 – Images infrarouges de IBU-BB sur un pic spécifique de l'ibuprofène (1512 cm⁻¹). A) IBU-BB chargées à différentes concentrations de médicament *in vitro*; B) coupe de tissu montrant 3 IBU-BB dans un vaisseau, 24 h après embolisation (graphical abstract de l'article)

1.2.5 Conclusions

L'utilisation de la FTIR-MS pour la quantification du médicament dans la bille in situ est faisable. Les IBU-BB libèrent leur contenu d'anti-inflammatoire sur une période d'au moins une semaine. L'élution est biphasique, avec une libération massive dans les premières 24 heures, puis une libération d'une dose plus faible, probablement active, sur les jours suivant. La persistance des effets anti-inflammatoires des IBU-BB à une semaine démontrée par l'étude immunohistochimique, peut être expliquée par la première phase ou la deuxième phase de libération ou plus probablement par une combinaison des deux.

1.2.6 Perspectives pour les chimiosphères ibuprofène

La FTIR-MS, avec une sensibilité mesurée d'environ 5 mM, convient parfaitement pour la quantification de l'IBU dans la bille, chargée à des concentrations 100 fois plus élevées. Il semble tout à fait pertinent d'appliquer la technique à d'autres types de vecteur ou principe actif.

La méthode n'est probablement pas la plus adaptée pour une quantification tissulaire de l'ibuprofène, dont les concentrations actives sont autour de 10⁻⁶ M.

Des essais de faisabilité ont été menés en microspectroscopie Raman sur les billes chargées en ibuprofène. La technique a démontré les mêmes performances que l'infrarouge en termes de limite de quantification et de linéarité, mais pour des temps d'acquisition 5 à 6 fois plus longs. Aussi la méthode n'a pas été retenue pour ce couple bille / principe actif.

Cette étude a montré la faisabilité de la technique de microspectroscopie infrarouge pour quantifier le médicament. Il nous faut maintenant **caractériser et valider la méthode** pour une utilisation en routine. Les étapes d'acquisition et de traitement des données ont été optimisées au cours de ce travail. Les résolutions spatiales et spectrales, modes de normalisation, méthodes de mesures d'intensités ou décompositions spectrales donnant la meilleure sensibilité ont également été établies. La linéarité (points de la gamme de calibration) et les limites de détection / quantification doivent être déterminées de façon plus précise.

L'étape suivante, d'un point de vue médical, consiste à démontrer que les propriétés d'élution des billes permettent une diminution de ces douleurs chez les patientes. Suite à notre travail, une **étude clinique** multicentrique a été lancée sur une vingtaine de patients pour vérifier l'efficacité du produit. Les résultats sont attendus prochainement.

Journal of Controlled Release 135 (2009) 198-202



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Controlled Release

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jconrel



Infrared microspectroscopy analysis of Ibuprofen release from drug eluting beads in uterine tissue

J. Namur ^{a,*}, M. Wassef ^b, J.P. Pelage ^c, A. Lewis ^d, M. Manfait ^a, A. Laurent ^{e,f}

- a MéDyC UMR CNRS 6237, unité MéDIAN, Université de Reims Champagne Ardennes, 51 rue Cognaq-Jay, 51096 Reims, France
- ^b Pathology Department, Lariboisière Hospital, 10 rue Ambroise, 75010 Paris, France
- ^c Radiology Department, Ambroise Paré Hospital, 9 avenue Charles de Gaulle, 92104 Boulogne-Billancourt, France
- d Biocompatibles UK, Ltd, Farnham Business Park, Weydon Lane, Farnham, Surrey, GU9 8QL, UK
 Matière et Système Complexes, UMR CNRS 7057, Université Paris 7, 2 place Jussieu, 75006 Paris, France
- f Center for Research of Interventional Imaging (CR2i, AP/HP-INRA), Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas, France

Abstract

Ibuprofen loaded embolization beads (IBU-BB) have been developed to reduce inflammation and pain following uterine artery embolization for the treatment of uterine fibroids. The present work has investigated the elution properties of IBU-BB in situ after embolization with Fourier Transform Infrared Microspectroscopy (FTIRMS). Twelve sheep underwent uterine artery embolization with IBU-BB (485 mM) or control unloaded beads. IBU concentration was determined inside the beads and in the tissue surrounding the beads using FTIRMS of uterine tissue sections sampled 24 hours or 1 week after embolization.

After 24 hours, IBU concentration inside the bead was only 18.6 mM out of the 485 mM initially loaded (p<0.0001, univariate sign test). The concentration in the tissue around the beads was 8 mM, which is well above the *in vitro* therapeutic levels (6 µM). After one week the concentration of IBU had decreased to 4.9 mM in the beads (p=0.0502, Mann Whitney) and no IBU was detected in the surrounding tissue.

This work has demonstrated that IBU-BB can provide a sustained release of the antiinflammatory drug over at least one week. The *in vivo* elution properties of IBU-BB may be suitable to alleviate pain and inflammation after embolization.

Keywords

drug eluting beads; Ibuprofen; embolization; in vivo drug release; infrared microspectroscopy

1. Introduction

Bead BlockTM (BB) (Biocompatibles UK Ltd, Farnham, UK) is a polyvinyl alcohol based calibrated microsphere which has been FDA cleared for the embolization of hypervascular tumors such as uterine fibroid. To reduce the pain which is experienced by 92% of patients after fibroid embolization [1], the loading of BB with the anti-inflammatory drug Ibuprofen (IBU-BB) has been proposed [2]. IBU-BB could potentially: 1° reduce the systemic and gastric exposure to the drug, hence reduce dose-related side effects (gastric erosion, thrombasthenia or thrombocytopenia), 2° increase the local concentration of drug directly at the site of the lesion, and 3° provide a controlled delivery of IBU over an appropriate period of time.

Two studies have partially demonstrated that IBU-BB have the above mentioned benefits [3, 4]. Borovac et al. have demonstrated that a reduction of IBU plasma level is achieved after embolization with IBU-BB, when compared to a standard intra arterial administration. In addition, Borovac et al. showed in an *in vitro* model that IBU-BB provides a sustained release of the drug over a 24 hour period [3]. Wassef et al. have noted that, *in vivo*, the release of IBU may extend to several days as supported by the significant decrease of inflammatory cells around IBU-BB one week after embolization in a sheep uterus model [4].

Two matters have not been inquired yet. First, the sustained release of IBU evidenced *in vitro* has to be thoroughly demonstrated *in vivo* after embolization, through the quantification of the drug still present within the microsphere at different time points. Secondly, it has to be proven that IBU-BB does deliver high levels of the drug to the tissue surrounding the microsphere. In order to quantify IBU both in the bead and in the surrounding tissue, we propose Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIRMS). The technique is based on the coupling of a microscope with an IR spectrometer [5]. When a sample is irradiated with a beam of infrared light, peaks of absorbance, corresponding to the absorption of incident light by the molecules, appear at specific wavelengths characteristic for the sample. By coupling a microscope to the spectrometer, an IR image can be obtained and the drug distribution inside the sample can be visualized. FTIRMS has been already used to assess IBU concentration and repartition in drug formulations *in vitro* [6, 7]. Vibrational microspectroscopies have also been successfully applied *ex vivo* to track different drugs in tissue specimen [8-10].

The present work aimed to determine whether IBU-BB can provide a sustained release *in vivo* with the presence of a therapeutic amount of the drug in the tissue around the beads. To this aim, we have applied FTIRMS to histological sections of uterine tissue embolized with IBU-BB and sampled one day or one week after embolization. Our objective was to determine the amount of IBU still retained inside the beads and in the tissue around the beads at two time points.

2. Material and Methods

2.1. IBU-BB manufacturing

BB (Bead BlockTM calibrated 500-700 μm) were loaded with IBU according to a validated proprietary process (Biocompatibles UK Ltd, Farnham, UK). Briefly, lyophilized beads were placed for 1 hour in an ethanol/ibuprofen solution. Then, the excess solution was removed and the beads were dried overnight in a vacuum oven (45±5 °C). The beads were then rehydrated with demineralized water and steam sterilised by autoclaving at 121°C for 15 minutes. The amount of drug loaded inside the beads was verified in a subset of beads by complete elution and quantification of the drug in the release medium with a UV–Visible spectrophotometer [3].

2.2. IBU-BB characterization with FTIRMS

2.2.1. Sample preparation

For the *in vitro* calibration of FTIRMS, four doses of IBU-BB and a control unloaded BB were used as references. Concentration of IBU in the beads was 0.485 / 4.85 / 48.5 / 485 mM. The beads were embedded in medium for cryosection (OCT TissueTek®, Sakura) and snapfrozen. Ten micron-thick sections were cut and deposited on a Zinc Selenide slide (Crystal GmBh, Berlin, Germany) suitable for IR transmission analysis. ZnSe slides were kept frozen at -20°C before IR microspectroscopy.

A potassium bromide (KBr) pellet containing 1% w/w IBU (Ibuprofen, Sigma Aldrich, Lyon, France) was prepared and used to obtain a reference spectrum of the drug.

2.2.2. FTIRMS procedure

IBU-BB sections were analyzed with a Spectrum Spotlight 300 Fourier transform infrared imaging system (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) using the "image" mode of the instrument. A frame was defined around each microsphere and a visible image of the sample was collected. Before capturing the IR image of the sample, a reference spectrum was collected for each pixel of the detector on the ZnSe window. An IR image was then produced using a liquid nitrogen cooled 16-pixel mercury cadmium telluride (MCT-A) line detector at a 25 μm/pixel spatial resolution. An absorbance spectrum was recorded in the transmission mode for each pixel of the defined area. All spectra were recorded in the mid-IR region (4000-650 cm⁻¹) at 32 scans/pixel with a 4 cm⁻¹ spectral resolution. These conditions allowed good quality spectra with reasonable acquisition time (90 min to map a 1x1 mm² surface). A total of 47 beads were imaged with FTIRMS.

FTIR images were processed with Spotlight 1.0.0 (Perkin Elmer) and Opus 5.5 (Bruker Optik GmBH, Germany) softwares. Twelve spectra homogeneously distributed over the bead were extracted from the FTIR image and averaged to calculate the mean spectrum of each bead. The processing of the extracted spectra was adapted from protocols developed in our laboratory [11, 12] and included smoothing, cutting between 1900-800 cm⁻¹, baseline correction, normalization to correct for possible slight differences in section thickness and allow quantitative assessments and finally subtraction of the mean spectrum of unloaded beads.

The spectra of the reference products, such as IBU, were recorded using the "point" mode of the apparatus with an aperture of $100x100~\mu m^2$ and with acquisition parameters similar to those of the "image" mode.

2.2.3. Absorbance – IBU concentration calibration curve

The spectra of IBU-BB and control BB were compared statistically at each wavenumber to determine which spectral ranges were the most discriminative between IBU-BB and BB. The p value was calculated at each wavenumber with a Mann-Whitney non parametric test (Matlab 7.2, The MatWorks Inc., Natich, MA USA) [11, 13, 14]. The spectral regions where p value is statistically significant (p<0.05) correspond to the discriminative zones between IBU-BB and control BB.

The absorbance (A) was evaluated in each discriminative spectral range by measuring the area of the peak of interest. A was statistically compared between control unloaded BB and each dose of IBU-BB to determine the lowest limit of quantification (LLOQ). A at LLOQ should be at least 5 times the response compared to control BB. A was then correlated to IBU concentration using a linear regression model to obtain a calibration curve for drug quantification. Linearity was determined by Spearman correlation coefficient Rho. The accuracy was calculated with 3 samples of known concentration of IBU at 2 different doses of IBU-BB (485mM and 48.5mM). The repeatability was assessed on 3 beads at 1 dose of IBU-BB (48.5mM). Criterion for accuracy and repeatability was a relative standard deviation (RSD) inferior to 15% as recommended in FDA guidance.

2.3. IBU quantification in IBU-BB and uterine tissue

2.3.1. Embolization and sample preparation

Tissue specimens were obtained from a former study of uterine artery embolization in sheep [4].

Briefly, bilateral uterine artery embolization was performed in 12 Pre-Alpes ewes with IBU-BB loaded at 485 mM IBU or control unloaded BB (6 animals in each group). The uterine artery was catheterized via the common femoral artery and the contralateral internal iliac artery.

A volume of 1mL of microspheres (BB or IBU-BB) was suspended in a 50/50 mixture of contrast medium (Visipaque 270, Amersham) and saline at a dilution of 1/10, then injected slowly in the uterine artery under fluoroscopic control. Embolization was considered complete when 0.5mL of beads was delivered in each uterine artery. One day or one week after the procedure, sheep were euthanized according to veterinary regulatory rules (6 animals at each time point).

Uteri samples were snap-frozen in OCT and kept at -80°C. At the time of analysis, 10 µm thick sections of tissues were cut from frozen blocks and laid on ZnSe slide.

2.3.2. IR microspectroscopy and data processing

On the tissue section, an IR image of each vessel occluded by a bead was performed using the same acquisition parameters as for the in vitro characterization.

Spectra localized inside the bead or in the surrounding tissue were extracted from the IR image. In the beads, 12 spectra homogeneously distributed were extracted. In the tissue, 8 spectra were extracted around each bead, 4 spectra in the vessel wall and 4 spectra at a distance of $100~\mu m$ from the vessel. Spectra were averaged, cut, baseline corrected, normalized and subtracted according to the same protocol as in vitro.

2.3.3. IBU quantification

After spectra treatment, A was evaluated on the discriminative zones of the spectra. The concentration of IBU in the bead and in the tissue was calculated using the calibration curve

established previously. Drug concentration was then compared between time points using non-parametric tests (Statview SAS 5.0, SAS Institute, Cary, NC USA).

3. Results

3.1. *IBU-BB characterization with FTIRMS*

Figure 1 shows the infrared spectra of IBU-BB, IBU and BB, and Table 1 shows the assignement of infrared bands to chemical bond vibrations [15, 16].

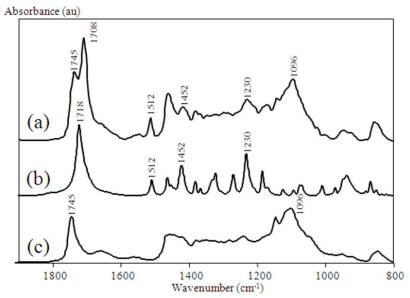


Figure 1 FTIR spectra of IBU-BB loaded with 485 mM (a), IBU in KBr pellet (b) and control BB (c). The spectrum of IBU-BB showed infrared peaks of IBU (1708, 1512, 1452 and 1230 cm⁻¹) and BB (1745 and 1096 cm⁻¹)

Table 1 Main infrared absorption band for IBU-BB 485 mM.

v (cm ⁻¹)	in IBU or BB	Assignment
1745	BB	C=O stretching (COOH)
1708	IBU	C=O stretching (COOH)
1512	IBU	C-C ring vibration
1452	IBU	C-H asymmetric bending (CH ₃) and C-H scissoring (CH ₂)
1268 1230 1184	- IBU	C-O stretching (COOH) and O-H bending
1144 1096 1044	ВВ	C-O stretching (secondary alcohol) and O-H bending

The spectra of IBU-BB and control BB were statistically differentiated in several spectral ranges corresponding to IBU absorbance peaks for doses of IBU between 4.85 and 485 mM. For the dose of IBU 0.485 mM, the spectra of IBU-BB and BB could not be differentiated on any band corresponding to the drug.

For the measurement of A, the three bands discriminative between IBU-BB 4.85 mM and BB were used. They were situated at 1708, 1512 and 1462 cm⁻¹ wavenumbers (Figure 2).

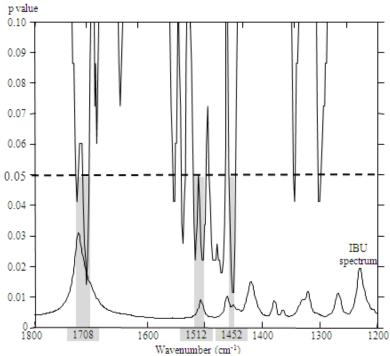


Figure 2 Plot of the Mann Whitney p value comparing the spectra of IBU-BB 4.85 mM and BB as a function of the wavenumber.

Significant differences (p<0.05) were observed in 3 spectral regions (greyed areas). These 3 regions all corresponded to peaks present in IBU spectrum (Table 1): 1708, 1512 and 1452 cm⁻¹.

A was measured on these three IBU bands and compared statistically between control BB and each dose of IBU-BB (Table 2). On the peak at 1512 cm⁻¹, A was significantly higher in IBU-BB than control BB for IBU-BB doses of 4.85 mM, 48.5 mM and 485 mM (p<0.05, univariate sign test, reference value=0) and was not statistically different for IBU dose 0.485 mM. On the two other peaks at 1708 and 1462 cm⁻¹, A was statistically higher in IBU-BB loaded with 48.5 and 485 mM only, and was not different for lower doses.

The peak at 1512 cm^{-1} was therefore considered as the most discriminative and was used for the quantification of the drug (Figure 3). The lowest limit of quantification (LLOQ) of IBU with FTIRMS was defined to be 4.85 mM in the dose range. A at this concentration was 5 times A for control BB. Correlation between A and drug concentration on this peak was high (Spearman correlation coefficient Rho = 0.949, p<.0001). A was related to the concentration of IBU via the regression line equation:

$$A \text{ (a.u.)} = 5.6 \times 10^{-4} \text{ x (IBU concentration) (mM)} + 1.46 \times 10^{-3}$$
 (1)

RSD accuracy was 14.4% and 13.5% for IBU-BB 485mM and 48.5mM respectively. RSD repeatability was 13.8% for IBU-BB 48.5mM.

Table 2 Absorbance measured on the 3 peaks of IBU for the different doses of IBU-BB (mean \pm standard deviation). * : value statistically different from control BB (p<0.05, Mann Whitney).

IBU signal could be detected down to a concentration of 4.85 mM on the peak at 1512 cm⁻¹ or down to a concentration of 48.5 mM on the peaks at 1708 and 1452 cm⁻¹.

IBU concentration	n beads	A (au) 1708 cm ⁻¹	A (au) 1512 cm ⁻¹	A (au) 1452 cm ⁻¹
0mM (BB)	9	0.007 ± 0.008	0.0006 ± 0.001	0.023 ± 0.029
0.485mM	10	0.005 ± 0.006	0.000 ± 0.000	0.013 ± 0.031
4.85mM	10	0.004 ± 0.007	$0.003 \pm 0.003 *$	0.045 ± 0.074
48.5mM	9	$0.035 \pm 0.017 *$	$0.031 \pm 0.009 *$	$0.133 \pm 0.029 *$
485mM	9	$0.703 \pm 0.130 *$	0.274 ± 0.017 *	0.396 ± 0.042 *

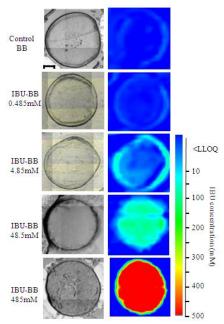


Figure 3 Control BB and IBU-BB at different doses of drug: visible image (left) and FTIR image at 1512 cm $^{-1}$ (right). Scale bar: 100 μ m.

IBU could be visualized in IBU-BB loaded with 485 mM, 48.5 mM and 4.85 mM of drug.

3.2. IBU quantification in IBU-BB and uterine tissue

3.2.1 IBU quantification in IBU-BB in uterus (Figure 4 and 5)

A total of 50 beads from 27 uteri samples were imaged with FTIRMS. After spectral treatment, A was measured on the peak at 1512 cm⁻¹ and the concentration of drug inside the bead was calculated with the equation derived from (1):

(IBU concentration) (mM) =
$$(A (a.u.) - 1.46x10^{-3}) / 5.6x10^{-4}$$
 (2)

At day 1, the mean concentration of IBU inside IBU-BB was 18.6±17.0 mM (n=17, median=9.52 mM). After 1 week, the mean concentration of IBU in the beads decreased down to 4.9±3.1 mM (n=10, median=5.9 mM), but it did not reach statistical significance (p=0.0502, Mann Whitney). At both time points, the concentration of drug inside IBU-BB was statistically lower than initially loaded (univariate sign test, reference value 485 mM). IBU was never detected in control BB at any time point.

3.2.2. IBU quantification in uterine tissue around IBU-BB (Figure 4 and 6)

On the same IR images, the amounts of drug present in the vessel wall of occluded arteries and at a $100 \, \mu m$ distance from the artery were also determined.

At day 1, IBU could be detected in the vessel wall (p<0.0001, univariate sign test, reference value 0) at a concentration of 8.8 ± 4.8 mM (n=16, median=10.5 mM), but was not detected 100 μ m from the occluded artery.

At week 1, IBU concentration was below LLOQ all around the beads both in the arterial wall and at distance from the occluded vessels.

IBU signal was absent from BB embolized tissues.

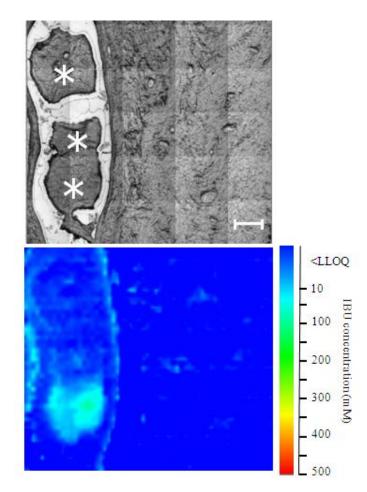


Figure 4 Uterine tissue section embolized with IBU-BB 485 mM and sampled at day 1: visible image (top) and FTIR image at 1512 cm $^{-1}$ (bottom). Scale bar: 200 μ m.

The vessel contains 3 beads (stars). IBU could be visualized in one bead and in the vessel wall.

.

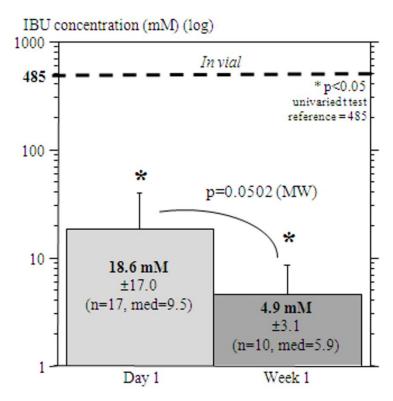


Figure 5 IBU concentration in IBU-BB in uterus at day 1 and week 1. At both time points, IBU concentration is statistically lower than initially loaded (stars). IBU concentration inside IBU-BB was not different between the two time points.

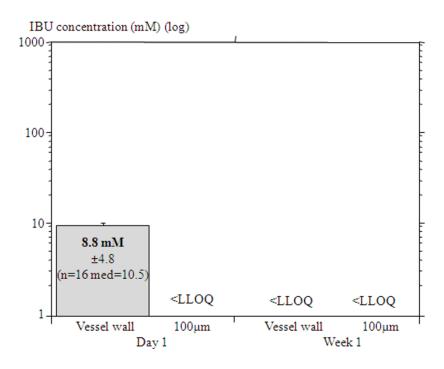


Figure 6 IBU concentration in tissue around IBU-BB in the vessel wall and at a 100 μm distance from the vessel at day 1 and week 1. At day 1 IBU could be detected in the vessel wall and could not be detected at distance from the vessel. At week 1, IBU could not be detected.

4. Discussion

4.1. Use of Fourier transform infrared microspectroscopy

Several techniques have been described in the study of IBU in biological specimens, including HPLC/electrophoresis of tissue homogenates, autoradiography with radiolabelled drug and immunohistochemistry. HPLC [17, 18] or electrophoresis techniques [19] coupled to UV-Visible detection both allow the quantification of IBU in tissular samples but require tissue homogenization which prevents any assessment of drug distribution. Microdialysis has been reported alternatively to tissue homogenization yet the procedure is very complex to set up and gives drug concentration at probe site only [20]. IBU radiolabeling coupled with autoradiography [21] allows IBU mapping on histology sections but the technique is not quantitative. Wassef et al. recently used an anti-IBU antibody to assess concentration and distribution of the drug on histology slides, after IBU-BB embolization [4]. They demonstrated that the drug was still present inside the microsphere at one week and three weeks after embolization and that the IBU labelling decreased over this period of time. The concentration of IBU could however not be determined. Furthermore, the method could not be applied to the tissue around the implant because of high unspecific background interference.

In the present study, we have demonstrated that Fourier transform infrared microspectroscopy, contrary to other techniques, allows the assessment of IBU concentration and IBU distribution at once, both inside the drug eluting bead and in the surrounding tissue. Although the lowest limit of quantification is much lower for HPLC or electrophoresis (micromolar) than for FTIRMS (millimolar), this level of sensitivity is satisfactory considering the high amount of drug which is initially loaded inside the bead. Hence, FTIRMS could potentially be applied for the quantification of any other drug loaded in the same range of concentration in the bead. Future studies of FTIRMS would require a higher level of validation, particularly regarding the definition of calibration points.

4.2. Controlled release with IBU-BB

In vitro, IBU-BB has been shown to deliver a large amount of the loaded drug within the first hours of testing [3]. These authors have also postulated that, beyond these first hours the remaining drug may be released slowly from the bead.

Our *in vivo* data confirm that IBU is eluted in two phases with a delivery that covers at least a one week period after embolization. The most important release stands within the first 24 hours, as evidenced by the low concentration of IBU inside the bead at one day compared to the initial loaded dose. Secondarily, IBU-BB elutes locally a low amount of drug, over at least a one week period, as demonstrated by the decrease of IBU concentration inside the bead over this period.

Wassef et al. have demonstrated that the anti-inflammatory effects of IBU-BB extend over one week, since a significant decrease of all the inflammatory cells present around IBU-BB was observed at this time point [4]. Our findings, when taken together with Wassef's data, suggest that an initial burst release of IBU lead to high tissue concentration of the drug which is maintained over one week. This hypothesis is however challenged by the fact that we have found low concentrations of IBU around the bead compared to the high amount of drug eluted within the first 24 hours. Thus, the IBU concentration is twice as low in the vessel wall than inside the bead, and the drug was not detected at a 100 µm distance from the occluded artery.

These results show that there is no accumulation of IBU in the surrounding tissue and suggest that the drug is rapidly eliminated after its delivery.

In fact, the tissular therapeutic dose of IBU might be much lower than the total dose administered and the small amount of the drug that is eluted locally during the first week is sufficient to induce significant anti-inflammatory effect. Accordingly, different reports show that low IBU concentrations of 6–10 μ M can inhibit COX2 activity, the main pharmacological target of non steroidal anti-inflammatory drugs such as IBU [22, 23]. These therapeutic levels are indeed 2000 times lower that the concentration still retained inside the bead at 24 hours, suggesting that IBU-BB can still retain anti-inflammatory effects beyond this time point.

To conclude, we have been able to determine the elution properties of the drug eluting bead IBU-BB *in vivo* after embolization. In the first 24 hours, IBU-BB releases rapidly a high dose of IBU which may give high tissue concentrations of drug. Up to one week after the embolization, IBU-BB can slowly release IBU at a dose which is low but sufficient to maintain anti-inflammatory effects.

Clinical trials are required to confirm that the elution properties of IBU-BB are appropriately adapted for alleviating pain classically reported by patients after uterine fibroid embolization.

Acknowledgments

This work has been supported by Biocompatibles UK Ltd. The authors would like to thank Rosie Palmer from Biocompatibles UK Ltd for the provision of different doses of IBU-BB.

References

- [1] G. Pron, E. Mocarski, J. Bennett, G. Vilos, A. Common, M. Zaidi, K. Sniderman, M. Asch, R. Kozak, M. Simons, C. Tran, J. Kachura, Tolerance, hospital stay, and recovery after uterine artery embolization for fibroids: the Ontario Uterine Fibroid Embolization Trial, J Vasc Interv Radiol 14 (10) (2003) 1243-50.
- [2] A. Lewis, R. Taylor, V. Gonzalez, Y. Tang, R. Palmer, S. Small, A. Laurent, M. Wassef, J. Namur, J. Pelage, Product optimization and characterization of Ibuprofen drug-eluting beads for use in uterine artery embolization, Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe, Roma Italy (2006), Ref Type: Conference Proceeding.
- [3] T. Borovac, J.P. Pelage, A. Kasselouri, P. Prognon, G. Guiffant, A. Laurent, Release of ibuprofen from beads for embolization: in vitro and in vivo studies, J Control Release 115 (3) (2006) 266-74.
- [4] M. Wassef, J.P. Pelage, E. Velzenberger, J. Namur, I. Schwartz-Cornil, R.R. Taylor, A.L. Lewis, A. Laurent, Anti-inflammatory effect of ibuprofen-loaded embolization beads in sheep uterus, J Biomed Mater Res B Appl Biomater 86 (1) (2008) 63-73.
- [5] M. Diem, M. Romeo, S. Boydston-White, M. Miljkovic, C. Matthaus, A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994-2004), Analyst 129 (10) (2004) 880-5.
- [6] K.L. Chan, S.G. Kazarian, High-throughput study of poly(ethylene glycol)/ibuprofen formulations under controlled environment using FTIR imaging, J Comb Chem 8 (1) (2006) 26-31.
- [7] S.G. Kazarian, G.G. Martirosyan, Spectroscopy of polymer/drug formulations processed with supercritical fluids: in situ ATR-IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP, Int J Pharm 232 (1-2) (2002) 81-90.
- [8] P. Garidel, M. Boese, Mid infrared microspectroscopic mapping and imaging: a bioanalytical tool for spatially and chemically resolved tissue characterization and evaluation of drug permeation within tissues, Microsc Res Tech 70 (4) (2007) 336-49.
- [9] P.J. Caspers, A.C. Williams, E.A. Carter, H.G. Edwards, B.W. Barry, H.A. Bruining, G.J. Puppels, Monitoring the penetration enhancer dimethyl sulfoxide in human stratum corneum in vivo by confocal Raman spectroscopy, Pharm Res 19 (10) (2002) 1577-80.
- [10] A. Tfayli, O. Piot, F. Pitre, M. Manfait, Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy, Eur Biophys J 36 (8) (2007) 1049-58.
- [11] F. Bonnier, D. Bertrand, S. Rubin, L. Venteo, M. Pluot, B. Baehrel, M. Manfait, G.D. Sockalingum, Detection of pathological aortic tissues by infrared multispectral imaging and chemometrics, Analyst 133 (6) (2008) 784-90.
- [12] A. Tfayli, O. Piot, A. Durlach, P. Bernard, M. Manfait, Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy, Biochim Biophys Acta 1724 (3) (2005) 262-9.
- [13] L.M. McIntosh, M. Jackson, H.H. Mantsch, M.F. Stranc, D. Pilavdzic, A.N. Crowson, Infrared spectra of basal cell carcinomas are distinct from non-tumor-bearing skin components, J Invest Dermatol 112 (6) (1999) 951-6.
- [14] M.A. Short, H. Lui, D. McLean, H. Zeng, A. Alajlan, X.K. Chen, Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy, J Biomed Opt 11 (3) (2006) 34004.

- [15] F.S. Parker, Introduction and Brief theory, in: Plenum Press (Ed.), Applications of Infrared, Raman and Resonnance Spectroscopy in Biochemistry, Springer, New York, 1983, 1-38.
- [16] R.M. Silverstein, G.C. Basler, T.C. Morill, Spectrométrie Infrarouge, in: De Boeck Université (Ed.), Identification spectrométrique de composés organiques, John Wiley & sons Inc, Paris, Bruxelles, 1998, 91-162.
- [17] M. Dominkus, M. Nicolakis, R. Kotz, F.E. Wilkinson, R.R. Kaiser, K. Chlud, Comparison of tissue and plasma levels of ibuprofen after oral and topical administration, Arzneimittelforschung 46 (12) (1996) 1138-43.
- [18] C. Herkenne, A. Naik, Y.N. Kalia, J. Hadgraft, R.H. Guy, Ibuprofen transport into and through skin from topical formulations: in vitro-in vivo comparison, J Invest Dermatol 127 (1) (2007) 135-42.
- [19] K. Makino, Y. Itoh, D. Teshima, R. Oishi, Determination of nonsteroidal antiinflammatory drugs in human specimens by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography, Electrophoresis 25 (10-11) (2004) 1488-95.
- [20] I. Tegeder, U. Muth-Selbach, J. Lotsch, G. Rusing, R. Oelkers, K. Brune, S. Meller, G.R. Kelm, F. Sorgel, G. Geisslinger, Application of microdialysis for the determination of muscle and subcutaneous tissue concentrations after oral and topical ibuprofen administration, Clin Pharmacol Ther 65 (4) (1999) 357-68.
- [21] U. Giese, Absorption and distribution of ibuprofen from a cream formulation after dermal administration to guinea pigs, Arzneimittelforschung 40 (1) (1990) 84-8.
- [22] D.W. Cushman, H.S. Cheung, Effect of substrate concentration on inhibition of prostaglandin synthetase of bull seminal vesicles by anti-inflammatory drugs and fenamic acid analogs, Biochim Biophys Acta 424 (3) (1976) 449-59.
- [23] J.K. Gierse, C.M. Koboldt, M.C. Walker, K. Seibert, P.C. Isakson, Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases, Biochem J 339 (Pt 3) (1999) 607-14.

Points clefs sur l'étude de la chimiosphère d'ibuprofène

Microspectroscopie

- La FTIR-MS peut être utilisée pour déterminer la quantité d'ibuprofène dans un vecteur de chimioembolisation après implantation. La technique doit permettre l'étude d'autres médicaments et d'autres vecteurs.
- La FTIR-MS ne permet pas de détecter l'ibuprofène dans les tissus à des concentrations biologiquement actives. Une approche de dosage point par point avec microprélèvement pourrait être envisagée.

Chimiosphère

- Les IBU-BB délivrent *in vivo* leur anti-inflammatoire en 2 phases : 1) une libération rapide et importante de 95 % de la dose chargée en 24 heures et 2) une libération lente et ténue de 3% de la dose en une semaine.
- La cinétique de libération de l'anti-inflammatoire par les IBU-BB suit la même séquence que la survenue des douleurs post-embolisation et couvre la période habituelle du traitement analgésique.
- Les doses d'ibuprofène éluées par la chimiosphère permettent une diminution significative de la réaction inflammatoire locale à une semaine (Wassef 2008).
- Il doit maintenant être démontré que les propriétés de vectorisation des IBU-BB conduisent à une efficacité clinique (étude en cours).

Chapitre 2

Chimiosphère de doxorubicine

Tableau 7 – Données cliniques sur les tumeurs hépatiques et la chimioembolisation.

CHC : carcinome hépatocellulaire, CCR : cancer colorectal

	Tumeurs primitives (CHC)	Tumeurs secondaires
Incidence	 hommes: 14.2 p. 100.000 par an femmes: 6.0 p. 100.000 par an 	• 30 à 70 % des patients décédés d'un cancer.
Etiologie	• sur foie cirrhotique (HVB, HVC, alcool) dans 90% cas	rarement sur foie cirrhotiquecancers colorectaux, du sein, du poumon
Pronostic	 survie à 5 ans aux USA : 11% 2^{ième} plus faible après cancer du pancréas 	• survie médiane (CCR) : 16 mois
Traitements	 curatifs : chirurgie (transplantation, résection), ablation percutanée palliatifs : chimioembolisation, sorafénib 	 curatifs : chirurgie (résection) palliatifs : chimiothérapie, chimioembolisation, ablation percutanée
Indications de la chimioembolisation	palliatif: tumeurs non opérables, stade intermédiaire ou avancé, pas d'invasion portale, fonction hépatique normale	palliatif : invasion extra-hépatique, récurrence postopératoire
	 (néo-)adjuvant : en préopératoire pour réduction de la taille / nombre / vascularité des tumeurs investigation 	 (néo-)adjuvant : en préopératoire pour réduction de la taille / nombre / vascularité des tumeurs investigation
Résultats de la chimioembolisation	 réponse objective médiane (WHO) : 38 % nécrose tumorale complète : 44 % survie à 2 ans : 24 à 63 % 	• survie médiane (CCR) : 7.7 à 14 mois

2.1 Contexte médical : les tumeurs hépatiques

2.1.1 Le foie

i. Structures hépatiques (Worobetz 1997)

Le foie est situé sous le diaphragme et traverse la cavité abdominale sur toute sa largeur. Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme. Chez l'adulte sain, il pèse entre 1400 et 1600 g, plus 800 à 900 g de sang. Il mesure en moyenne 28 cm dans le sens transversal, 16 cm de haut et 8 cm d'épaisseur.

Sur le plan anatomique, le foie est formé de deux lobes principaux, le droit et le gauche, et de deux petits lobes, le lobe caudé, situé à la face postérieure, et le lobe carré, situé à la face inférieure. La vésicule biliaire est située au niveau du lobe droit.

Le lobule hépatique est l'unité anatomique du foie. Il se présente comme une structure hexagonale, centrée par une veine centrolobulaire et limitée en périphérie par une ligne imaginaire joignant plusieurs espaces portes voisins (Figures 21 et 22). Le diamètre moyen d'un lobule hépatique chez l'homme est d'environ 1 mm.

L'organisation vasculaire du foie détermine son fonctionnement. L'acinus de Rappaport, défini d'après les données hémodynamiques, constitue l'unité fonctionnelle du foie (Figure 21). Cette structure triangulaire est formée à sa base par une ligne virtuelle réunissant deux veines centrolobulaires, à son sommet par un espace porte, et centrée par le canal biliaire. Trois zones y sont délimitées, rendant compte des différences morphologiques et fonctionnelles des hépatocytes au sein du parenchyme : périportale ou afférente (zone 1), médiolobulaire ou intermédiaire (zone 2), et centrolobulaire ou efférente (zone 3).

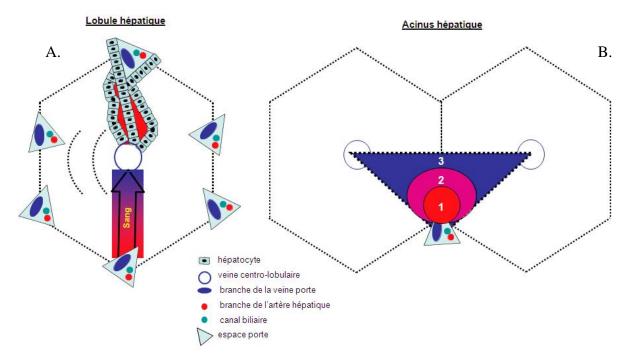


Figure 21 – A) Schémas du lobule hépatique classique, unité anatomique du foie. B) Schéma de l'acinus de Rappaport, unité fonctionnelle du foie (d'après (Deugnier 2005)).

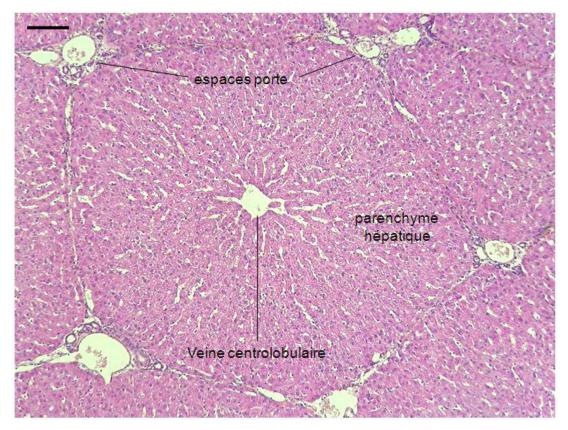


Figure 22 – Photographie d'une coupe histologique de foie de porc montrant un lobule hépatique (coloration HES, échelle 100μm).

ii. <u>Vascularisation hépatique</u>

Le foie est le seul organe, avec les poumons, à recevoir un apport sanguin double.

La veine porte hépatique amène du sang veineux en provenance du petit et du gros intestin (veines mésentériques supérieure et inférieure), de la rate et du pancréas (veine splénique) et de l'estomac (veine gastrique), riche en nutriments. Elle apporte les 3/4 du volume sanguin hépatique.

L'artère hépatique, issue du tronc cœliaque, amène du sang oxygéné directement du cœur.

L'ensemble veine porte – artère hépatique constitue, avec le canal cholédoque, le pédicule hépatique. La ramification pédiculaire aboutit aux espaces portes constitués d'une branche de l'artère hépatique, d'une branche de la veine porte et d'un ou deux canaux biliaires (Figure 23). Le sang passe de l'espace porte à la veine centrolobulaire au sein du parenchyme hépatique par les sinusoïdes, capillaires hépatiques dans lesquels se déversent les branches de division de l'artère hépatique et de la veine porte. Les sinusoïdes, longeant les travées hépatiques monocellulaires, se déversent dans une veine centrolobulaire qui conduit ensuite le sang vers les veines sus-hépatiques puis dans la veine cave inférieure.

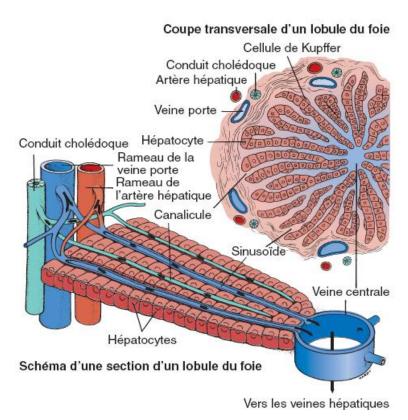


Figure 23 – Schéma du lobule hépatique et de son organisation vasculaire. (http://erpi.com/elm/10433.8855873905537647460.pdf)

La double vascularisation hépatique a 2 conséquences en thérapeutique :

- les substances absorbées par la muqueuse intestinale traversent obligatoirement le parenchyme hépatique avant de se distribuer dans le reste de l'organisme via la veine porte. Au cours de ce "premier passage hépatique", les médicaments ayant un métabolisme au niveau du foie seront partiellement inactivés, réduisant la fenêtre thérapeutique. Pour garantir une efficacité, d'autres voies d'administration peuvent alors être envisagées : voie parentérale, voie percutanée, soit encore la voie rectale ou sublinguale, la molécule absorbée gagnant alors la circulation générale respectivement par la veine cave inférieure et supérieure et échappant ainsi au premier passage hépatique.
- les tumeurs primaires ou secondaires du foie reçoivent l'essentiel de leur apport sanguin par l'artère hépatique, et non pas par la veine porte comme le tissu hépatique sain. Cette particularité est exploitée dans plusieurs approches thérapeutiques : infusion d'antinéoplasique dans l'artère hépatique et chimioembolisation intra-artérielle.

