



**HAL**  
open science

**RMN d'émulsions fluorées : développements  
méthodologiques et application à l'évaluation de  
l'oxymétrie et de la biodistribution dans le foie et la  
rate, et à la détection de l'angiogenèse tumorale dans le  
cerveau du rongeur**

Céline Giraudeau

► **To cite this version:**

Céline Giraudeau. RMN d'émulsions fluorées : développements méthodologiques et application à l'évaluation de l'oxymétrie et de la biodistribution dans le foie et la rate, et à la détection de l'angiogenèse tumorale dans le cerveau du rongeur. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112004 . tel-00670097

**HAL Id: tel-00670097**

**<https://theses.hal.science/tel-00670097>**

Submitted on 14 Feb 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE PARIS-SUD 11

*ECOLE DOCTORALE* : Sciences et Technologies de l'Information des Télécommunications  
et des Systèmes (STITS)

*LABORATOIRE D'ACCUEIL* : NeuroSpin, CEA Saclay

*DISCIPLINE* : Imagerie médicale

**THÈSE DE DOCTORAT**

soutenue le 23 janvier 2012

par

**Céline GIRAUDEAU**

**RMN d'émulsions fluorées : développements méthodologiques et  
application à l'évaluation de l'oxymétrie et de la biodistribution  
dans le foie et la rate, et à la détection de l'angiogenèse tumorale  
dans le cerveau du rongeur**

**Membres du jury :**

Franck LETHIMONNIER

Directeur de thèse

Julien VALETTE

Responsable du travail de thèse

Bernard GALLEZ

Rapporteur

Emmanuel BARBIER

Rapporteur

Philippe ROBERT

Examineur

Philippe CHAUMET-RIFFAUD

Examineur



## REMERCIEMENTS

Sur la couverture de ce manuscrit figure le nom d'un auteur unique. Le travail présenté ici n'est pourtant pas le fruit d'une seule personne mais est le résultat d'un réel travail d'équipe, que je souhaite remercier ici.

La thèse est une période très riche en enseignements, et je peux dire sans exagérer que je dois une part non négligeable de ce que j'y ai appris à Julien Valette. Ce travail ne serait pas ce qu'il est si je n'avais bénéficié de son aide et de ses conseils avisés, même délivrés à distance. Qu'il soit remercié ici de l'attention qu'il m'a portée pendant ces 3 ans, de sa grande patience et de son indulgence vis-à-vis de mon ingénuité de RMNiste débutante.

J'adresse également mes remerciements les plus chaleureux à Franck Lethimonnier, qui aura été tout sauf un directeur de thèse « administratif ». Tous les membres d'Iseult pourront témoigner de son investissement au sein du projet, de la qualité de son encadrement et de la richesse de ses connaissances dont il a su nous faire profiter. J'espère pouvoir un jour prétendre à autant d'expérience et de sagesse !

Je remercie Bernard Gallez et Emmanuel Barbier pour avoir accepté de rapporter mon travail de thèse, ainsi que Philippe Chaumet-Riffaud et Philippe Robert pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury.

Tout le monde n'a pas l'opportunité de faire sa thèse dans un lieu à la pointe de l'imagerie cérébrale comme NeuroSpin. Je remercie pour cela Denis Le Bihan de m'avoir acceptée au sein de ce bâtiment exemplaire en termes de pluridisciplinarité... et à l'esthétique remarquable.

Les excellentes conditions de travail dont j'ai bénéficié à NeuroSpin doivent beaucoup aux personnes que j'y ai côtoyées. Au sein du projet Iseult, je suis particulièrement reconnaissante à Fawzi Boumezbou et Sébastien Mériaux pour nous avoir fait partager leurs connaissances et avoir éclairé notre route dans les domaines des voies métaboliques ou des statistiques (la liste est bien sûr loin d'être exhaustive). Merci aussi à eux d'avoir animé des conversations nettement moins scientifiques autour d'un café !

Merci à toute l'équipe Guerbet, Claire Corot, Philippe Robert, Marc Port, Caroline Robic, Jean-Sébastien Raynaud, Gaëlle Louin, pour leur soutien pendant ces 3 années et pour nos discussions animées et enrichissantes en termes d'agents de contraste. Merci également à Xavier Violas et Robin Santus pour nous avoir patiemment enseigné comment poser une ligne.