2.1.2 Tumeurs hépatiques

Les tumeurs du foie peuvent être classées en affections bénignes et malignes, les tumeurs malignes étant primitives ou des métastases de cancers primitifs situés dans un autre organe. En Amérique du Nord et en Europe, les néoplasmes primaires du foie sont rares et les tumeurs métastatiques sont fréquentes, alors qu'ailleurs dans le monde, surtout dans l'Extrême-Orient, le carcinome hépatocellulaire est beaucoup plus répandu que les métastases.

i. Types histologiques (Andrieu 1997; Worobetz 1997; Cotran 2000)

Des **tumeurs bénignes du foie**, les hémangiomes sont les plus fréquents (0,5 à 7,0 % de la population). Ces lésions vasculaires sont stables, elles ne dégénèrent jamais, elles sont presque toujours asymptomatiques, l'hémorragie est rare et la biologie hépatique est normale. Elles ne requièrent aucun traitement. Leur intérêt clinique principal est de ne pas être prises pour des tumeurs métastatiques à l'examen radiologique et de ne pas être intéressées par les biopsies percutanées.

L'adénome hépatocellulaire est une tumeur beaucoup plus rare que l'hémangiome, dont la fréquence réelle est cependant mal connue. Plus fréquent chez la femme, une relation a été établie entre la survenue et les complications de l'adénome et la prise de contraceptifs oraux. Le diagnostic de l'adénome hépatocellulaire justifie une résection chirurgicale, en raison du risque de complications sévères, de la régression très inconstante de la tumeur après l'arrêt des contraceptifs, du danger de transformation maligne (10 % et plus important pour les tumeurs multiples de plus grandes dimensions) et de l'éventualité, toujours possible, d'une erreur diagnostique qui conduirait à laisser en place une tumeur maligne.

L'hyperplasie nodulaire focale du foie est rare, mais beaucoup plus fréquente (10 fois) que l'adénome. Les complications sont exceptionnelles et le risque de cancérisation est nul. Les examens morphologiques actuels permettent généralement de différencier cette tumeur de l'adénome et lorsque le diagnostic a été formellement établi, l'abstention chirurgicale est recommandée. Aucun traitement n'est requis si le patient est asymptomatique.

Les autres tumeurs bénignes du foie (adénome biliaire, cystadénome, lipome) sont d'observation extrêmement rare.

Il existe principalement 2 types de cancers primitifs du foie : le carcinome hépatocellulaire dérivant des hépatocytes et le cholangiosarcome dérivant de l'épithélium des canaux biliaires.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente environ 80 à 90 % des cancers primitifs du foie. Les autres types de cancers sont beaucoup plus rares, mais ont généralement un pronostic de moins d'un an. L'hépatoblastome est une tumeur spécifique de l'enfant et l'angiosarcome, semblable à ceux développés dans d'autres organes, à partir de la cellule endothéliale.

Le foie est l'organe le plus souvent atteint par des métastases dans l'abdomen. Cela s'explique par sa taille, et par son rôle de drainage sanguin au niveau digestif via la veine porte.

ii. <u>Etiologie et pathogénie</u>

Dans plus de 90 % des cas, le CHC survient chez un patient atteint de maladie chronique du foie, en général une cirrhose. Les facteurs de risque de cette maladie sont relativement bien connus. Ils sont viraux (hépatite B, hépatite C), environnementaux (alcool, aflatoxines) ou génétiques (hémochromatose, déficit en alpha 1-antitrypsine).

Les mécanismes de l'hépatocarcinogenèse restent imprécis (Zucman-Rossi 2009). On sait que l'hépatite chronique et la cirrhose génèrent une inflammation associée à une régénération hépatocytaire qui favorise le stress oxydatif, la sénescence réplicative et l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques dans les hépatocytes. Ainsi les nodules cirrhotiques de haut grade sont souvent considérés comme de véritables lésions prénéoplasiques. Cependant, les altérations structurales des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, c'est-à-dire les mutations activatrices d'oncogènes ou les mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs, n'ont jamais été identifiées jusqu'à présent dans les nodules cirrhotiques alors qu'elles sont très fréquemment accumulées dans les CHC. De fait, les mécanismes de la carcinogénèse hépatique sont toujours à l'étude aujourd'hui. La recherche procède par l'identification des facteurs d'initiation de la carcinogenèse, dont un grand nombre sont spécifiques d'un facteur de risque donné, et par une approche plus récente sur la compréhension de la complexité et l'interaction de ces voies de transformation cancéreuse.

Les tumeurs primitives donnant le plus fréquemment des **métastases hépatiques** sont celles du colon, du sein et du poumon, mais tout cancer de n'importe quel siège peut s'étendre au foie, y compris leucémies et lymphomes. L'invasion se fait quasiment toujours par la voie

sanguine, notamment par la veine porte pour les tumeurs gastro-intestinales. Il faut noter que contrairement aux tumeurs primitives, les métastases hépatiques ne se développent que rarement sur foie cirrhotique (Kasper 2005).

iii. Incidence et pronostic

	Nouveaux cas	Mortalité	Référence
Monde, 2002	626 000	598 000	(Ferlay 2004)
USA, 2008	21 370	18 140	(Jemal 2008)
Europe, 2006	48 700	43 300	(Ferlay 2007)
France, 2005	6 433	7 390	(Belot 2008)

Tableau 8 – Incidence des cancers primitifs du foie dans le monde, aux USA, en Europe et en France.

S'ils ne représentent que 6 % des nouveaux cancers au niveau mondial, les cancers du foie sont la troisième cause de mortalité liée à un cancer (IARC 2008), et présentent le plus faible pronostic après le cancer du pancréas (survie à 5 ans aux USA : 11 %) (Jemal 2008). Le taux de mortalité a augmenté au cours des dernières décennies (+ 40,6 % entre 1990 et 2004 aux USA (Jemal 2008)), en raison d'une meilleure détection et d'une meilleure prise en charge de la cirrhose, mais plus important encore, à cause de l'expansion du virus de l'hépatite C (Tanaka 2002). L'incidence augmente avec l'âge et est globalement 2,5 fois supérieure chez l'homme par rapport à la femme.

Il existe d'importantes variations géographiques au niveau mondial de l'incidence des cancers du foie (Figure 24), du fait du lien étiologique démontré entre le CHC les maladies hépatiques chroniques. Sa répartition calque celle de l'hépatite virale B, avec une prédominance en Asie du sud-est et Afrique tropicale. Les pays où il existe une infection endémique par le virus de l'hépatite C comme le Japon présentent également un fort taux de CHC. En France, la première cause de développement du CHC reste la cirrhose d'origine alcoolique.

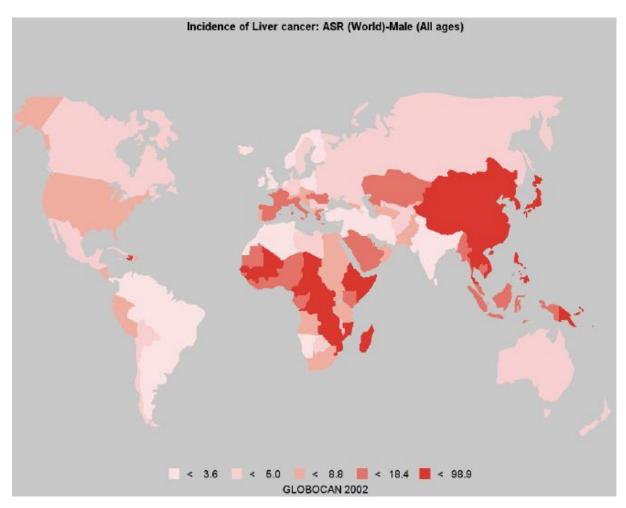


Figure 24 – Cartographie mondiale de l'incidence des cancers primitifs du foie pour les hommes (IARC 2008).

La véritable prévalence des tumeurs hépatiques secondaires n'est pas connue, car la plupart des chiffres proviennent d'études nécropsiques. Selon le site du cancer primitif, entre 30 et 70 % des patients décédés d'un cancer ont des métastases hépatiques (Gilbert 1982; Pickren 1982). Il n'existe pas de preuve que la fréquence au niveau international est différente de celle enregistrée aux Etats-Unis (Khan 2009).

La survie des patients porteurs de métastases hépatiques en l'absence de traitement est très variable. Pour les cancers colorectaux elle peut varier de 2 à 58 mois avec une médiane aux alentours de 16 mois (Rivoire 2005).

iv. <u>Classification et traitements</u>

Le CHC étant l'un des cancers dont on connaît le mieux l'étiologie, une surveillance régulière et parfois une prévention a été mise en place pour les populations à risque (Trinchet 2009). Il est actuellement recommandé de surveiller les patients cirrhotiques tous les 6 mois par échographie. Les modalités et l'impact clinique du dépistage sont cependant mal connus. Il faut également souligner que le diagnostic de la cirrhose est contemporain de celui du CHC dans environ 50 % des cas.

Le type de traitement proposé dépend directement du stade de la maladie. Différentes classifications existent (Dilou 2004; ACS 2009). Le système le plus répandu, également utilisé pour les cancers ayant d'autres localisations, est le système TNM de l'American Joint Committee on Cancer. Il s'appuie principalement sur les résultats des examens cliniques, radiologiques et anatomopathologiques. Il prend en compte 3 facteurs :

- T (Tumor) décrit le nombre et la localisation des nodules, la taille du plus grand nodule et la présence d'une invasion soit vasculaire, soit d'un organe de voisinage (péritoine);
- N (Node) décrit l'invasion des ganglions lymphatiques voisins
- M (Metastasis) indique si le cancer est métastasé dans des ganglions ou des organes distants (principalement le poumon et les os)

Chacun de ces facteurs est décrit par un indice. La combinaison des différents facteurs et de leurs indices aboutit à la classification en stades allant de 1 à 4.

Cette méthode de classification ne prend cependant pas en compte la fonction hépatique, qui peut influencer le choix du traitement. Aussi d'autres systèmes ont été développés, incluant les résultats des tests fonctionnels hépatiques : le système BCLC (Barcelona-Clinic Liver Cancer), le système CLIP (Cancer of the Liver Italian Program) ou le système Okuda. La fonction hépatique est généralement mesurée par le score Child-Pugh classé de A (normal) à C (dysfonctionnements majeurs). Enfin une dernière classification du CHC, sur critère chirurgical, distingue les cancers localisés résécables, les cancers localisés non résécables et les cancers avancés.

On distingue habituellement les traitements curatifs et les traitements palliatifs (Figure 25) (Llovet 2003; Taieb 2009).

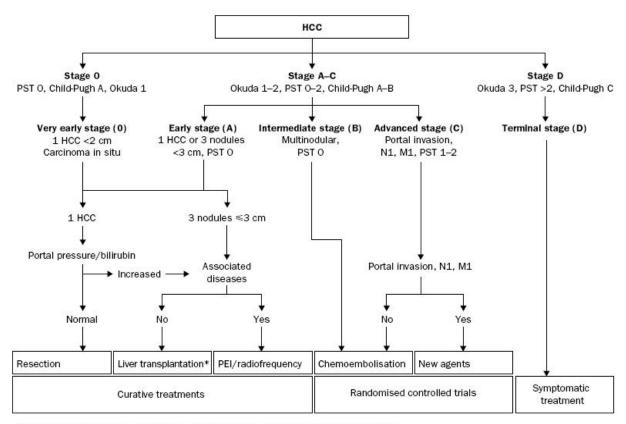


Figure 5: Barcelona-Clinic Liver Cancer staging classification and treatment schedule
PST=performance status test. N=nodules. M=metastases. PEI=percutaneous ethanol injection. *Cadaveric liver transplantation or living donor liver transplantation. Modified from references 54 and 40 with permission from The American Association for the Study of Liver Disease.

Figure 25 – Programme de traitement du CHC basé sur le système BCLC (Llovet 2003)

Les traitements curatifs incluent la transplantation hépatique, la résection chirurgicale et les techniques d'ablation percutanée (injection intratumorale d'alcool absolu et radiofréquence).

La **transplantation** est le meilleur traitement curatif du CHC sur foie cirrhotique, car c'est la seule approche qui va permettre de traiter à la fois le cancer et la maladie du foie sous-jacente. Deux questions se posent aujourd'hui dans le domaine de la transplantation : l'extension des critères d'éligibilité à la procédure, et les traitements qui peuvent être proposés avant de réaliser la transplantation pour améliorer ses résultats et éviter les sorties de liste. C'est dans ce cadre que s'inscrit l'étude clinique du Dr S.J. Citron du Piedmont Hospital à Atlanta (Citron 2008), dont nous avons étudié les prélèvements de foies, explantés à différents délais après embolisation aux chimiosphères de doxorubicine (voir section II.2.4 p154).

La **résection** est un traitement de choix pour les CHC sur foie non cirrhotique, et peut être envisagée pour certains CHC sur foie cirrhotique en tenant compte de la fonction hépatique. Elle permet la guérison de certains patients. Comme dans le cas de la transplantation, les

chirurgiens s'intéressent aux potentiels traitements adjuvants pour la résection car le risque de récidive après l'intervention reste élevé (> 70 % à 5 ans).

Le dernier traitement curatif, l'ablation percutanée, rassemble des techniques dites miniinvasives qui consistent à guider par imagerie une sonde ou une aiguille directement dans la
tumeur, en vue d'une geste thérapeutique : injection de substances toxiques (alcool, acétate),
ou destruction thermique (radiofréquence, laser, cryothérapie). L'alcoolisation est la
technique la plus étudiée avec des survies proches de celles obtenues par chirurgie. Elle tend
aujourd'hui à être remplacée par la radiofréquence (RFA) qui montre un meilleur contrôle
local de la maladie, une meilleure survie sans récidive et une meilleure survie globale.
L'intérêt d'une approche thérapeutique combinant RFA avec d'autres traitements locaux tels
que la chimioembolisation est en cours d'évaluation (Veltri 2006; Cheng 2008; Schwartz
2008).

En raison du stade avancé de la maladie au moment du diagnostic, les traitements curatifs ne peuvent être proposés que dans 30 à 40 % des cas. Différents traitements palliatifs sont alors envisagés, seuls ou en combinaison. Seuls la chimioembolisation artérielle (TACE) et le sorafénib (Nexavar®) sont considérés comme traitement de référence (SNFGE 2008).

La **chimioembolisation de l'artère hépatique** est la méthode la plus utilisée pour le traitement des CHC non chirurgicaux. Elle utilise la vascularisation préférentielle de la tumeur par l'artère hépatique plutôt que par la veine porte qui irrigue le parenchyme sain. Elle entraîne une réponse objective dans 38 % des cas et une nécrose tumorale complète dans 44 % des cas (Marelli 2007). La survie à 2 ans varie entre 24 % et 63 % (Llovet 2003). Le principal effet secondaire est le "syndrome post-chimioembolisation", i.e. des douleurs abdominales transitoires et de la fièvre (60 à 80 % des patients) (Marelli 2007).

L'irradiation interne par une solution de lipiodol marquée à l'iode radioactif ¹³¹I est utilisée en tant que traitement adjuvant à la chirurgie. La "radioembolisation" à l'aide de microsphères en résine chargée en ⁹⁰Yttrium est actuellement en phase II des essais cliniques (Kulik 2008).

La doxorubicine a été la substance la plus évaluée en phase II pour le CHC (Taieb 2009). Les mono et poly-**chimiothérapies** systémiques offrent un bénéfice de survie très faible mais peuvent permettre d'amener à la chirurgie des tumeurs initialement non résécables. Les anti-angiogéniques (bevacizumab) et les molécules ciblant spécifiquement les voies dépendantes des facteurs de croissance (cetuximab, gefitinib) ont montré des taux de réponse marginaux en

monothérapie, et des résultats comparables à ceux de la chimiothérapie lorsqu'associés à la chimiothérapie conventionnelle cytotoxique.

Le traitement des **métastases hépatiques** dépend du bilan d'extension. Dans le cas où seul le foie est envahi, un traitement local est privilégié, principalement par chirurgie. En cas d'ablation complète des métastases hépatiques d'un cancer colorectal, les chances de guérison à long terme (> 5 ans) se situent entre 25 et 40 %. Malheureusement seuls 10 % des patients sont opérables au moment du diagnostic (Kanter 2005).

Dans le cas d'une dissémination dans plusieurs organes ou d'une contre-indication chirurgicale, une chimiothérapie systémique palliative est utilisée. La chimiothérapie peut également être employée en pré-opératoire pour réduire le nombre et la taille des nodules.s Après opération, elle est systématique dans le cas des cancers du sein car elle réduit le risque de récidive, fréquente dans le cas des cancers du colon où la preuve d'un bénéfice n'a pas encore été rapportée. Les médicaments dépendent du type de cancer primitif et de sa chimiosensibilité : 5-FU, dérivés du platine, CPT11 mais également anticorps monoclonaux tels le cetuximab et le bevacuzimab.

La chimioembolisation est utilisée en traitement palliatif et en adjuvant à la chirurgie ou à la radiofréquence (Vogl 2007). Aucune étude n'a montré un bénéfice significatif en termes de survie par rapport au traitement symptomatique. La survie médiane après chimioembolisation des métastases des cancers colorectaux varie entre 7,7 et 14 mois (Wasser 2005; Hong 2009; Vogl 2009).

2.1.3 Apport d'une bille d'embolisation chargée en doxorubicine

Si la chimioembolisation est la méthode la plus utilisée pour le traitement des CHC non résécables, seules deux études randomisées ont réussi à démontrer un bénéfice clinique par rapport à un traitement symptomatique (Llovet 2002; Lo 2002).

Il existe une grande hétérogénéité dans les pratiques et les techniques de chimioembolisation ou encore dans le planning des séances de traitement. La procédure la plus commune est ellemême largement critiquée, notamment dans l'utilisation du lipiodol comme vecteur du médicament. Cet agent de contraste huileux est mélangé à la solution aqueuse de chimiothérapie, formant une émulsion. La nature de l'émulsion (eau/huile, huile/eau), la taille des gouttelettes ou encore la stabilité de l'émulsion ne peuvent pas être contrôlées, alors que ces facteurs détermineront la distribution, la concentration et le temps de résidence du médicament dans la tumeur.

En résumé, le rôle de vecteur du lipiodol dans la chimioembolisation n'a jamais été démontré. La chimioembolisation lipiodolée est une technique très peu reproductible, qui ne peut être standardisée.

Par rapport à la chimioembolisation classique, l'utilisation d'une chimiosphère pour le traitement des tumeurs hépatiques peut apporter : 1) une standardisation de la procédure ; 2) un contrôle de la distribution du médicament, en contrôlant la distribution des billes ; 3) un contrôle du temps et de la quantité de médicament délivré à la tumeur en contrôlant la chimie des billes.

2.1.4 Doxorubicine

Les principales indications, la plupart du temps en polychimiothérapie, sont les leucémies aiguës, la maladie de Hodgkin, les lymphomes, les cancers du poumon, du sein, de la vessie, de l'estomac, les sarcomes.

i. Chimie

La doxorubicine (DOXO) ou adriamycine est un antibiotique anti-tumoral, appartenant à la famille des anthracyclines. Sa formule est $C_{27}H_{29}NO_{11}$, elle a un poids moléculaire de 543 g/mol et un pKa autour de 8.3.

Figure 26 – Formule semi-développée de la doxorubicine

ii. Pharmacocinétique (Page 1999; BIAM 2001; Lullmann 2003)

La doxorubicine est administrée par voie intraveineuse, et pour des indications particulières en voie artérielle, intrapéritonéale ou instillations vésicales. La liaison aux protéines plasmatiques est importante. Elle quitte rapidement le plasma (demi-vie : 10-30 min) pour se fixer sur les tissus sous forme active, non métabolisée (principalement les reins, le foie, la rate, le coeur et les poumons). Elle franchit peu la barrière hémato-encéphalique, mais peut passer la barrière placentaire. L'élimination triphasique correspond respectivement au captage tissulaire, au métabolisme et au relargage de la drogue à partir de ses sites de liaison. Le métabolisme s'effectue principalement au niveau du foie et consiste en une réduction en dérivé hydroxylé en position 13 (réduction) donnant le doxorubicinol. Le doxorubicinol serait 20 fois moins cytotoxique que la DOXO (Olson 1988). La seconde classe de métabolite sont

les aglycones et correspondent à une réduction et une coupure de la chaîne glucoside. L'élimination se fait par voie biliaire (40-50 % de la dose en 7 jours), et dans une moindre mesure par voie rénale (5-25 % de la dose). Le principal effet indésirable des anthracyclines est une cardiotoxicité cumulative, problème majeure puisque pouvant conduire à la mort par défaillance cardiaque. Cette toxicité est liée au pic de la concentration plasmatique, de sorte qu'une perfusion intraveineuse ou des doses échelonnées dans le temps diminuent le risque. Les nausées, diarrhées, la myélosuppression, l'inflammation des muqueuses et la stomatite sont d'autres effets secondaires fréquents.

iii. Mode d'action (Myers 1986; Page 1999)

La cytotoxicité des anthracyclines passe par 5 modes d'action principaux :

- c'est un agent intercalant. Grâce à sa structure moléculaire plane, elle peut s'intercaler entre deux paires de bases azotées de l'ADN. L'intercalation seule n'est pas suffisante pour perturber la réplication et la transcription ;
- c'est un inhibiteur de la topoisomérase II (Top II), une enzyme impliquée dans la réplication de l'ADN. Le médicament forme un complexe stable avec l'ADN et la Top II, complexe qui stabilise le clivage de l'ADN normalement transitoire produit par Top II. La conséquence est une coupure définitive de l'ADN double brin, bloquant ses fonctions et entraînant la mort cellulaire;
- elle forme des radicaux oxygène et OH. Toutes les anthracyclines sont des quinones capables de produire des radicaux libres endommageant les membranes et les protéines;
- elle forme également avec le fer un complexe organométallique, susceptible de produire des ions superoxydes et qui se fixe fortement aux membranes cellulaires causant une destruction membranaire spontanée;
- \bullet enfin à faibles doses (< 1 μM), la doxorubicine déclenche les mécanismes de l'apoptose.

Plusieurs mécanismes de résistance spécifique ont été identifiés, le plus décrit étant l'efflux du médicament depuis la cellule par une glycoprotéine sous la dépendance du gène p-Gp/mdr.

2.2 Etude de libération dans un milieu liquide et dans un gel de collagène en spectrométries de fluorescence

2.2.1 Travaux antérieurs sur la chimiosphère de doxorubicine

Deux études ont été publiées sur l'évaluation *in vitro* de la cinétique d'élution des DC BeadTM (Biocompatibles UK Ltd) chargées en doxorubicine (DOXO-DEB) (Lewis 2006; Gonzalez 2008). Le temps de demi-élution (temps au bout duquel 50% de la dose chargée a été libérée) varie de 30 min à 5 mois selon le type d'appareil de dissolution utilisé (Figure 27). L'étude la plus récente a cherché quel était le meilleur modèle pour prédire la durée du release *in vivo* (Gonzalez 2008).

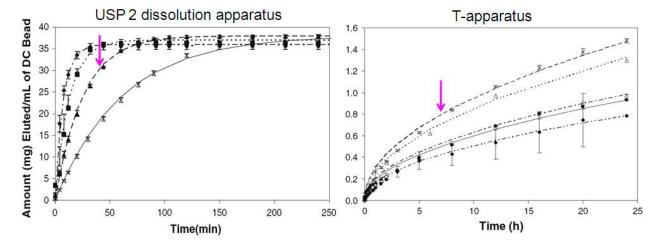


Figure 27 – Cinétique d'élution des DOXO-DEB *in vitro* dans l'appareil de dissolution USP type 2 et dans l'appareil en T (d'après (Gonzalez 2008)). Les deux courbes fléchées correspondent au même type de bille dans deux appareils différents.

Les méthodes de dissolution préconisées par la pharmacopée américaine consistent à agiter un milieu liquide où est disposée la forme pharmaceutique (Figure 28). Ces méthodes sont rapides et faciles à mettre en œuvre, mais ne reproduisent absolument pas les conditions d'élution *in situ*.

Borovac et al. ont proposé et validé un nouveau dispositif, l'appareil en T, pour l'étude de chimiosphères chargées en ibuprofène (Borovac 2006). Le dispositif est constitué d'un puits au fond duquel sont placées les billes, et relié à un circuit fermé où circule un tampon

d'élution (Figure 28). Ce système reproduit une zone de transport convectif et une zone de transport diffusif.

Gonzalez et al. ont montré sur les DEB chargées en doxorubicine, une excellente corrélation des données de l'appareil en T avec les données expérimentales de dosage plasmatique (Gonzalez 2008). Dans son fonctionnement actuel, seul le compartiment "systémique" (boucle) est accessible, et les phénomènes locaux dans les zones de diffusion et de convection ne peuvent être étudiés. Autrement dit le dispositif ne permet pas de ne permet pas de prédire la libération et la pénétration du principe actif dans le tissu autour des billes.

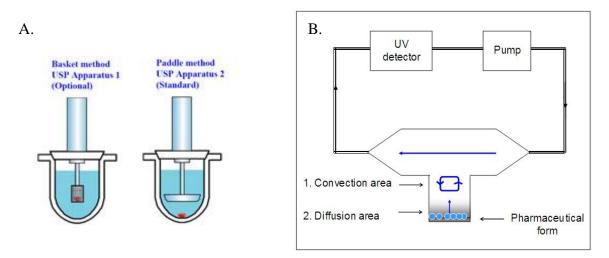


Figure 28 – Schémas des appareils de dissolution : A) USP types 1 / 2 (http://www.jascofrance.fr) et B) appareil en T (Borovac 2006).

2.2.2 Objectif

Ce travail avait pour objectif de mettre au point un modèle et une technique d'analyse simples pour étudier la libération et la diffusion de la DOXO depuis la bille dans le milieu environnant.

Pour simplifier le modèle, nous avons décidé de travailler sur bille unique. La première étape a consisté à reproduire les précédents travaux d'élution en milieu liquide en travaillant sur une seule bille. La seconde étape a validé, dans un gel de collagène, l'utilisation de la microspectrofluorimétrie pour déterminer la concentration et la distribution du médicament autour de la bille.

2.2.3 Matériel et méthodes

i. Billes chargées en DOXO

Nous avons utilisé les billes DC Bead TM fabriquées par la société Biocompatibles UK Ltd (Farnham, UK). Elles sont faites d'un polymère d'alcool polyvinylique (PVA) modifié par des groupements sulfonate (2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate ou AMPS). Elles sont calibrées par tranche de 200 μ m. Deux tailles de billes ont été utilisées, correspondant au plus petit et au plus grand calibres disponibles commercialement : 100-300 μ m et 700-900 μ m.

Les billes peuvent fixer certaines molécules chargées positivement telle la doxorubicine (DOXO), par des interactions ioniques avec les groupements AMPS. Deux concentrations de chargement ont été étudiées : 5 mg et 25 mg DOXO /mL bille.

Le chargement a été effectué selon les instructions données par le fabricant : dans un flacon de 2 mL de billes dans 6 mL de solution saline, on retire le surnageant de salin du flacon de bille à l'aide d'une micropipette. On ajoute ensuite aux billes un volume de 10 mL ou de 50 mL d'une solution de doxorubicine à 2 mg/mL (Doxorubicin Teva®, TEVA Pharma S.A., Courbevoie, France) pour obtenir respectivement un chargement à 5 mg et 25 mg de DOXO par millilitre de bille. Le flacon est ensuite placé à l'obscurité et agité régulièrement pour un chargement homogène des billes. Après 24 à 48 h, le taux de chargement est vérifié en mesurant l'intensité de fluorescence du surnageant à l'aide d'un spectromètre de fluorescence. Au total 3 groupes de DOXO-DEB ont été comparés (Tableau 9) : groupe 1 : 700-900 μm DEB à 5 mg DOXO /mL; groupe 2 : 700-900 μm DEB à 25 mg DOXO /mL; groupe 3 : 100-300 μm DEB à 25 mg DOXO /mL.

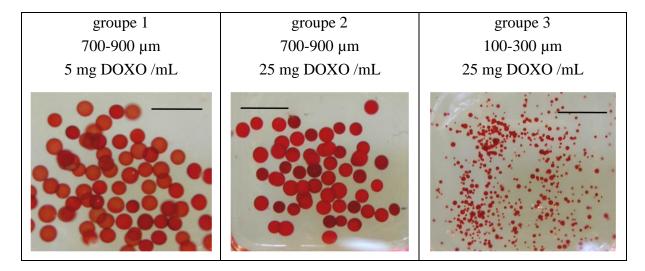


Tableau 9 – Photographies des DOXO-DEB des 3 groupes (échelle : 2,5mm).

ii. <u>Libération en milieu liquide</u>

Une bille est isolée du flacon de DOXO-DEB à l'aide d'une micropipette. La bille est rincée dans l'eau déminéralise puis placée dans une cuve en quartz contenant 3 mL de milieu. La cuve est alors laissée dans l'obscurité sans agitation. La concentration de DOXO est mesurée dans le surnageant par fluorimétrie à 0, 15, 30, 45, 60, 90 min, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h puis toutes les 12 h jusqu'à 4 jours. Avant chaque mesure, la solution est homogénéisée en agitant légèrement la cuve.

La cuve est placée dans un spectrofluorimètre Shimadzu RF5000 (Shimadzu, Kyoto, Japon) sur le trajet d'un faisceau d'excitation à $\lambda_{exc}=470$ nm (Figure 29). L'intensité d'émission de fluorescence (IF) est mesurée à $\lambda_{em}=570$ nm. La concentration en doxorubicine est ensuite calculée à partir d'une courbe étalon donnant IF = f ([DOXO]_{PBS}) (0.05 à 10 μ M, R² = 0.997). La bille est ensuite récupérée de la cuve et vidée complètement pour déterminer la quantité totale chargée initialement.

La procédure a été répétée pour 3 billes de chaque groupe. La procédure a été répétée pour le groupe 2 dans l'eau distillée et dans le PBS 10 fois concentré (PBS x10) pour déterminer l'effet de la concentration ionique.

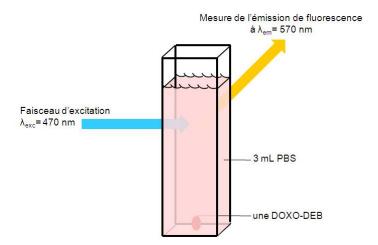


Figure 29 – Schéma du dispositif expérimental pour l'étude de la libération d'une DOXO-DEB en milieu liquide.

iii. Libération en gels de collagène

Des gels de collagène de type I pour culture cellulaire 3D sont préparés à partir de tendons de queues de rat (Sprague Dawley) (Fourre 2006). Le collagène est extrait sans trypsinisation par

des bains d'acide acétique et 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 à 1.5 mg/mL sont préparés à partir de la solution mère de collagène (1 mL), d'une solution de MEM sans rouge de phénol 10x concentrée (200 μ L), d'une solution de bicarbonate de sodium à 0.26 μ M (200 μ L), d'eau distillée (480 μ L) et enfin de soude 0.1 M (180 μ L), toutes maintenues à 4°C. Le mélange (2 mL) est alors coulé dans une boîte de Pétri de 35x10 mm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA) et on ajoute une bille DOXO-DEB au milieu de la boîte. Le mélange précipite en 4 à 5 minutes à température ambiante.

La boîte de Pétri est alors placée sur la platine d'un microspectrofluorimètre (V45 Dilor, JobinYvon-Horiba, Longjumeau, France) couplé à un laser Argon ($\lambda_{exc} = 488$ nm) (Spectra Physics, Evry, France) et avec un objectif grossissement x10, ouverture numérique 0.25. Un spectre d'émission de fluorescence est enregistré tous les 20 μ m depuis le bord de la bille jusqu'à une distance de 5 mm (Figure 30). Les temps de mesure sont de 15, 30, 60, 120 et 180 min après ajout de la bille.

La contribution de la doxorubicine à la fluorescence totale est déterminée en soustrayant la fluorescence du gel de collagène sans médicament. L'intensité moyenne de fluorescence est calculée entre 500 et 800 nm et la concentration de DOXO est déterminée à partir d'une courbe étalon donnant IF = f ([DOXO]_{collagène}) établie sur des gels contenant des quantités connues de médicament (0.05 à 7.40 μ M, R^2 = 0.994). La quantité totale de DOXO libérée dans le gel à un temps t, est estimée graphiquement à partir des pentes des profils de concentration et en supposant que la diffusion se fait de façon isotrope dans un volume sphérique.

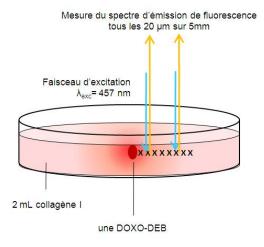


Figure 30 – Schéma du dispositif expérimental pour l'étude de la libération d'une DOXO-DEB dans un gel de collagène de type I.

2.2.4 Résultats

i. Libération en milieu liquide

La cinétique d'élution des DOXO-DEB dépend de la concentration ionique du milieu. Le temps de demi-élution, défini comme le temps au bout duquel la bille a libéré 50 % de sa dose initiale, diminue avec l'ionicité du milieu (Figure 31). Les DEB sont des microsphères de PVA modifié par des groupements sulfonate qui portent une charge négative. La DOXO en solution à pH neutre est chargée positivement. L'interaction ionique entre les charges positives du médicament et les charges négatives de la bille est le principal mode de chargement de la DOXO dans les DEB. Nos résultats suggèrent logiquement que l'élution est également contrôlée par un processus d'échange ionique.

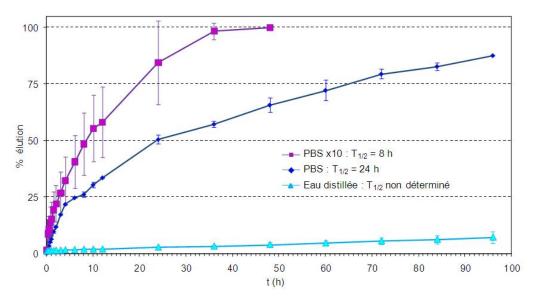


Figure 31 – Profils d'élution des DOXO-DEB 700-900 μ m, 25 mg/mL en fonction de la concentration ionique du milieu.

La cinétique d'élution des DOXO-DEB dépend également de **la taille des DEB** (Figure 32). Le temps de demi-élution est plus court pour les billes de 100-300 µm (1 h) que pour les billes de 700-900 µm (24 h). Cet effet taille suggère que la libération du principe actif dépend de la surface d'échange de la bille, qui est relativement plus importante pour les petits calibres.

Enfin, la vitesse de libération diminue avec **la concentration de chargement**, avec un temps de demi-élution plus court pour les billes chargées à 5 mg/mL (11 h) que pour les billes chargées à 25 mg/mL (24 h) (Figure 32). Cette donnée peut s'expliquer par la cinétique de la

réaction de dissolution (ordre 1), ou par la solubilité limitée du médicament dans le milieu. On sait notamment que la doxorubicine a tendance à former des dimères aux concentrations élevées (stacking), diminuant sa solubilité dans le milieu aqueux.

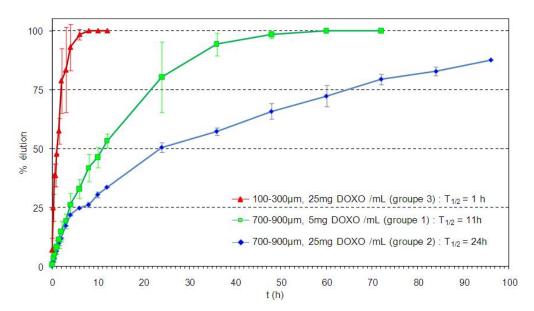


Figure 32 – Profils d'élution des DOXO-DEB dans le PBS en fonction de la taille de la bille et de la dose de chargement.

L'ensemble des résultats obtenus sur bille unique est cohérent avec ceux des trois études précédentes réalisées sur des volumes contenant plusieurs milliers de billes (Lewis 2006; Lewis 2007; Gonzalez 2008). L'élution de la doxorubicine dépend de la concentration ionique, de la taille des billes et de la concentration de chargement.

La quantité de médicament libérée par une seule bille semble être compatible avec les performances des techniques de fluorescence.

ii. Libération en gels de collagène

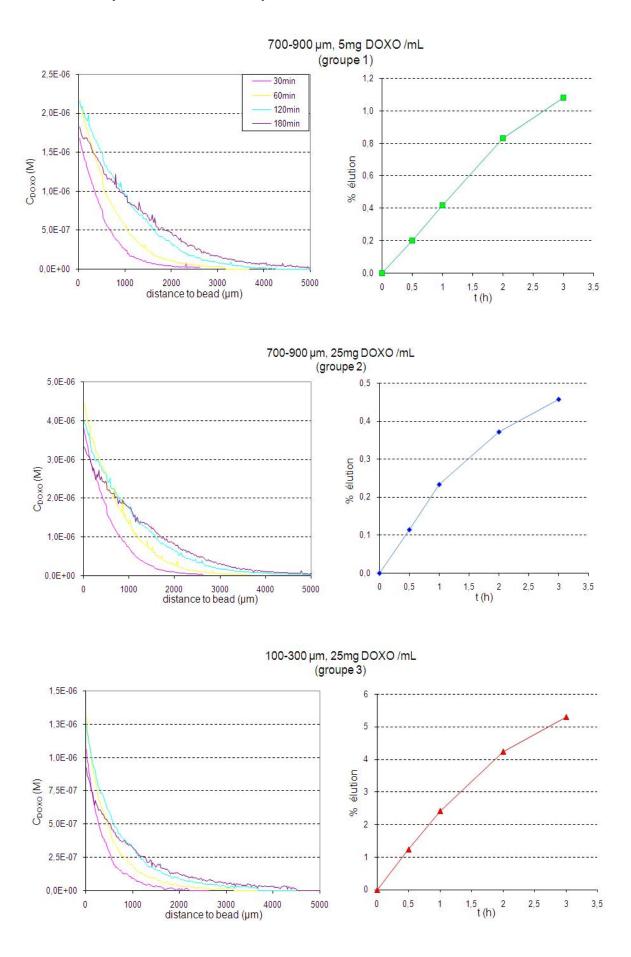
L'expérience d'élution en gel de collagène a été menée pour les 3 groupes de billes de taille/concentration de chargement différentes.

Les concentrations de DOXO mesurées autour des billes et les taux d'élution sont différents entre les 3 groupes (Figure 33). On observe les mêmes effets de la taille de la bille et de la

concentration de chargement sur la vitesse de libération que dans les tests en PBS. Les petites billes se vident plus vite que les grosses, et les billes faiblement chargées se vident plus vite que les fortement chargées. Les mécanismes de la libération sont probablement identiques dans le PBS et dans l'hydrogel.

L'évolution des profils de concentration au cours du temps est globalement identique dans les 3 groupes (Figure 33). Entre 30 min et 120 min, les pentes des courbes sont à peu près stables et on observe une augmentation de la concentration à la fois à proximité de la bille et à distance de la bille. A 180 min, on note une diminution de la concentration à proximité de la bille et une diminution de la pente de la courbe. Ces résultats suggèrent que la libération du médicament par la bille est devenue plus lente que la diffusion dans le milieu. Cette hypothèse pourrait être confirmée en calculant la vitesse d'élution à partir de modèles théoriques de dissolution (premier ordre, Higuchi, Hixson-Crowell) et en calculant la vitesse de diffusion de la DOXO dans le gel par des modèles de transfert de masse.

Figure 33 (page suivante) – Profils de concentration de la DOXO dans le collagène autour des billes à différents temps après injection de la DOXO-DEB, pour les 3 groupes de billes (gauche) et pourcentages cumulatifs de DOXO libérée correspondant (droite) (n = 1 bille dans chaque groupe).



2.2.5 Conclusion

La cinétique d'élution de la DOXO depuis la bille dépend de paramètres intrinsèques au vecteur (taille des billes, dose de chargement) et de facteurs environnementaux (concentration ionique, nature du milieu).

Le modèle de collagène peut être utilisé pour déterminer à la fois les mécanismes de libération de la bille et les mécanismes de diffusion dans le milieu environnant.

Ce travail nous a permis de mettre au point les techniques de spectrométrie et microspectroscopie de fluorescence pour l'étude d'une chimiosphère chargée en doxorubicine. Nous avons pu vérifier que les performances de la technique sont satisfaisantes pour mesurer les niveaux de médicament libérés par une bille unique.

2.2.6 Perspectives

L'interprétation de nos données doit être complétée par l'analyse théorique : 1) des cinétiques d'élution, pour identifier le modèle (premier ordre, Higuchi) et les mécanismes de libération (film diffusion, particle diffusion, chemical exchange), 2) des profils de distribution dans le gel pour estimer le coefficient de diffusion de la doxorubicine

De nombreuses améliorations peuvent être apportées facilement au modèle de gel pour se rapprocher des conditions *in vivo*. La concentration en collagène pourrait être augmentée entre 2 et 9 mg/mL comme dans différentes tumeurs solides expérimentales (Netti 2000), et la composition en fibres complexifiée avec de l'élastine et des laminines. Des protéines (albumine), des polysaccharides (acide hyaluronique) et des glycoprotéines susceptibles d'interagir avec la DOXO et d'en modifier le transport peuvent être ajoutées (Jain 1987). Des cellules tumorales peuvent être mises en culture directement dans le gel (Fourre 2006). Plusieurs DEB peuvent être coulées dans le gel, pour évaluer l'effet de la répartition relative des billes sur les profils de concentration. Le gel pourrait être disposé dans l'appareil en T au dessus des billes.

2.3 Libération tissulaire dans un modèle expérimental de foie non tumoral

Article $n^{\circ}2$: Drug eluting beads for liver embolization: concentration of doxorubicin in tissue and in beads in a pig model

J. Namur, M. Wassef, J.M. Millot, A. Lewis, M. Manfait, A. Laurent. *J Vasc Interv Radiol* 2010; 21 (2): 259-267.

2.3.1 Travaux antérieurs sur la chimiosphère de doxorubicine

Deux études *in vivo* ont été menées sur les DOXO-DEB préalablement à notre travail. La première étude était une étude de tolérance après embolisation de l'artère hépatique avec des DOXO-DEB chez des porcs sains non porteurs de tumeur (Lewis 2006). Elle a permis d'établir le **profil d'élution plasmatique des billes** et démontré que le traitement était bien toléré pour des doses équivalentes à celles injectées en chimioembolisation classique chez l'homme. Elle a également suggéré un effet de la taille des billes sur la cinétique plasmatique et sur les effets tissulaires locaux des DOXO-DEB : les billes de 100-300 μm montrent un pic plasmatique significativement plus élevé et une nécrose du parenchyme hépatique plus importante que des billes de 700-900 μm, bien que ce dernier paramètre n'ait pas été évalué de façon quantitative. La concentration tissulaire de DOXO dans l'organe embolisé n'a pas été déterminée.

La seconde étude portait sur un modèle de carcinome hépatique chez le lapin (Vx2) embolisé avec des DOXO-DEB (Hong 2006). Elle a montré une diminution du pic plasmatique par rapport à une injection d'antinéoplasique seul dans l'artère hépatique, et une augmentation très significative de la concentration de médicament dans la tumeur avec les billes chargées. Cette étude présente cependant un défaut majeur dans la méthodologie de quantification de l'antinéoplasique dans la tumeur. Les auteurs ont utilisé des homogénats de tissus, qui contiennent des centaines de milliers de billes chargées en médicament, ce qui ne permet pas de séparer la DOXO effectivement libérée dans les tissus de celle toujours contenue dans la bille. Les concentrations rapportées ne correspondent probablement pas la quantité de médicament trouvée dans le tissu mais plutôt à la somme des quantités dans les tissus et dans les billes.

2.3.2 Objectif

Notre objectif dans cette étude était de déterminer séparément la concentration de DOXO toujours contenue dans les DEB et la concentration de DOXO dans le tissu autour des DEB, à différents temps d'embolisation, et de les comparer aux lésions tissulaires induites.

2.3.3 Matériel et méthodes

Le matériel correspondait aux prélèvements de foie de l'étude de tolérance chez un modèle de porc sain non tumoral (Lewis 2006). Quinze porcs minipig Yucatan ont subi une embolisation de l'artère hépatique gauche avec des billes calibrées de 100-300 µm ou 700-900 µm et chargées à 37,5 mg de doxorubicine par millilitre de bille. Cinq porcs ont été embolisés avec des billes de 100-300 µm non chargées. Les animaux ont été sacrifiés 28 jours ou 90 jours après embolisation. Des coupes fines jointives ont été effectuées sur des prélèvements de foie fixés en formol et inclus en paraffine. La première coupe a été analysée par microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR-MS) pour déterminer la quantité de doxorubicine toujours contenue dans les billes.

La seconde coupe a été analysée par microspectrofluorimétrie de fluorescence pour déterminer la concentration de doxorubicine dans le tissu autour des billes. La troisième coupe a été colorée par l'hématéine-éosine-safran (HES) pour évaluer les lésions histologiques autour des billes. Les résultats ont été comparés statistiquement par groupe et par délai, et les niveaux de médicament ont été comparés aux lésions histologiques.

2.3.4 Résultats

La FTIR-MS permet la quantification de la DOXO dans les billes *in situ* après implantation. La microspectrofluorimétrie peut être utilisée pour déterminer la concentration et la distribution de la DOXO dans le tissu autour des billes.

La bille a libéré 43 % et 89 % de la dose chargée initialement après 28 et 90 jours respectivement. Le principe actif est présent dans le tissu autour des billes aux deux temps

d'implantation avec une diminution au cours du temps (Figure 34). Il est détecté jusqu'à une distance de 600 μm depuis la surface de la bille (distance maximale évaluée). La concentration de doxorubicine autour des billes varie de 0.55 à 6.80 μM ce qui correspond à des concentrations d'incubation ayant des effets cytotoxiques sur des cultures d'hépatocytes *in vitro*. Les billes contrôle non chargées n'induisent pas de nécrose du parenchyme hépatique. Les DOXO-DEB de 100-300 μm induisent plus de nécrose que les DOXO-DEB de 700-900 μm. La concentration de doxorubicine est significativement plus élevée dans le tissu nécrotique que dans le tissu non nécrotique.

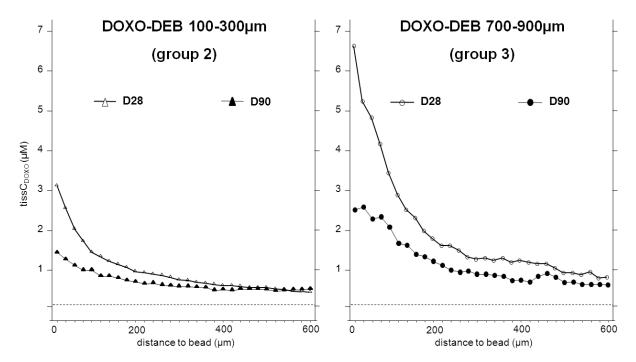


Figure 34 – Profils de distribution de la DOXO dans le tissu depuis le bord de la bille aux deux délais d'implantation pour les deux groupes de taille.

2.3.5 Conclusion

La libération de DOXO par les DEB s'étend sur une période d'au moins 3 mois après implantation, couvre une zone d'un diamètre supérieur à 1,2 mm autour du vaisseau embolisé et induit une nécrose du parenchyme hépatique autour des billes.

2.3.6 Perspectives

Notre étude a montré un **effet de la taille des billes sur la concentration tissulaire de DOXO et sur les lésions induites**. Ces effets sont à première vue contradictoires : les billes de 100-300 µm donnent des concentrations de drogue significativement moins élevée que les billes de 700-900 µm, mais une nécrose tissulaire plus importante. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet effet taille : une décharge immédiate de médicament plus élevée avec les billes de 100-300 µm, comme suggéré par les données *in vitro* et le profil de concentration plasmatique ; une dose totale et une couverture du parenchyme plus importante grâce à une pénétration plus distale des billes de petit calibre ; un temps de résidence de l'anticancéreux augmenté par une dévascularisation plus complète avec les 100-300 µm ; une architecture tissulaire différente entre les deux calibres bloqués à des niveaux différents de l'arbre artériel hépatique.

La quantité de médicament libérée par les billes aux délais précoces peut être déterminée expérimentalement avec la méthode employée dans notre étude. En revanche, les nombreux paramètres susceptibles d'influencer la diffusion du médicament dans le tissu semblent difficiles à appréhender par une approche purement empirique. Quelle doit être la distance maximale entre les billes pour couvrir le tissu embolisé avec l'anticancéreux ? A quelle vitesse le médicament diffuse dans le tissu ? Quelle est la fraction de médicament éliminée par convection dans la veine porte non occluse et adjacente à l'artère hépatique ? La comparaison de nos profils de distribution expérimentaux avec des modèles théoriques pourrait nous aider à répondre à ces questions. Weinberg et al. ont cherché à décrire la pénétration de la DOXO dans un tissu hépatique depuis un implant chargé en reprenant des modèles mathématiques de transport de masse (Saltzman 1991). La confrontation des deux types de données a permis de calculer la vitesse de diffusion du médicament, sa vitesse d'élimination, et a démontré l'effet de la nature du tissu (tumoral vs non-tumoral, nécrotique vs non-nécrotique) sur ces deux paramètres (Weinberg 2007).

Notre travail présente une limite dans l'interprétation quantitative des données de fluorescence. La relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration du fluorophore est déterminée par le rendement quantique de fluorescence, qui dépend lui-même de l'environnement du fluorophore. La méthode de calibration pour la quantification de la doxorubicine utilise un modèle de doxorubicine dans un gel de collagène dans lequel l'environnement et donc le rendement de fluorescence de la molécule peuvent être différents

de ceux dans un échantillon biologique ou sur une coupe de tissu ayant subi divers traitements chimiques.

La validation du modèle de calibration pourrait être réalisée en :

- comparant l'intensité de fluorescence émise par la DOXO dans des coupes d'échantillons fixés en formol+paraffine, comme utilisés ici, et des coupes d'échantillons congelés n'ayant subit aucun traitement chimique
- mesurant les rendements quantiques de fluorescence de la DOXO dans un gel de collagène et dans un prélèvement tissulaire contenant des quantités connues de médicament

Enfin il ne peut être totalement exclu que la fluorescence mesurée dans le tissu corresponde en partie à une autre molécule possédant le même fluorophore que la doxorubicine. La dégradation en doxorubicinol, son principal métabolite, ne modifie pas le fluorophore. On ignore si cette transformation a lieu dans le foie chez le cochon, mais on sait qu'il s'agit du principal site de métabolisation chez l'homme (BIAM 2001). Pour répondre à cette question, nous pourrions mesurer le spectre du doxorubicinol et essayer de discriminer les contributions des deux molécules par décomposition spectrale.

L'étape suivante consiste à vérifier que les propriétés d'élution des DOXO-DEB, qui semblent pertinentes dans ce modèle préclinique non tumoral, ne sont pas modifiées dans un foie cirrhotique tumoral présentant des caractéristiques anatomiques et fonctionnelles distinctes de celle d'un foie normal : un apport sanguin différent, une perméabilité limitée, une sensibilité au médicament diminuée.

Drug-eluting Beads for Liver Embolization: Concentration of Doxorubicin in Tissue and in Beads in a Pig Model

Julien Namur, MS, Michel Wassef, MD, Jean-Marc Millot, PhD, Andrew L. Lewis, PhD, Michel Manfait, PhD, and Alexandre Laurent, MD, PhD

PURPOSE: To evaluate the local tissue concentrations of the antineoplastic agent doxorubicin and the amount of drug still present inside drug delivery embolization beads at different time points after embolization and to compare doxorubicin levels with histologic modifications around the beads in a pig liver model. It was hypothesized that doxorubicin-eluting beads maintain cytotoxic concentrations of drug locally over a period of several weeks, as suggested by in vitro elution tests.

MATERIALS AND METHODS: Left lobe hepatic artery embolization was performed in 10 pigs with 100–300- μ m or 700–900- μ m beads loaded with 37.5 mg doxorubicin/mL. Control unloaded 100–300- μ m beads were injected in five pigs. Livers were sampled 28 days or 90 days after embolization. The amount of drug retained inside the beads was assessed with infrared microspectroscopy. Doxorubicin concentration and distribution in the tissue around the beads were determined with microspectrofluorimetry and compared with tissue modifications on hematein eosin saffron–stained sections.

RESULTS: Doxorubicin-eluting beads eluted 43% of their initial drug load after 28 days and 89% after 90 days. Doxorubicin was present in tissues around the beads at both time points, with a significant decrease over time (P=.0004). The drug was detected at distances as far as 600 μ m from the bead edge. Doxorubicin tissue concentrations ranged from 0.55 M to 6.80 M, which are cytotoxic levels in hepatocyte cell cultures. High concentrations of drug were associated with coagulative necrosis of liver parenchyma. Doxorubicin-eluting beads 100–300 μ m in size induced more necrosis than 700–900- μ m beads (P=.0036).

CONCLUSIONS: Doxorubicin-eluting beads deliver high concentrations of the drug over a period of at least 3 months at several hundred micrometers from the bead, leading to significant cytotoxic effects.

J Vasc Interv Radiol 2010; 21:259-267

Introduction

Transarterial chemoembolization is the most common treatment for patients with unresectable primary or secondary liver tumors (1, 2). The injected mixture of ethiodized oil, drug and embolization particles vary considerably in size, nature and stability (3-7), and has never demonstrated to provide a controlled release of drug to the tumor (8). Calibrated drug eluting beads (DEB) offer the theoretical advantages of controlling 1) the level of occlusion, 2) the amount of drug delivered, and 3) the duration of drug delivery to the tumor.

The DEB product LC/DC BeadTM is a calibrated embolization bead with negatively charged functional groups that allow the loading of many positively charged drugs (9). DEB loaded with the antineoplastic drug doxorubicin (DOXO) has been recently investigated *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, DOXO-DEB can provide a sustained release of the anticancer drug with a half-life for elution of two months (10, 11). *In vivo*, in a rabbit Vx2 liver tumor model embolized with DOXO-DEB, the drug can be detected in the embolized area over the whole time of observation from 24 hours to 14 days (12). Two animal studies using LC/DC BeadTM further showed that DOXO-DEB were associated with a major necrosis of the embolized area, an effect attributed to the drug (12, 13).

Several questions are left unanswered. Firstly, the controlled release of DOXO-DEB demonstrated *in vitro* has to be confirmed *in vivo*, through the quantification of the drug still contained inside the bead after embolization. Secondly, the local concentrations of drug obtained in the tissue surrounding the DEB have not been investigated. Thirdly, we do not know whether these levels are high enough to induce the expected cytotoxic effects of DOXO.

Addressing these issues is technically very challenging because it requires quantitative methods with high spatial resolution which can separate drug levels in the bead and in the surrounding tissue. The use of tissue homogenates (14) in which thousands of drug loaded beads may be present is excluded since the amount of drug actually delivered to the tissue and the amount still retained inside the DEB cannot be differentiated. Moreover, the spatial information is lost at homogenization. Fluorescence microscopy allows the assessment of drug distribution directly on tissue sections (15), yet they are not quantitative. Wang et al. have proposed an interesting alternative of direct sampling on histology sections (16) followed by electrophoretic analysis, but the technique is still time-prohibitive. On the opposite, optical microspectroscopies (infrared and fluorescence) use the unique spectral features of the drug to map its distribution quantitatively in a biological sample at the micrometric scale (17-19).

The present study was conducted in a model of pig healthy liver embolized with either $100\text{-}300~\mu m$ or $700\text{-}900~\mu m$ DOXO-DEB (smallest and largest size available), and examined at two time points, i.e. one month prior to and after the *in vitro* half-life elution time of the drug. Using two validated microspectroscopy techniques for DOXO quantification and common histology methods, we determined 1. the concentration of DOXO inside the bead at the two time points, 2. the concentration of DOXO in the tissue around the DEB and 3. the tissue modifications in the same field of observation where DOXO was quantified for comparison with drug levels.

Material and Methods

Raw materials

Doxorubicin hydrochloride was obtained as a solution for injection in 25mL vials at 2mg/mL concentration (Teva®, TevaClassics, Paris La Défense, France). Reference DOXO-DEB (LC/DC Bead TM , 100-300 μ m) with known concentrations of drug were obtained preloaded from Biocompatibles UK Ltd. Collagen type I was extracted from rat tail tendons and hydrogels were prepared at a concentration of 1.5mg collagen/mL as previously described (18).

Embolization and tissue samples

The embolization procedures and animal handling were performed at Charles River Laboratories (Southbridge MA, USA) with the agreement of the institutional animal care and use committee. Tissue samples were obtained from a former pharmacokinetics study of DOXO loaded DEB (LC/DC BeadTM, Biocompatibles UK Ltd). Embolization of the hepatic artery with DOXO-DEB was performed in a non-tumorous healthy pig liver model. The materials and procedures have already been described (13).

Briefly, 15 adult male Yucatan pigs (40-52~kg) were randomly assigned by a computer-generated (weight-ordered) distribution to one of three groups: Group 1 was a control group of unloaded DEB measuring 100-300 μ m. Group 2 consisted in DEB measuring 100-300 μ m and loaded with 37.5 mg DOXO/mL bead. In group 3, DEB measuring 700-900 μ m and loaded with 37.5 mg DOXO/mL bead were used. A 6-F catheter was inserted into the femoral artery and placed into the common hepatic artery. A 3-F microcatheter was then passed and advanced into the left hepatic lobe. Beads were administered slowly until stasis under fluoroscopy monitoring. The mean volume of beads injected was 2.0 mL per animal in the control group and 2.75 mL in the two test groups, corresponding to a mean total dose of 103 mg DOXO administered. Three animals per group were euthanized 28 days after embolization (D28) and two animals 90 days after embolization (D90). Livers were sampled, fixed in 10% formalin, dehydrated and embedded in paraffin blocks. For each paraffin block, three consecutive 5μ m thick sections were cut with a microtome: one section for doxorubicin quantification in DEB, one section for doxorubicin quantification in tissue and one section for histological assessment.

Doxorubicin concentration in DEB

Because the concentration of drug loaded inside the bead is high (micromolar) and may cause quenching, i.e. reduction of the DOXO fluorescence, we used infrared rather than fluorescence microspectroscopy to quantify the drug in the DEB.

Infrared microspectroscopy

A liver section was deposited on a calcium fluoride slide (Crystran Ltd, Poole, UK) suitable for infrared transmission analysis. Sections were analyzed with a Fourier transform infrared (FTIR) microspectrometer (Spectrum Spotlight 300, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) as previously described (19). An IR image of each bead on the tissue section was produced using the following parameters: $4000-820~\text{cm}^{-1}$ spectral range; $4~\text{cm}^{-1}$ spectral resolution; $6.25~\mu\text{m/pixel}$ spatial resolution; 2~scans/pixel. These conditions allowed good quality spectra with reasonable acquisition time (90 min to map a $1x1~\text{mm}^2$ surface).

Quantification

FTIR images were processed with Spotlight 1.0.0 (Perkin Elmer) and Opus 5.5 (Bruker Optik GmBH, Germany) softwares. Twelve spectra homogeneously distributed over the DEB were extracted from the FTIR image and averaged to calculate the mean spectrum of each bead. The processing of the extracted spectra was adapted from protocols developed in our laboratory (20, 21) and included smoothing, cutting between 1900-900 cm⁻¹, baseline correction and standard normal variate transformation. Absorbance A was measured on one peak characteristic for the polymer (1040 cm⁻¹) and one peak characteristic for the drug (988 cm⁻¹), and the band ratio A_{988}/A_{1040} was calculated. DOXO concentration in the bead ($beadC_{DOXO}$) was then assessed using standard $C_{DOXO} = f(A_{988}/A_{1040})$ calibration curves.

Calibration

Sections of DEB with known concentration of DOXO were used as reference. Reference DOXO-DEB were processed similarly to tissue samples and analyzed with infrared microspectroscopy following the same procedure. The lowest limit of quantification (LLOQ) was determined to be 1 mg/mL. $A_{988}/A_{1040} = f(C_{DOXO})$ curve was linear in the concentration range 1-25 mg/mL, with a determination coefficient $R^2=0.981$.

Doxorubicin concentration in tissue

Microspectrofluorimetry

A liver section was laid on a glass slide and analyzed with a microspectrofluorimeter (V45 Dilor, JobinYvon-Horiba) coupled to an argon ion laser at 488 nm excitation (Spectra Physics, Evry France). Fluorescence emission spectra were recorded linearly every $20\mu m$ from the edge of the bead occluding the vessel up to $600~\mu m$ from the bead.

Quantification

As previously described (17), the fluorescence signal (F) arising from a tissue impregnated with DOXO can be considered as composed of an intrinsic tissular contribution F_{tissue} and contribution of the drug itself F_{DOXO} : $F = F_{DOXO} + F_{tissue}$.

Each contribution has a characteristic spectral shape and is proportional to the concentration of the suitable species. F_{tissue} and F_{DOXO} were determined for each spectrum recorded with reference spectra of normal liver tissue and a solution of free DOXO by direct least squares (LabSpec 4.10, Jobin-Yvon, Horiba). DOXO concentration in the tissue $tissC_{DOXO}$ was then calculated from F_{DOXO} using standard $C_{DOXO} = f(F_{DOXO})$ calibration curves.

Calibration

Calibration was performed using standard collagen type I phantoms (18) loaded with different concentrations of DOXO (2.5mg/mL, Teva PHARMA, Puteaux, France) from 10nM to 10 μ M. DOXO contribution to total fluorescence F_{DOXO} was determined as described above and plotted against the C_{DOXO} in phantom. The lowest limit of quantification (LLOQ) was determined to be 50nM. $F_{DOXO} = f(C_{DOXO})$ curve was linear in the concentration range 50nM -7.4μ M, with a determination coefficient R²=0.994.

Tissue lesions

The liver sections for histology evaluation were stained with hematein eosin saffron (HES) and observed with an optical microscope (Leitz Diaplan, Leitz, Kremlin Bicêtre, France).

For each embolized vessel found on HES slide, the tissue adjacent to the bead was classified in 3 categories: normal liver parenchyma / fibrotic tissue / coagulative necrosis. Observations were performed with an objective magnification of x10 and an eyepiece of x12.5 magnification containing a calibrated micrometer.

Tissue lesions and DOXO concentrations, measured on two successive slices, could be compared statistically.

Statistics

All parameters were statistically compared according to DEB group and according to time using non parametric tests (Mann Whitney MW, Kruskal Wallis KW and Chi-square Chi²). Statistical analyses were performed using Statview SAS 5.0 (SAS Institute, Cary NC, USA). The level of significance was defined as P<0.05 for all tests.

Results

Doxorubicin concentration in DEB

A total of 103 beads were analyzed, 13 beads in the control group 1, 76 beads in group 2 and 14 in group 3 (Fig 1 & 2).

No DOXO was detected in any DEB from the control group 1.

DOXO was detected in both small-sized 100-300 μm DOXO-DEB (group 2) and large-sized 700-900 μm DOXO-DEB (group 3). For small beads, the mean concentration of DOXO in DEB was 22.5 mg/mL at 28 days and 4 mg/mL at 90 days, and was significantly different between the two time points (P<0.0001; Mann-Whitney). For large beads, the mean concentration of DOXO in DEB was 15 mg/mL at 28 days and 4 mg/mL at 90 days, with a significant decrease over time (P=0.0240; Mann-Whitney)

The concentration of DOXO in the DEB was not significantly different between the 2 sizes of beads at D28 (P=0.0975; Mann-Whitney) or D90 (P=0.0767; Mann-Whitney). Regardless of the size of injected beads, these levels correspond to a percentage of drug release of 43 % of the initial loaded dose at D28, and 89 % at D90.

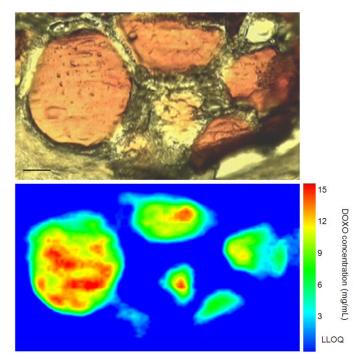


Figure 1. DOXO quantitative mapping in the DEB. (top) Unstained tissue section of a vessel occluded by 5 DOXO-DEB (100-300 μ m, D28). (bottom) Infrared microspectroscopy image of DOXO inside the DEB. Scale bar: 70μ m.

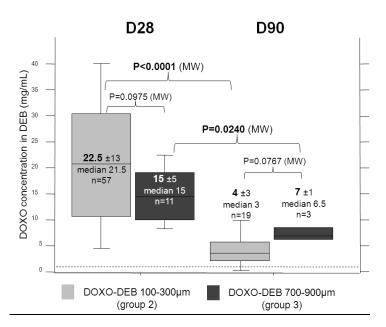


Figure 2. DOXO concentration in DEB at D28 and D90 for the two sizes of DEB. DOXO concentration was measured on 68 beads at D28 and 22 beads at D90. Dotted line: LLOQ (1mg/mL). The concentration of DOXO inside DEB was not significantly different between the two sizes of DOXO-DEB at either time point. DOXO concentration in the beads decreased significantly with time.

Doxorubicin concentration in tissue

A total of 220 DOXO profiles were recorded around different DEB, 14 profiles in control group, 177 profiles in group 2 and 29 profiles in group 3 (Fig 3 & 4).

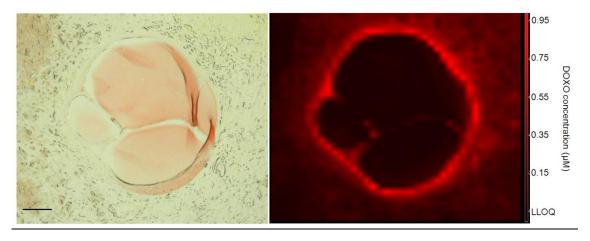


Figure 3. DOXO quantitative mapping in the tissue around DEB. (left) Unstained tissue section of a vessel occluded by 4 DOXO-DEB (100-300 μm , D28). (right) Fluorescence microspectroscopy image of free DOXO around the same vessel. Scale bar: 50 μm .

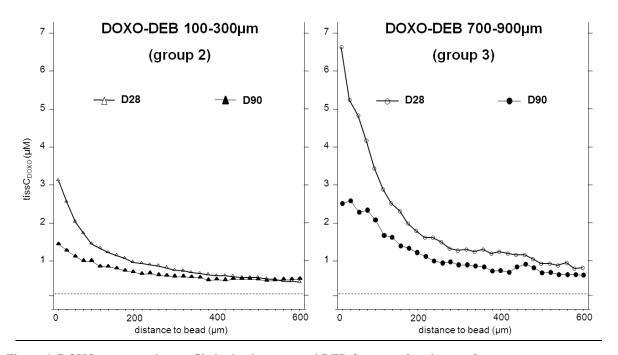


Figure 4. DOXO concentration profile in the tissue around DEB for group 2 and group 3. DOXO concentration was measured on 110 different profiles at D28 and 21 profiles at D90 in group 2, and 67 profiles at D28 and 8 profiles at D90 in group 3. Dotted line: LLOQ (50nM). The tissCDOXO decreased with the distance to the bead for both sizes of DOXO-DEB. The tissCDOXO decreased over time in both size groups. The tissCDOXO was higher around large than small beads at both time points.

DOXO was never detected around control beads (group 1).

In group 2 at D28, $tissC_{DOXO}$ decreased with the distance to the bead surface from 3.25 μ M to 0.55 μ M. The mean $tissC_{DOXO}$ was 1.05 μ M in the field of observation. At D90, $tissC_{DOXO}$ varied between 1.55 μ M and 0.60 μ M with the distance to DEB. The mean $tissC_{DOXO}$ was 0.75 μ M and was significantly lower than at D28 (P=0.0004; Mann-Whitney).

In group 3 at D28, $tissC_{DOXO}$ decreased from 6.80 μ M to 0.90 μ M with a mean value of 2.05 μ M and from 2.60 μ M to 0.70 μ M at D90 with a mean value of 1.25 μ M. The decrease of $tissC_{DOXO}$ from D28 and D90 did not reach statistical significance (P=0.2416; Mann-Whitney).

The mean $tissC_{DOXO}$ was significantly higher in large size (group 3) than in small size (group 2) DOXO-DEB at both D28 (P=0.0023; Mann-Whitney) and D90 (P=0.0319; Mann-Whitney).

Tissue lesions

The lesions of the tissue adjacent to each bead were classified in 3 categories: normal liver parenchyma, fibrotic tissue or coagulative necrosis (Table 1 & Fig 5).

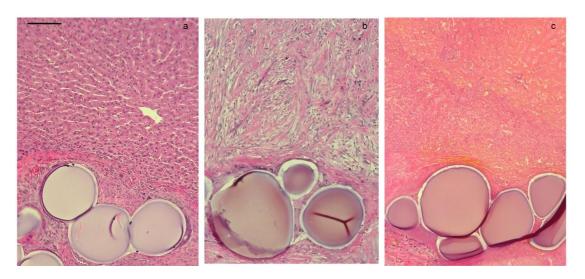


Figure 5. DEB associated with (a) normal liver parenchyma (group 1, D28), (b) fibrotic tissue (group 2, D28), or (c) coagulative necrosis (group 2, D90). Scale bar: 100µm.

In the control group at D28, 100 % of the analyzed beads were associated with normal liver parenchyma. At D90, 67 % were associated with normal liver and 33 % with fibrotic tissue. These percentages were not statistically different between the two time points (P=0.2432, Chi²).

At D28, small DOXO-DEB (group 2) were associated with coagulative necrosis (58 % bead), fibrotic tissue (41 %) and normal liver (1 %). At D90, the presence of coagulative necrosis decreased down to 12 % of the DEB while the presence of fibrotic tissue and normal liver increased up to 81 % and 7 % of the beads, respectively. The tissue modifications between the two time points was statistically significant (p<0.0001, Chi²). The percentages of coagulative necrosis, fibrotic tissue and normal liver were significantly different between group 2 and control group 1 at both time points (p<0.0001 at two time points, Chi²). There was more necrosis, more fibrosis and less normal liver in DOXO-DEB groups than in control group.

At D28, 19 % of large DOXO-DEB (group 3) were associated with coagulative necrosis and 81 % with fibrotic tissue. No normal liver was observed. At D90, 100 % of the DEB were associated with fibrosis. These percentages were not statistically different between the two time points (P=0.4545, Chi²).

The occurrence of coagulative necrosis, fibrotic tissue and normal liver was significantly different between group 2 and group 3 at D28 (P=0.0036, Chi²) with more necrosis and less fibrosis in group 2 than in group 3. The percentages were not significantly different at D90 (P=0.3911, Chi²).

Table 1. Lesions of the tissue surrounding the DEB-occluded vessels.

		coagulative necrosis	fibrotic tissue	normal liver
Unloaded DEB	D28 (n=6)	0 %	0 %	100%
100-300μm (group 1)	D90 (n=27)	0 %	33 %	67 %
DOXO-DEB 100-300µm (group 2)	D28 (n=105)	58 %	41 %	1 %
	D90 (n=67)	12 %	81 %	7 %
DOXO-DEB	D28 (n=21)	19 %	81 %	0 %
700-900μm (group 3)	D90 (n=8)	0 %	100 %	0 %

Doxorubicin concentration and tissue lesions

There was a significant difference in the concentration of DOXO found in coagulative necrosis, fibrotic tissue and normal liver parenchyma at both time points and for both test groups (Fig 6).

At D28, in the group 2 of small DOXO-DEB, the mean $tissC_{DOXO}$ was higher in coagulative necrosis (1.45 μ M) than in fibrotic tissue (0.55 μ M) and normal liver (<LLOQ) (P<0.0001; Kruskal-Wallis). These concentrations did not evolve significantly with time, and the difference between the 3 types of tissues was still statistically significant at D90 (P<0.0001; Kruskal-Wallis).

At D28, in the group 3 of large DOXO-DEB, the mean $tissC_{DOXO}$ was also higher in necrosis (4.80 μ M) than fibrosis (1.40 μ M) (P=0.0054; Mann-Whitney).

The $tissC_{DOXO}$ was higher for large beads than small beads in coagulative necrosis (P=0.0046; Mann-Whitney) and fibrotic tissue (p<0.0001; Mann-Whitney).

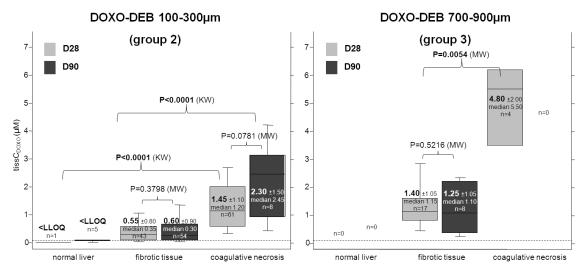


Figure 6. Mean DOXO concentration in normal liver, fibrotic tissue and coagulative necrosis in group 2 and group 3.

DOXO levels in normal liver parenchyma were always below the LLOQ (dotted line). The concentration of DOXO was higher in necrotic tissue than in fibrotic tissue for both group 2 and 3 (p<0.0001 and P=0.00054 respectively; Mann-Whitney). In the two groups, the concentration of DOXO in each type of tissue was not significantly different between the two time points (p>0.05; Mann-Whitney).

Discussion

Doxorubicin loaded LC/DC BeadTM, DOXO-DEB, are proposed for the chemoembolization of liver tumors, with the aim of providing a prolonged drug delivery, with a high diffusion of drug from the bead into the surrounding tissue, and local concentrations above the cytotoxic threshold.

Long term release

One in vivo study suggested that DOXO-DEB could release the anticancer drug for a period of time that covers 14 days following embolization (14). The elution properties of the bead were however not investigated at longer time points. The present work provides the demonstration that DOXO-DEB can in fact carry and release the drug in the embolized tissues over at least 3 months after embolization. The beads have released 43 % of their initial load at one month, and 89 % at 3 months, which is in good agreement with the *in vitro* elution tests predicting a 50 % elution in 2 to 3 months (10, 11). Our quantification of the drug inside the bead also reveals that the percentage of drug release is not different between 100-300 µm and 700-900 µm DEB at the two time points. The effect of bead size on the sustained properties of DOXO-DEB has never been investigated in vivo. In vitro testings have given divergent results depending on the experimental set up (10). In a simple beaker model where beads are placed in a dissolution medium under agitation, large beads showed a significantly slower release than the small beads, due to their relative lower surface of exchange. In the T-apparatus model, consisting of a closed loop system with a low flow rate and a low volume of elution medium to better mimic the *in vivo* conditions, there was no evident effect of bead diameter. In such experimental conditions, the solubility of DOXO and the amount of drug circulating in the system limit its delivery from the DEB, and overrule the influence of the area of bead exchange surface. The present in vivo data are consistent with the predictions of this latter in

vitro model and show that no difference in the duration of drug release should be expected between the different calibres of DEB *in vivo* after embolization.

Drug diffusion from the DEB

The profile of DOXO tissue concentration reveals that, once eluted, the drug diffuses around the embolic up to a distance of 600 μ m from the bead edge (the maximum distance evaluated in our study). Considering that the drug level is still well above the limit of quantification at that distance, we assume that the impregnation of the tissue with DOXO may cover an area of at least one millimeter in radius around the embolized vessel. The concentration profile of DOXO shows two distinct parts: a rapid decrease in the first 100-200 μ m surrounding the beads, followed by a very slow diminishing over the next 400-500 μ m. The tissue distribution profile of drug eluted from loadable implants generally shows a much more gradual decrease when the drug transport is governed by diffusion and elimination only (22-24). The abrupt fall of drug concentration observed here evokes the presence of barriers to drug diffusion (25, 26). This hypothesis could be thoroughly confirmed by comparing our experimental data to theoretical models of drug transport

Drug tissue concentration and cytotoxic levels

The mean tissue concentration of DOXO in the area of observation ranges between 0.75 and 2.05 μ M. In a liver Vx2 model embolized with DOXO-DEB, Hong et al. have reported drug tumor concentrations of 413 μ M (413 nmol/g tissue) and 41 μ M (41 nmol/g tissue) after 3 days and 14 days respectively (14). These concentrations can hardly be compared with our own measurements, which were performed one month and three months after embolization. Moreover, these authors employed a completely different method for DOXO quantification, based on homogenized samples which may retain thousands of drug loaded beads. By using tissue homogenates, it cannot be excluded that the measured drug concentration corresponds to the sum of drug concentrations in tissue and in beads.

Our data show a 30-40 % decrease of tissue DOXO concentration between one and three months. This decrease is due to the emptying of the drug reservoir in the DEB, as demonstrated here, and advocates a progressive wash out of the drug from the tissues. That the large beads provide higher tissue levels of DOXO than the small beads can be explained by the fact that they initially contain higher amounts of DOXO (same concentration of loading).

The concentrations of drug obtained around the embolics were further compared with the levels known to have significant biological effects, i.e. for the antineoplastic DOXO, an antiproliferative effect, evaluated with the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀), or a direct cytotoxicity, evaluated with the half maximal effective concentration (EC₅₀). Animal and human reports were included in the search, with a particular interest in studies using with prolonged exposure time (≥ 1 day) to better approximate the sustained delivery of DOXO-DEB. Two studies on rat hepatocytes cell cultures have described IC₅₀ between 1 μ M and 1.8 μ M (27, 28). Review of the literature failed to yield any report on the antiproliferative or toxic effects of DOXO on healthy liver cells from pig or human. In cultures of human hepatoma cells (HepG2), IC₅₀ ranged between 0.42 μ M and 5 μ M depending on the time of incubation (29, 30). Finally, Chuu et al. have shown in hepatocellular carcinoma explants that DOXO had an IC₅₀ of 0.97 μ M and an EC₅₀ of 3.06 μ M (31). Taken altogether, these data suggest that the levels of DOXO measured here between 0.75 μ M and 2.05 μ M are in the antiproliferative / cytotoxic range respectively.

Tissue modifications induced by DOXO-DEB

The modifications of the tissue adjacent to the bead were evaluated at two time points after implantation. After one month, DOXO-DEB are associated with a coagulative necrosis of the adjacent liver parenchyma. DOXO may have a direct toxic effect or induce apoptosis of the treated cells (32-34), resulting in both cases in the necrosis of the tissues (35). As no necrosis is observed around control unloaded DEB, this modification reflects the efficacy of solely the drug. The presence of these lesions confirms that the tissue concentration of drug at one month is in the cytotoxic range.

At one month, small beads are more often associated with coagulative necrosis of the surrounding tissue compared to large beads. This difference is obviously not related to a difference in the tissue drug concentration at this time point, since we measured lower DOXO concentrations around small beads than around large beads. The tissue concentration of drug might have been different around the two sizes of DEB some time before one month. While the present study did not include a shorter time point, a pharmacokinetics experiment comparing the two sizes of DOXO-DEB suggested a higher burst release with 100-300 μ m beads than 700-900 μ m beads (13). One should also consider that the two calibres of DEB are located in very different structures: 700-900 μ m occlude large vessels in proximal portal spaces with high flow in the adjacent portal vein, while 100-300 μ m beads penetrate more distally in the arterial branches and locate in vessels closer to hepatic lobules and sinusoids. All these discrepancies may lead to different drug release, drug clearance and different effects of the two sizes of DEB.

After three months, the evolution of tissue lesions is not different between the calibres. There is a less important coagulative necrosis around DEB than at one month, and an increase of the fibrotic tissue. This fibrosis may originate from the resorption of drug-induced necrosis coupled to its replacement by a scar type fibrotic tissue (36), and from the foreign body reaction, common to all types of embolization particles (37-39) and which isolates the implant in a fibrotic capsule. This evolution of the tissue lesions suggests that the local drug concentration has fallen under the cytotoxic levels.

<u>Interactions</u> between drug release and tissue modifications

DOXO delivery modifies the tissue around the DEB and these modifications may alter in return the drug diffusion from the DEB. Thus, we found that the necrotic tissue is associated with higher concentrations than fibrotic tissue and normal liver parenchyma. Au and others have shown in tumor histocultures that the penetration of DOXO was enhanced after a prolonged exposure to the drug, which induces cell death and decreases cell density (25, 40). At the tissular level, Gao et al. have confirmed that the concentration of DOXO was higher in necrotized liver parenchyma than in intact tissue because of reduction of drug washout, drugcell interactions and drug metabolism (41). On the opposite, the lower concentration found in the fibrotic tissue may be related to the impairment of DOXO diffusion in collagen (18), causing the fibrous capsule around the implant to act as a possible barrier to drug penetration (26).

Clinical relevancy

Clinically, the choice of beads sizing $100\text{-}300~\mu m$ in diameter seems relevant for HCC embolization. The present work has further confirmed the interest of small DOXO-DEB, showing they provide 1) a sustained release of drug for at least three months, 2) an impregnation of the surrounding tissue over an area which is 6 times larger than the bead, 3) local concentrations which are obviously cytotoxic.

Beads with a diameter of 700-900 µm are probably too large to penetrate inside the tumor vasculature. However beads of this caliber or intermediate caliber may be injected in the chemoembolization procedure to occlude proximal vessels and complete devascularization. The use of drug loaded beads or non-loaded beads in such case can be discussed. One should be aware that, despite less evident necrotic effects, large DOXO-DEB also provide potentially cytotoxic over a wide surface around the beads and a long period of time.

One limitation of this work is that no tumor was present in the liver of the animals. There are reasons to believe that the drug delivery and the efficacy of DOXO-DEB could be different in a cirrhotic tumor-bearing liver, including a different vascular supply (42), a different permeability of the drug in the tumor (43, 44) and a different sensitivity of cancer cells to DOXO (43). A study has been initiated on human hepatocellular carcinoma resected at different time points after DOXO-DEB embolization (45), to assess the concentration and impregnation of DOXO released from the DEB in a hepatic tumor.

From this study it is clear that DOXO released from DEB post embolisation has a significant cytotoxic effect on the tissue, different to the effects of the beads alone. The DOXO diffuses into the tissue to a range in excess of 600 μ m from the bead surface and is present in the tissue at levels above its IC₅₀ for up to 90 days or more. LC/DC BeadTM is therefore effective at delivering a localized dose of DOXO at therapeutic levels over a high distance from the embolisation site for an extended period of time of several months.

References

- 1. Stuart K. Chemoembolization in the management of liver tumors. Oncologist 2003; 8:425-437
- 2. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. Hepatology 2003; 37:429-442.
- 3. Struk D, Rankin RN, Karlik SJ. Stability studies on chemoembolization mixtures. Dialysis studies of doxorubicin and lipiodol with Avitene, Gelfoam, and Angiostat. Invest Radiol 1993; 28:1024-1027.
- 4. 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; 194:165-170.
- 5. Kan Z, Wright K, Wallace S. Ethiodized oil emulsions in hepatic microcirculation: in vivo microscopy in animal models. Acad Radiol 1997; 4:275-282.
- 6. Yi SW, Kim YH, Kwon IC, et al. Stable lipiodolized emulsions for hepatoma targeting and treatment by transcatheter arterial chemoembolization. J Control Release 1998; 50:135-143.
- 7. Tzeng WS, Wu RH, Chang SC, et al. Ionic versus nonionic contrast media solvents used with an epirubicin-based agent for transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma. J Vasc Interv Radiol 2008; 19:342-350.
- 8. 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. Cardiovasc Intervent Radiol 2007; 30:6-25.
- 9. Lewis AL. DC Bead: a major development in the toolbox for the interventional oncologist. Expert Rev Med Devices 2009; 6:(in press).

- 10. Gonzalez MV, Tang Y, Phillips GJ, et al. Doxorubicin eluting beads-2: methods for evaluating drug elution and in-vitro:in-vivo correlation. J Mater Sci Mater Med 2008; 19:767-775.
- 11. Lewis AL, Gonzalez MV, Lloyd AW, et al. DC bead: in vitro characterization of a drug-delivery device for transarterial chemoembolization. J Vasc Interv Radiol 2006; 17:335-342.
- 12. Hong K, Kobeiter H, Georgiades CS, Torbenson MS, Geschwind JF. Effects of the type of embolization particles on carboplatin concentration in liver tumors after transcatheter arterial chemoembolization in a rabbit model of liver cancer. J Vasc Interv Radiol 2005; 16:1711-1717.
- 13. Lewis AL, Taylor RR, Hall B, Gonzalez MV, Willis SL, Stratford PW. Pharmacokinetic and safety study of doxorubicin-eluting beads in a porcine model of hepatic arterial embolization. J Vasc Interv Radiol 2006; 17:1335-1343.
- 14. 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.
- 15. Dreher M, Sharma K, Orandi B, et al. Distribution of Image-Able Beads and Doxorubicin Following Transcatheter Arterial Chemoembolization. J Vasc Interv Radiol 2009; 20:S104.
- 16. Wang Y, Hong J, Cressman EN, Arriaga EA. Direct sampling from human liver tissue cross sections for electrophoretic analysis of doxorubicin. Anal Chem 2009; 81:3321-3328.
- 17. Gigli M, Doglia SM, Millot JM, Valentini L, Manfait M. Quantitative study of doxorubicin in living cell nuclei by microspectrofluorometry. Biochim Biophys Acta 1988; 950:13-20.
- 18. Fourre N, Millot JM, Garnotel R, Jeannesson P. In situ analysis of doxorubicin uptake and cytotoxicity in a 3D culture model of human HT-1080 fibrosarcoma cells. Anticancer Res 2006; 26:4623-4626.
- 19. Namur J, Wassef M, Pelage J, Lewis A, Manfait M, Laurent L. Infrared microspectroscopy analysis of Ibuprofen release from drug eluting beads in uterine tissue. J Control Release 2009; 135:198-202.
- 20. Tfayli A, Piot O, Durlach A, Bernard P, Manfait M. Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy. Biochim Biophys Acta 2005; 1724:262-269.
- 21. Bonnier F, Bertrand D, Rubin S, et al. Detection of pathological aortic tissues by infrared multispectral imaging and chemometrics. Analyst 2008; 133:784-790.
- 22. Saltzman WM, Radomsky ML. Drugs released from polymers: diffusion and elimination in brain tissue. Chem Eng Sci 1991; 46:2429-2444.
- 23. Strasser JF, Fung LK, Eller S, Grossman SA, Saltzman WM. Distribution of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and tracers in the rabbit brain after interstitial delivery by biodegradable polymer implants. J Pharmacol Exp Ther 1995; 275:1647-1655.
- 24. Weinberg BD, Patel RB, Exner AA, Saidel GM, Gao J. Modeling doxorubicin transport to improve intratumoral drug delivery to RF ablated tumors. J Control Release 2007; 124:11-19.
- 25. Au JL, Jang SH, Zheng J, et al. Determinants of drug delivery and transport to solid tumors. J Control Release 2001; 74:31-46.
- 26. Blanco E, Qian F, Weinberg B, Stowe N, Anderson JM, Gao J. Effect of fibrous capsule formation on doxorubicin distribution in radiofrequency ablated rat livers. J Biomed Mater Res A 2004; 69:398-406.

- 27. Carr BI, Laishes BA. Carcinogen-induced drug resistance in rat hepatocytes. Cancer Res 1981; 41:1715-1719.
- 28. Le Bot MA, Begue JM, Kernaleguen D, et al. Different cytotoxicity and metabolism of doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, esorubicin and idarubicin in cultured human and rat hepatocytes. Biochem Pharmacol 1988; 37:3877-3887.
- 29. Luo D, Cheng SC, Xie H, Xie Y. Effects of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma HepG2 cell line. Biochem Cell Biol 2000; 78:119-126.
- 30. Yuan S, Zhang X, Lu L, Xu C, Yang W, Ding J. Anticancer activity of methoxymorpholinyl doxorubicin (PNU 152243) on human hepatocellular carcinoma. Anticancer Drugs 2004; 15:641-646.
- 31. Chuu JJ, Liu JM, Tsou MH, et al. Effects of paclitaxel and doxorubicin in histocultures of hepatocelular carcinomas. J Biomed Sci 2007; 14:233-244.
- 32. Ling YH, Priebe W, Perez-Soler R. Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells. Cancer Res 1993; 53:1845-1852.
- 33. Muller I, Jenner A, Bruchelt G, Niethammer D, Halliwell B. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin--apoptosis and oxidative DNA damage. Biochem Biophys Res Commun 1997; 230:254-257.
- 34. Mailloux A, Grenet K, Bruneel A, Beneteau-Burnat B, Vaubourdolle M, Baudin B. Anticancer drugs induce necrosis of human endothelial cells involving both oncosis and apoptosis. Eur J Cell Biol 2001; 80:442-449.
- 35. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 1995; 146:3-15.
- 36. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing and fibrosis. In: Elsevier Saunders, ed. 7th Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia, 1999; 87-117.
- 37. Bendszus M, Klein R, Burger R, Warmuth-Metz M, Hofmann E, Solymosi L. Efficacy of trisacryl gelatin microspheres versus polyvinyl alcohol particles in the preoperative embolization of meningiomas. AJNR Am J Neuroradiol 2000; 21:255-261.
- 38. Laurent A, Wassef M, Chapot R, Houdart E, Merland JJ. Location of vessel occlusion of calibrated tris-acryl gelatin microspheres for tumor and arteriovenous malformation embolization. J Vasc Interv Radiol 2004; 15:491-496.
- 39. Weichert W, Denkert C, Gauruder-Burmester A, et al. Uterine arterial embolization with tris-acryl gelatin microspheres: a histopathologic evaluation. Am J Surg Pathol 2005; 29:955-961.
- 40. Zheng JH, Chen CT, Au JL, Wientjes MG. Time- and concentration-dependent penetration of doxorubicin in prostate tumors. AAPS PharmSci 2001; 3:E15.
- 41. Gao J, Qian F, Szymanski-Exner A, Stowe N, Haaga J. In vivo drug distribution dynamics in thermoablated and normal rabbit livers from biodegradable polymers. J Biomed Mater Res 2002; 62:308-314.
- 42. Nakashima T, Kojiro M. Pathologic characteristics of hepatocellular carcinoma. Semin Liver Dis 1986; 6:259-266.
- 43. Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. Cancer Res 1987; 47:3039-3051.
- 44. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. Nat Rev Cancer 2006; 6:583-592.
- 45. Namur J, Citron SJ, Dupuis M, et al. Diffusion of Doxorubicin from Drug Eluting Beads and Tissular Changes After Embolisation of Hepatocellular Carcinoma. J Vasc Interv Radiol 2009; 20:S61 (Supplement).

2.4 Libération tissulaire dans des foies humains porteurs de CHC

Article n°3: Drug eluting beads for the treatment of HCC: analysis of doxorubicin concentration and distribution in liver explants.. J. Namur, S. J. Citron, M. H. Dupuis, M. T. Sellers, M. Manfait, M. Wassef, A. Laurent. (en rédaction).

2.4.1 Travaux antérieurs sur la chimiosphère de doxorubicine

Plusieurs études de phase II sont actuellement menées pour vérifier la tolérance des DOXO-DEB chez des patients atteints de CHC non opérables (Poon 2007; Varela 2007; Malagari 2008). Une étude de phase III a également été lancée, comparant l'efficacité des chimiosphères à celle de la procédure de chimioembolisation classique avec lipiodol (Lammer 2009). L'équipe du Dr S.J. Citron du Piedmont Hospital à Atlanta USA a proposé d'utiliser les DOXO-DEB chez des patients éligibles à la chirurgie en attente de transplantation (Citron 2008). L'objectif est de stabiliser l'état de ces patients afin d'éviter les sorties de liste. Cette étude a fourni des prélèvements de foie atteints de CHC que nous nous sommes proposés d'analyser par microspectroscopies optiques.

2.4.2 Objectif

Notre travail visait à confirmer les résultats obtenus sur modèle animal non tumoral à savoir que les DEB pouvaient libérer leur contenu médicamenteux sur une période de plusieurs semaines et à des niveaux cytotoxiques dans des foies porteurs de CHC.

2.4.3 Matériel et méthodes

Nous avons utilisé les prélèvements de foie réalisés chez 9 de ces patients. Au total, 6 patients ont été intégrés à l'étude, avec des temps d'explantation s'échelonnant de 8 heures à 36 jours après embolisation. Nous avons éliminé 3 patients, deux patients ayant subi plusieurs séances de traitements aux DOXO-DEB et un patient ayant été transplanté à un délai beaucoup plus

long et pour lequel seules 4 billes ont été retrouvées. Deux coupes fines jointives ont été effectuées sur des prélèvements fixés en formol et inclus en paraffine. La première coupe a été analysée par microspectrofluorimétrie pour déterminer la concentration de doxorubicine dans le tissu autour des billes et la seconde coupe a été colorée par l'hématéine-éosine-safran (HES) pour évaluer les lésions histologiques autour des billes. Les résultats ont été regroupés par délai pour analyse statistique : 8 heures (1 patient), 9 à 14 jours (3 patients) et 32 à 36 jours (2 patients).

2.4.4 Résultats

Les billes sont retrouvées à la fois dans la tumeur (42 %) et dans le foie non tumoral environnant (58 %). La DOXO a été retrouvée dans le tissu autour des billes chez tous les patients, avec une diminution au cours du temps (Figure 35). Les concentrations tissulaires d'anticancéreux sont très supérieures aux doses cytotoxiques rapportées dans des cultures de prélèvements de tumeurs CHC (Chuu 2007) pendant les 2 premières semaines suivant l'embolisation, et du même ordre de grandeur 1 mois après l'intervention. La pénétration tissulaire du médicament depuis la bille est de l'ordre du millimètre, comme suggéré par le niveau élevé de DOXO retrouvé dès 8 heures à 600 µm de la bille (la distance la plus longue évaluée dans notre étude). Enfin les billes sont associées à une nécrose importante du tissu environnant, et ne sont quasiment jamais trouvées dans du tissu tumoral viable (1 % des billes), suggérant que les DOXO-DEB sont efficaces pour détruire les cellules tumorales adjacentes. La concentration de médicament est plus élevée dans le tissu nécrotique que dans le tissu non-nécrotique à un mois, mais pas à 2 semaines.

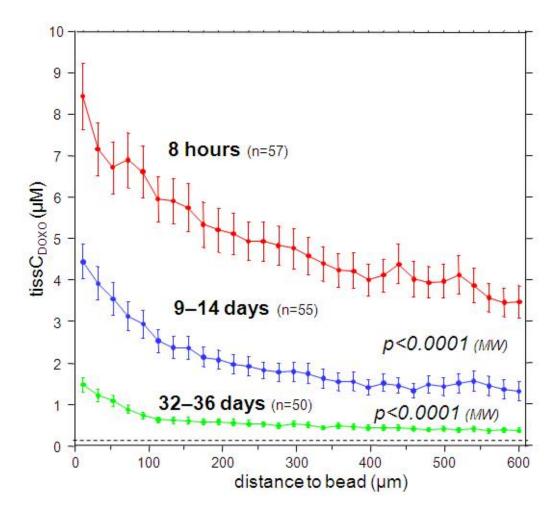


Figure 35 – Profils de distribution de la DOXO dans le tissu depuis le bord de la bille pour les trois délais d'implantation.

2.4.5 Conclusion

Les résultats obtenus sur les prélèvements de CHC confirment ceux obtenus sur l'animal. Les DOXO-DEB remplissent à la fois leur rôle d'agent d'embolisation ciblé et de vecteur à libération contrôlée : elles bloquent des vaisseaux intra et péri-tumoraux, et les niveaux de doxorubicine libérés sont au dessus du seuil de toxicité pendant 14 jours, même à distance de la bille. L'effet anti-tumoral des DOXO-DEB pourrait être dû, à court terme, à l'occlusion vasculaire et à l'ischémie, et, à long terme, à la libération d'anticancéreux par la bille.

2.4.6 Perspectives

Plusieurs éléments distinguent les modèles clinique et animal : l'architecture et la composition du tissu du fait de la présence des nodules tumoraux et de la cirrhose sous-jacente, la vascularisation par l'artère hépatique et la veine porte ou encore la sensibilité des cellules normales et tumorales à la doxorubicine. Il est surprenant de constater que les concentrations, les profils et les lésions tissulaires sont assez proches entre les deux modèles.

Ces données, obtenues sur un faible nombre de patient, devraient être confirmées sur un plus grand effectif. Deux études cliniques actuellement en cours, prospectives et randomisées, sont susceptibles de nous fournir des prélèvements de CHC traités par les DOXO-DEB.

Notre étude a émis une hypothèse sur les mécanismes de l'action anti-tumorale des billes chargées, avec un effet prédominant de l'embolisation à court terme et un effet à long terme dû à la libération prolongée de l'antinéoplasique. Cette hypothèse devrait être confirmée par une étude comparative entre billes chargées et billes non chargées afin de clairement différencier les effets de l'embolisation et ceux de la chimiothérapie. En clinique, l'effet additionnel ou synergétique de la chimiothérapie par rapport à une embolisation simple sans anticancéreux (TAE) n'a pas encore été démontré (Llovet 2002). Certaines équipes ont proposé de traiter les CHC par TAE pour éviter certaines complications liées à l'utilisation d'un cytotoxique (Rand 2005; Osuga 2008). Il semble cependant que la réponse tumorale à ce traitement ne soit que transitoire.

Nous disposons désormais des **outils permettant la caractérisation** *in situ* **de chimiosphères chargées en doxorubicine**. Il serait maintenant intéressant :

- de comparer les propriétés des chimiosphères DC BeadTM étudiées ici à celles de l'autre chimiosphère chargeable en doxorubicine, HepaSphereTM;
- de comparer le résultat du dosage par microspectrofluorimétrie avec une autre méthode de quantification, telle que le microprélèvement direct / MEKC sur lame histologique établi très récemment par Wang et al. (Wang 2009).

Drug eluting beads for the treatment of HCC: analysis of doxorubicin concentration and distribution in liver explants

Julien Namur¹, Steven J. Citron², Mark H. Dupuis³, Marty T. Sellers⁴, Michel Manfait¹, Michel Wassef⁵, Alexandre Laurent⁶.

¹MEDyC UMR CNRS 6237, Reims, France, ²Radiology, Piedmont Hospital, Atlanta, GA, United States, ³Pathology, Piedmont Hospital, Atlanta, GA, United States, ⁴Transplantation Surgery, Piedmont Hospital, Atlanta, GA, United States, ⁵Pathology, Lariboisiere Hospital, Paris, France, ⁶Neuroradiology, Lariboisiere Hospital, Paris, France.

Introduction

Primary hepatocellular cancer (HCC) is the fifth most common cancer in the world and third most common cause of cancer-related death (1). Recent estimates predict the incidence of HCC will show a major increase in the USA over the next decades (2). At present day, the only curative treatments are resection, liver transplantation, and percutaneous ablation. However 60–70 % of patients with HCC are not eligible for these therapies because of advanced stage disease (3), urging the need for other treatments.

Transarterial chemoembolization (TACE) recently demonstrated significant improvement of tumor response and patient survival compared to symptomatic treatment (4, 5). TACE consists of the selective catheterization of the hepatic artery branches feeding the tumor followed by the injection of an antineoplasic drug and an occlusive agent. The reduction/halting of blood flow increases the *in situ* dwell time and concentration of drug inside the tumor (6).

While clear recommendation have been edited on which patient should be treated by TACE (7), there is still no consensus on how to perform the procedure. The optimal strategy would allow the monitoring of the distribution, the time and the amount of drug delivery to the tumor.

To this aim, most clinicians mix the chemotherapeutic with ethiodized oil (lipiodol) based on the observation that lipiodol favors drug uptake and retention in tumor tissue (8-12), two factors positively correlated to patient survival (13).

However the use of lipiodol as a drug carrier in TACE procedure seems at odd with regards to the objective of a controllable procedure. The mixture of a water soluble drug and an oily contrast agent forms an emulsion. The deposition of the preparation in tumor vasculature is mainly determined by its nature (oil in water/ water in oil emulsion) and the size of oily droplets. Large-droplets water in oil emulsions show a specific accumulation in tumor tissue while small-droplet oil in water emulsions lead to a low tumor uptake and a high systemic passage (14, 15). However these parameters can hardly be monitored extemporaneously by the clinician. Second, the liberation of the drug from its oily carrier is difficult to control. The emulsion obtained by a simple agitation separates in two phases within a few minutes (8, 16). Many solutions have been proposed to increase the stability and prolong the release (a stronger agitation with a blender (14) or ultrasonicator (10, 17) or, or the adding of various surfactants (8, 16, 18, 19)), but none has been implemented in clinical

practice. The duration of drug delivery with these mixtures has in fact never been assessed *in situ* after administration. The pumping method (repeated pulls and push between two syringes) is most commonly used, although it is barely reproducible and does not guarantee a controlled release (14, 19). Finally, a few studies have measured quantitatively the amount of drug delivered to the tumor after lipiodol TACE, but they have all been performed on tissue homogenates (9, 10, 17). The release of the drug from lipiodol *in vivo* in the tissue is still a theory, not a fact.

Drug eluting beads (DEB) are presented as a new approach to offer a standardized and reproducible TACE procedure, and overcome the limitations of lipiodol. The innovation is that the chemotherapeutic is loaded directly inside the embolic, serving as an occlusive agent and a drug vector at once.

The theoretical advantages of such an approach are attractive: 1) DEB are calibrated which potentially allows to monitor the distality of occlusion and their intra/extra tumoral location (20); 2) the tissue distribution of the chemotherapeutic is firstly determined by the distribution of the beads that will release the antineoplasic; 3) the drug is loaded inside the DEB extemporaneously at the dose chosen by the clinician; 4) the release kinetics can be modulated by the chemistry of the DEB.

One DEB product (LC/DC BeadTM) loaded with the antineoplasic doxorubicin (DOXO) is currently investigated in the treatment of HCC in a phase II clinical trial (21, 22).

In vitro, DOXO-DEB show a sustained release over several weeks (23, 24), comparable to certain formulations of DOXO-lipiodol (ref). More interesting are in vivo animal data, where DOXO-DEB have demonstrated to deliver their drug content to the target tissue for a period covering at least 3 months after embolization, at levels leading to significant cytotoxic effects (25, 26).

Before comparing their efficacy to conventional TACE in phase III, the theoretical benefits of DOXO-DEB mentioned above should now be thoroughly evidenced *in vivo* in HCC-bearing livers.

The present work aimed to assess 1) the concentration and the distribution of DOXO released by DEB and 2) the tissue lesions associated with the beads, in liver explants from 6 patients with hepatocellular carcinoma and transplanted at different time points after embolization.

Material and Methods

Raw material

Doxorubicin hydrochloride was obtained as a solution for injection in 25mL vials at 2mg/mL concentration (Teva®, TevaClassics, Paris La Défense, France). Drug eluting beads (DEB) were obtained hydrated in 2mL sterile vials (LC Bead® Biocompatibles UK Ltd, size range: 100-300mm). DEB were loaded extemporaneously with DOXO solution prior to embolization procedure at a fixed dose of 37.5mg DOXO /mL DEB.

Liver samples

Patient population

The clinical study was approved by the Investigational Review Board (IRB) of Piedmont Hospital. The use of pathology samples was considered a retrospective study and was not submitted to IRB approval

Six patients with histologically confirmed HCC underwent chemoembolization with DOXO-DEB prior to liver transplantation. No patient had received sorafenib prior to chemoembolization.

Table I – Patient baseline characteristics								
Patient #	Age	Gender	Etiology	HCC stage	Child-Pugh	AFP	Number of lesions	Main lesion diameter (cm)
1		F			C		1	3.9
2		F			В		3	3.7
3	60	F			В	1.4	1	4.0
4	39	M			C	2	1	4.4
5		M			В	22	4	2.8
6	53	F			A	93	1	4.3

Table 1 – Patient baseline characteristics

Embolization and surgery procedures

Embolization procedure consisted of a transfemoral arterial access followed by selective catheterization of the arterial supply to the tumor(s) with 3F microcatheter, pre-treatment digital-subtraction angiography to confirm, followed by slow infusion of 2mL LC Beads reconstituted within a 20mL syringe with non-ionic iodinated contrast medium and saline at a 2:1 mixture at a rate of 0.3-2mL/minute during intermittent fluoroscopic observation, slowing as the embolization endpoint was approached to avoid reflux of the material into non-target vessels. Occasional pre-treatment prophylactic embolization of non-target vessel, typically the cystic artery, was performed with non loaded beads to avoid chemical cholecystitis. Treatment endpoint was an embolization endpoint, consisting of stasis of flow within feeding vessel(s) or completed delivery of maximum single-session dose of 4mL LC Beads containing 150mg doxorubicin.

The total dose of drug injected was 75 to 150mg, with a mean dose of 98.3±24.4mg. All patients had a single session of embolization.

Liver transplantation was performed between 8 hours and 36 days after embolization, with a mean time of 17.5±11days between embolization and surgery.

• Tumor treatment response

Tumor response to treatment was assessed by CT-scan prior to transplant by measurement of residual viable tumor according to RESIST criteria. Follow-up CT scans showed complete necrosis of 9/10 of treated lesions (4/5 patients) and partial response in 1/10 treated tumors. CT scan was not available for 1/6 patient transplanted 8 hours after embolization. Pathology analysis confirmed that no viable tumor was present on the liver explants from the patients showing complete response on CT. A residual 0.5cm viable area within an otherwise necrotic

7.5cm diameter nodule was found in patient showing partial response. No tumor necrosis was found in histology for the patient transplanted after 8 hours due to the very early sampling (27).

Procedure-related complications were seen in two patients and included two cases of alopecia and one case of gangrenous cholecystitis which required hospitalization in intensive care unit prior to transplant.

After a median post-transplant follow-up of 15 months (range 3.5-21 months), 7 patients are alive. No patients have developed tumor recurrence during follow-up.

• Pathology sample procedure

Samples were taken on explanted livers from tumor bearing segments and at distance from the tumor nodule(s). Samples were fixed in 10% formalin, dehydrated and embedded in paraffin blocks. Two $5\mu m$ thick sections were cut consecutively from block with a microtome: one section for doxorubicin quantification and one section for pathology assessment.

Doxorubicin tissue concentration

DOXO concentration in the tissue around the beads was assessed using microspectrofluorimetry as previously described (26). The liver section was analyzed with a microspectrofluorimeter (V45 Dilor, JobinYvon-Horiba) coupled to an argon ion laser (Spectra Physics, Evry France) at λ =488nm excitation (28, 29). Fluorescence emission spectra were recorded linearly every 20 μ m from the surface of the bead occluding the vessel up to 600 μ m from the bead with an objective x10 magnification and 0.25 numerical aperture. Contributions of DOXO and tissue to total fluorescence were separated with reference spectra of each component by direct least squares (LabSpec 4.10, Jobin-Yvon, Horiba). The tissular concentration of DOXO (tissCDOXO) was calculated from the fluorescence contribution of DOXO with standard DOXO collagen phantoms and then plotted against the distance to the DEB. The lowest limit of quantification (LLOQ) of the method was 50nM.

Pathology mesurements

The second liver histology section was stained with hematein eosin saffron (HES) and observed with an optical microscope (Leitz Diaplan, Leitz, Kremlin Bicêtre, France). The diameter of the vessel and the number of beads occluding the vessel were measured as previously described (30). For patient #1 whom did not show any tumor necrosis, the intra/extratumoral location of the beads was evaluated. For the 5 other patients whom evidenced significant necrosis of the embolized area and tissue modifications, the intra/extratumoral location could not be assessed. For these patients, the tissue adjacent to the bead was further classified in 4 categories: viable tumor / cirrhotic liver / fibrotic tissue / coagulative necrosis. Measurements were performed with a objective magnification of x10 and an eyepiece magnification of x12.5 containing a calibrated micrometer.

Statistics

tissCDOXO and pathology measurements were compared statistically using non parametric tests Mann Whitney (MW), Kruskall Wallis (KW) and Chi-square (Chi 2) (Statview SAS 5.0). The level of significance was defined as p<0.05.

Results

Number of beads per vessel and vessel size

A total number of 77 vessels occluded by DEB were evaluated. There was a median number of one bead per occluded vessel, and a mean value of 1.7 ± 1.2 bead per vessel (range 1-7). The mean diameter of occluded vessels was $399\pm272~\mu m$ with a median value of $330~\mu m$.

DOXO tissue concentration

A total of 162 DOXO profiles were recorded around different DEB (Figure 1). DOXO profiles were compared between time points of explantation classified as 8 hours (1 patient/57 profiles), 9–14 days (3 patients/55 profiles) or 32–36 days (2 patients/50 profiles).

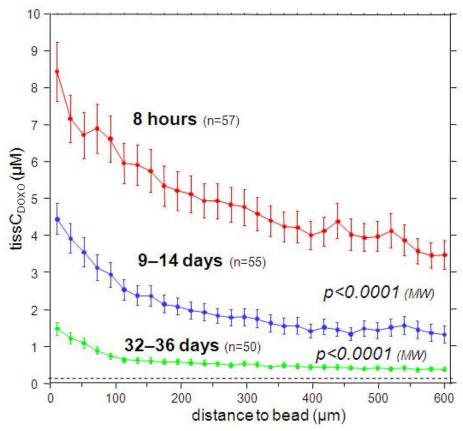


Figure 1-DOXO concentration profile in the tissue around the DEB 8 hours, 9-14 days and 32-36 days after DOXO-DEB embolisation. Dots: mean value; Bars: standard error.

DOXO was detected in the tissue around DEB for all times of explantation.

After 8 hours, tissCDOXO decreased with the distance to the bead surface from $8.45\mu M$ to $3.55\mu M$ at a distance of $600\mu m$ from the bead. The mean tissCDOXO in the field of observation was $5.00\pm3.45~\mu M$.

For livers explanted between 9 and 14 days, tissCDOXO varied between $4.50\mu M$ and $1.40\mu M$ from the edge of the bead. The mean tissCDOXO was $2.10\pm1.70~\mu M$ and was significantly lower than at 8 hours (p<0.0001; Mann-Whitney).

After 32 - 36 days, tissCDOXO decreased from $1.55\mu M$ to $0.45\mu M$ with the distance to the DEB. The mean tissCDOXO was $0.65\pm0.50~\mu M$ and was significantly lower than after 1 day (p<0.0001; Mann-Whitney) or after 9 - 14 days (p<0.0001; Mann-Whitney).

<u>Pathology</u>

In patient #1, 42% of the vessels occluded by DEB were located inside the tumor and 58% were located outside the tumor in cirrhotic liver (Figure 2.A).

For the 5 other patients, DEB were surrounded with coagulative necrosis in 39% of cases, fibrotic tissue in 56% of cases, liver parenchyma in 4% of cases and tumor tissue in 1% of cases (Figure 2.B). The tissue modifications around the DEB were not significantly different between 9-14 days and 32-36 days (p=0.1030; Chi²).

The bead surrounded with tumor tissue was found in patient #4 presenting a 0.5cm viable area. It was the only DEB found in the tumor nodule.

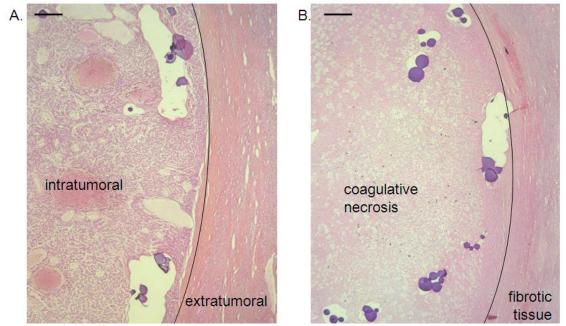


Figure 2 – A) DOXO-DEB inside a tumor nodule (8 hours); B) DOXO-DEB in coagulative necrosis (32 days) (HES staining, scale bar : 300 μ m).

Pathology and DOXO concentration

The concentration of DOXO was compared between necrotic and non-necrotic tissues (viable tumor, fibrotic tissue and liver parenchyma) (Figure 3).

Drug concentration was not significantly between necrotic and non-necrotic tissue at 9-14 days (p=0.7363; Mann Whitney), but was significantly higher in necrotic compared to non-necrotic tissue at 32-36 days (p=0.0032; Mann Whitney).

The concentration of DOXO decreased significantly between 9-14 and 32-36 days both in necrotic (p=0.0090; Mann Whitney) and non necrotic tissues (p<0.0001; Mann Whitney).

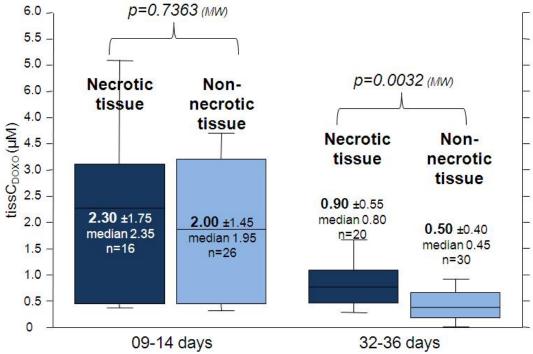


Figure 3 – Mean DOXO concentration in necrotic and non necrotic tissue 9-14 days and 32-36 days after DOXO-DEB treatment.

Discussion

The rationale for using DOXO-DEB in TACE procedure with the objective of tumor killing is based on the following assumptions: 1) the distribution of the beads can be controlled, so intratumoral/extratumoral vessels can be targeted, 2) the vector does deliver its chemotherapeutic load locally, for a long time and at cytotoxic levels, 3) this release results in the necrosis of the target tissue.

Good embolization bead

The present work first demonstrates that DOXO-DEB act as an embolic with a controlled size. The particles occlude vessels with a diameter corresponding to their caliber, they are found in most cases as a single bead occluding the vessel and do not aggregate to block proximal arterial branches.

Hence DOXO-DEB fulfill their first requirement as a calibrated embolic agent and it can be expected that the repartition of the drug loaded bead within or in the periphery of the tumor can be monitored by selecting a proper size of beads. Our data further suggest that the use DEB measuring 100 to 300 μm in diameter allows penetrating inside the tumor nodule, since 42% of DEB seen on tissue samples from patient #1 are found inside the lesion.

The intra/extratumoral distribution of DEB could not be confirmed in other patients due to major tissue modifications in the embolized area. A general statement on which caliber is best adapted for HCC embolisation should be assessed in dedicated studies on a higher number of cases.

Controlled release system

The location of the beads will further determine the distribution of the drug, as evidenced by the decrease of DOXO concentration with the distance to the bead edge. The drug diffuses radially in the tissue around the implant and each bead impregnates an area of at least 1.2mm in diameter with chemotherapeutic. DOXO diffusion might cover a surface even larger, considering that drug level at that distance is still high above the limit of quantification during the two first weeks.

Time of delivery

At the 8 hours time point, tissue concentration of DOXO is maximum (5.00 μ M) and remains high at two weeks (2.10 μ M) and one month (0.65 μ M). These results evidence that DOXO delivery from the DEB starts within the first hours following the injection and is maintained for a period of at least one month after treatment.

DOXO concentration

Interestingly, Hong et al. have reported, in a rabbit liver carcinoma model, tissue drug concentrations of 413 μM (413 nmol/g tissue) after 3 days and 41 μM (41nmol/g tissue) after 14 days (25). These levels are much higher than those reported in HCC at similar time point, and two facts may account for such discrepancy. The dose injected in the animal model was much higher than the dose used in the present clinical study relatively to the size of the animals. Moreover, these authors employed a completely different method for DOXO quantification, based on homogenized samples which may retain thousands of drug loaded beads. By using tissue homogenates, it cannot be excluded that the measured drug concentration corresponds to the sum of drug concentrations delivered to the tissue and still retained inside the beads. On the other hand, Namur et al. have measured, in a non-tumorous pig liver, mean DOXO tissue concentrations of 1.05 μM and 0.75 μM , one month and three month after DEB treatment respectively. The levels obtained here in HCC confirm these experimental data, only the concentrations are slightly higher in the present study because measured at shorter time points.

The question arises as to whether the concentrations of drug achieved around the embolics are clinically relevant, in other words if they are high enough to induce the desired cytotoxic effect. The levels measured around DEB in HCC in situ were compared with the levels reported to have significant biological activity on human hepatoma cells in vitro. The activity of antineoplasic drugs is generally assessed through their antiproliferative effect, measured by the half maximal inhibitory concentration (IC50). The IC50 of DOXO on HeP-G2 cells, decreasing with the time of contact between the drug and the cells, is 110μ M after 5 min of drug incubation (31), 7.9μ M after 6 hours of incubation (32), 0.92μ M after 1 day (33) and 0.42 after 3 days (34). By comparison, drug concentrations found here in embolized HCC were $5.00~\mu$ M after 8 hours, 2.10~after~10~days and 0.65μ M after one month, suggesting the delivery of DOXO from the DEB may lead to antiproliferative effect.

In histocultures of explanted HCC, Chuu et al. have reported IC50 of $0.97\mu M$ after 4 days of incubation, and further showed that the drug caused cell death at a concentration of $3.06\mu M$ (35). So DOXO released by DEB may also have a pharmacological effect through a direct cytotoxicity on the cells surrounding the beads.

Tissue modifications

Pathological analysis shows major tissue modifications around the DEB, mainly characterized by a coagulative necrosis and a fibrotic tissue. The necrotic effect of DOXO-DEB supposedly reflects the pharmacological effect of the drug measured at biologically active concentrations, but may also result from the embolization itself (36) (ref).

The fact that DOXO concentration was measured at similar levels in necrotic and non-necrotic areas 2 weeks after embolization suggests that the initial necrotic effect of DOXO-DEB is not determined by the tissue level of drug. It rather supports the hypothesis of ischemia. On the other hand, ischemia induced necrosis is usually resolved in a few days (ref) so the persistence of coagulative necrosis over one month rather support the efficacy of the drug. Taken altogether, these findings suggest that vessel occlusion might be initially predominant in the efficacy of DOXO-DEB while the delivery of therapeutic levels of drug for a sustained period of time may help to prolong the acute effect of embolization.

These mechanisms, though scientifically based, are hypothetic and could be thoroughly demonstrated in a comparative study of loaded and unloaded beads.

Clinical relevancy

DEB for the treatment of HCC have evidenced several characteristics, not provided by the commonly used lipiodol: a controllable distribution of the chemotherapy, a sustained delivery over several weeks and local drug concentrations within the therapeutic range.

These results reinforce the need of a phase III clinical trial comparing DEB and lipiodol embolization of HCC, to confirm the advantages endowed by such properties.

References

- 1. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer, *94*: 153-156, 2001.
- 2. Tanaka, Y., Hanada, K., Mizokami, M., Yeo, A. E., Shih, J. W., Gojobori, T., and Alter, H. J. Inaugural Article: A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. Proc Natl Acad Sci U S A, 99: 15584-15589, 2002.
- 3. Bruix, J. and Llovet, J. M. Prognostic assessment and evaluation of the benefits of treatment. J Clin Gastroenterol, *35:* S138-142, 2002.
- 4. Llovet, J. M., Real, M. I., Montana, X., Planas, R., Coll, S., Aponte, J., Ayuso, C., Sala, M., Muchart, J., Sola, R., Rodes, J., and Bruix, J. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. Lancet, *359*: 1734-1739, 2002.
- 5. Lo, C. M., Ngan, H., Tso, W. K., Liu, C. L., Lam, C. M., Poon, R. T., Fan, S. T., and Wong, J. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. Hepatology, *35*: 1164-1171, 2002.
- 6. Raoul, J. L., Heresbach, D., Bretagne, J. F., Ferrer, D. B., Duvauferrier, R., Bourguet, P., Messner, M., and Gosselin, M. Chemoembolization of hepatocellular carcinomas. A study of the biodistribution and pharmacokinetics of doxorubicin. Cancer, *70:* 585-590, 1992.

- 7. Bruix, J. and Llovet, J. M. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. Hepatology, *35*: 519-524, 2002.
- 8. Konno, T. Targeting cancer chemotherapeutic agents by use of lipiodol contrast medium. Cancer, *66*: 1897-1903, 1990.
- 9. Sasaki, Y., Imaoka, S., Kasugai, H., Fujita, M., Kawamoto, S., Ishiguro, S., Kojima, J., Ishikawa, O., Ohigashi, H., Furukawa, H., and et al. A new approach to chemoembolization therapy for hepatoma using ethiodized oil, cisplatin, and gelatin sponge. Cancer, *60*: 1194-1203, 1987.
- 10. Katagiri, Y., Mabuchi, K., Itakura, T., Naora, K., Iwamoto, K., Nozu, Y., Hirai, S., Ikeda, N., and Kawai, T. Adriamycin-lipiodol suspension for i.a. chemotherapy of hepatocellular carcinoma. Cancer Chemother Pharmacol, *23*: 238-242, 1989.
- 11. Kan, Z., Wright, K., and Wallace, S. Ethiodized oil emulsions in hepatic microcirculation: in vivo microscopy in animal models. Acad Radiol, *4*: 275-282, 1997.
- 12. Tzeng, W. S., Wu, R. H., Chang, S. C., Chou, C. K., Lin, C. Y., Chen, J. J., Yang, S. C., and Lin, C. H. Ionic versus nonionic contrast media solvents used with an epirubicin-based agent for transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma. J Vasc Interv Radiol, *19*: 342-350, 2008.
- 13. Van Beers, B., Roche, A., Cauquil, P., Jamart, J., Pariente, D., and Ajavon, Y. Transcatheter arterial chemotherapy using doxorubicin, iodized oil and Gelfoam embolization in hepatocellular carcinoma. Acta Radiol, *30*: 415-418, 1989.
- 14. de Baere, T., Dufaux, J., Roche, A., Counnord, J. L., Berthault, M. F., Denys, A., and Pappas, P. Circulatory alterations induced by intra-arterial injection of iodized oil and emulsions of iodized oil and doxorubicin: experimental study. Radiology, *194*: 165-170, 1995.
- 15. Cay, O., Kruskal, J., Thomas, P., and Clouse, M. E. Targeting of different ethiodized oil-doxorubicin mixtures to hypovascular hepatic metastases with intraarterial and intraportal injections. J Vasc Interv Radiol, 7: 409-417, 1996.
- 16. Nakamura, H., Hashimoto, T., Oi, H., and Sawada, S. Transcatheter oily chemoembolization of hepatocellular carcinoma. Radiology, *170*: 783-786, 1989.
- 17. Horiguchi, Y., Itoh, M., Takagawa, H., Imai, H., Kamei, A., Sekoguchi, B., and Nagamura, Y. Assessment of chemoembolization therapy for primary liver cancer using a stabilized adriamycin-lipiodol suspension. Cancer Chemother Pharmacol, *31 Suppl:* S60-64, 1992.
- 18. Yi, S. W., Kim, Y. H., Kwon, I. C., Chung, J. W., Park, J. H., Choi, Y. W., and Jeong, S. Y. Stable lipiodolized emulsions for hepatoma targeting and treatment by transcatheter arterial chemoembolization. J Control Release, *50*: 135-143, 1998.
- 19. Hino, T., Kawashima, Y., and Shimabayashi, S. Basic study for stabilization of w/o/w emulsion and its application to transcatheter arterial embolization therapy. Adv Drug Deliv Rev, *45*: 27-45, 2000.
- 20. Laurent, A., Wassef, M., Chapot, R., Houdart, E., and Merland, J. J. Location of vessel occlusion of calibrated tris-acryl gelatin microspheres for tumor and arteriovenous malformation embolization. J Vasc Interv Radiol, *15*: 491-496, 2004.
- 21. Varela, M., Real, M. I., Burrel, M., Forner, A., Sala, M., Brunet, M., Ayuso, C., Castells, L., Montana, X., Llovet, J. M., and Bruix, J. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. J Hepatol, *46*: 474-481, 2007.
- 22. Malagari, K., Chatzimichael, K., Alexopoulou, E., Kelekis, A., Hall, B., Dourakis, S., Delis, S., Gouliamos, A., and Kelekis, D. Transarterial chemoembolization of

- unresectable hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: results of an open-label study of 62 patients. Cardiovasc Intervent Radiol, 31: 269-280, 2008.
- 23. Lewis, A. L., Gonzalez, M. V., Lloyd, A. W., Hall, B., Tang, Y., Willis, S. L., Leppard, S. W., Wolfenden, L. C., Palmer, R. R., and Stratford, P. W. DC bead: in vitro characterization of a drug-delivery device for transarterial chemoembolization. J Vasc Interv Radiol, *17*: 335-342, 2006.
- 24. Gonzalez, M. V., Tang, Y., Phillips, G. J., Lloyd, A. W., Hall, B., Stratford, P. W., and Lewis, A. L. Doxorubicin eluting beads-2: methods for evaluating drug elution and invitro:in-vivo correlation. J Mater Sci Mater Med, *19*: 767-775, 2008.
- 25. Hong, K., Khwaja, A., Liapi, E., Torbenson, M. S., Georgiades, C. S., and Geschwind, J. F. New intra-arterial drug delivery system for the treatment of liver cancer: preclinical assessment in a rabbit model of liver cancer. Clin Cancer Res, *12*: 2563-2567, 2006.
- 26. Namur, J., Wassef, M., Millot, J., Lewis, A. L., Manfait, M., and Laurent, L. Drug eluting beads for liver embolization: concentration of doxorubicin in tissue and in beads in a pig model. J Vasc Interv Radiol, 2009.
- 27. Majno, G. and Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol, *146*: 3-15, 1995.
- 28. Gigli, M., Doglia, S. M., Millot, J. M., Valentini, L., and Manfait, M. Quantitative study of doxorubicin in living cell nuclei by microspectrofluorometry. Biochim Biophys Acta, *950*: 13-20, 1988.
- 29. Fourre, N., Millot, J. M., Garnotel, R., and Jeannesson, P. In situ analysis of doxorubicin uptake and cytotoxicity in a 3D culture model of human HT-1080 fibrosarcoma cells. Anticancer Res, 26: 4623-4626, 2006.
- 30. Laurent, A., Wassef, M., Saint Maurice, J. P., Namur, J., Pelage, J. P., Seron, A., Chapot, R., and Merland, J. J. Arterial distribution of calibrated tris-acryl gelatin and polyvinyl alcohol microspheres in a sheep kidney model. Invest Radiol, *41*: 8-14, 2006.
- 31. Favoulet, P., Cercueil, J. P., Faure, P., Osmak, L., Isambert, N., Beltramo, J. L., Cognet, F., Krause, D., Bedenne, L., and Chauffert, B. Increased cytotoxicity and stability of Lipiodol-pirarubicin emulsion compared to classical doxorubicin-Lipiodol: potential advantage for chemoembolization of unresectable hepatocellular carcinoma. Anticancer Drugs, *12*: 801-806, 2001.
- 32. Barraud, L., Merle, P., Soma, E., Lefrancois, L., Guerret, S., Chevallier, M., Dubernet, C., Couvreur, P., Trepo, C., and Vitvitski, L. Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. J Hepatol, *42*: 736-743, 2005.
- 33. Castaneda, F. and Kinne, R. K. Effects of doxorubicin, mitomycin C, and ethanol on Hep-G2 cells in vitro. J Cancer Res Clin Oncol, *125*: 1-8, 1999.
- 34. Yuan, S., Zhang, X., Lu, L., Xu, C., Yang, W., and Ding, J. Anticancer activity of methoxymorpholinyl doxorubicin (PNU 152243) on human hepatocellular carcinoma. Anticancer Drugs, *15*: 641-646, 2004.
- 35. Chuu, J. J., Liu, J. M., Tsou, M. H., Huang, C. L., Chen, C. P., Wang, H. S., and Chen, C. T. Effects of paclitaxel and doxorubicin in histocultures of hepatocelular carcinomas. J Biomed Sci, *14*: 233-244, 2007.
- 36. Osuga, K., Hori, S., Hiraishi, K., Sugiura, T., Hata, Y., Higashihara, H., Maeda, N., Tomoda, K., and Nakamura, H. Bland embolization of hepatocellular carcinoma using superabsorbent polymer microspheres. Cardiovasc Intervent Radiol, *31*: 1108-1116, 2008.

Points clefs sur l'étude de la chimiosphère de doxorubicine

Microspectroscopies

- La microspectroscopie infrarouge peut être utilisée pour déterminer la quantité de doxorubicine restante dans un vecteur de chimioembolisation après implantation.
- La microspectroscopie de fluorescence peut être utilisée pour déterminer la distribution et la concentration de doxorubicine libérée par le vecteur dans le tissu environnant.

Chimiosphère

- La diffusion du médicament dans les tissus autour de la bille est de l'ordre du millimètre à partir du bord de la bille.
- Les DOXO-DEB délivrent leur contenu anticancéreux sur une période d'au moins 1 mois.
- Les concentrations tissulaires retrouvées autour des billes correspondent à des niveaux cytotoxiques (Chuu 2007) induisant une nécrose des tissus.
- Une étude préclinique sur modèle tumoral comparant les effets de chimiosphères et de billes non chargées à long terme permettrait d'élucider les rôles respectifs de l'occlusion vasculaire et de la libération d'antinéoplasique sur la tumeur.
- Un essai clinique de phase III est actuellement en cours pour comparer l'efficacité des chimiosphères et de la chimioembolisation lipiodolée.
- Les profils de doxorubicine obtenus *in vitro*, chez l'animal et chez l'homme doivent être confrontés à des modèles théoriques de transfert de masse pour optimiser le traitement.

Chapitre 3

Chimiosphère d'irinotécan

Tableau 10 – Données cliniques sur les tumeurs pulmonaires et la chimioembolisation.

CBPC : cancers bronchiques à petites cellules ; CBNPC : cancers bronchiques non à petites cellules.

	Tumeurs primitives	Tumeurs secondaires
Incidence	 hommes: 30.9 p. 100.000 par an femmes: 12.6 p. 100.000 par an 	• 24 à 50 % des patients décédés d'un cancer
Etiologie	• tabac dans 80% cas	cancers primitifs colorectaux, du sein, de l'estomac, de la vessie et du rein
Pronostic	 survie à 5 ans aux USA : 16 % 3^{ième} plus faible après cancer du pancréas et CHC 	• survie médiane : 10 mois
Traitements	 curatifs : chirurgie (CBPC), chimiothérapie (CBNPC) palliatifs : radiothérapie, chimiothérapie 	palliatifs : chimiothérapie, chirurgie
Indications de la chimioembolisation	• investigation	• investigation
Résultats de la chimioembolisation	• diminution volume : 24 % patients	 diminution volume : 30 % patients survie médiane : 21 mois

3.1 Contexte médical : les tumeurs pulmonaires

3.1.1 Le poumon

i. Structures pulmonaires

Les poumons sont majoritairement situés dans la cavité thoracique qu'ils occupent en quasitotalité. Le poumon droit pèse en moyenne 650 g, le gauche 550 g. Leur volume moyen en inspiration (capacité pulmonaire totale) est de 6 L.

Sur le plan anatomique, chaque poumon se divise en lobes puis en segments (unité chirurgicale) : 3 lobes du côté droit (supérieur, moyen et inférieur) et 2 lobes du côté gauche (supérieur et inférieur). Chaque lobe pulmonaire se subdivise en millier de lobules. C'est l'unité macroscopique et physiologique la plus petite du poumon (Figure 36).

L'ensemble des éléments du lobule est enveloppé dans un tissu conjonctif riche en fibres élastiques. Chaque lobule reçoit une bronchiole terminale et une branche de l'artère pulmonaire.

Dans le lobule, la bronchiole se ramifie encore pour déboucher finalement dans les alvéoles. Elle y amène l'air riche en oxygène. La branche de l'artère pulmonaire court le long des divisons et subdivisions de la bronchiole, jusqu'au niveau des alvéoles où s'effectuent les échanges gazeux.

ii. Vascularisation pulmonaire

La vascularisation du poumon est double. Elle est assurée par les artères et veines pulmonaires, et les artères et veines bronchiques (Stevens 1997).

Les artères pulmonaires apportent au poumon du sang désoxygéné provenant du cœur droit. Ce sang a fourni l'oxygène aux tissus et reçu du gaz carbonique. C'est au niveau des capillaires du système pulmonaire que se déroulent les échanges gazeux.

Les artères pulmonaires droite et gauche pénètrent dans le poumon par le hile et suivent étroitement le trajet de la bronche adjacente et de ses branches, se divisant plus ou moins avec les bronches. La vascularisation artérielle pulmonaire se termine par le lit capillaire étendu des cloisons interalvéolaires où se déroulent les échanges gazeux. Le réseau capillaire déverse son sang réoxygéné dans les veinules et les veines pulmonaires qui le transportent ensuite vers le cœur gauche d'où il repartira par l'aorte.

Les artères bronchiques fournissent un second réseau d'irrigation qui perfuse le poumon à la pression de la circulation systémique artérielle. Elles assurent la nutrition et l'oxygénation du parenchyme pulmonaire. Elles proviennent de l'aorte ou des artères intercostales et suivent elles aussi le chemin de l'arbre bronchique et de ses branches jusqu'au niveau des bronchioles respiratoires, où elles s'anastomosent avec les branches de l'artère pulmonaire. Elles communiquent également avec le système artériel pulmonaire par des anastomoses capillaires dans la sous-muqueuse bronchique.

La double vascularisation du poumon et des tumeurs pulmonaires a été exploitée dans des essais de chimiothérapie par la voie de l'artère pulmonaire.

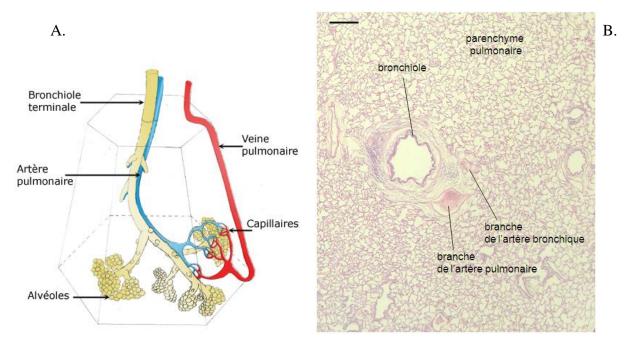


Figure 36 – A) Schéma du lobule pulmonaire (http://www.respir.com). B) Photographie d'une coupe histologique de poumon de mouton (HES, échelle 300 μm)

3.1.2 Tumeurs pulmonaires

i. Types histologiques

Une grande variété de tumeurs bénignes et malignes peut survenir dans les poumons. La grande majorité (90-95 %) correspond à des carcinomes bronchiques. Le terme de bronchique fait référence à la naissance de ces tumeurs à partir de l'épithélium bronchique, parfois bronchiolaire (Cotran 2000).

La classification la plus connue, basée sur les classifications de l'OMS, distingue 4 catégories :

- Carcinome malpighien (25-40 %)
- Adénocarcinome (25-40 %)
- Carcinome à petites cellules (20-25 %)
- Carcinome à grande cellules (10-15 %)

Le poumon est également une localisation fréquente des métastases néoplasiques. L'aspect de l'envahissement est très variable. Dans le cas le plus typique, des nodules multiples se dispersent dans l'ensemble des lobes ("lâcher de ballons"). A la différence du carcinome bronchique primitif, ces nodules se localisent plutôt à la périphérie du parenchyme pulmonaire que dans les zones centrales (Cotran 2000).

ii. Etiologie et pathogénie

L'effet carcinogénique de la **fumée du tabac** a été démontré dans les années 1950 et a été reconnu par les autorités règlementaires au milieu des années 1960. Le risque de développer un cancer du poumon chez les fumeurs est environ 10 fois plus élevé que chez un non fumeur. Il y a une association statistique entre la survenue du cancer bronchique et la quantité de tabac fumé par jour, la durée du tabagisme, l'âge au début de la consommation, le type de tabac et la façon d'inhaler la fumée. La durée du tabagisme est le facteur dominant. L'exposition involontaire à la fumée de tabac pour un non-fumeur augmente également de façon significative le risque de carcinome bronchique (20 %) (IARC 2008).

Les autres facteurs de risque avérés sont principalement les expositions industrielles à l'amiante (risque multiplié par 5, voire par 50-90 chez un fumeur), aux radiations ionisantes,

et les expositions domestiques liées à la combustion de charbon ou de bois, ou encore au radon.

Certaines maladies pulmonaires (tuberculose, bronchite) sont associées à un risque élevé, bien qu'on ignore s'il est dû à l'inflammation chronique ou à l'action de l'agent pathogène. Un risque héréditaire a été évoqué, notamment pour les cancers chez les patients de moins de 60 ans, mais n'a pu être démontré indépendamment de la consommation de tabac (IARC 2008). Madeleine et al. ont récemment publié une revue très complète des nombreux gènes impliqués dans les mécanismes de la carcinogénèse des cancers bronchiques (Madelaine 2005). Il s'agit principalement d'hyperexpression d'oncogènes et des gènes codant certains facteurs de croissance (gènes des familles ras, Myc, gène codant pour l'EGF) et d'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur et de gènes apoptotiques (gènes de la p53 et du rétinoblastome).

Pour les métastases, la localisation primitive est souvent le sein, le colon/rectum, l'estomac/œsophage, la vessie et le rein. Pour une part importante, le site d'origine ne peut être déterminé. Les métastases gagnent le plus souvent les poumons par voie sanguine via l'artère pulmonaire, mais peuvent également emprunter la voie lymphatique (tumeurs digestives) ou passer par contigüité directe (sein, œsophage).

iii. <u>Incidence et pronostic</u>

	Nouveaux cas	Mortalité	Référence
Monde, 2002	1 352 000	1 179 000	(Ferlay 2004)
USA, 2008	215 000	161 840	(Jemal 2008)
Europe, 2006	386 300	334 800	(Ferlay 2007)
France, 2005	30 651	26 624	(Belot 2008)

Tableau 11 – Incidence des cancers primitifs du poumon dans le monde, aux USA, en Europe et en France.

Le cancer du poumon était une pathologie rare au début du 20^{ième} siècle. **Il est actuellement le cancer le plus fréquent** (12,5 % des cancers) **et le plus meurtrier** (17,5 % des décès par cancer) (IARC 2008). Il présente le plus faible pronostic après le cancer du pancréas et le CHC (survie à 5 ans aux USA : 16 %) (Jemal 2008). L'incidence augmente avec l'âge et est globalement 3 fois supérieure chez l'homme par rapport à la femme.

Les répartitions géographiques et temporelles des cancers bronchiques sont majoritairement liées à la consommation de tabac (Figure 37). Les incidences les plus élevées chez les hommes sont enregistrées en Amérique du nord ainsi qu'en Europe de l'est et Europe centrale, mais ont tendance à diminuer aux USA et en Europe du nord. Les incidences sont faibles en Afrique et en Asie du sud-est. Chez les femmes, l'Amérique du nord, le Royaume-Uni ou le Danemark sont les plus touchés, tandis que le Japon ou l'Espagne où le tabagisme chez les femmes est récent, présentent les taux les plus faibles. La Chine est une exception avec un taux relativement élevé malgré une faible consommation tabagique.

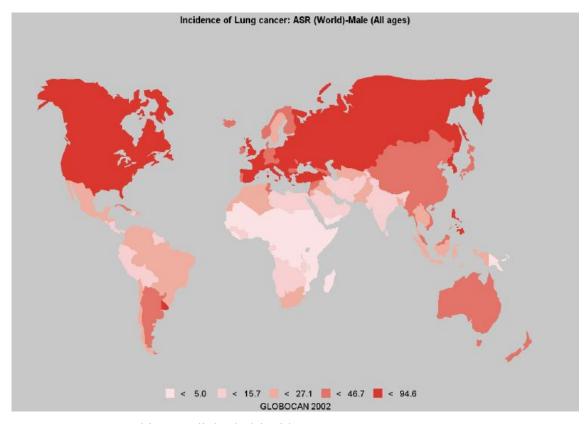


Figure 37 – Cartographie mondiale de l'incidence des cancers primitifs du poumon chez les hommes (IARC 2008).

Une augmentation de la consommation tabagique est suivie 20 à 30 ans plus tard d'une augmentation de l'incidence des cancers des voies bronchiques. Parallèlement, une diminution du tabagisme entraîne une diminution de l'incidence des cancers du poumon.

Tout comme pour le foie, les chiffres de l'incidence des **métastases pulmonaires** viennent d'études post-mortem. Entre 20 et 54 % des patients décédés d'un cancer présente une invasion pulmonaire (Hassan 2009). Il ne semble pas y avoir de variation au niveau mondial. La survie moyenne après constatation de métastases pulmonaires non traitées est de 9 à 11 mois (Mazières 2008).

iv. Classification et traitement

L'intérêt du dépistage des cancers broncho-pulmonaires n'est pas encore établi. Une étude du NCI (National Cancer Institute) sur plus de 10 000 fumeurs de plus de 45 ans semble plaider pour un dépistage dans les populations à risque (Melamed 2000).

L'approche thérapeutique distingue les cancers bronchiques non à petites cellules (carcinome épidermoïde, adénocarcinome, carcinome à grandes cellules) (CBNPC) et les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC).

Pour les CBNPC, la classification à l'aide du système TNM et le regroupement en stades a une valeur pronostique et conditionne le traitement (Goldstraw 2007).

Les tumeurs opérables (généralement stades I et II, éventuellement IIIa), correspondent à 25-30% des patients. Le traitement standard consiste en une exérèse chirurgicale complète et la plus large possible, et un curage ganglionnaire médiastinal complet. Les indications thérapeutiques post-chirurgicales dépendent ensuite des résultats de l'examen anatomopathologique, associant la chimiothérapie et/ou la radiothérapie adjuvantes. Pour les tumeurs complètement réséquées, la survie à 5 ans est supérieure à 70 %.

La radiochimiothérapie est actuellement recommandée dans le traitement des CBNPC inopérables (généralement stade III). Pour les maladies métastatiques (stade IV), qui représentent près de 50 % des patients, la chimiothérapie palliative permet l'augmentation de la durée de vie et de la qualité de vie (Souquet 1993).

Pour les CBPC, la plupart des cliniciens utilisent une simple classification dichotomique distinguant les formes localisées et les formes diffuses. La question de l'utilité de la classification TNM pour le traitement et le pronostic est posée (Vallieres 2009).

Les CBPC localisés représentent environ 30 % patients des patients. Leur prise en charge repose sur l'association d'une polychimiothérapie, à base de combinaisons de cisplatine, étoposide, cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, et d'une radiothérapie précoce. Les traitements chimio- et radiothérapeutiques peuvent être alternés ou concomitants. Ils permettent un allongement significatif de la durée de vie (21 % à 4 ans) (Mornex 2006).

Pour les 70 % de formes diffuses, le traitement est palliatif. L'utilisation de la polychimiothérapie selon le même régime que pour les formes localisées permet une amélioration substantielle du pronostic. Cependant, la médiane de survie n'excède pas 10 mois.

La stratégie thérapeutique pour les **métastases pulmonaires** dépend du contrôle du cancer primitif et du bilan d'extension. Un traitement général est le plus habituel, certaines tumeurs répondant assez bien à la chimiothérapie (lymphomes, thyroïde, sein, prostate, ovaire).

L'excision chirurgicale d'une ou plusieurs métastases pulmonaires est aussi possible, isolément ou en association avec le traitement général. Elle donne des survies à 5 ans entre 20 et 40 % pour l'ensemble des cancers (Pastorino 1997). Ces chiffes varient considérablement selon l'origine du cancer primitif (50 % pour les ostéosarcomes, < 1 % pour les cancers d'origine épithéliale). Le taux de récurrence après l'intervention reste élevé (26-64 %) (Pastorino 1997).

L'ablation par radiofréquence, la radiothérapie stéréotaxique ou la chimiothérapie par l'artère pulmonaire sont utilisées à titre d'investigation (Demmy 2007; Timmerman 2009).

3.1.3 Apport d'une bille charge en irinotécan

Contrairement au parenchyme sain, les tumeurs pulmonaires sont irriguées à la fois par les artères bronchiques et pulmonaires (Van Schil 2008). Plus précisément, Milne et al. ont montré que les tumeurs primaires sont majoritairement vascularisées par le système bronchique, tandis que les métastases pulmonaires reçoivent un apport sanguin par la seule artère pulmonaire dans 48 % des cas, par l'artère bronchique dans 16 % des cas et par les deux voies 36 % des cas (Milne 1976; Milne 1987).

Dans les années 1980 et 1990, plusieurs équipes ont cherché à mettre au point une méthode de traitement chimiothérapeutique des tumeurs pulmonaires par la voie de l'artère pulmonaire (Johnston 1983; Minchin 1984; Ratto 1993; Weksler 1993; Klaase 1994; Ng 1995). Ces travaux ont montré, comparativement au traitement IV :

- une augmentation de la concentration intra-tumorale d'anticancéreux,
- une diminution de la concentration systémique,
- une réduction du nombre de nodules tumoraux.

La technique est complexe à mettre en œuvre en clinique. Elle requiert une thoracotomie, une cannulation des artères et veines pulmonaires et la mise en place d'une circulation extracorporelle.

La **chimioembolisation** pourrait être une technique moins invasive. Schneider et al. ont obtenu, sur un modèle expérimental de métastases colorectales, des nécroses tumorales similaires entre perfusion sur poumon isolé et chimioembolisation au cisplatine plus microsphères d'amidon (Schneider 2002). Aucune toxicité majeure sur le poumon non tumorale n'a été notée. En clinique, Vogl et al. ont obtenu des réductions de volume tumoral de l'ordre de 50 % chez 30 % des patients avec des métastases pulmonaires et chez 24 % des patients avec un cancer primitif (Vogl 2007; Vogl 2008).

Le rationnel pour l'utilisation d'une chimiosphère plutôt que la procédure classique de chimioembolisation, est le même que pour le traitement des tumeurs hépatiques. La vectorisation de l'anticancéreux directement dans la bille d'embolisation permet théoriquement un contrôle plus précis de la distribution du médicament, ainsi que du temps et de la quantité de principe actif délivré au tissu cible. Nous avons démontré que le lipiodol

n'est pas un bon vecteur, d'autant plus que les tumeurs pulmonaires secondaires montrent une faible affinité pour l'agent de contraste (Vogl 2008).

La nature de la molécule à charger dans les billes peut être discutée. Parmi les anticancéreux ayant montré une efficacité sur les tumeurs pulmonaires, seuls l'irinotécan et la doxorubicine ont montré une libération prolongée après chargement dans des chimiosphères (Lewis 2009). Le choix initial d'utiliser l'irinotécan plutôt que la doxorubicine repose sur la meilleure tolérance des CPT11-DEB rapportée dans deux modèles expérimentaux sain (Taylor 2007) et tumoral (Eyol 2008). Ce choix devra être réexaminé au vue des données expérimentales.

3.1.4 Irinotécan

La seule recommandation de l'irinotécan (CPT11) est dans les cancers colorectaux métastatiques en première ligne en combinaison avec le 5-FU et l'acide folinique (FOLFIRI) et en seconde ligne en monothérapie après un échec du 5-FU.

Dans le CBPC, l'irinotécan en combinaison avec le cisplatine a montré une amélioration significative de la survie par rapport à l'étoposide + cisplatine (Noda 2002). Plusieurs essais ont été menés dans le traitement des CBNPC sans démontrer d'effet significatif sur la survie des patients (Pizzolato 2003).

i. <u>Chimie</u>

L'irinotécan (CPT11) est un dérivé hémisynthétique de camptothécine. Sa formule est C₃₃H₃₈N₄O₆, elle a un poids moléculaire de 587 g/mol et un pKa autour de 8.1.

L'irinotécan contient un noyau lactone, susceptible de s'ouvrir rapidement et spontanément en chaîne carboxylique. Cette réaction est importante car seule la forme lactone possède une activité anti-tumorale (Jaxel 1989). A pH 7 - 37°C - PBS, la forme lactone représente 13 % à l'équilibre, avec un temps de demi-réaction de 26 min (Burke 1994).

Figure 38 – Formule semi-développée de l'irinotécan.

ii. Pharmacocinétique (Page 1999; BIAM 2001; Pizzolato 2003)

Le cycle piperidine, qui permet la solubilité dans l'eau, diminue l'activité anticancéreuse. Le clivage de ce cycle (SN38) par des carboxyestérases présentes principalement dans le foie et dans le tractus gastro-intestinal, donne le SN38 qui est 100-1000 fois plus actif que le CPT11. Après une perfusion veineuse à la dose recommandée, la concentration plasmatique maximale est environ de 6,0 µg/ml (~1 mM). Le pic plasmatique du SN38, le métabolite actif, apparaît 1 à 1,5 heures après le début de la perfusion.

La liaison aux protéines plasmatiques est de 35 % pour l'irinotécan et 94 % pour le SN38. La demi-vie plasmatique de l'irinotécan est courte, celle du SN38 se situe entre 10 et 14 heures. L'irinotécan est éliminé par voie biliaire et par voie urinaire pour 15 à 20 %. Si la plupart des organes peuvent métaboliser le CPT11 en SN38, seul le foie peut détoxifier le SN38 par glucuronidation.

Le principal effet secondaire limitant est la diarrhée.

iii. Mode d'action (Pizzolato 2003)

C'est un inhibiteur spécifique de la topo-isomérase I (Top I). La Top I induit des coupures simple brin réversibles de l'ADN. Le CPT11 se fixe au complexe de clivage formé par la Top I et l'ADN et inhibe la religature des fragments d'ADN. Les clivages provoqués enclenchent les mécanismes de la mort cellulaire. Pour de nombreuses cellules cancéreuses, c'est pendant la réplication que la camptothécine est le plus cytotoxique, cependant son activité a aussi été observée lors de la transcription de l'ADN. Agissant à des moments particuliers du cycle cellulaire, les camptothécines doivent être présents à l'intérieur de la cellule pendant un temps prolongé.

Le CPT11 et le SN38 ne sont pas reconnus par la P-glycoprotéine du système de résistance chimiothérapeutique mdr, d'où une efficacité sur des lignées cellulaires résistantes à la doxorubicine et à la vinblastine

3.2 Libération tissulaire dans un modèle expérimental de poumon non tumoral

3.2.1 Travaux antérieurs

Deux études *in vitro* ont été réalisées sur les billes d'embolisation DC BeadTM (Biocompatibles UK Ltd) chargées en irinotécan. Il a été vérifié que la forme lactone de la molécule, i.e. la forme biologiquement active, est majoritairement présente dans la bille après chargement (Tang 2008). D'autre part, le temps de demi-élution prédit par l'appareil en T est d'environ 5 h pour les billes de 100-300 μm (Taylor 2007).

In vivo, dans un modèle non tumoral d'embolisation hépatique chez le porc, le pic plasmatique est réduit par rapport à l'injection intra-artérielle d'une même dose d'irinotécan (Taylor 2007), suggérant que les DEB fournissent une élution prolongée de CPT11.

Notre objectif était de déterminer quantitativement la durée de libération de CPT11 par les DEB après embolisation.

Le travail présenté ici fait partie d'une étude plus générale de toxicité des CPT11-DEB sur un modèle pulmonaire sain non tumoral de mouton. Wassef et al. ont observé que l'embolisation des artères pulmonaires n'induit pas de lésions tissulaires ischémiques, quelque soit le type (coils, billes de 700-900 µm, billes de 100-300 µm) et la quantité d'embole injecté (données non publiées). Par conséquent les effets nécrotiques éventuels des CPT11-DEB dans ce modèle peuvent être directement attribués au médicament et non pas à l'occlusion vasculaire. L'étude comporte 3 parties : 1) la pharmacocinétique plasmatique du CPT11, 2) l'examen anatomopathologique des prélèvements pulmonaires à 4 jours et 4 semaines après embolisation, 3) la quantification du CPT11 restant dans les billes aux deux temps d'implantation.

Nous avons tout d'abord validé la technique de microspectroscopie infrarouge pour la quantification de l'irinotécan dans les DEB, puis appliqué la méthode *ex vivo* sur des coupes de tissus congelés.

3.2.2 Matériel et méthodes

i. Embolisation et prélèvement

Brièvement, 24 moutons ont été embolisés au niveau de l'artère pulmonaire droite avec 2 mL de DEB (DC BeadTM, 100-300 μm, Biocompatibles UK Ltd). Trois doses de chargement ont été étudiées : 10, 20 et 50 mg CPT11/mL bille. Un groupe témoin de bille non chargées en anticancéreux et un groupe témoin injecté avec un bolus de CPT11 dans l'artère pulmonaire ont également été inclus. Les animaux ont été sacrifiés 4 jours ou 4 semaines après embolisation, et des prélèvements frais de poumon ont été effectués pour congélation.

ii. Matériel

Des billes DC BeadTM de calibre 100-300 µm ont été chargées avec des concentrations connues d'irinotécan pour calibration. La préparation des billes a été effectuée par Biocompatibles UK. Une solution de CPT11 dans l'eau a été préparée à la concentration de 10 mg/mL. De l'acide lactique a été ajouté pour maintenir la solution à un pH acide. La solution de chargement a ensuite été versée dans un flacon contenant 2 mL de billes hydratées. Le volume de solution d'irinotécan a été adapté pour obtenir la concentration finale de chargement souhaitée. Cinq doses de DEB-IRI ont été préparées : 5 mg, 12,5 mg, 25 mg et 50 mg /mL de bille. La concentration finale de chargement a été vérifiée en mesurant la quantité de médicament restant dans le surnageant. Puis le surnageant a été aspiré et remplacé par une solution d'acide lactique. Le contenu du flacon a alors été lyophilisé pour être expédié au laboratoire MEDyC. A réception, les billes ont été réhydratées dans 6 mL d'eau déminéralisée. Les billes ont ensuite suivi le même traitement que les échantillons tissulaires.

Les échantillons tissulaires testés dans cette étude correspondent aux 144 prélèvements de poumons (6 échantillons par animal), inclus dans un milieu pour cryosection (Tissue-Tek® OCT Compound, Sakura, Zoeterwoude, Pays-Bas) et congelés en azote liquide. Les échantillons ont été conservés à -80° C avant analyse.

iii. Microspectroscopie infrarouge

Des sections fines de billes / tissus ont été coupées à l'aide d'un cryomicrotome (10 μm d'épaisseur), puis étalées sur des lames de Sélénite de Zinc (ZnSe) pour analyse infrarouge en transmission (Crystal GmBh, Berlin, Germany).Les sections fines ont été analysées à l'aide d'un microspectromètre infrarouge Spectrum Spotlight 300 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) en utilisant le mode image de l'appareil.

Un cadre est défini autour de chaque zone d'intérêt (bille ou vaisseau contenant des billes) et une image "visible" est enregistrée avec la caméra. Avant l'acquisition de l'image infrarouge, le signal de la lame de ZnSe est mesuré comme référence sur chaque pixel du détecteur. L'image infrarouge de la zone d'intérêt est alors enregistrée sur la gamme 4000-650 cm⁻¹, à la résolution spectrale de 4 cm⁻¹, résolution spatiale de 25 µm/pixel, 32 acquisitions /pixel.

Les spectres sont ensuite extraits au niveau des billes retrouvées sur les images infrarouges (Spotlight 1.0.0 software, Perkin Elmer). Le protocole de traitement des données spectrales a été décrit précédemment (voir section II.1.2 p96), et inclus des étapes de lissage, correction de ligne de base, normalisation vectorielle (Opus 5.5 software, Bruker Optik GmBH, Germany).

iv. Quantification

Nous avons tout d'abord établi une courbe de calibration donnant la concentration de CPT11dans la bille à partir de l'absorbance mesurée sur les bandes caractéristiques du médicament.

Les pics correspondant au signal du médicament sur le spectre des CPT11-DEB ont été déterminés par comparaison avec les spectres de la poudre de CPT11 et les spectres de billes contrôle non chargées. L'absorbance A a été mesurée sur les bandes IR caractéristiques du médicament et comparé pour chaque dose de CPT11-DEB à l'absorbance aux mêmes nombres d'onde sur le spectre des DEB contrôle non chargées. La limite de quantification pour chaque pic d'intérêt (LLOQ) a été définie comme la dose la plus faible pour laquelle A était significativement plus élevée que pour les DEB contrôle. On a tracé la courbe de calibration A = f (concentration de chargement de CPT11) entre la LLOQ et la dose la plus élevée. L'équation de la droite de régression linéaire et le coefficient de détermination R^2 de la droite ont été déterminés en utilisant le logiciel Excel 2007 (Microsoft Corporation).

L'exactitude, définie comme l'écart entre la valeur prédite par la méthode et la valeur vraie, a été calculée sur 6 billes chargées à 50 mg/mL et sur 9 billes chargées à 10 mg/mL.

La concentration de CPT11 dans la bille sur la coupe tissulaire a ensuite été déterminée en mesurant l'absorbance A sur les bandes infrarouges caractéristiques du médicament et en utilisant les courbes de calibration A = f (concentration de chargement de CPT11).

3.2.3 Résultats

i. Calibration

Sur le spectre de la CPT11-DEB chargée à 50 mg/mL, le signal du CPT11 est détecté aux nombres d'onde suivants : 1740, 1718, 1598, 1512 et 1434 cm⁻¹ (Figure 39, Tableau 12). Le signal de la bille est détecté aux nombres d'onde suivants : 1232, 1112 and 1038 cm⁻¹ (Figure 39, Tableau 12).

La bande à 1718 cm^{-1} donne la meilleure sensibilité et la meilleure linéarité (Figure 40). Sur ce pic, la LLOQ a été déterminée à 5 mg/mL et le coefficient de détermination de la droite de régression linéaire est $R^2 = 0.977$. L'exactitude est de 7.1 % pour les CPT11-DEB à 10 mg/mL et 1.7 % à 50 mg/mL

ii. Concentration dans les CPT11-DEB sur les coupes tissulaires

Au total, 146 billes ont été trouvées sur les coupes de poumons et analysées en microspectroscopie infrarouge. La concentration de CPT11 dans les billes est inférieure à la LLOQ sur les 5 pics de médicament dans les 3 groupes et aux 2 délais d'implantation (Tableau 13).

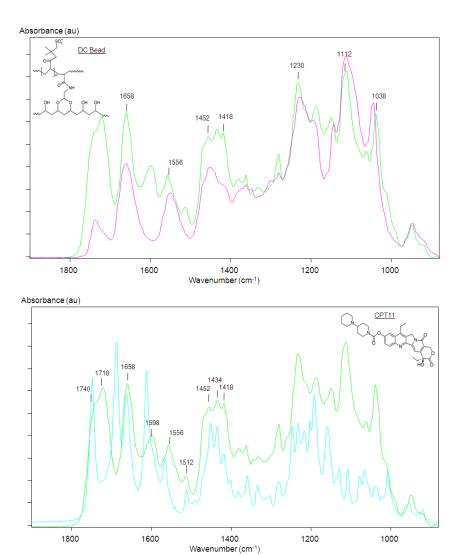


Figure 39 – Spectres infrarouges de CPT11-DEB chargée à 50 mg/mL (vert), de la poudre de CPT11 (violet), et d'une bille DEB témoin non chargée (bleu).

v (cm ⁻¹) CPT11-DEB	CPT11 / DEB	v (cm ⁻¹) spectre ref.	Attribution	
1740	CPT11	1748	C=O élongation (lactone)	
1718	CPT11	1688	C=O élongation (quinoline)	
1658	CPT11 DEB	1662 1658	C=O élongation (pyridone) C=O élongation (Amide I)	
1598	CPT11	1612	N-H déformation (Amide II)	
1556	CPT11 DEB	1566 1548	C=N élongation (cyclic) N–H déformation (Amide II)	
1512	CPT11	1512	C=C élongation (ring)	
1452	CPT11 DEB	1452 1450	C=C élongation C-H déformation (CH ₃ . CH ₂)	
1434	CPT11	1435	C-H déformation (ring)	
1418	CPT11 DEB	1418 1418	O-H déformation (alcool)	
1232	DEB	1230	C–O élongation (éther) C–N élongation	
1112	DEB	1112	C–O élongation (alcool 2 nd)	
1038	DEB	1045	S=O élongation	

Tableau 12 – Attribution des bandes d'absorption du spectre infrarouge de CPT11-DEB chargée à 50 mg/mL (Silverstein 1998; Dicko 2007).

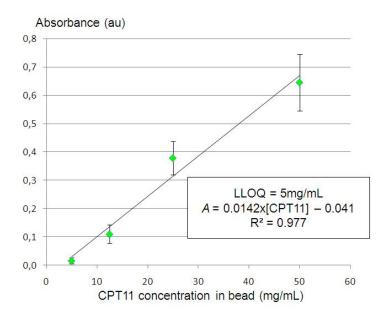


Figure 40 – Corrélation entre l'absorbance sur une bande spécifique du CPT11 (1718 cm⁻¹) et la dose de chargement dans la bille.

4 jours	A 1740cm ⁻¹	A 1718cm ⁻¹	A 1598cm ⁻¹	A 1512cm ⁻¹	A 1434cm ⁻¹
LLOQ	0,295	0,017	0,043	0,020	0,251
0 mg/mL (n=28)	0,041	0,000	0,000	0,002	0,039
10 mg/mL (n=20)	0,040	0,000	0,000	0,002	0,029
25 mg/mL (n=10)	0,037	0,000	0,000	0,001	0,053
50 mg/mL (n=9)	0,033	0,000	0,000	0,001	0,031

4 semaines	A 1740cm ⁻¹	A 1718cm ⁻¹	A 1598cm ⁻¹	A 1512cm ⁻¹	A 1434cm ⁻¹
LLOQ	0,295	0,017	0,043	0,020	0,251
0 mg/mL (n=0)	-	-	-	-	-
10 mg/mL(n=22)	0,039	0,000	0,000	0,008	0,044
25 mg/mL (n=20)	0,033	0,000	0,000	0,006	0,077
50 mg/mL (n=37)	0,037	0,000	0,000	0,005	0,069

Tableau 13 – Valeurs d'absorbance sur les pics spécifiques de CPT11 dans les billes sur coupes tissulaires à 4 jours et 4 semaines.

3.2.4 Conclusion

La microspectroscopie infrarouge a été validée pour la quantification de l'irinotécan dans les billes de chimioembolisation. La sensibilité est proche de celle des DOXO-DEB, quoique sensiblement inférieure.

L'absence de signal de l'irinotécan dans les billes dès 4 jours après l'embolisation suggère :

- 1. que la technique n'est peut-être pas assez sensible pour ce couple médicament/vecteur.
- 2. que la libération de CPT11 *in vivo* dans ce modèle d'embolisation de l'artère pulmonaire est très rapide.

Globalement, cette étude de dose a montré une bonne tolérance de l'embolisation de l'artère pulmonaire aux CPT11-DEB pour toutes les doses étudiées. La pharmacocinétique plasmatique révèle une diminution significative des concentrations systémiques de CPT11 avec les DEB sur toute la durée de l'étude, par rapport à l'injection artérielle. L'examen anatomopathologique met en évidence une nécrose de la paroi des artères embolisées et du parenchyme pulmonaire environnant pour les billes chargées à 50 mg/mL à 4 jours. Aucun signe de toxicité n'est visible à 4 semaines.

3.2.5 Perspectives

Une seconde étude a été réalisée dans le cadre du partenariat avec l'industriel. Cette étude avait pour objectif d'évaluer la tolérance de la double embolisation artère pulmonaires et artères bronchiques avec des CPT11-DEB. Aucune différence significative n'a été observée en termes de lésions tissulaires, suggérant que la double embolisation ne permet pas d'augmenter la quantité ou la durée de présence du médicament dans le tissu embolisé.

L'adéquation entre les propriétés d'élution des CPT11-DEB et l'objectif d'un effet antitumoral doit maintenant être démontré sur un modèle d'embolisation pulmonaire tumoral.

Points clefs sur l'étude de la chimiosphère d'irinotécan

Microspectroscopies

- En utilisant la FTIR-MS, l'irinotécan n'a pas pu être détecté dans la chimiosphère après implantation, même à des délais très courts.
- La FTIR-MS n'est pas adaptée pour étudier ce couple bille / médicament. Une étude de faisabilité en microspectroscopie Raman ou de fluorescence pourrait être entreprise.

Chimiosphère

- Les tests in vitro de libération (Taylor 2007), ainsi que notre propre analyse ex vivo, suggèrent que la chimiosphère CPT11-DEB libère son contenu anticancéreux en quelques heures. Une élution prolongée d'irinotécan implique sans doute l'utilisation d'un autre vecteur.
- L'effet additif ou synergétique de la libération de CPT11 par les billes par rapport à la seule embolisation doit être rapidement démontré sur un modèle tumoral.
- Les études cliniques de tolérance sur l'embolisation de tumeurs pulmonaires secondaires aux chimiosphères d'irinotécan sont en cours.

J. Namur.

Conclusion générale

Les chimiosphères sont des billes d'embolisation calibrées et chargées en principe actif. Les chimiosphères présentes sur le marché sont actuellement en phase d'essais cliniques de leur efficacité dans le traitement de diverses tumeurs bénignes et malignes.

Ce travail avait pour objectif de déterminer *in situ* après embolisation, la quantité de médicament toujours contenu dans la chimiosphère et la concentration du médicament dans le tissu autour des billes.

Nous conclurons premièrement sur l'apport des microspectroscopies optiques pour répondre à ces questions, et nous nous arrêterons deuxièmement sur les principales informations amenées par ce travail sur chaque coupe bille / principe actif étudié, et enfin sur les perspectives attendues pour l'utilisation clinique des chimiosphères

Apport des microspectroscopies pour l'étude des chimiosphères

Les deux techniques de microspectroscopie de fluorescence et microspectroscopie infrarouge se sont révélées applicables, informatives et complémentaires.

La microspectroscopie infrarouge peut être utilisée pour mesurer sur une coupe histologique la concentration du principe actif toujours présent dans la chimiosphère. La technique, validée sur les trois couples bille / médicament, est potentiellement applicable à tout type de médicament et à tout type d'implant chargé (stent, implants sous-cutanés, ophtalmiques..).

La microspectroscopie de fluorescence permet de mesurer la concentration et la distribution de doxorubicine dans le tissu autour de la bille, et pourrait être utilisée pour d'autres principes actifs fluorescents (mitoxantrone, topotécan, autres anthracyclines).

La mise en œuvre des microspectroscopies est simple et rapide. La résolution spatiale est satisfaisante compte tenu de la taille des chimiosphères. Elles peuvent toutes deux être appliquées directement sur la 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 d'histologie classiques, soit par la microspectroscopie vibrationnelle. On peut ainsi imaginer superposer sur le même échantillon, la distribution du médicament et ses effets sur le tissu cible.

Dans la suite de ce travail, une méthodologie de validation solide basée les référentiels reconnus (FDA, IHC, COFRAC) pourrait être mise en place.

Chimiosphère d'ibuprofène

Nous avons démontré que l'anti-inflammatoire est libéré en 2 phases : une élution rapide de 95 % du contenu initial en 24 h et une élution lente de 3 % de la charge sur une semaine. Il a été montré précédemment que les billes d'ibuprofène permettent une réduction significative de la réaction inflammatoire locale une semaine après embolisation, suggérant deux mécanismes d'action de la chimiosphère : une imprégnation précoce par une forte dose ayant des effets durables, et une libération locale prolongée d'une dose faible mais suffisante pour exercer une efficacité biologique.

Si la cinétique d'élution semble du même type que celle de la séquence des douleurs chez les patientes, soit un pic initial à la phase aiguë postopératoire puis une décroissance en plusieurs jours/semaines, il reste à démontrer par un essai clinique que la libération locale de l'anti-inflammatoire est associée à une efficacité thérapeutique.

Chimiosphère de doxorubicine

La seconde série d'études sur la chimiosphère chargée en doxorubicine nous a tout d'abord renseignés sur ses propriétés d'embolisation et de vectorisation *in vivo*. Les billes de diamètre 100-300 µm se répartissent dans la tumeur et dans le plexus péri-tumoral, elles fournissent une libération prolongée d'antinéoplasique sur plusieurs mois, donnant des concentrations tissulaires au dessus des seuils d'efficacité *in vitro*, à des distances près de 10 fois supérieures à la taille de la bille.

Comme pour les chimiosphères d'ibuprofène, il faut déterminer par des essais cliniques si ces caractéristiques sont associées à un effet thérapeutique significatif. Une étude comparative chimiosphère versus bille non chargée permettrait d'éclaircir l'apport de la libération du médicament par rapport à la simple occlusion vasculaire.

L'originalité de ce travail a également consisté à comparer point par point les concentrations tissulaires de DOXO et les lésions associées. Il a été clairement montré que la concentration du médicament varie avec la nature du tissu, et plus particulièrement selon que le tissu est nécrosé ou non. Ce résultat impose deux conclusions :

 une administration locale sur plusieurs semaines d'une dose de 1-10 μM de doxorubicine a un effet cytotoxique significatif. A notre connaissance, il s'agit de la première étude rapportant pour un anticancéreux un seuil d'efficacité au niveau tissulaire. 2. les modifications induites par le traitement aux chimiosphères influent en retour les concentrations et la pénétration du médicament dans le tissu cible. Ce phénomène a déjà été décrit *in vitro* avec différentes molécules cytotoxiques. En thérapeutique, il a été exploité dans une approche combinée RFA + implant chargé en anticancéreux (Qian 2003), ainsi que dans le développement de vecteur chimiothérapeutique à libération pulsée plutôt que continue (Qian 2004).

De nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer la diffusion tissulaire de la molécule, comme démontré par les nombreux travaux de RK Jain (Jain 1999) puis de IF Tannock (Minchinton 2006). La liste est exhaustive et il semble difficile de l'appréhender par une approche purement *ex vivo*: barrières physiques et physiologiques, densité cellulaire, composition de la matrice, architecture vasculaire, pression interstitielle, conditions environnementales, etc. L'analyse théorique de nos données expérimentales sur la base des lois de diffusion de la matière constitue donc la suite logique de ce travail sur les chimiosphères. La molécule de doxorubicine, largement référencée et facilement traçable du fait de ses propriétés fluorescentes, pourrait constituer une drogue idéale pour ce faire.

Chimiosphère d'irinotécan

Sur un troisième couple bille / médicament utilisant la même chimiosphère mais chargée avec de l'irinotécan, nous avons montré que l'élution du principe actif, contrairement à la doxorubicine, est très rapide. Ce résultat suggère qu'une élution prolongée d'irinotécan requiert une modification du vecteur pour renforcer sa capacité à retenir la drogue.

D'autre part, on peut émettre des doutes sur l'efficacité anti-tumorale de cette chimiosphère chargée en irinotécan avec un effet réservoir aussi court. La durée de libération semble particulièrement importante dans le cas des camptothécines dont les effets sur les cellules tumorales dépendent de la phase du cycle cellulaire. Aucune étude expérimentale n'a encore démontré le bénéfice d'une chimiosphère chargée en irinotécan, que ce soit sur un modèle sain ou sur un modèle tumoral.

Vers une dosimétrie locale

Ce travail a validé le concept de libération locale de médicament par une microsphère d'embolisation chargée. Chaque embole libère une dose de principe actif qui va diffuser localement. L'effet réservoir de la chimiosphère permet une imprégnation des tissus environnants jusqu'à franchir le seuil d'efficacité de la molécule et induire l'effet pharmacologique recherché.

Cette analyse se fonde essentiellement sur les conclusions de nos études sur les chimiosphères de doxorubicine. Nous n'avons pu démontrer, pour les deux autres chimiosphères, qu'une dose rapidement éluée était rapidement éliminée et ne pouvait en conséquence imprégner de façon efficace les tissus environnants. Toutefois les concentrations plasmatiques élevées retrouvées pour les deux produits tendent à confirmer cette hypothèse.

Toute la dose chargée et libérée par la chimiosphère est comptabilisée dans le bilan chimiothérapeutique. La rémanence tissulaire du médicament pendant plusieurs mois pose de nouvelles questions sur l'éventuelle toxicité des chimiosphères. Au niveau local, l'accumulation de quantités élevées de médicament présente-t-elle un risque pour les structures saines? Au niveau général, quels sont les effets de la circulation, faible mais continue, de cytotoxiques?

C'est en définissant une dosimétrie locale que l'on pourra définir l'apport spécifique des chimiosphères aux côtés des autres voies d'administration afin de les intégrer dans une véritable stratégie de dose en chimiothérapie.

Références

Abnet CC, Lai B, Qiao YL, Vogt S, Luo XM, Taylor PR, et al.

Zinc concentration in esophageal biopsy specimens measured by x-ray fluorescence and esophageal cancer risk.

J Natl Cancer Inst 2005; 97(4): 301-6.

ACOG American College of Obstetricians & Gynecologists

ACOG practice bulletin. Alternatives to hysterectomy in the management of leiomyomas.

Obstet Gynecol 2008; 112(2 Pt 1): 387-400.

ACS American Cancer Society

Detailed Guide: Liver Cancer. How Is Liver Cancer Staged?

http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_3X_How_is_liver_cancer_staged_25.a sp (mise à jour 07/12/2009).

Adovelande J, Boulard Y, Berry JP, Galle P, Slodzian G and Schrevel J.

Detection and cartography of the fluorinated antimalarial drug mefloquine in normal and Plasmodium falciparum infected red blood cells by scanning ion microscopy and mass spectrometry.

Biol Cell 1994; 81(2): 185-92.

Ahuja S.

Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis

Oxford. Ed: Ahuja S; Academic Press, 2008: 530.

Aït-Slimane T

Principe physique de la fluorescence.

http://www.edu.upmc.fr/sdv/docs_sdvbmc/Master/ue/MV426/fluo89.pdf (mise à jour 2007)

Aliberti C, Benea G, Tilli M and Fiorentini G.

Chemoembolization (TACE) of unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma with slow-release doxorubicin-eluting beads: preliminary results.

Cardiovasc Intervent Radiol 2008; 31(5): 883-8.

Alvarez-Cedron L, Sayalero ML and Lanao JM.

High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues.

J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999; 721(2): 271-8.

Amharref N, Beljebbar A, Dukic S, Venteo L, Schneider L, Pluot M, et al.

Discriminating healthy from tumor and necrosis tissue in rat brain tissue samples by Raman spectral imaging.

Biochim Biophys Acta 2007; 1768(10): 2605-15.

Amharref N, Beljebbar A, Dukic S, Venteo L, Schneider L, Pluot M, *et al.* Brain tissue characterisation by infrared imaging in a rat glioma model. Biochim Biophys Acta 2006; 1758(7): 892-9.

Andrieu JM, Colonna P and Lévy R.

Cancers primitifs du foie. in: Cancers : évaluation, traitement et surveillance.

Paris. Ed: ESTEM; 1997.

Arnold RD, Slack JE and Straubinger RM.

Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy.

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004; 808(2): 141-52.

Bailey-Wood R, Dallimore CM and Whittaker JA.

Effect of adriamycin on CFUGM at plasma concentrations found following therapeutic infusions.

Br J Cancer 1984; 50(3): 351-355.

Baloglu E, Kingston DG, Patel P, Chatterjee SK and Bane SL.

Synthesis and microtubule binding of fluorescent paclitaxel derivatives.

Bioorg Med Chem Lett 2001; 11(17): 2249-52.

Baraga JJ, Feld MS and Rava RP.

In situ optical histochemistry of human artery using near infrared Fourier transform Raman spectroscopy.

Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(8): 3473-7.

Bardin S, Guo W, Johnson JL, Khan S, Ahmad A, Duggan JX, et al.

Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for the simultaneous quantification of Camptosar and its metabolite SN-38 in mouse plasma and tissues.

J Chromatogr A 2005; 1073(1-2): 249-55.

Bazan V, Rocca GL, Corsale S, Agnese V, Macaluso M, Migliavacca M, et al.

Laser pressure catapulting (LPC): Optimization LPC-system and genotyping of colorectal carcinomas.

J Cell Physiol 2005; 202(2): 503-9.

Bechtel W, Wright KC, Wallace S, Mosier B, Mosier D, Mir S, et al.

An experimental evaluation of microcapsules for arterial chemoembolization.

Radiology 1986; 161(3): 601-4.

Belhoussine R, Morjani H, Millot JM, Sharonov S and Manfait M.

Confocal scanning microspectrofluorometry reveals specific anthracyline accumulation in cytoplasmic organelles of multidrug-resistant cancer cells.

J Histochem Cytochem 1998; 46(12): 1369-76.

Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jougla E, Benhamou E, Delafosse P, et al.

Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005.

Rev Epidemiol Sante Publique 2008; 56(3): 159-75.

Benita S, Zouai O and Benoit JP.

5-Fluorouracil:carnauba wax microspheres for chemoembolization: an in vitro evaluation.

J Pharm Sci 1986; 75(9): 847-51.

Beppu T, Ohara C, Yamaguchi Y, Ichihara T, Yamanaka T, Katafuchi S, et al.

A new approach to chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma using aclarubicin microspheres in combination with cisplatin suspended in iodized oil.

Cancer 1991; 68(12): 2555-60.

Berger P and Revel G.

Microsondes nucléaires : applications

Techniques de l'Ingénieur - traité Analyse et Caractérisation 2005: P 2564.

Bernstein PS, Zhao DY, Sharifzadeh M, Ermakov IV and Gellermann W.

Resonance Raman measurement of macular carotenoids in the living human eye.

Arch Biochem Biophys 2004; 430(2): 163-9.

BIAM Banque de Données Automatisée sur les Médicaments

Doxorubicine Chlorhydrate.

http://www.biam2.org/www/Sub322.html (mise à jour le 05/04/2001)

BIAM Banque de Données Automatisée sur les Médicaments

Ibuprofène (mise à jour le 05/01/2001).

http://www.biam2.org/www/Sub1878.html

BIAM Banque de Données Automatisée sur les Médicaments

Irinotecan Chlorhydrate.

http://www.biam2.org/www/Sub5066.html (mise à jour le 26/04/2001).

BIAM Banque de Données Automatisée sur les Médicaments

En Substance, la lettre BIAM - Ibuprofène.

http://www.biam.fr/substance/ibuprofene.asp (mise à jour mai 2005).

Blanco E, Qian F, Weinberg B, Stowe N, Anderson JM and Gao J.

Effect of fibrous capsule formation on doxorubicin distribution in radiofrequency ablated rat livers.

J Biomed Mater Res 2004; 69A(3): 398-406.

Borovac T Conception et validation d'un nouvel appareil de dissolution permettant l'étude des formes pharmaceutiques administrées en milieu clos : Corrélations in vitro - in vivo.

Université Paris 7, Dir: Guiffant G; 2006: 213

Borovac T, Pelage JP, Kasselouri A, Prognon P, Guiffant G and Laurent A.

Release of ibuprofen from beads for embolization: in vitro and in vivo studies.

J Control Release 2006; 115(3): 266-74.

Breitenbach J, Schrof W and Neumann J.

Confocal Raman-spectroscopy: analytical approach to solid dispersions and mapping of drugs.

Pharm Res 1999; 16(7): 1109-13.

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, Dir: Millot JM; 2006: 196

Breuzard G, Angiboust JF, Jeannesson P, Manfait M and Millot JM.

Surface-enhanced Raman scattering reveals adsorption of mitoxantrone on plasma membrane of living cells.

Biochem Biophys Res Commun 2004; 320(2): 615-21.

Bugay DE.

Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques.

Adv Drug Deliv Rev 2001; 48(1): 43-65.

Burgot G and Burgot J.

Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications

Paris. Ed: Tec & Doc; Lavoisier, 2006: 320.

Burke TG and Mi Z.

The structural basis of camptothecin interactions with human serum albumin: impact on drug stability.

J Med Chem 1994; 37(1): 40-6.

Camma C, Schepis F, Orlando A, Albanese M, Shahied L, Trevisani F, et al.

Transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: meta-analysis of randomized controlled trials.

Radiology 2002; 224(1): 47-54.

Castaneda-Zuniga WR, Sanchez R and Amplatz K.

Experimental observations on short and long-term effects of arterial occlusion with Ivalon.

Radiology 1978; 126(3): 783-5.

Cay O, Kruskal J, Thomas P and Clouse ME.

Targeting of different ethiodized oil-doxorubicin mixtures to hypovascular hepatic metastases with intraarterial and intraportal injections.

J Vasc Interv Radiol 1996; 7(3): 409-17.

CCE Conseil des Communautés Européennes

Directive 90/385/CEE concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux dispositifs médicaux implantables actifs. 1990

CCE Conseil des Communautés Européennes

Directive 93/42 relative aux dispositifs médicaux. 1993.

Chan KL, Hammond SV and Kazarian SG.

Applications of attenuated total reflection infrared spectroscopic imaging to pharmaceutical formulations.

Anal Chem 2003; 75(9): 2140-6.

Chan KL and Kazarian SG.

Fourier transform infrared imaging for high-throughput analysis of pharmaceutical formulations.

J Comb Chem 2005; 7(2): 185-9.

Chan KL and Kazarian SG.

High-throughput study of poly(ethylene glycol)/ibuprofen formulations under controlled environment using FTIR imaging.

J Comb Chem 2006; 8(1): 26-31.

Chaurand P, Fouchecourt S, DaGue BB, Xu BJ, Reyzer ML, Orgebin-Crist MC, et al.

Profiling and imaging proteins in the mouse epididymis by imaging mass spectrometry.

Proteomics 2003; 3(11): 2221-39.

Chen Y, Burton MA, Codde JP, Napoli S, Martins IJ and Gray BN.

Evaluation of ion-exchange microspheres as carriers for the anticancer drug doxorubicin: invitro studies.

J Pharm Pharmacol 1992; 44(3): 211-5.

Cheng BQ, Jia CQ, Liu CT, Fan W, Wang QL, Zhang ZL, et al.

Chemoembolization combined with radiofrequency ablation for patients with hepatocellular carcinoma larger than 3 cm: a randomized controlled trial.

Jama 2008; 299(14): 1669-77.

Choo-Smith LP, Edwards HG, Endtz HP, Kros JM, Heule F, Barr H, et al.

Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation.

Biopolymers 2002; 67(1): 1-9.

Christin-Maitre S and Wirthner D.

[Uterine fibromas: classification and physiopathology].

J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 1999; 28(7): 707-14.

Chu J and Gallo JM.

Application of microdialysis to characterize drug disposition in tumors.

Adv Drug Deliv Rev 2000; 45(2-3): 243-53.

Chuu JJ, Liu JM, Tsou MH, Huang CL, Chen CP, Wang HS, et al.

Effects of paclitaxel and doxorubicin in histocultures of hepatocelular carcinomas.

J Biomed Sci 2007; 14(2): 233-44.

Citron SJ, Dupuis MH, Gallardo E and Wheeler S.

Doxorubicin-loaded DC-Bead chemoembolization for HCC (Precision TACE): Assessment of tumor necrosis with imaging and histologic follow-up (*poster*).

Annual meeting of the International Liver Cancer Association, Chicago IL, 2008.

Clerc J, Fourre C and Fragu P.

SIMS microscopy: methodology, problems and perspectives in mapping drugs and nuclear medicine compounds.

Cell Biol Int 1997; 21(10): 619-33.

Cliff B, Lockyer N, Jungnickel H, Stephens G and Vickerman JC.

Probing cell chemistry with time-of-flight secondary ion mass spectrometry: development and exploitation of instrumentation for studies of frozen-hydrated biological material.

Rapid Commun Mass Spectrom 2003; 17(19): 2163-7.

Codde JP, Lumsden AJ, Napoli S, Burton MA and Gray BN.

A comparative study of the anticancer efficacy of doxorubicin carrying microspheres and liposomes using a rat liver tumour model.

Anticancer Res 1993; 13(2): 539-43.

Colgan TJ, Pron G, Mocarski EJ, Bennett JD, Asch MR and Common A.

Pathologic features of uteri and leiomyomas following uterine artery embolization for leiomyomas.

Am J Surg Pathol 2003; 27(2): 167-77.

Cotran RS, Kumar V and Collins T.

Robbins - Anatomie Pathologique

Padova. Ed: Cotran RS, Kumar V and Collins T; Piccin Nuova Libraria, 2000.

Coutts-Lendon CA, Wright NA, Mieso EV and Koenig JL.

The use of FT-IR imaging as an analytical tool for the characterization of drug delivery systems.

J Control Release 2003; 93(3): 223-48.

Crow P, Stone N, Kendall CA, Uff JS, Farmer JA, Barr H, et al.

The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro. Br J Cancer 2003; 89(1): 106-8.

Czauderna P, Zbrzezniak G, Narozanski W, Sznurkowska K, Skoczylas-Stoba B and Stoba C. Pulmonary embolism: a fatal complication of arterial chemoembolization for advanced hepatocellular carcinoma.

J Pediatr Surg 2005; 40(10): 1647-50.

DaCosta RS, Wilson BC and Marcon NE.

Fluorescence and spectral imaging.

ScientificWorldJournal 2007; 7: 2046-71.

Dalibart M and Servant L.

Spectroscopie dans l'infrarouge.

Techniques de l'Ingénieur - traité Analyse et Caractérisation 2000; P2845:1-26

Davies MI.

A Review of Microdialysis Sampling for Pharmacokinetic Applications.

Anal Chim Acta 1999; 379: 227-249.

de Baere T, Deschamps F, Teriitheau C, Rao P, Conengrapht K, Schlumberger M, et al.

Transarterial chemoembolization of liver metastases from well differentiated gastroenteropancreatic endocrine tumors with doxorubicin-eluting beads: preliminary results.

J Vasc Interv Radiol 2008; 19(6): 855-61.

de Baere T, Dufaux J, Roche A, Counnord JL, Berthault MF, Denys 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): 165-70.

de Baere T, Zhang X, Aubert B, Harry G, Lagrange C, Ropers J, et al.

Quantification of tumor uptake of iodized oils and emulsions of iodized oils: experimental study.

Radiology 1996; 201(3): 731-5.

De Beer TR, Baeyens WR, Ouyang J, Vervaet C and Remon JP.

Raman spectroscopy as a process analytical technology tool for the understanding and the quantitative in-line monitoring of the homogenization process of a pharmaceutical suspension. Analyst 2006; 131(10): 1137-44.

Decorti G, Klugmann FB, Crivellato E, Malusa N, Furlan G, Candussio L, et al.

Biochemical and microscopic evidence for the internalization of drug-containing mast cell granules by macrophages and smooth muscle cells.

Toxicol Appl Pharmacol 2000; 169(3): 269-75.

Demmy TL and Dunn KB.

Surgical and nonsurgical therapy for lung metastasis: indications and outcomes.

Surg Oncol Clin N Am 2007; 16(3): 579-605, ix.

Denkbas EB, Seyyal M and Piskin E.

5-fluorouracil loaded chitosan microspheres for chemoembolization.

J Microencapsul 1999; 16(6): 741-9.

Derdeyn CP, Graves VB, Salamat MS and Rappe A.

Collagen-coated acrylic microspheres for embolotherapy: in vivo and in vitro characteristics.

AJNR Am J Neuroradiol 1997; 18(4): 647-53.

Deugnier Y

Anatomo-Physiologie du foie. *in*: Polycopié Médecine M2 - Sémiologie du Foie et des Voies Biliaires, Université de Médecine de Rennes 1.

www.med.univ-rennes1.fr/resped/s/semio/semiodigestif/AnatomoPhysioFoie.pdf (mise à jour septembre 2005).

Diamandidou E, Ajani JA, Yang DJ, Chuang VP, Brown CA, Carrasco HC, et al.

Two-phase study of hepatic artery vascular occlusion with microencapsulated cisplatin in patients with liver metastases from neuroendocrine tumors.

AJR Am J Roentgenol 1998; 170(2): 339-44.

Dicko A, Tardi P, Xie X and Mayer L.

Role of copper gluconate/triethanolamine in irinotecan encapsulation inside the liposomes.

Int J Pharm 2007; 337(1-2): 219-28.

Diem M, Chiriboga L and 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): 282-90.

Dillon CT, Lay PA, Bonin AM, Cholewa M, Legge GJ, Collins TJ, et al.

Permeability, cytotoxicity, and genotoxicity of chromium (V) and chromium (VI) complexes in V79 Chinese hamster lung cells.

Chem Res Toxicol 1998; 11(2): 119-29.

Dilou N, Patouillard B and Audigier JC.

[Staging systems in hepatocellular carcinoma].

Gastroenterol Clin Biol 2004; 28(4): 359-66.

Dominkus M, Nicolakis M, Kotz R, Wilkinson FE, Kaiser RR and Chlud K.

Comparison of tissue and plasma levels of ibuprofen after oral and topical administration.

Arzneimittelforschung 1996; 46(12): 1138-43.

Draux F, Jeannesson P, Beljebbar A, Tfayli A, Fourre N, Manfait M, et al.

Raman spectral imaging of single living cancer cells: a preliminary study.

Analyst 2009; 134(3): 542-8.

Drexler DM, Garrett TJ, Cantone JL, Diters RW, Mitroka JG, Prieto Conaway MC, et al.

Utility of imaging mass spectrometry (IMS) by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) on an ion trap mass spectrometer in the analysis of drugs and metabolites in biological tissues.

J Pharmacol Toxicol Methods 2007; 55(3): 279-88.

Dubois J, Le Goff MT, Gueritte-Voegelein F, Guenard D, Tollon Y and Wright M.

Fluorescent and biotinylated analogues of docetaxel: synthesis and biological evaluation.

Bioorg Med Chem 1995; 3(10): 1357-68.

Duvillard C, Benoit L, Moretto P, Beltramo JL, Brunet-Lecomte P, Correia M, et al.

Epinephrine enhances penetration and anti-cancer activity of local cisplatin on rat sub-cutaneous and peritoneal tumors.

Int J Cancer 1999; 81(5): 779-84.

Edwards RD, Moss JG, Lumsden MA, Wu O, Murray LS, Twaddle S, et al.

Uterine-artery embolization versus surgery for symptomatic uterine fibroids.

N Engl J Med 2007; 356(4): 360-70.

Eikje NS, Aizawa K and Ozaki Y.

Vibrational spectroscopy for molecular characterisation and diagnosis of benign, premalignant and malignant skin tumours.

Biotechnol Annu Rev 2005: 11: 191-225.

Elmquist WF and Sawchuk RJ.

Application of microdialysis in pharmacokinetic studies.

Pharm Res 1997; 14(3): 267-88.

Emerich DF, Snodgrass P, Lafreniere D, Dean RL, Salzberg H, Marsh J, et al.

Sustained release chemotherapeutic microspheres provide superior efficacy over systemic therapy and local bolus infusions.

Pharm Res 2002; 19(7): 1052-60.

Emerich DF, Winn SR, Snodgrass P, LaFreniere D, Agostino M, Wiens T, et al.

Injectable chemotherapeutic microspheres and glioma II: enhanced survival following implantation into deep inoperable tumors.

Pharm Res 2000; 17(7): 776-81.

Erickson HS, Gillespie JW and Emmert-Buck MR.

Tissue microdissection.

Methods Mol Biol 2008; 424: 433-48.

Essendoubi M

Identification et typage par (micro) spectroscopie IRTF des levures du genre Candida d'origine clinique.

Université de Reims Champagne Ardennes, Reims, Dir: Sockalingum G; 2007: 173

Evans P and Brunsell S.

Uterine fibroid tumors: diagnosis and treatment.

Am Fam Physician 2007; 75(10): 1503-8.

Eyol E, Boleij A, Taylor RR, Lewis AL and Berger MR.

Chemoembolisation of rat colorectal liver metastases with drug eluting beads loaded with irinotecan or doxorubicin.

Clin Exp Metastasis 2008; 25(3): 273-82.

Fabian H, Thi NA, Eiden M, Lasch P, Schmitt J and Naumann D.

Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections by using IR-microspectroscopy.

Biochim Biophys Acta 2006; 1758(7): 874-82.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Device and Radiological Health Immunotoxicity Testing Guidance.

Rockville MA, Ed: FDA; 1999

Fend F, Emmert-Buck MR, Chuaqui R, Cole K, Lee J, Liotta LA, et al.

Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis.

Am J Pathol 1999; 154(1): 61-6.

Feofanov A, Charonov S, Fleury F, Kudelina I, Jardillier JC and Nabiev I.

Confocal spectral imaging analysis of intracellular interactions of mitoxantrone at different phases of the cell cycle.

Anticancer Res 1999; 19(6B): 5341-8.

Feofanov A, Sharonov S, Fleury F, Kudelina I and Nabiev I.

Quantitative confocal spectral imaging analysis of mitoxantrone within living K562 cells: intracellular accumulation and distribution of monomers, aggregates, naphtoquinoxaline metabolite, and drug-target complexes.

Biophys J 1997; 73(6): 3328-36.

Feofanov A, Sharonov S, Kudelina I, Fleury F and Nabiev I.

Localization and molecular interactions of mitoxantrone within living K562 cells as probed by confocal spectral imaging analysis.

Biophys J 1997; 73(6): 3317-27.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M and Boyle P.

Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006.

Ann Oncol 2007; 18(3): 581-92.

Ferlay J, Bray F, Pisani P and Parkin DM (International Agency for Research on Cancer)

GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide.

Lyon, Ed: IARC Press; 2004

Fourre N, Millot JM, Garnotel R and Jeannesson P.

In situ analysis of doxorubicin uptake and cytotoxicity in a 3D culture model of human HT-1080 fibrosarcoma cells.

Anticancer Res 2006; 26(6B): 4623-6.

Fragu P and Kahn E.

Secondary ion mass spectrometry (SIMS) microscopy: a new tool for pharmacological studies in humans.

Microsc Res Tech 1997; 36(4): 296-300.

Frank CJ, Redd DC, Gansler TS and McCreery RL.

Characterization of human breast biopsy specimens with near-IR Raman spectroscopy.

Anal Chem 1994; 66(3): 319-26.

Fujimoto S, Endoh F, Kitsukawa Y, Okui K, Morimoto Y, Sugibayashi K, et al.

Continued in vitro and in vivo release of an antitumor drug from albumin microspheres.

Experientia 1983; 39(8): 913-6.

Fujimoto S, Endoh F, Miyazaki M, Shreestha RD, Okui K and Morimoto Y.

Intra-arterial administration of heated albumin microspheres containing mitomycin C to rabbits with VX-2 tumor.

Jpn J Surg 1984; 14(3): 252-7.

Fujimoto S, Miyazaki M, Endoh F, Takahashi O, Okui K and Morimoto Y.

Biodegradable mitomycin C microspheres given intra-arterially for inoperable hepatic cancer. With particular reference to a comparison with continuous infusion of mitomycin C and 5-fluorouracil.

Cancer 1985; 56(10): 2404-10.

Fung LK, Shin M, Tyler B, Brem H and Saltzman WM.

Chemotherapeutic drugs released from polymers: distribution of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in the rat brain.

Pharm Res 1996; 13(5): 671-82.

Gao J, Qian F, Szymanski-Exner A, Stowe N and Haaga J.

In vivo drug distribution dynamics in thermoablated and normal rabbit livers from biodegradable polymers.

J Biomed Mater Res 2002; 62(2): 308-14.

Gao T, Feng J and Ci Y.

Human breast carcinomal tissues display distinctive FTIR spectra: implication for the histological characterization of carcinomas.

Anal Cell Pathol 1999; 18(2): 87-93.

Geze A, Chourpa I, Boury F, Benoit JP and Dubois P.

Direct qualitative and quantitative characterization of a radiosensitizer, 5-iodo-2'-deoxyuridine within biodegradable polymeric microspheres by FT-Raman spectroscopy. Analyst 1999; 124(1): 37-42.

Gigli M, Doglia SM, Millot JM, Valentini L and Manfait M.

Quantitative study of doxorubicin in living cell nuclei by microspectrofluorometry.

Biochim Biophys Acta 1988; 950(1): 13-20.

Gilbert HA, Kagan AR, Hintz BL and Nussbaum H.

Patterns of metastases. in: Liver Metastases.

Boston. Ed: Weiss L and Gilbert HA; 1982: 19-39.

Goldberg JA, Willmott N, Kerr DJ, Sutherland C and McArdle CS.

An in vivo assessment of adriamycin-loaded albumin microspheres.

Br J Cancer 1992; 65(3): 393-5.

Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al.

The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours.

J Thorac Oncol 2007; 2(8): 706-14.

Golzarian J, Lang E, Hovsepian D, Kroncke T, Lampmann L, Lohle P, et al.

Higher rate of partial devascularization and clinical failure after uterine artery embolization for fibroids with spherical polyvinyl alcohol.

Cardiovasc Intervent Radiol 2006; 29(1): 1-3.

Gonzalez MV, Tang Y, Phillips GJ, Lloyd AW, Hall B, Stratford PW, et al.

Doxorubicin eluting beads-2: methods for evaluating drug elution and in-vitro:in-vivo correlation.

J Mater Sci Mater Med 2008; 19(2): 767-75.

Goodwin SC and Spies JB.

Uterine fibroid embolization.

N Engl J Med 2009; 361(7): 690-7.

Goodwin SC, Spies JB, Worthington-Kirsch R, Peterson E, Pron G, Li S, et al.

Uterine artery embolization for treatment of leiomyomata: long-term outcomes from the FIBROID Registry.

Obstet Gynecol 2008; 111(1): 22-33.

Grabnar I, Bogataj M and Mrhar A.

Influence of chitosan and polycarbophil on permeation of a model hydrophilic drug into the urinary bladder wall.

Int J Pharm 2003; 256(1-2): 167-73.

Grosso M, Vignali C, Quaretti P, Nicolini A, Melchiorre F, Gallarato G, et al.

Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma with drug-eluting microspheres: preliminary results from an Italian multicentre study.

Cardiovasc Intervent Radiol 2008; 31(6): 1141-9.

Guerquin-Kern JL, Coppey M, Carrez D, Brunet AC, Nguyen CH, Rivalle C, et al.

Complementary advantages of fluorescence and SIMS microscopies in the study of cellular localization of two new antitumor drugs.

Microsc Res Tech 1997; 36(4): 287-95.

Guiet-Bara A, Michelet-Habchi C, Barberet P, Dutta RK, Moretto P and Bara M.

Elemental maps in human allantochorial placental vessels cells. 4. Isoproterenol and sodium nitroprusside effects.

Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2004; 50 Online Pub: OL609-15.

Han X, Lui H, McLean DI and Zeng H.

Near-infrared autofluorescence imaging of cutaneous melanins and human skin in vivo. J Biomed Opt 2009; 14(2): 024017.

Harris NM, Anderson WR, Lwaleed BA, Cooper AJ, Birch BR and Solomon LZ.

Epirubicin and meglumine gamma-linolenic acid: a logical choice of combination therapy for patients with superficial bladder carcinoma.

Cancer 2003; 97(1): 71-8.

Hassan I

Lung, Metastases.

http://emedicine.medscape.com/article/358090-overview (mise à jour le 06/01/2009)

Hawi SR, Campbell WB, Kajdacsy-Balla A, Murphy R, Adar F and Nithipatikom K. Characterization of normal and malignant human hepatocytes by Raman microspectroscopy. Cancer Lett 1996; 110(1-2): 35-40.

Hehenkamp WJ, Volkers NA, Birnie E, Reekers JA and Ankum WM.

Symptomatic uterine fibroids: treatment with uterine artery embolization or hysterectomyresults from the randomized clinical Embolisation versus Hysterectomy (EMMY) Trial. Radiology 2008; 246(3): 823-32.

Henry CM.

Raman spectra of breast tissue.

Anal Chem 1996; 68(23): 718A-719A.

Hindie E, Escaig F, Coulomb B, Lebreton C and Galle P.

Rapid localization of carbon 14-labeled molecules in biological samples by ion mass microscopy.

J Histochem Cytochem 1989; 37(2): 135-8.

Hino T, Kawashima Y and Shimabayashi S.

Basic study for stabilization of w/o/w emulsion and its application to transcatheter arterial embolization therapy.

Adv Drug Deliv Rev 2000; 45(1): 27-45.

Hong K, Khwaja A, Liapi E, Torbenson MS, Georgiades CS and 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(8): 2563-7.

Hong K, McBride JD, Georgiades CS, Reyes DK, Herman JM, Kamel IR, et al.

Salvage therapy for liver-dominant colorectal metastatic adenocarcinoma: comparison between transcatheter arterial chemoembolization versus yttrium-90 radioembolization.

J Vasc Interv Radiol 2009; 20(3): 360-7.

Horiguchi Y, Itoh M, Takagawa H, Imai H, Kamei A, Sekoguchi B, et al.

Assessment of chemoembolization therapy for primary liver cancer using a stabilized adriamycin-lipiodol suspension.

Cancer Chemother Pharmacol 1992; 31 Suppl: S60-4.

Hosseini K, Jongsma FH, Hendrikse F and Motamedi M.

Non-invasive monitoring of commonly used intraocular drugs against endophthalmitis by Raman spectroscopy.

Lasers Surg Med 2003; 32(4): 265-70.

Huang Z, McWilliams A, Lui H, McLean DI, Lam S and Zeng H.

Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer.

Int J Cancer 2003; 107(6): 1047-52.

Hwang CW, Wu D and Edelman ER.

Physiological transport forces govern drug distribution for stent-based delivery.

Circulation 2001; 104(5): 600-5.

IARC World Health Organization

World Cancer Report 2008.

Lyon, Ed: Boyle P and Levin B; 2008

Ichihara T, Sakamoto K, Mori K and Akagi M.

Transcatheter arterial chemoembolization therapy for hepatocellular carcinoma using polylactic acid microspheres containing aclarubicin hydrochloride.

Cancer Res 1989; 49(15): 4357-62.

Imamura S and Adams JC.

Distribution of gentamicin in the guinea pig inner ear after local or systemic application. J Assoc Res Otolaryngol 2003; 4(2): 176-95.

Ishimori S, Hattori M, Shibata Y, Shizawa H and Fujinaga R.

Treatment of carotid-cavernous fistula by gelfoam embolization.

J Neurosurg 1967; 27(4): 315-9.

ISO Organisation Internationale de Normalisation

Évaluation biologique des dispositifs médicaux. ISO 10993

Jain RK.

Transport of molecules in the tumor interstitium: a review.

Cancer Res 1987; 47(12): 3039-51.

Jain RK.

Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors.

Annu Rev Biomed Eng 1999; 1: 241-63.

Jaxel C, Kohn KW, Wani MC, Wall ME and Pommier Y.

Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. Cancer Res 1989; 49(6): 1465-9.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al.

Cancer statistics, 2008.

CA Cancer J Clin 2008; 58(2): 71-96.

Jeong YI, Nah JW, Lee HC, Kim SH and Cho CS.

Adriamycin release from flower-type polymeric micelle based on star-block copolymer composed of poly(gamma-benzyl L-glutamate) as the hydrophobic part and poly(ethylene oxide) as the hydrophilic part.

Int J Pharm 1999; 188(1): 49-58.

Joffre F, Tubiana JM and Pelage JP.

FEMIC (Fibromes Embolises aux MICrospheres calibrees): uterine fibroid embolization using tris-acryl microspheres. A French multicenter study.

Cardiovasc Intervent Radiol 2004; 27(6): 600-6.

Johnston MR, Minchin R, Shull JH, Thenot JP, McManus BM, Terrill R, et al.

Isolated lung perfusion with Adriamycin. A preclinical study.

Cancer 1983; 52(3): 404-9.

Jones C, Burton MA and Gray BN.

Albumin microspheres as vehicles for the sustained and controlled release of doxorubicin.

J Pharm Pharmacol 1989; 41(12): 813-6.

Jones C, Burton MA and Gray BN.

Enhanced in vivo activity of adriamycin incorporated into controlled release microspheres.

Br J Cancer 1989; 59(5): 743-5.

Jordan O, Denys A, De Baere T, Boulens N and Doelker E.

Irinotecan and Doxorubicin-Loaded Microspheres for Transarterial Chemoembolization: In Vitro Comparative Study of Drug Loading and Release Properties of Two Commercially Available Microspheres.

J Vasc Interv Radiol 2009; 20(2): S115.

Juni K, Ogata J, Nakano M, Ichihara T, Mori K and Akagi M.

Preparation and evaluation in vitro and in vivo of polylactic acid microspheres containing doxorubicin.

Chem Pharm Bull (Tokyo) 1985; 33(1): 313-8.

Kan Z, Wright K and Wallace S.

Ethiodized oil emulsions in hepatic microcirculation: in vivo microscopy in animal models. Acad Radiol 1997; 4(4): 275-82.

Kang SH, Chang SY, Do KC, Chi SC and Chung DS.

High-performance liquid chromatography with a column-switching system and capillary electrophoresis for the determination of ibuprofen in plasma.

J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 712(1-2): 153-60.

Kanter P.

Métastases hépatiques - Quand le cancer s'étend au foie.

Le Journal de l'Institut Curie 2005; 61: 8-10.

Kasper HU, Drebber U, Dries V and Dienes HP.

[Liver metastases: incidence and histogenesis].

Z Gastroenterol 2005; 43(10): 1149-57.

Kassab AC, Xu K, Denkbas EB, Dou Y, Zhao S and Piskin E.

Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent.

J Biomater Sci Polym Ed 1997; 8(12): 947-61.

Katagiri Y, Mabuchi K, Itakura T, Naora K, Iwamoto K, Nozu Y, et al.

Adriamycin-lipiodol suspension for i.a. chemotherapy of hepatocellular carcinoma.

Cancer Chemother Pharmacol 1989; 23(4): 238-42.

Kato T, Nemoto R, Mori H, Takahashi M and Harada M.

Arterial chemoembolization with mitomycin C microcapsules in the treatment of primary or secondary carcinoma of the kidney, liver, bone and intrapelvic organs.

Cancer 1981; 48(3): 674-80.

Kato T, Nemoto R, Mori H, Takahashi M and Tamakawa Y.

Transcatheter arterial chemoembolization of renal cell carcinoma with microencapsulated mitomycin C.

J Urol 1981; 125(1): 19-24.

Kato T, Sato K, Sasaki R, Kakinuma H and Moriyama M.

Targeted cancer chemotherapy with arterial microcapsule chemoembolization: review of 1013 patients.

Cancer Chemother Pharmacol 1996; 37(4): 289-96.

Katsumori T and Kasahara T.

The size of gelatin sponge particles: differences with preparation method.

Cardiovasc Intervent Radiol 2006; 29(6): 1077-83.

Kazarian SG and Martirosyan GG.

Spectroscopy of polymer/drug formulations processed with supercritical fluids: in situ ATR-IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP.

Int J Pharm 2002; 232(1-2): 81-90.

Kerr DJ, Willmott N, McKillop JH, Cummings J, Lewi HJ and McArdle CS.

Target organ disposition and plasma pharmacokinetics of doxorubicin incorporated into albumin microspheres after intrarenal arterial administration.

Cancer 1988; 62(5): 878-83.

Keyoung JA, Levy EB, Roth AR, Gomez-Jorge J, Chang TC and Spies JB.

Intraarterial lidocaine for pain control after uterine artery embolization for leiomyomata.

J Vasc Interv Radiol 2001; 12(9): 1065-9.

Khan AN, MacDonald S, Pankhania A and Sherlock D.

Liver, Metastases.

http://emedicine.medscape.com/article/369936-overview (mise à jour le 10/02/2009)

Klaase JM, Kroon BB, Beijnen JH, van Slooten GW and van Dongen JA.

Melphalan tissue concentrations in patients treated with regional isolated perfusion for melanoma of the lower limb.

Br J Cancer 1994; 70(1): 151-3.

Koljenovic S, Choo-Smith LP, Bakker Schut TC, Kros JM, van den Berge HJ and Puppels GJ. Discriminating vital tumor from necrotic tissue in human glioblastoma tissue samples by Raman spectroscopy.

Lab Invest 2002; 82(10): 1265-77.

Konishi M, Tabata Y, Kariya M, Hosseinkhani H, Suzuki A, Fukuhara K, et al.

In vivo anti-tumor effect of dual release of cisplatin and adriamycin from biodegradable gelatin hydrogel.

J Control Release 2005; 103(1): 7-19.

Konno T.

Targeting cancer chemotherapeutic agents by use of lipiodol contrast medium.

Cancer 1990; 66(9): 1897-903.

Krafft C, Codrich D, Pelizzo G and Sergo V.

Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study.

J Biophotonics 2008; 1(2): 154-69.

Krafft C, Kirsch M, Beleites C, Schackert G and Salzer R.

Methodology for fiber-optic Raman mapping and FTIR imaging of metastases in mouse brains.

Anal Bioanal Chem 2007; 389(4): 1133-42.

Krafft C, Shapoval L, Sobottka SB, Schackert G and Salzer R.

Identification of primary tumors of brain metastases by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis.

Technol Cancer Res Treat 2006; 5(3): 291-8.

Krafft C, Steiner G, Beleites C and Salzer R.

Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy.

J Biophotonics 2009; 2(1-2): 13-28.

Krishna CM, Sockalingum GD, Bhat RA, Venteo L, Kushtagi P, Pluot M, et al.

FTIR and Raman microspectroscopy of normal, benign, and malignant formalin-fixed ovarian tissues.

Anal Bioanal Chem 2007; 387(5): 1649-56.

Kulik LM, Carr BI, Mulcahy MF, Lewandowski RJ, Atassi B, Ryu RK, et al.

Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis.

Hepatology 2008; 47(1): 71-81.

Kunsman GW and Rohrig TP.

Tissue distribution of ibuprofen in a fatal overdose.

Am J Forensic Med Pathol 1993; 14(1): 48-50.

Kunstlinger F, Brunelle F, Chaumont P and Doyon D.

Vascular occlusive agents.

AJR Am J Roentgenol 1981; 136(1): 151-6.

Kwapiszewska G, Meyer M, Bogumil R, Bohle RM, Seeger W, Weissmann N, et al.

Identification of proteins in laser-microdissected small cell numbers by SELDI-TOF and Tandem MS.

BMC Biotechnol 2004; 4(1): 30.

Kyotani S, Nishioka Y, Okamura M, Tanaka T, Miyazaki M, Ohnishi S, et al.

A study of embolizing materials for chemo-embolization therapy of hepatocellular carcinoma: antitumor effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) albumin microspheres, containing chitin and treated with chitosan on rabbits with VX2 hepatic tumors.

Chem Pharm Bull (Tokyo) 1992; 40(10): 2814-6.

Lakowicz JR.

Principles of fluorescence spectroscopy

New York. Ed: Springer; 2006: 954.

Lalonde AB.

SOGC clinical practice guidelines. Uterine fibroid embolization (UFE).

Int J Gynaecol Obstet 2005; 89(3): 305-18.

Lammer J, Malagari K, Denys A, Vogl T, Pilleul F and Watkinson A.

A randomized phase II trial of a drug-eluting bead in the treatment of hepatocellular carcinoma by transcatheter arterial chemoembolization (*poster*).

Annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, Orlando FL, 2009.

Langer O and Muller M.

Methods to assess tissue-specific distribution and metabolism of drugs.

Curr Drug Metab 2004; 5(6): 463-81.

Lasch P, Haensch W, Naumann D and Diem M.

Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis. Biochim Biophys Acta 2004; 1688(2): 176-86.

Lasch P and Naumann D.

FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques.

Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 1998; 44(1): 189-202.

Laurent A.

Radiodiagnostic - Principes et techniques d'imagerie - Agents d'embolisation.

EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) 2006; 35-140-A-20: 1-10.

Laurent A, Velzenberger E, Wassef M, Pelage JP and Lewis AL.

Do microspheres with narrow or standard size distributions localize differently in vasculature? An experimental study in sheep kidney and uterus.

J Vasc Interv Radiol 2008; 19(12): 1733-9.

Laurent A, Wassef M, Namur J, Martal J, Labarre D and Pelage JP.

Recanalization and particle exclusion after embolization of uterine arteries in sheep: a long-term study.

Fertil Steril 2009; 91(3): 884-92.

Laurent A, Wassef M, Pelage JP, Velzenberger E, Namur J, Schwartz-Cornil I, et al.

Quantification of inflammatory reaction towards Embosphere and Contour SE microspheres after embolization in uterine sheep (*oral presentation*).

Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe, Barcelona, 2004.

Laurent A, Wassef M, Saint Maurice JP, Namur J, Pelage JP, Seron A, et al.

Arterial distribution of calibrated tris-acryl gelatin and polyvinyl alcohol microspheres in a sheep kidney model.

Invest Radiol 2006; 41(1): 8-14.

Le Bot MA, Begue JM, Kernaleguen D, Robert J, Ratanasavanh D, Airiau J, et al.

Different cytotoxicity and metabolism of doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, esorubicin and idarubicin in cultured human and rat hepatocytes.

Biochem Pharmacol 1988; 37(20): 3877-3887.

Le Dref O, Pelage JP and Jacob D.

[Uterine fibroids. Embolization: state-of-the-art].

Gynecol Obstet Fertil 2004; 32(12): 1057-63.

Lee LS, Chi CW, Liu HC, Cheng CL, Li MJ and Lin SY.

Assessment of protein conformation in human benign and malignant astrocytomas by reflectance Fourier transform infrared microspectroscopy.

Oncol Res 1998; 10(1): 23-7.

Leveque D, Gailion-Renault C, Monteil H and Jehl F.

Capillary electrophoresis for pharmacokinetic studies.

J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997; 697(1-2): 67-75.

Lewis A, Taylor R, Gonzalez V, Tang Y, Palmer R, Small S, et al.

Product optimization and characterization of Ibuprofen drug-eluting beads for use in uterine artery embolization (*poster*).

Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe, Roma Italy, 2006.

Lewis AL.

DC Bead: a major development in the toolbox for the interventional oncologist.

Expert Rev Med Devices 2009; 6(4): (in press).

Lewis AL, Gonzalez MV, Leppard SW, Brown JE, Stratford PW, Phillips GJ, et al.

Doxorubicin eluting beads - 1: effects of drug loading on bead characteristics and drug distribution.

J Mater Sci Mater Med 2007; 18(9): 1691-9.

Lewis AL, Gonzalez MV, Lloyd AW, Hall B, Tang Y, Willis SL, et al.

DC bead: in vitro characterization of a drug-delivery device for transarterial chemoembolization.

J Vasc Interv Radiol 2006; 17(2 Pt 1): 335-42.

Lewis AL, Taylor RR, Hall B, Gonzalez MV, Willis SL and Stratford PW.

Pharmacokinetic and safety study of doxorubicin-eluting beads in a porcine model of hepatic arterial embolization.

J Vasc Interv Radiol 2006; 17(8): 1335-43.

Li C, Yang DJ, Nikiforow S, Tansey W, Kuang LR, Wright KC, et al.

Formation and characterization of cisplatin-loaded poly(benzyl l-glutamate) microspheres for chemoembolization.

Pharm Res 1994; 11(12): 1792-9.

Lin CC, Li YT and Chen SH.

Recent progress in pharmacokinetic applications of capillary electrophoresis.

Electrophoresis 2003; 24(22-23): 4106-15.

Lincoff AM, Furst JG, Ellis SG, Tuch RJ and Topol EJ.

Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model.

J Am Coll Cardiol 1997; 29(4): 808-16.

Lindh U, Conradi NG and Sourander P.

Distribution of lead in the cerebellum of suckling rats following low and high dose lead exposure. A micro-PIXE analysis.

Acta Neuropathol 1989; 79(2): 149-53.

Ling J, Weitman SD, Miller MA, Moore RV and Bovik AC.

Direct Raman imaging techniques for study of the subcellular distribution of a drug.

Appl Opt 2002; 41(28): 6006-17.

Liu CH, Das BB, Sha Glassman WL, Tang GC, Yoo KM, Zhu HR, et al.

Raman, fluorescence, and time-resolved light scattering as optical diagnostic techniques to separate diseased and normal biomedical media.

J Photochem Photobiol B 1992; 16(2): 187-209.

Llovet JM and Bruix J.

Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival.

Hepatology 2003; 37(2): 429-42.

Llovet JM, Burroughs A and Bruix J.

Hepatocellular carcinoma.

Lancet 2003; 362(9399): 1907-17.

Llovet JM, Real MI, Montana X, Planas R, Coll S, Aponte J, et al.

Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial.

Lancet 2002; 359(9319): 1734-9.

Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, et al.

Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma.

Hepatology 2002; 35(5): 1164-71.

Los G, Mutsaers PH, Lenglet WJ, Baldew GS and McVie JG.

Platinum distribution in intraperitoneal tumors after intraperitoneal cisplatin treatment.

Cancer Chemother Pharmacol 1990; 25(6): 389-94.

Lullmann H and Mohr K.

Atlas de Poche de Pharmacologie

Paris. Ed: Flammarion-Médecine-Sciences; 2003: 400.

Lunn G.

HPLC methods for pharmaceutical analysis

New York. Ed; Wiley-Interscience, 2000: 7009.

Ly E, Piot O, Durlach A, Bernard P and Manfait M.

Polarized Raman microspectroscopy can reveal structural changes of peritumoral dermis in basal cell carcinoma.

Appl Spectrosc 2008; 62(10): 1088-94.

Ly E, Piot O, Durlach A, Bernard P and Manfait M.

Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared spectral micro-imaging combined with pattern recognition.

Analyst 2009; 134(6): 1208-14.

Ly E, Piot O, Wolthuis R, Durlach A, Bernard P and Manfait M.

Combination of FTIR spectral imaging and chemometrics for tumour detection from paraffinembedded biopsies.

Analyst 2008; 133(2): 197-205.

Lyaruu DM, Tros GH, Bronckers AL and Woltgens JH.

Micro-PIXE (proton-induced X-ray emission) study of the effects of fluoride on mineral distribution patterns in enamel and dentin in the developing hamster tooth germ.

Scanning Microsc 1990; 4(2): 315-22.

Madelaine J and Zalcman G.

Biologie des cancers bronchiques.

EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) - Pneumologie 2005; 6-002-G-25: 1-16.

Mahadevan-Jansen A, Mitchell MF, Ramanujam N, Malpica A, Thomsen S, Utzinger U, *et al.* Near-infrared Raman spectroscopy for in vitro detection of cervical precancers.

Photochem Photobiol 1998; 68(1): 123-32.

Makino K, Itoh Y, Teshima D and Oishi R.

Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human specimens by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography.

Electrophoresis 2004; 25(10-11): 1488-95.

Malagari K, Chatzimichael K, Alexopoulou E, Kelekis A, Hall B, Dourakis S, et al.

Transarterial chemoembolization of unresectable hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: results of an open-label study of 62 patients.

Cardiovasc Intervent Radiol 2008; 31(2): 269-80.

Malins DC, Polissar NL and Gunselman SJ.

Tumor progression to the metastatic state involves structural modifications in DNA markedly different from those associated with primary tumor formation.

Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(24): 14047-52.

Manoharan R, Shafer K, Perelman L, Wu J, Chen K, Deinum G, et al.

Raman spectroscopy and fluorescence photon migration for breast cancer diagnosis and imaging.

Photochem Photobiol 1998; 67(1): 15-22.

Marelli L, Stigliano R, Triantos C, Senzolo M, Cholongitas E, Davies N, et al.

Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies.

Cardiovasc Intervent Radiol 2007; 30(1): 6-25.

Mauro T, Bench G, Sidderas-Haddad E, Feingold K, Elias P and Cullander C.

Acute barrier perturbation abolishes the Ca2+ and K+ gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE.

J Invest Dermatol 1998; 111(6): 1198-201.

Mauthe RJ, Sideras-Haddad E, Turteltaub KW and Bench G.

Quantitative imaging microscopy for the sensitive detection of administered metal containing drugs in single cells and tissue slices--a demonstration using platinum based chemotherapeutic agent.

J Pharm Biomed Anal 1998; 17(4-5): 651-63.

Mazières J and Hermant C.

Tumeurs du poumon, primitives et secondaires. *in*: Cours de Pneumologie de DCEM2, Université de Médecine de Toulouse.

http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module12/Module157_MZS/texteI2.htm (mise à jour 2008)

McArdle CS, Lewi H, Hansell D, Kerr DJ, McKillop J and Willmott N.

Cytotoxic-loaded albumin microspheres: a novel approach to regional chemotherapy.

Br J Surg 1988; 75(2): 132-4.

McDonald S, Faibushevich AA, Garnick S, McLaughlin K and Lunte C.

Determination of local tissue concentrations of bupivacaine released from biodegradable microspheres and the effect of vasoactive compounds on bupivacaine tissue clearance studied by microdialysis sampling.

Pharm Res 2002; 19(11): 1745-52.

Melamed MR.

Lung cancer screening results in the National Cancer Institute New York study.

Cancer 2000; 89(11 Suppl): 2356-62.

Michelet-Habchi C, Barberet P, Dutta RK, Moretto P, Guiet-Bara A and Bara M.

Elemental maps in human allantochorial placental vessels cells: 2. MgCl2 and MgSO4 effects. Magnes Res 2003; 16(3): 171-5.

Mihelic-Rapp M and Giebel W.

A new immunohistochemical method for the detection of gentamicin in inner ear fluid compartments.

Eur Arch Otorhinolaryngol 1996; 253(7): 411-6.

Millot JM, Rasoanaivo TD, Morjani H and Manfait M.

Role of the aclacinomycin A--doxorubicin association in reversal of doxorubicin resistance in K562 tumour cells.

Br J Cancer 1989; 60(5): 678-84.

Milne EN.

Pulmonary metastases: vascular supply and diagnosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1976; 1(7-8): 739-42.

Milne EN and Zerhouni EA.

Blood supply of pulmonary metastases.

J Thorac Imaging 1987; 2(4): 15-23.

Minchin RF, Johnston MR, Aiken MA and Boyd MR.

Pharmacokinetics of doxorubicin in isolated lung of dogs and humans perfused in vivo.

J Pharmacol Exp Ther 1984; 229(1): 193-8.

Minchinton AI and Tannock IF.

Drug penetration in solid tumours.

Nat Rev Cancer 2006; 6(8): 583-92.

Misirli Y, Ozturk E, Kursaklioglu H and Denkbas EB.

Preparation and characterization of Mitomycin-C loaded chitosan-coated alginate microspheres for chemoembolization.

J Microencapsul 2005; 22(2): 167-78.

Molckovsky A, Song LM, Shim MG, Marcon NE and Wilson BC.

Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps.

Gastrointest Endosc 2003; 57(3): 396-402.

Moreton RB.

Optical methods for imaging ionic activities.

Scanning Microsc Suppl 1994; 8: 371-90.

Moretto P and Beck L

Émission X induite par particules chargées (PIXE) : applications.

Techniques de l'Ingénieur - traité Analyse et Caractérisation. 2004: P 2558

Morjani H, Millot JM, Belhoussine R, Sebille S and Manfait M.

Anthracycline subcellular distribution in human leukemic cells by microspectrofluorometry: factors contributing to drug-induced cell death and reversal of multidrug resistance.

Leukemia 1997; 11(7): 1170-9.

Morjani H, Pignon B, Millot JM, Debal V, Lamiable D, Potron G, et al.

Intranuclear concentration measurements of doxorubicin in living leucocytes from patients treated for a lympho-proliferative disorder.

Leuk Res 1992; 16(6-7): 647-53.

Mornex F, Douillard JY, Martin E, Bennouna J and Collodet S.

Cancers bronchiques primitifs. in: Polycopié National de Cancérologie, UMVF.

http://cancero.unice.fr/sitelocal/corpus.html (mise à jour janvier 2006)

Morris CS.

Update on uterine artery embolization for symptomatic fibroid disease (uterine artery embolization).

Abdom Imaging 2008; 33(1): 104-11.

Myers CE, Muindi J, Batist G, Haim N and Sinha BK.

Chapter 3 - Anthracyclines. in: The Cancer Pharmacology - Annual 4.

Amsterdam. Ed: Chabner BA and Pinedo HM; 1986: 57-75.

Nagamine T, Nakazato K, Suzuki K, Kusakabe T, Sakai T, Oikawa M, et al.

Analysis of tissue cadmium distribution in chronic cadmium-exposed mice using in-air micro-PIXE.

Biol Trace Elem Res 2007; 117(1-3): 115-26.

Nakakuma K, Tashiro S, Hiraoka T, Ogata K and Ootsuka K.

Hepatocellular carcinoma and metastatic cancer detected by iodized oil.

Radiology 1985; 154(1): 15-7.

Nakamura H, Hashimoto T, Oi H and Sawada S.

Transcatheter oily chemoembolization of hepatocellular carcinoma.

Radiology 1989; 170(3 Pt 1): 783-6.

Namur J, Wassef M, Pelage JP, Lewis A, Manfait M and Laurent A.

Infrared microspectroscopy analysis of ibuprofen release from drug eluting beads in uterine tissue.

J Control Release 2009; 135(3): 198-202.

Napoli S, Burton MA, Martins IJ, Chen Y, Codde JP and Gray BN.

Dose response and toxicity of doxorubicin microspheres in a rat tumor model.

Anticancer Drugs 1992; 3(1): 47-53.

Netti PA, Berk DA, Swartz MA, Grodzinsky AJ and Jain RK.

Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors.

Cancer Res 2000; 60(9): 2497-503.

Ng B, Lenert JT, Weksler B, Port JL, Ellis JL and Burt ME.

Isolated lung perfusion with FUDR is an effective treatment for colorectal adenocarcinoma lung metastases in rats.

Ann Thorac Surg 1995; 59(1): 205-8.

Nijssen A, Bakker Schut TC, Heule F, Caspers PJ, Hayes DP, Neumann MH, et al.

Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy.

J Invest Dermatol 2002; 119(1): 64-9.

Nishioka Y, Kyotani S, Okamura M, Miyazaki M, Okazaki K, Ohnishi S, et al.

Release characteristics of cisplatin chitosan microspheres and effect of containing chitin.

Chem Pharm Bull (Tokyo) 1990; 38(10): 2871-3.

Nishioka Y, Kyotani S, Okamura M, Ohnishi S, Yamamoto Y, Kawashima Y, et al.

A study of embolizing materials for chemo-embolization therapy of hepatocellular carcinoma: effects of particle size and dose on chitin-containing cis-diamminedichloroplatinum(II) albumin microsphere antitumor activity in VX2 hepatic tumor model rabbits. Biol Pharm Bull 1994; 17(9): 1251-5.

Nishioka Y, Kyotani S, Okamura M, Ohnishi S, Yamamoto Y, Tanada S, et al.

A study of embolizing materials for chemo-embolization therapy of hepatocellular carcinoma: effects of chitin concentration on cis-diamminedichloroplatinum(II) albumin microsphere properties and antitumor effect in VX2 hepatocellular carcinoma model rabbits. Biol Pharm Bull 1993; 16(11): 1136-9.

Noda K, Nishiwaki Y, Kawahara M, Negoro S, Sugiura T, Yokoyama A, *et al.* Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer.

N Engl J Med 2002; 346(2): 85-91.

Nygren H, Malmberg P, Kriegeskotte C and Arlinghaus HF.

Bioimaging TOF-SIMS: localization of cholesterol in rat kidney sections.

FEBS Lett 2004; 566(1-3): 291-3.

Offermanns S and Rosenthal W.

Encyclopedic Reference of Molecular Pharmacology

New York NY. Ed: Offermanns S and Rosenthal W; Springer, 2003: 1500.

Okamoto Y, Konno A, Togawa K, Kato T and Amano Y.

Microcapsule chemoembolization for head and neck cancer.

Arch Otorhinolaryngol 1985; 242(1): 105-11.

Okamoto Y, Konno A, Togawa K, Kato T, Tamakawa Y and Amano Y.

Arterial chemoembolization with cisplatin microcapsules.

Br J Cancer 1986; 53(3): 369-75.

Okolo S.

Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids.

Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2008; 22(4): 571-88.

Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer S, Cusack BJ, Chang BK, et al.

Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol.

Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85(10): 3585-9.

Omelyanenko V, Kopeckova P, Gentry C and Kopecek J.

Targetable HPMA copolymer-adriamycin conjugates. Recognition, internalization, and subcellular fate.

J Control Release 1998; 53(1-3): 25-37.

Osuga K, Hori S, Hiraishi K, Sugiura T, Hata Y, Higashihara H, et al.

Bland embolization of hepatocellular carcinoma using superabsorbent polymer microspheres.

Cardiovasc Intervent Radiol 2008; 31(6): 1108-16.

Owen CA, Notingher I, Hill R, Stevens M and Hench LL.

Progress in Raman spectroscopy in the fields of tissue engineering, diagnostics and toxicological testing.

J Mater Sci Mater Med 2006; 17(11): 1019-23.

Page CP, Curtis MJ, Sutter MC, Walker MJ and Hoffman BB.

Pharmacologie Intégrée

Paris. Ed: DeBoeck; De Boeck Université, 1999: 616.

Paluszkiewicz C, Kwiatek WM, Galka M, Sobieraj D and Wentrup-Byrne E.

FT-Raman, FT-IR spectroscopy and PIXE analysis applied to gallstones specimens.

Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 1998; 44(1): 65-73.

Pastorino U, Buyse M, Friedel G, Ginsberg RJ, Girard P, Goldstraw P, et al.

Long-term results of lung metastasectomy: prognostic analyses based on 5206 cases. The International Registry of Lung Metastases.

J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 113(1): 37-49.

Pelage JP, Laurent A, Wassef M, Bonneau M, Germain D, Rymer R, et al.

Uterine artery embolization in sheep: comparison of acute effects with polyvinyl alcohol particles and calibrated microspheres.

Radiology 2002; 224(2): 436-45.

Pelage JP, Le Dref O, Jacob D, Soyer P, Rossignol M, Truc J, et al.

[Uterine artery embolization: anatomical and technical considerations, indications, results, and complications].

J Radiol 2000; 81(12 Suppl): 1863-72.

Pelage JP, Le Dref O, Soyer P, Jacob D, Kardache M, Dahan H, et al.

Arterial anatomy of the female genital tract: variations and relevance to transcatheter embolization of the uterus.

AJR Am J Roentgenol 1999; 172(4): 989-94.

Perring S, Hind R, Fleming J, Birch S, Batty V and Taylor I.

Dosimetric assessment of radiolabelled lipiodol as a potential therapeutic agent in colorectal liver metastases using combined CT and SPECT.

Nucl Med Commun 1994; 15(1): 34-8.

Petibois C and Cestelli Guidi M.

Bioimaging of cells and tissues using accelerator-based sources.

Anal Bioanal Chem 2008; 391(5): 1599-608.

Pickren JW, Tsukada Y and Lane WW.

Analysis of Autopsy Data in: Liver metastasis.

Boston. Ed: Weiss L and Gilbert HA; 1982: 2-18.

Piemi MP, Korner D, Benita S and MartyJp.

Positively and negatively charged submicron emulsions for enhanced topical delivery of antifungal drugs.

J Control Release 1999; 58(2): 177-87.

Pisco JM, Bilhim T, Duarte M, Ferreira A, Santos D, Pires FM, et al.

Pelvic pain after uterine artery embolization: a prospective randomized study of polyvinyl alcohol particles mixed with ketoprofen versus bland polyvinyl alcohol particles.

J Vasc Interv Radiol 2008; 19(11): 1537-42.

Pizzolato JF and Saltz LB.

The camptothecins.

Lancet 2003; 361(9376): 2235-42.

Poggi G, Quaretti P, Minoia C, Bernardo G, Bonora MR, Gaggeri R, et al.

Transhepatic arterial chemoembolization with oxaliplatin-eluting microspheres (OEM-TACE) for unresectable hepatic tumors.

Anticancer Res 2008; 28(6B): 3835-42.

Poon RT, Tso WK, Pang RW, Ng KK, Woo R, Tai KS, et al.

A phase I/II trial of chemoembolization for hepatocellular carcinoma using a novel intraarterial drug-eluting bead.

Clin Gastroenterol Hepatol 2007; 5(9): 1100-8.

Pron G, Mocarski E, Bennett J, Vilos G, Common A, Zaidi M, et al.

Tolerance, hospital stay, and recovery after uterine artery embolization for fibroids: the Ontario Uterine Fibroid Embolization Trial.

J Vasc Interv Radiol 2003; 14(10): 1243-50.

Qian F, Stowe N, Liu EH, Saidel GM and Gao J.

Quantification of in vivo doxorubicin transport from PLGA millirods in thermoablated rat livers.

J Control Release 2003; 91(1-2): 157-66.

Qian F, Stowe N, Saidel GM and Gao J.

Comparison of doxorubicin concentration profiles in radiofrequency-ablated rat livers from sustained- and dual-release PLGA millirods.

Pharm Res 2004; 21(3): 394-9.

Rand T, Loewe C, Schoder M, Schmook MT, Peck-Radosavljevic M, Kettenbach J, et al.

Arterial embolization of unresectable hepatocellular carcinoma with use of microspheres, lipiodol, and cyanoacrylate.

Cardiovasc Intervent Radiol 2005; 28(3): 313-8.

Rao CS, Chu JJ, Liu RS and Lai YK.

Synthesis and evaluation of [14C]-labelled and fluorescent-tagged paclitaxel derivatives as new biological probes.

Bioorg Med Chem 1998; 6(11): 2193-204.

Raoul JL, Bourguet P, Bretagne JF, Duvauferrier R, Coornaert S, Darnault P, et al.

Hepatic artery injection of I-131-labeled lipiodol. Part I. Biodistribution study results in patients with hepatocellular carcinoma and liver metastases.

Radiology 1988; 168(2): 541-5.

Ratto GB, Esposito M, Leprini A, Civalleri D, De Cian F, Vannozzi MO, et al.

In situ lung perfusion with cisplatin. An experimental study.

Cancer 1993; 71(10): 2962-70.

Ravina JH, Herbreteau D, Ciraru-Vigneron N, Bouret JM, Houdart E, Aymard A, et al.

Arterial embolisation to treat uterine myomata.

Lancet 1995; 346(8976): 671-2.

Rigas B, Morgello S, Goldman IS and Wong PT.

Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra.

Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87(20): 8140-4.

Rivoire M.

Tumeurs du foie, primitives et secondaires. *in*: Polycopié National de Cancérologie, UMVF. http://cancero.unice.fr/sitelocal/corpus.html (mise à jour décembre 2005).

Romeo MJ, Quinn MA, Burden FR and McNaughton D.

Influence of benign cellular changes in diagnosis of cervical cancer using IR microspectroscopy.

Biopolymers 2002; 67(4-5): 362-6.

Romer TJ, Brennan JF, 3rd, Fitzmaurice M, Feldstein ML, Deinum G, Myles JL, et al.

Histopathology of human coronary atherosclerosis by quantifying its chemical composition with Raman spectroscopy.

Circulation 1998; 97(9): 878-85.

Rongieres C.

[Epidemiology of uterine fibroma: risk factors and frequency. Impact on public health].

J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 1999; 28(7): 701-6.

Rose LM, Tillery KF, el Dareer SM and Hill DL.

High-performance liquid chromatographic determination of doxorubicin and its metabolites in plasma and tissue.

J Chromatogr 1988; 425(2): 419-23.

Sakurai H, Okamoto M, Hasegawa M, Satoh T, Oikawa M, Kamiya T, et al.

Direct visualization and quantification of the anticancer agent, cis-diamminedichloro-platinum(Π), in human lung cancer cells using in-air microparticle-induced X-ray emission analysis.

Cancer Sci 2008; 99(5): 901-4.

Saltzman WM and Radomsky ML.

Drugs released from polymers: Diffusion and elimination in brain tissue.

Chem Eng Sci 1991; 46(10): 2429-2444.

Sasaki Y, Imaoka S, Kasugai H, Fujita M, Kawamoto S, Ishiguro S, et al.

A new approach to chemoembolization therapy for hepatoma using ethiodized oil, cisplatin, and gelatin sponge.

Cancer 1987; 60(6): 1194-203.

Sato H, Kitazawa H, Adachi I and Horikoshi I.

Microdialysis assessment of microfibrous collagen containing a P-glycoprotein-mediated transport inhibitor, cyclosporine A, for local delivery of etoposide.

Pharm Res 1996; 13(10): 1565-9.

Sawaya A, Fickat R, Benoit JP, Puisieux F and Benita S.

Ion-exchange albumin microcapsules of doxorubicin: an in vitro release kinetic evaluation. J Microencapsul 1988; 5(3): 255-67.

Schneider P, Kampfer S, Loddenkemper C, Foitzik T and Buhr HJ.

Chemoembolization of the lung improves tumor control in a rat model.

Clin Cancer Res 2002; 8(7): 2463-8.

Schwartz M and Weintraub J.

Combined transarterial chemoembolization and radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma.

Nat Clin Pract Oncol 2008; 5(11): 630-1.

Shiah HS, Liu TW, Chen LT, Chang JY, Liu JM, Chuang TR, et al.

Pulmonary embolism after transcatheter arterial chemoembolization.

Eur J Cancer Care (Engl) 2005; 14(5): 440-2.

Shihabi ZK and Hinsdale ME.

Analysis of ibuprofen in serum by capillary electrophoresis.

J Chromatogr B Biomed Appl 1996; 683(1): 115-8.

Shimamura Y, Gunven P, Takenaka Y, Shimizu H, Shima Y, Akimoto H, et al.

Combined peripheral and central chemoembolization of liver tumors. Experience with lipiodol-doxorubicin and gelatin sponge (L-TAE).

Cancer 1988; 61(2): 238-42.

Shinozawa S, Mimaki Y, Araki Y and Oda T.

Determination of the concentration of adriamycin and its metabolites in the serum and tissues of Ehrlich carcinoma-bearing mice by high-performance liquid chromatography.

J Chromatogr 1980; 196(3): 463-9.

Shiono T, Yoshikawa K, Hisamatsu K and Takenaka E.

Efficacy of emulsion containing Gd-DTPA and lipiodol in hepatic transcatheter arterial embolization.

Radiat Med 1993; 11(5): 187-90.

Sigurdsson S, Philipsen PA, Hansen LK, Larsen J, Gniadecka M and Wulf HC.

Detection of skin cancer by classification of Raman spectra.

IEEE Trans Biomed Eng 2004; 51(10): 1784-93.

Silverstein RM, Basler GC and Morill TC.

Spectrométrie Infrarouge. in: Identification spectrométrique de composés organiques.

Bruxelles. Ed: DeBoeck; 1998: 91-162.

SIR Society of Interventional Radiology

Uterine Fibroid Symptoms, Diagnosis and Treatment.

http://www.scvir.org/patients/uterine-fibroids/ (mise à jour 2009).

Siskin GP, Bonn J, Worthington-Kirsch RL, Smith SJ, Shlansky-Goldberg R, Machan LS, et al

III. Uterine fibroid embolization: pain management.

Tech Vasc Interv Radiol 2002; 5(1): 35-43.

Smyth WF and Brooks P.

A critical evaluation of high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the detection and determination of small molecules of significance in clinical and forensic science.

Electrophoresis 2004; 25(10-11): 1413-46.

Smyth WF.

Recent applications of capillary electrophoresis-electrospray ionisation-mass spectrometry in drug analysis.

Electrophoresis 2006; 27(11): 2051-62.

SNFGE Société National Française de Gastro-Entérologie

Carcinome hépatocellulaire (cancer primitif du foie) *In:* Thésaurus National de Cancérologie Digestive.

www.snfge.asso.fr/data/ModuleDocument/publication/5/pdf/TNCD-chapitre-903.pdf (mise à jour le 09/12/2007).

Souquet PJ, Chauvin F, Boissel JP, Cellerino R, Cormier Y, Ganz PA, et al.

Polychemotherapy in advanced non small cell lung cancer: a meta-analysis.

Lancet 1993; 342(8862): 19-21.

Speakman TJ.

Internal Occlusion of a Carotid-Cavernous Fistula.

J Neurosurg 1964; 21: 303-5.

Spenlehauer G, Veillard M and Benoit JP.

Formation and characterization of cisplatin loaded poly(d,l-lactide) microspheres for chemoembolization.

J Pharm Sci 1986; 75(8): 750-5.

Spies J and Pelage JP.

Uterine artery embolization and gynecologic embolotherapy

Philadelphia PA. Ed: Spies J and Pelage JP; Lippincott Williams and Wilkins, 2005.

Spies JB, Allison S, Flick P, Cramp M, Bruno J, Jha RC, et al.

Spherical polyvinyl alcohol versus tris-acryl gelatin microspheres for uterine artery embolization for leiomyomas: results of a limited randomized comparative study.

J Vasc Interv Radiol 2005; 16(11): 1431-7.

Spies JB, Myers ER, Worthington-Kirsch R, Mulgund J, Goodwin S and Mauro M. The FIBROID Registry: symptom and quality-of-life status 1 year after therapy. Obstet Gynecol 2005; 106(6): 1309-18.

Stevens A and Lowe J.

Appareil respiratoire. in: Histologie humaine.

Paris. Ed: Stevens A and Lowe J; 1997: 159-176.

Stewart J.

HPLC application of drugs in Biological Samples. *in*: Hanbook of HPLC. New York. *Ed*: Katz E, Eksteen R, Schoenmmakers P *et al*; 1988: 629-668.

Stewart EA.

Uterine fibroids.

Lancet 2001; 357(9252): 293-8.

Strachan CJ, Rades T, Gordon KC and Rantanen J.

Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids.

J Pharm Pharmacol 2007; 59(2): 179-92.

Stumpf W E.

Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J Pharmacol Toxicol Methods 2005; 51(1): 25-40

Taieb J, Barbare JC, Boussaha T, Cunha AS, Baere T, Rosmorduc O, *et al*. [Management of hepatocellular carcinoma. Where are we now? What's next?]. Bull Cancer 2009; 96(1): 19-34.

Taira M, Sasaki K, Saitoh S, Nezu T, Sasaki M, Kimura S, et al.

Accumulation of element Ti in macrophage-like RAW264 cells cultured in medium with 1 ppm Ti and effects on cell viability, SOD production and TNF-alpha secretion. Dent Mater J 2006; 25(4): 726-32.

Takayasu K, Shima Y, Muramatsu Y, Moriyama N, Yamada T, Makuuchi M, et al.

Hepatocellular carcinoma: treatment with intraarterial iodized oil with and without chemotherapeutic agents.

Radiology 1987; 163(2): 345-51.

Taleb A, Diamond J, McGarvey JJ, Beattie JR, Toland C and Hamilton PW.

Raman microscopy for the chemometric analysis of tumor cells.

J Phys Chem B 2006; 110(39): 19625-31.

Tanaka Y, Hanada K, Mizokami M, Yeo AE, Shih JW, Gojobori T, et al.

Inaugural Article: A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades.

Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(24): 15584-9.

Tang Y, Czuczman PR, Chung ST and Lewis AL.

Preservation of the active lactone form of irinotecan using drug eluting beads for the treatment of colorectal cancer metastases.

J Control Release 2008; 127(1): 70-8.

Tang Y, Taylor RR, Gonzalez MV, Lewis AL and Stratford PW.

Evaluation of irinotecan drug-eluting beads: a new drug-device combination product for the chemoembolization of hepatic metastases.

J Control Release 2006; 116(2): e55-6.

Taylor RR, Tang Y, Gonzalez MV, Stratford PW and Lewis AL.

Irinotecan drug eluting beads for use in chemoembolization: in vitro and in vivo evaluation of drug release properties.

Eur J Pharm Sci 2007; 30(1): 7-14.

Tfayli A, Piot O, Durlach A, Bernard P and Manfait M.

Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy.

Biochim Biophys Acta 2005; 1724(3): 262-9.

Tfayli A, Piot O, Pitre F and Manfait M.

Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy.

Eur Biophys J 2007; 36(8): 1049-58.

Timmerman RD, Bizekis CS, Pass HI, Fong Y, Dupuy DE, Dawson LA, et al.

Local surgical, ablative, and radiation treatment of metastases.

CA Cancer J Clin 2009; 59(3): 145-70.

Todd PJ, Schaaff TG, Chaurand P and Caprioli RM.

Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization.

J Mass Spectrom 2001; 36(4): 355-69.

Tomashefski JF, Jr., Cohen AM and Doershuk CF.

Longterm histopathologic follow-up of bronchial arteries after therapeutic embolization with polyvinyl alcohol (Ivalon) in patients with cystic fibrosis.

Hum Pathol 1988; 19(5): 555-61.

Touitou E, Meidan VM and Horwitz E.

Methods for quantitative determination of drug localized in the skin.

J Control Release 1998; 56(1-3): 7-21.

Treado PT and Nelson MP.

Raman imaging. in: Handbook of Vibrational Spectroscopy.

Chichester. Ed: Chalmers J and Griffiths PR; 2001: 1429–1459.

Trinchet JC, Alperovitch A, Bedossa P, Degos F, Hainaut P and Beers BV.

[Epidemiology, prevention, screening and diagnosis of hepatocellular carcinoma].

Bull Cancer 2009; 96(1): 35-43.

Vallieres E, Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, Postmus PE, Carney D, et al.

The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals regarding the relevance of TNM in the pathologic staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer.

J Thorac Oncol 2009; 4(9): 1049-59.

van Asperen J, van Tellingen O and Beijnen JH.

Determination of doxorubicin and metabolites in murine specimens by high-performance liquid chromatography.

J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 712(1-2): 129-43.

Van de Poll SW, Kastelijn K, Bakker Schut TC, Strijder C, Pasterkamp G, Puppels GJ, *et al.* On-line detection of cholesterol and calcification by catheter based Raman spectroscopy in human atherosclerotic plaque ex vivo.

Heart 2003; 89(9): 1078-82.

Van Ruth S, van Tellingen O, Korse CM, Verwaal VJ and Zoetmulder FA.

Pharmacokinetics of doxorubicin and cisplatin used in intraoperative hyperthermic intrathoracic chemotherapy after cytoreductive surgery for malignant pleural mesothelioma and pleural thymoma.

Anticancer Drugs 2003; 14(1): 57-65.

Van Schil PE, Hendriks JM, van Putte BP, Stockman BA, Lauwers PR, Ten Broecke PW, et al.

Isolated lung perfusion and related techniques for the treatment of pulmonary metastases. Eur J Cardiothorac Surg 2008; 33(3): 487-96.

Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, et al.

Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics.

J Hepatol 2007; 46(3): 474-81.

Veltri A, Moretto P, Doriguzzi A, Pagano E, Carrara G and Gandini G.

Radiofrequency thermal ablation (RFA) after transarterial chemoembolization (TACE) as a combined therapy for unresectable non-early hepatocellular carcinoma (HCC). Eur Radiol 2006; 16(3): 661-9.

Vibet S, Maheo K, Gore J, Dubois P, Bougnoux P and Chourpa I.

Differential subcellular distribution of mitoxantrone in relation to chemosensitization in two human breast cancer cell lines.

Drug Metab Dispos 2007; 35(5): 822-8.

Vogl TJ, Gruber T, Balzer JO, Eichler K, Hammerstingl R and Zangos S.

Repeated transarterial chemoembolization in the treatment of liver metastases of colorectal cancer: prospective study.

Radiology 2009; 250(1): 281-9.

Vogl TJ, Herzog C, Zangos S and Lindemayr S.

[Palliative treatment of primary lung tumors with transpulmonary chemoembolization (TPCE)].

Rofo 2007; 179(3): 300-7.

Vogl TJ, Lehnert T, Zangos S, Eichler K, Hammerstingl R, Korkusuz H, et al.

Transpulmonary chemoembolization (TPCE) as a treatment for unresectable lung metastases. Eur Radiol 2008; 18(11): 2449-55.

Vogl TJ, Zangos S, Eichler K, Yakoub D and Nabil M.

Colorectal liver metastases: regional chemotherapy via transarterial chemoembolization (TACE) and hepatic chemoperfusion: an update.

Eur Radiol 2007; 17(4): 1025-34.

Walsh MJ, German MJ, Singh M, Pollock HM, Hammiche A, Kyrgiou M, et al.

IR microspectroscopy: potential applications in cervical cancer screening.

Cancer Lett 2007; 246(1-2): 1-11.

Wang HP, Wang HC and Huang YJ.

Microscopic FTIR studies of lung cancer cells in pleural fluid.

Sci Total Environ 1997; 204(3): 283-7.

Wang Y, Hong J, Cressman EN and Arriaga EA.

Direct sampling from human liver tissue cross sections for electrophoretic analysis of doxorubicin.

Anal Chem 2009; 81(9): 3321-8.

Wassef M, Pelage JP, Velzenberger E, Namur J, Schwartz-Cornil I, Taylor RR, et al.

Anti-inflammatory effect of ibuprofen-loaded embolization beads in sheep uterus.

J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2008; 86(1): 63-73.

Wasser K, Giebel F, Fischbach R, Tesch H and Landwehr P.

[Transarterial chemoembolization of liver metastases of colorectal carcinoma using degradable starch microspheres (Spherex): personal investigations and review of the literature].

Radiologe 2005; 45(7): 633-43.

Watanabe T, Nakasaki H, Kamijou A, Mitomi T, Matsuki H and Kasuga H.

The technical problems shoot for the production of anti low molecular weight hapten antibody.

Kitasato Arch Exp Med 1993; 65 Suppl: 47-55.

Weichert W, Denkert C, Gauruder-Burmester A, Kurzeja R, Hamm B, Dietel M, et al.

Uterine arterial embolization with tris-acryl gelatin microspheres: a histopathologic evaluation.

Am J Surg Pathol 2005; 29(7): 955-61.

Weinberg BD, Patel RB, Exner AA, Saidel GM and Gao J.

Modeling doxorubicin transport to improve intratumoral drug delivery to RF ablated tumors.

J Control Release 2007; 124(1-2): 11-9.

Weksler B, Ng B, Lenert JT and Burt ME.

Isolated single-lung perfusion with doxorubicin is pharmacokinetically superior to intravenous injection.

Ann Thorac Surg 1993; 56(2): 209-14.

White AM and Spies JB.

Uterine fibroid embolization.

Tech Vasc Interv Radiol 2006; 9(1): 2-6.

Wientjes MG, Dalton JT, Badalament RA, Dasani BM, Drago JR and Au JL.

A method to study drug concentration-depth profiles in tissues: mitomycin C in dog bladder wall.

Pharm Res 1991; 8(2): 168-73.

Wolthuis R, Travo A, Nicolet C, Neuville A, Gaub MP, Guenot D, et al.

IR spectral imaging for histopathological characterization of xenografted human colon carcinomas.

Anal Chem 2008; 80(22): 8461-9.

Wong SHY.

Therapeutic drug monitoring and toxicology by liquid chromatography

New York. Ed: Wong SHY; Dekker, 1985: 500.

Worobetz LJ, Hilsden RJ, Shaffer EA, Simon JB, Paré P, Bain VG, et al.

Le foie. *in*: Principes fondamentaux de gastro-entérologie - États pathologiques et démarches thérapeutiques.

Edmonton. Ed: Archambault A, Beaudry R, Paré P et al; 1997: 520-637.

Worthington-Kirsch R, Spies JB, Myers ER, Mulgund J, Mauro M, Pron G, et al.

The Fibroid Registry for outcomes data (FIBROID) for uterine embolization: short-term outcomes.

Obstet Gynecol 2005; 106(1): 52-9.

Worthington-Kirsch RL and Koller NE.

Time course of pain after uterine artery embolization for fibroid disease.

Medscape Womens Health 2002; 7(2): 4.

Wright KC, Wallace S, Mosier B and Mosier D.

Microcapsules for arterial chemoembolization: appearance and in vitro drug release characteristics.

J Microencapsul 1988; 5(1): 13-20.

Yamazaki H, Kaminaka S, Kohda E, Mukai M and Hamaguchi HO.

The diagnosis of lung cancer using 1064-nm excited near-infrared multichannel Raman spectroscopy.

Radiat Med 2003; 21(1): 1-6.

Yang J, Ma XC, Zou ZJ and Wei SL.

Experimental maxillofacial arterial chemoembolization with encased-cisplatin ethylcellulose microspheres.

AJNR Am J Neuroradiol 1995; 16(5): 1037-41.

Yang Y, Sule-Suso J, Sockalingum GD, Kegelaer G, Manfait M and El Haj AJ. Study of tumour cell invasion by Fourier transform infrared microspectroscopy. Biopolymers 2005.

Yano K, Ohoshima S, Gotou Y, Kumaido K, Moriguchi T and Katayama H. Direct measurement of human lung cancerous and noncancerous tissues by fourier transform infrared microscopy: can an infrared microscope be used as a clinical tool? Anal Biochem 2000; 287(2): 218-25.

Yi SW, Kim YH, Kwon IC, Chung JW, Park JH, Choi YW, et al.

Stable lipiodolized emulsions for hepatoma targeting and treatment by transcatheter arterial chemoembolization.

J Control Release 1998; 50(1-3): 135-43.

Yumoto Y, Jinno K, Tokuyama K, Araki Y, Ishimitsu T, Maeda H, *et al.* Hepatocellular carcinoma detected by iodized oil. Radiology 1985; 154(1): 19-24.

Yun W, Pratt ST, Miller RM, Cai Z, Hunter DB, Jarstfer AG, *et al.* X-ray imaging and microspectroscopy of plants and fungi. J Synchrotron Radiat 1998; 5(Pt 6): 1390-5.

Zheng JH, Chen CT, Au JL and Wientjes MG.

Time- and concentration-dependent penetration of doxorubicin in prostate tumors. AAPS PharmSci 2001; 3(2): E15.

Zucman-Rossi J, Clement B, Buendia MA, Lerat H, Beers BV, Bedossa P, *et al.* [Fundamental and translational research on hepatocellular carcinoma in 2008: forces and priorities].

Bull Cancer 2009; 96(1): 45-50.

Annexe 1 - Instrumentation

Microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'appareil utilisé est le microspectromètre infrarouge à transformée de Fourier Spectrum Spotlight300 (Perkin Elmer, Courtaboeuf France) (Figure A1.1).

Ce microspectromètre est composé :

- d'une platine motorisée sur laquelle est disposé l'échantillon à analyser (pas de déplacement minimum: 156 nm),
- d'une source de lumière visible et d'une caméra CCD permettant d'enregistrer une image de l'échantillon en transmission dans le domaine visible,
- de miroirs dichroïques qui laissent passer la lumière visible et réfléchissent la lumière infrarouge, permettant d'utiliser le même trajet optique pour les 2 types de rayonnement au niveau de l'échantillon,
- d'une source de lumière polychromatique émettant un faisceau lumineux continu d'intensité uniforme dans la gamme du moyen infrarouge (600 à 400 cm⁻¹),
- d'objectifs "Cassegrain" qui assurent la focalisation du faisceau sur l'échantillon et sur les détecteurs,
- d'un système optique Z-fold qui permet de passer de la résolution spatiale de 25 μ m à 6,25 μ m,
- d'un système de deux détecteurs de type MCT (Mercure Cadmium Tellure) : l'un composé d'une barrette de 16 éléments de 6,25 x 6,25 µm² en quinconce sur 2 colonnes, utilisée pour l'imagerie spectrale ; l'autre monocanal de 100 x 100 µm² utilisé en mode point. Les détecteurs sont refroidis par de l'azote liquide.

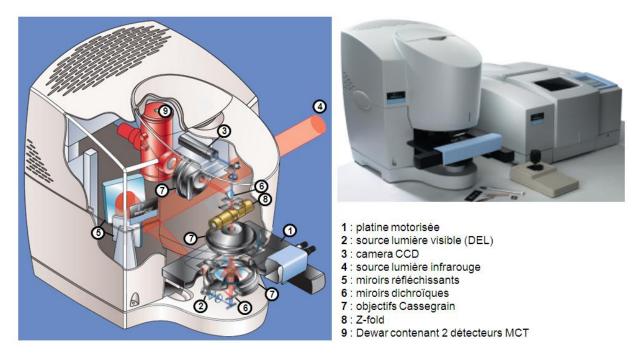


Figure A1.1 – Schéma et photographie du microspectromètre infrarouge Spotlight 300.

La mesure des intensités transmises est réalisée simultanée sur l'ensemble de la gamme spectrale avec un interféromètre de Michelson. Le spectre d'absorption est ensuite obtenu en calculant de la transformée de Fourier de l'interférogramme.

L'image infrarouge peut être obtenue par cartographie ou par imagerie. La cartographie utilise le détecteur monocanal qui balaye la zone d'intérêt et enregistre chaque spectre infrarouge point par point de façon séquentielle. L'imagerie utilise le détecteur barrette permettant l'acquisition simultanée de plusieurs spectres. La carte ou l'image spectrale sont par la suite traitées à l'aide de méthodes analytiques et statistiques pour en extraire l'information utile. Le dispositif n'utilise pas d'étalon interne ou externe avant utilisation.

Microspectroscopie de fluorescence

L'appareil utilisé est le microspectrofluorimètre Dilor V45 (Jobin-Yvon/Horiba, Lille, France) (Figure A1.2).

Ce microspectromètre est composé:

- d'une platine motorisée sur laquelle est disposé l'échantillon à analyser (pas de déplacement minimum: 100 nm),
- d'une source de lumière visible et d'une caméra permettant d'enregistrer une image de l'échantillon en transmission dans le domaine visible,
- d'un laser argon ionisé (Series 2000, Spectra-Physics, UK) générant une raie principale monochromatique vers 458 nm. On ajoute un filtre interférentiel avant l'entrée du faisceau dans le spectrofluorimètre pour éliminer les raies parasites proches de l'excitatrice.
- d'un diaphragme à ouverture variable (ou trou focal) de 50 à 1000 μm, placé dans le plan focal image de l'objet et donnant la confocalité du système
- d'un filtre passe-haut positionné sur le trajet de l'émission de fluorescence pour diminuer l'intensité du rayonnement de l'excitatrice,
- d'un système dispersif, un réseau de 300 traits/mm, permettant l'acquisition de spectres sur domaine spectral de 250 nm
- d'une série d'objectifs de différents grossissements (x4 à x100). L'objectif 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. Puis la lumière émise est dispersée par un réseau de 300 traits/mm suivi de l'analyse du signal par un détecteur CCD.
- d'un détecteur CCD bidimensionnel de 1200 × 300 pixels, refroidi par effet Peltier.

L'image spectrale est obtenue par cartographie uniquement, c'est-à-dire par acquisition ponctuelle et déplacement successifs de la platine sur un axe ou une surface définis 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.

Une solution de fluorescéine 1 mM est utilisée comme étalon avant toute utilisation de l'appareil.

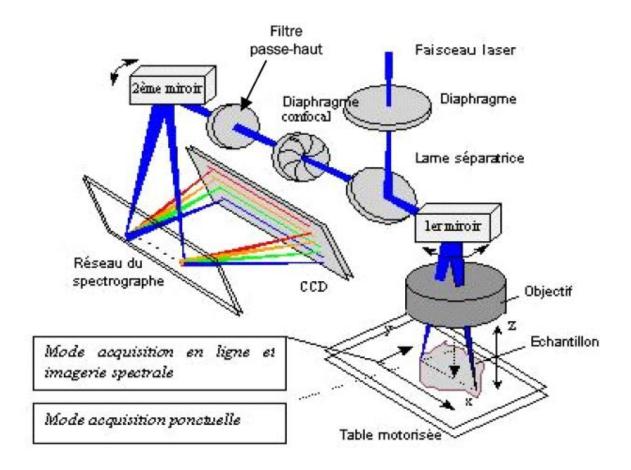


Figure A1.2 – Schéma du microspectrofluorimètre V45.

Annexe 2

« Un nouveau chapitre de thèse ${\mathbb R}$ »





Julien NAMUR

et

"Les microspectroscopies optiques pour la caractérisation in vitro / in vivo de vecteurs de chimioembolisation"

<u>Directeurs de thèse</u>:

Monsieur le Docteur Alexandre LAURENT et Monsieur le Professeur Michel MANFAIT

Mentor ABG:

Madame Viviane REBOUD

Ecole Doctorale:

Ecole doctorale Sciences Technologies Santé 358, Université de Reims Champagne Ardennes

Date prévue de soutenance de thèse : Novembre 2009

Sommaire

Défini	tion – Objectifs	239
1 - Ca	dre général et enjeux de la thèse	240
1.1	Définition du sujet	240
1.2	Les partenaires	240
1.3	Un thésard	242
1.4	Enjeux techniques, scientifiques, économiques	243
2 - Dé	roulement, gestion, coût	244
2.1	Préparation et cadrage	244
2.2	Conduite du projet	244
2.3	Evaluation et prise en charge du coût	245
3 - Co	mpétences et savoir-faire	246
3.1	Compétences scientifiques et techniques	246
3.2	Compétences transférables	246
4 - Im	pacts du projet	250
4.1	Pour le laboratoire	250
4.2	Pour l'entreprise	250
4.3	À titre personnel	251



« Un nouveau chapitre de thèse ® »

Définition - Objectifs

Le « nouveau chapitre de la thèse » ou NCT est une formation proposée aux doctorants via l'association Bernard Grégory (ABG), et participe de la démarche de l'association visant à faciliter leur insertion professionnelle.

L'objectif est d'effectuer « un inventaire et une mise en valeur des compétences qui ont été nécessaires au bon déroulement de la thèse ». Le doctorant doit « faire une analyse critique de la manière dont il a conduit et géré sa thèse en tant que projet, et en tirer des conclusions quant aux qualités personnelles et aux savoir-faire qu'il a développés ». Il est accompagné dans sa démarche par un mentor, consultant en Ressources Humaines, et par le groupe dont il fait partie.

Depuis 2002, cette formation a été suivie par environ 2000 doctorants (*source: ABG*), pour environ 70.000 thèses soutenues (*source: Ministère de l'Education et de la Recherche*). Une enquête menée par l'ABG en 2007 révèle pour les doctorants qui se tournent vers le privé, que le NCT a un effet significatif sur la vitesse d'obtention du premier emploi, grâce à la valorisation des compétences liées à la préparation même du NCT et à une prospection du marché de l'emploi en amont de la soutenance.

J'ai participé à cette formation pour m'aider dans mon choix de carrière après la thèse, et pour appréhender avec le plus de confiance possible mes futurs entretiens d'embauche. L'ensemble de ce travail a été effectué sur une période de 10 jours ouvrés cumulés.

1 Cadre général et enjeux de la thèse

1.1 Définition du sujet

L'intitulé de mon sujet de thèse est <u>"Les microspectroscopies optiques pour la caractérisation in vitro / in vivo de vecteurs de chimioembolisation à libération contrôlée"</u>. La chimioembolisation est une technique thérapeutique initialement utilisée dans le traitement des tumeurs hépatiques non opérables. Elle consiste à administrer localement dans les vaisseaux irriguant la tumeur un médicament ayant une activité anticancéreuse, suivi d'un agent occlusif visant à bloquer l'apport de sang et à augmenter le temps de présence du médicament dans la tumeur. Ces deux actions peuvent être menées soit successivement, soit en même temps par l'utilisation d'un agent d'embolisation chargé en médicament. Différentes microsphères d'embolisation chargées en médicament (chimiosphère) sont en cours de développement chez les industriels des biomatériaux.

L'utilisation de ces chimiosphères pose cependant plusieurs questions pratiques :

- quelle dose de médicament doit être administrée au patient, i.e. chargée dans les chimiosphères ?
- pendant combien de temps la chimiosphère doit-elle libérer son contenu pour une efficacité biologique optimale ?

Pour répondre à ces questions, il faut des techniques d'évaluation permettant de déterminer, après injection de la chimiosphère :

- la concentration du médicament toujours contenu dans la microsphère ;
- la concentration et la distribution du médicament dans les structures biologiques autour de l'implant ;
- l'effet de la chimiosphère sur ces structures.

L'objectif du sujet de thèse est de développer et de valider ces techniques tout d'abord dans des modèles expérimentaux (animal) non tumoraux puis chez des patients porteurs de tumeurs.

1.2 Les partenaires

Ce projet implique 3 types de partenaires : des médecins, des entreprises privées et un laboratoire de recherche publique.

1.2.1 Des médecins ASSISTANCE TO HÔPITAUX

S'agissant d'une thématique médicale et thérapeutique, les médecins sont fortement impliqués dans la définition des objectifs et dans l'évaluation du travail réalisé. Plus précisément, ils définissent sur des bases médicales et scientifiques le cahier des charges que doivent remplir les chimiosphères et donc les propriétés du produit qu'il nous faudra évaluer. Nous avons pu collaborer avec des radiologues interventionnels (les utilisateurs des chimiosphères), des oncologues, des hépatologues et des chirurgiens de l'Assistance Publique et de centres hospitaliers étrangers (USA).

1.2.2 Des entreprises privées Archimmed Biocompatibles

Dans le cadre de notre étude, 2 partenaires privés sont impliqués : un industriel, Biocompatibles UK Ltd, et une start-up, ArchimMed SARL.

Biocompatibles UK est une société anglaise de 72 personnes qui fabrique et commercialise des microsphères d'embolisation. Elle développe actuellement des chimiosphères et souhaite démontrer l'efficacité de son produit. Cependant, le domaine d'activité de cette entreprise est la chimie et non pas la biologie ou la pharmacie. Si elle dispose des moyens techniques pour la synthèse de ces billes et leur caractérisation *in vitro*, elle ne peut assurer en interne l'évaluation des chimiosphères sur des modèles expérimentaux vivants. L'industriel a donc besoin de partenaires publics et privés dotés de l'expertise appropriée.

ArchimMed est le maître d'œuvre de notre projet de recherche. C'est une jeune société française créée en 2003, employant 11 salariés, principalement de jeunes ingénieurs et chercheurs. Elle exerce ses activités dans le secteur des biotechnologies destinées au biomédical. Forte de son expérience dans la conception et l'évaluation de biomatériaux implantables, elle souhaite utiliser ses compétences et son savoir-faire pour une nouvelle application, les biomatériaux chargés en principe actif.

1.2.3 Un laboratoire de recherche public

Le laboratoire MéDIAN (Médicament Dynamique Intracellulaire et Architecture Nucléaire) appartient à l'unité mixte de recherche UMR 6237 CNRS/URCA. Il est dirigé par le Professeur Michel MANFAIT, son effectif est de 35 personnes dont 13 doctorants et post-doctorants. Il dispose d'un équipement unique en France de microspectroscopies optiques, des appareils d'imagerie permettant de faire des cartographies chimiques sur des échantillons biologiques.

L'objectif principal de MéDIAN est l'application de la microspectroscopie à la recherche biomédicale, avec pour thématique principale le diagnostic des cancers. Le laboratoire a développé un réseau de partenariats avec des constructeurs d'appareils d'imagerie et de spectroscopie (Jobin Yvon, Horiba, Perkin Elmer), des professionnels de la santé (hôpitaux et instituts), des industriels (L'Oréal, Galderma) et des universités étrangères. L'utilisation de la microspectroscopie pour la détection de médicaments anticancéreux s'accorde parfaitement avec les objectifs de MéDIAN. Ce sujet s'inscrit dans la thématique « cancer » développée par le laboratoire, en ajoutant à ses compétences de diagnostic des cancers celle de l'évaluation d'un traitement anti-cancéreux.

1.3 Un thésard

Un quatrième intervenant participe à ce travail : le chef de projet, le thésard.

Ma curiosité m'a porté vers les sciences exactes et j'ai passé un Bac Scientifique option Physique Chimie. Je me suis ensuite inscrit en médecine à l'Université Paris 5 René Descartes et malgré un échec à l'examen, c'est au cours de cette année que j'ai pris la décision ferme d'exercer ma future activité professionnelle dans le domaine de la santé. J'ai donc poursuivi mes études à l'Université Paris 6 Pierre et Marie Curie pour y suivre une 2^{ième} année de DEUG de biologie. Cependant, la recherche académique, vers laquelle semblait me conduire la voie universitaire, ne m'attirait alors pas du tout, car je souhaitais un métier plus « dans le concret », en relation directe avec la médecine.

Ayant longuement enquêté pour savoir quel parcours pouvait m'y amener, j'ai choisi d'intégrer une école d'ingénieur, l'Université de Technologie de Compiègne, dans la filière Génie Biologique. L'enseignement et la validation des connaissances sous la forme de projets m'ont immédiatement séduit. L'école imposait également de suivre deux stages de 6 mois, ce qui allait enfin me permettre de mettre en pratique mes compétences. Ironiquement, mon premier stage s'est effectué dans un laboratoire de recherche à l'Hôpital Lariboisière. L'expérience me plut énormément si bien que je décidai de valider en parallèle de ma dernière année d'ingénieur, un DEA en Génie Biomédical.

Diplômé en septembre 2004, j'ai été embauché en qualité d'Ingénieur de Recherche par le laboratoire de mes débuts transformé depuis peu en start-up. Après un an et demi à ce poste, je me suis inscrit en thèse de sciences à l'université de Reims Champagne Ardenne.

Mes motivations pour faire une thèse étaient les suivantes :

- le désir de poursuivre et concrétiser le projet que j'avais moi-même initié (définition, recherche des partenaires, études de faisabilité);
- l'intérêt scientifique du sujet de recherche ;
- le haut niveau de connaissance et de technicité requis dans le domaine de la recherche;
- une mobilité internationale plus facile du fait de la reconnaissance internationale du diplôme de docteur, contrairement à celui d'ingénieur ;
- la possibilité d'évolution de carrière et d'évolution salariale, comparativement au seul diplôme d'ingénieur ;
- la prise de responsabilité dans le fait de se voir confier un projet de recherche de longue durée, impliquant plusieurs partenaires, avec des budgets relativement importants;
- ma très bonne entente avec l'équipe / l'entreprise d'accueil ;
- et une possibilité d'ouverture vers la recherche académique.

1.4 Enjeux techniques, scientifiques, économiques

L'enjeu principal de mon sujet est technique. Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode permettant d'évaluer l'ensemble des paramètres précédemment cités. L'objectif de ma thèse est donc de proposer une approche technique innovante, de valider cette méthode pour enfin l'appliquer à des échantillons d'intérêt.

Mon travail présente également une valeur scientifique, essentiellement médicale : évaluer *in situ* après implantation la libération d'un médicament à partir de son vecteur, sa diffusion dans les organes, son activité biologique afin de comprendre ses effets sur les cancers du foie.

Ce projet présente enfin un fort enjeu économique, puisqu'il s'agit d'étudier des produits commerciaux en développement ou déjà disponibles sur le marché. Les résultats de nos études, rendus publiques lors de conférences médicales ou dans des articles scientifiques, ont un impact direct sur la vente de ces produits. Il est malheureusement difficile de mesurer les retombées financières et les profits réalisés grâce à nos seules études.

2 Déroulement, gestion, coût

2.1 Préparation et cadrage

De janvier à mai 2006, j'ai mené plusieurs études de faisabilité dans différents laboratoires. Après 4 tests concluants au laboratoire MéDIAN de l'Université de Reims, j'ai présenté les résultats de ces essais aux directeurs d'ArchimMed et de MéDIAN et nous avons défini ensemble le cadre scientifique et un programme d'études pour un projet de thèse. Ce programme a par la suite été audité et validé par 2 experts scientifiques de l'ANRT, lors d'une demande de bourse CIFRE.

Pour financer le projet sur les 3 ans de thèse, ArchimMed a fait appel aux industriels du secteur. Au mois de juin 2006, j'ai présenté à 2 entreprises une proposition d'étude de leurs produits. L'un d'eux, Biocompatibles UK Ltd, s'est montré très intéressé par le projet, et ArchimMed et Biocompatibles ont signé un contrat de recherche pour une durée d'un an reconductible.

2.2 Conduite du projet

Le bon déroulement du projet a été régulièrement contrôlé par des réunions bimensuelles avec les directeurs de thèse dont l'objectif était de contrôler et interpréter les résultats et décider des orientations du sujet.

Des réunions de suivi ont eu lieu avec l'industriel partenaire tous les 3 mois. J'ai ajouté à ces réunions des e-mails d'information mensuels sur les principales avancées et problèmes du projet. La relation avec Biocompatibles est basée avant tout sur la confiance. L'industriel a soutenu toutes les décisions prises par l'équipe, même quand les objectifs différaient de ceux définis dans le contrat initial. Il ne s'est jamais opposé à la publication des résultats sur ses produits, positifs ou négatifs. Le projet de collaboration avec ArchimMed a été reconduit pour les 3 ans de thèse.

Les nombreux congrès auxquels j'ai assisté, environ 4 par an, étaient également l'occasion de présenter et discuter mes données avec un grand nombre de médecins ou scientifiques. L'avis de ces experts m'a beaucoup aidé dans l'interprétation et m'a donné l'ensemble des points de vue sous lesquels les résultats pouvaient être abordés, contribuant ainsi grandement à leur valorisation.

2.3 Evaluation et prise en charge du coût

Le coût total du projet a été estimé rétrospectivement à 310k€ (Figure A2.1, Tableau A2.1).

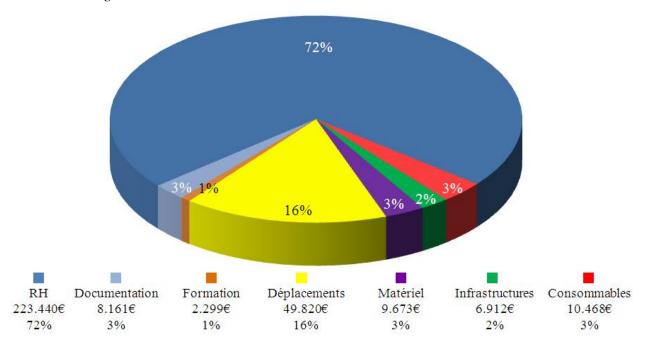


Figure A2.1. Estimation du coût consolidé de la thèse de J. NAMUR.

Les dépenses principales correspondent aux ressources humaines (73%) et aux déplacements (16%). Ce montant est élevé par rapport aux chiffres précédemment rapportés par d'autres doctorants du laboratoire (120-130k€). Cette différence tient principalement aux montants RH et déplacements plus nombreux dans notre projet. La rémunération du doctorant par l'entreprise était 2,5 fois supérieure au montant d'une allocation ministérielle ou régionale. La thèse était co-dirigée par 2 encadrants à des échelons élevés dans la classification des enseignants chercheurs. Un technicien a été embauché pour travailler à mi-temps sur le projet. Dans la mesure où je suis domicilié à Paris, l'hébergement et les déplacements hebdomadaires à Reims ont généré un coût supplémentaire. Enfin j'ai participé à 10 congrès à l'étranger au cours de ma thèse, alors que la moyenne pour un doctorant se situe entre 4 et 5.

Le projet a été principalement subventionné par ArchimMed qui finançait le salaire du doctorant et l'ensemble des déplacements. ArchimMed payait également les frais de consommables, matériel et infrastructures, en versant une indemnité à l'université. L'URCA a financé les salaires des encadrants issus de l'université et les frais de documentation.

3 Compétences et savoir-faire

3.1 Compétences scientifiques et techniques

Sur le plan scientifique, mes domaines d'expertise sont désormais : 1) les biomatériaux chargés en principe actif, 2) l'embolisation, 3) les implants médicaux et 4) l'interaction lumière-matière. Par des collaborations sur des projets annexes, j'ai acquis des connaissances durables dans les domaines de la cancérologie et ses traitements, de la cicatrisation, de la synthèse de polymère et du traitement du signal.

Sur le plan technique, j'ai maintenant une expérience confirmée de la microspectroscopie, de l'histologie, du traitement de données, ainsi qu'une expertise informatique des logiciels dédiés à ces techniques et des logiciels de bureautique classique. Diverses expérimentations m'ont également initié à la synthèse de polymères, à l'immunohistochimie, et aux techniques analytiques classiques type chromatographie ou calorimétrie différentielle.

Sur proposition de mon directeur de thèse, j'ai accepté en 2006 de présenter dans un diplôme interuniversitaire (DIU) un cours sur mes connaissances scientifiques et techniques, intitulé "Evaluation d'un implant chargé". Ma participation est sollicitée chaque année depuis.

3.2 Compétences transférables

Le projet de thèse m'a permis de développer ou renforcer des compétences transposables à toute nouvelle problématique.

Certaines de ces compétences sont liées à ma formation et à l'exercice même de la thèse :

• Capacité d'analyse et de synthèse, Inventivité

Pour répondre à la question qui m'était posée par les médecins, j'ai fait une analyse détaillée et critique des moyens techniques à notre disposition. J'ai proposé une approche complètement nouvelle qu'aucune équipe n'avait encore suggérée. Cette étape de préparation de la thèse a particulièrement renforcé mon esprit d'analyse et de synthèse.

En parallèle de mon projet, j'ai par la suite ouvert la voie à plusieurs sujets devenus des thématiques du laboratoire ou de l'entreprise : étude de la cicatrisation par microspectroscopie, utilisation de la chimiosphère pour libérer une substance active

dans une culture de cellules, évaluation de la dégradation d'un biomatériau résorbable par microspectroscopie.

Autonomie

J'ai personnellement recherché et démarché les différents laboratoires susceptibles de répondre aux besoins d'ArchimMed au départ du projet.

J'étais le seul étudiant à travailler sur cette thématique, au sein du laboratoire et au sein de l'entreprise.

• Démarche méthodique et logique

Pour valider les différentes techniques que j'ai mises au point, j'ai vérifié l'influence de chacun des paramètres sur le résultat de l'analyse, en suivant les méthodologies décrites par différentes organisations (Organisation internationale de normalisation, Food and Drug Administration, International Conference on Harmonisation).

• Réactivité et esprit d'initiative

Après avoir compris mon échec en médecine, j'ai construit moi-même mon parcours scolaire pour parvenir à un métier enrichissant. Plusieurs expériences au cours de ma thèse ont démontré ma réactivité.

Par exemple, l'une de nos techniques de quantification ne fonctionnait pas. Après concertation avec l'équipe du laboratoire, j'ai tout d'abord essayé de modifier plusieurs paramètres de la méthode d'acquisition, en vain. J'ai contacté un laboratoire parisien spécialiste de chimie analytique avec lequel j'ai mis au point une expérience révélant la cause du problème. J'ai finalement développé une nouvelle méthode de traitement des données, qui m'a permis de m'affranchir de ce biais et de valider la technique.

Un autre exemple : lorsque nous avons décidé de soumettre nos travaux à un nouveau congrès dont la date de soumission était le jour même, j'ai dû rédiger 3 résumés en quelques heures, et ces 3 résumés ont été acceptés en présentation orale.

• Veille scientifique

Tout au long de la thèse, j'ai développé un répertoire exhaustif des sources d'informations me permettant de surveiller les avancées scientifiques et techniques les plus récentes (pubmed, google scholar, portails CNRS et bibliothèques, offices des brevets). J'utilisais ces ressources 3 à 4 heures par semaine.

Ces aptitudes constituent la base pour tout docteur à l'issue de sa thèse. Mon projet a montré certaines spécificités dans son cadre ou son déroulement, ajoutant à ces compétences d'autres qualités particulières :

• Valorisation de mes résultats et sens de la communication

Mon goût pour la communication et l'enseignement s'est révélé au cours de mes études, grâce à ma participation à une association d'animation d'ateliers scientifiques en écoles primaires et en collèges. Pendant 3 ans, j'ai appris à délivrer un message rigoureux et clair, à exploiter le potentiel d'un élève, à le motiver et à m'auto-évaluer.

Pendant ma thèse, j'ai su valoriser mon travail par de nombreuses communications écrites et orales: 3 articles scientifiques, 14 présentations orales et 10 posters en congrès. De tels chiffres sont élevés pour un doctorant, la moyenne étant plutôt de 2 - 3 communications par voie orale et 3 - 4 par voie de poster.

J'ai choisi de présenter toutes mes communications dans des revues et conférences internationales pour donner davantage de visibilité au projet.

Mes interventions multiples dans des congrès internationaux m'ont appris à défendre mes résultats devant des spécialistes, parfois à l'encontre de l'opinion majoritaire ce qui a accru ma confiance en moi.

• Capacité à travailler en équipe

Depuis ma formation à l'UTC jusqu'à ma thèse, j'ai tenu plusieurs rôles dans les différents travaux d'équipe auxquels j'ai pris part.

En école d'ingénieur, j'ai tout d'abord été participant dans des projets courts de 2 à 5 étudiants qui permettaient la validation des enseignements. Avec un autre doctorant du laboratoire où j'ai fait ma thèse, nous avons également fait la démarche de rédiger les manuels d'utilisations de différents appareils du laboratoire. Ces expériences m'ont appris l'importance de la répartition des tâches.

En tant qu'ingénieur de recherche et thésard, j'ai été initié au rôle d'encadrant et de formateur. Depuis 5 ans, j'ai été responsable de 7 stagiaires ingénieurs/master, ce qui a renforcé mon sens de la pédagogie. J'ai appris à déléguer, contrôler, encourager et corriger. Sur les 3 derniers stagiaires, les 2 étudiants en fin d'étude ont été embauchés par ArchimMed, tandis que le troisième, en cours de cursus, a validé son stage avec la note A.

Enfin le travail de thèse m'a initié au rôle de coordinateur dans un projet avec de très nombreux partenaires. J'ai fait en sorte de communiquer régulièrement avec eux pour solliciter leur avis d'expert et vérifier que j'étais bien compris. J'ai ainsi développé une grande capacité d'écoute et de compréhension

• Adaptabilité

Dans ce projet pluridisciplinaire, je me suis aperçu que les attentes des différents acteurs ne sont pas les mêmes: les médecins attendent généralement d'une présentation un ou deux messages très clairs, tandis que les scientifiques souhaitent avoir le maximum d'informations pour construire eux-mêmes la conclusion. Les industriels apprécient le "petit plus" apporté au livrable, qui permet d'envisager la suite du projet et augmente les chances de continuer la collaboration.

Ainsi ai-je appris à adapter le contenu et la forme de mon discours à mes interlocuteurs.

Ouverture à l'international

A titre personnel, j'ai effectué de nombreux voyages à l'étranger de l'Amérique à l'Asie. A titre professionnel, j'ai collaboré avec des industriels anglais, des médecins américains et des chercheurs japonais.

L'ensemble de mes communications orales et écrites se sont effectuées en anglais et je dispose maintenant d'un niveau courant dans cette langue me permettant de parfaitement m'intégrer à un groupe de travail international.

4 Impacts du projet

4.1 Pour le laboratoire

Du point de vue scientifique et technique, le projet a amené au laboratoire MéDIAN de nouvelles connaissances dans les domaines de la vectorisation de médicaments et du traitement du cancer. Le laboratoire a trouvé une nouvelle application pour ses techniques microspectroscopiques. Il peut désormais promouvoir ses compétences dans l'évaluation de ces vecteurs. Nos nombreuses communications lui ont donné une notoriété internationale certaine, dans les secteurs de la radiologie et de la pharmacie. Ces acquis peuvent également lui permettre d'établir de nouveaux partenariats, publics ou privés.

Du point de vue de la valorisation de sa recherche, notamment vis-à-vis de l'université et du CNRS, le projet de thèse a apporté à l'unité:

- un doctorat effectué dans son laboratoire,
- 2 stagiaires et un futur étudiant en master,
- une embauche en CDI du docteur immédiatement après son cursus,
- 3 projets inscrits dans ses thématiques (1 sujet de thèse + 2 sujets ouverts en parallèle),
- 21 communications scientifiques (articles/présentations/poster) en premier auteur,
- un nouveau partenariat avec un organisme privé, ainsi qu'une bourse CIFRE.

4.2 Pour l'entreprise

L'entreprise a tiré de ce travail les mêmes bénéfices que le laboratoire, ce qui confère à ses activités une crédibilité scientifique et une visibilité internationale : des publications scientifiques, des compétences supplémentaires, une embauche, un partenariat durable avec un laboratoire académique reconnu comme le spécialiste national de la microspectroscopie.

Ce projet a également pérennisé la collaboration avec l'industriel Biocompatibles, puisque le projet devrait être reconduit après la fin de la thèse. Un protocole d'étude a également été signé avec un autre industriel du marché.

Une réflexion est en cours pour savoir si tout ou partie de ce projet peut faire l'objet d'un dépôt de brevet.

4.3 À titre personnel

Après ma thèse, je souhaite continuer à travailler dans le domaine de la R&D. Je peux utiliser mes compétences dans les secteurs de l'ingénierie, de la santé, de la chimie ou de la pharmacie. J'envisage de travailler dans le secteur privé. Je considère 2 types d'évolutions :

A) développer mes compétences dans la **conception** et l'**évaluation**.

Je dispose d'une expérience professionnelle de 5 ans dans l'évaluation de dispositifs médicaux implantables. Avec ma thèse, j'ai acquis de solides connaissances fondamentales, scientifiques et techniques. Mes qualités personnelles pour cette évolution résident dans ma capacité d'analyse, ma réactivité et mon initiative, mon esprit logique et rigoureux et mes compétences rédactionnelles.

Après mon doctorat, je peux devenir ingénieur R&D, chargé d'études ou ingénieur d'essais. A terme, cette voie me permettrait d'être responsable d'un laboratoire d'essais, un service technique ou une unité de production.

B) évoluer vers le management des projets de recherche.

En 5 ans d'activité professionnelle, j'ai acquis une véritable méthodologie de gestion de projets : définition des livrables, planification, gestion d'équipe, respect des jalons, communication. J'ai de solides connaissances scientifiques et techniques, une grande adaptabilité, des qualités d'écoute et de communication, un niveau élevé d'anglais, je sais valoriser mes résultats.

Dès à présent, je peux postuler pour un poste de chef de projet R&D. A terme, ce parcours me conduira vers un emploi de directeur de recherche, directeur de programme R&D. C'est le projet professionnel qui m'attire le plus, du fait principalement de son aspect pluridisciplinaire et des perspectives d'évolution.

ArchimMed m'a fait part de son désir de me garder dans son équipe. L'entreprise veut maintenant valoriser ses compétences techniques et développer une activité nouvelle d'ingénierie. Dans cet objectif, nous nous sommes accordés sur la nécessité d'avoir un chef de projet et sur le fait que je possède le meilleur profil pour ce poste. Si je reste dans la même entreprise, ce poste me permet néanmoins d'évoluer vers plus de responsabilités et de nouvelles activités. De plus, il me permettra de consolider dans un cadre familier, mes compétences de chef de projet : gestion des moyens financiers, encadrement d'une équipe de plusieurs personnes, maîtrise courante du vocable et des outils de management de projet.

Tableau A2.1 – Estimation détaillée du coût consolidé de la thèse de J. NAMUR

Montants en euros TTC

					Coûts totaux (euros TTC)		
	Nature de la dépense	re de la dépense Détails		Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote- part utilisation	Total
1	Ressources Humaines	Salaire brut	Charges				223440
1.1	Doctorant	2700	1080	36	3780	1	136080
1.2	Encadrant 1	5800	1740	36	7540	1/20	13572
1.3	Prime Encadrement	7520		3	7520	1/4	5640
1.4	Encadrant 2	3600	1080	36	4680	1/5	33696
1.5	Prime Encadrement	3360		3	3360	1/2	5040
1.6	Autre personnel (hors sous-traitance)						
	Technicien supérieur	2000	800	18	2800	1/2	25200
	Anatomo-pathologiste	3600	1080	36	4680	1/40	4212
1.7	Sous-traitance						
	Directeur R&D Biocompatibles	8540	3416	36	11956	1/78	5518
	Technicien Biocompatibles	1900	760	36	2660	1/78	1228
2	Consommables						10468
2.1	Fournitures expérimentales						
	Produits chimiques			1	280	1	280
	Lames CaF2			20	23	1/2	230
	Lames ZnSe			14	94	1/2	658
2.2	Fournitures de bureau						
	Papier, impressions, stylos			1	300	1	300
2.3	Sous-traitance						
	Chimiosphere (prix flacon unitaire AP (400€)			30	300	1	9000
	- marge estimée fabricant+distributeur (25%))						

					Coûts totau	x (euros TTC)	
	Nature de la dépense	Détails		Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote- part utilisation	Total
3	Infrastructures						6912
3.1	Loyers des locaux	Loyer brut	Charges locatives				
	Bureau $(32e/m^2 * 9m^2)$ (loyer+entretien etc)	288		36	288	2/3	6912
3.2	Electricité, eau, chauffage, (inclus charges)						0
4	Matériel						9673
4.1	Matériel d'expérimentation (dont les ordinateurs et logiciels spécialisés)	Taux d'amortissement					
	Microspectromètre Infrarfouge Spotlight	3/5		1	135000	407/11880	4625
	Microspectromètre Infrarfouge Spotlight			407	4	1	1628
	Microspectrofluorimètre Dilor			325	4	1	1300
	Spectromètre Shimadzu			40	2	1	80
4.2	Ordinateur de bureau	Taux d'amortissement					
	Ordinateur portable	1		1	1500	1	1500
	Equipement ordinateur	1		1	380	1	380
4.3	Logiciels de bureau	Taux d'amortissement					
	Logiciels de bureau	1		1	160	1	160
5	Déplacements						49820
5.1	Missions en France	Transport	Hébergement + autres				
	Laboratoire MéDIAN	9624	17111	1	26735	1	26735
5.2	Missions à l'étranger	Transport	Hébergement + autres				
	University of Mineapolis	500	337	1	837	1	837
5.3	Congrès en France	Transport	Hébergement + autres				0

					Coûts totaux (euros TTC)		
	Nature de la dépense	Détails		Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote- part utilisation	Total
5.4	Congrès à l'étranger	Transport	Hébergement + autres				
	Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe 2007-2008-2009	1000	3295	1	4295	1	4295
	Controlled Release Society 2008-2009	1400	2280	1	3680	1	3680
	Society of Interventional Radiology 2008-2009	1635	3018	1	4653	1	4653
	International Liver Cancer Association 2008	6570	725	1	7295	1	7295
	European Society of Surgical Oncology 2008	0	775	1	775	1	775
	European Conference on Spectroscopy of Biological Molecules 2009	300	1250	1	1550	1	1550
6	Formation						2299
6.1	Formations						
	Propriété industrielle et brevet			1	150	1	150
	Management des Hommes			1	3420	1/20	171
	Cours d'anglais			78	45	1/50	70
	Inscription TOEIC			1	77	1	77
	Nouveau Chapitre de Thèse			1	600	1	750
6.2	Autres frais (Inscription à l'Université, Sécurité Sociale étudiante, etc.)						
	Inscription URCA			3	350	1	1050
	Inscription Bibiliothèques			1	31	1	31

		-		Coûts totaux (euros TTC)				
	Nature de la dépense			Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote- part utilisation	Total	
7	Documentation et communication						8161	
7.1	Affranchissements, Internet, telephone (inclus loyer)						0	
7.2	Publicité, communication, impressions							
	Posters			3	45	1	135	
7.3	Documentation (périodiques, livres, bases de données, bibliothèque, etc.)	Taux d'amortissement						
	Articles scientifiques			400	20	1	8000	
	Livres	3/10		1	85	1	26	
8	Charges financières (intérêts des emprunts)						0	
9	Charges exceptionnelles						0	
10	TOTAL						310773	