Mes pensées vont bien entendu aussi au microcosme formé par l'open space 1025A. J'adresse tout particulièrement des remerciements à Julien et Benjamin, doctorants comme moi au sein du projet Iseult. Je les remercie entre autres de m'avoir sensibilisée à la subtilité des émissions

diffusées sur TF1 et M6, de ne pas m'avoir oubliée au milieu des montagnes en Turquie, ou de m'avoir forgé une culture en foot et en rugby. Merci surtout pour nos échanges en matière d'agents de contraste et d'imagerie, pour votre soutien au quotidien, et pour votre indéfectible bonne humeur qui va assurément me manquer. Courage, vous êtes les prochains sur la liste ! Un grand merci à mon éternel voisin de bureau, Olivier, à qui j'adresse également tous mes encouragements pour la fin de thèse, avec une belle soutenance pour l'automne ! Bonne chance à Ileana, pionnière à 17 T, longue vie à tes aphysies, et sois forte face à tous ces hommes dans l'open space. Bon courage également à Alfredo, que la spectro soit avec toi ! Je n'oublie pas notre radiologue préférée Nadya, indissociable de ses histoires drôles russes et de ses anecdotes sur le monde médical... Merci par ailleurs à Benoît Larrat pour avoir partagé avec nous ses connaissances en matière d'ultrasons et son travail sur la BHE... et d'autres discussions très croustillantes sur les canapés rouges de la cafétéria de NeuroSpin.

Un grand merci à Françoise Geffroy pour ses lumières en biologie, physiologie, histologie... et cuisinologie ! Son art de couper les cerveaux et leur donner de la couleur le dispute à celui de nous avoir concocté des merveilles pour le palais (Ah ! les macarons caramel-beurre-salé et tant d'autres...). Merci à Aline Perrin d'avoir, durant son bref passage à NeuroSpin, développé notre goût pour l'histologie et transmis une part de son savoir !

J'ai beaucoup apprécié la présence dans l'équipe d'Aurélie Verpilleux, autre entité féminine du projet Iseult. Merci Aurélie pour nos discussions de fille, et pour ton soutien quotidien !

Toute ma gratitude à Luisa Ciobanu pour son aide au 7T Bruker, sa gentillesse et sa bonne humeur communicative, ainsi qu'à Alexis Amadon et Nicolas Boulant pour leurs lumières sur le 7T Siemens.

Merci à Boucif Djemaï pour son aide pour installer les animaux lorsque j'étais encore débutante, et pour son anesthésie-miracle, sans laquelle mes souris n'auraient pas fait d'aussi gros dodos dans l'aimant. Merci également à Eric Giacomini, Marie-France Hang et Mohamed Ahmed-Ghaly pour la conception des antennes et leur service après vente !

Merci à Edouard Duchesnay de m'avoir initiée aux mystères des tests statistiques.

Merci à Nicolas Tsapis et Odile Diou de la faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry d'avoir pris part au projet fluor au sein d'Iseult. Et bonne chance à Odile pour la finalisation de sa thèse !

Merci à Véronique Brion pour nos trajets dans la navette D5 et merci à Benoît Schmitt pour sa serviabilité, que ce soit pour les trajets en voiture ou pour sauver une petite cuillère.

En dernier lieu, merci à tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin dans l'accomplissement de ce travail, mes amis, mes parents, mes grands-parents... Simon, même si ça a été à distance pendant les deux premières années, merci d'avoir été (et d'être toujours, et pour encore un bon moment !) le meilleur compagnon de route.

# SOMMAIRE

<b>Liste des abréviations et annotations.....</b>	<b>7</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>9</b>
<b>Préambule : environnement expérimental.....</b>	<b>13</b>
Le projet Iseult.....	13
IRM petit animal à NeuroSpin.....	13
Sondes de radiofréquence.....	14
<b>Chapitre I – IRM du fluor : bases théoriques et enjeux.....</b>	<b>15</b>
I.1. Noyaux, spins et aimantation macroscopique.....	17
I.2. Formalisme vectoriel de la RMN.....	18
I.2.1. Précession de l’aimantation.....	18
I.2.2. La résonance magnétique.....	19
I.2.2.1. Perturbation par impulsion de radiofréquence.....	19
I.2.2.2. Précession libre et relaxation.....	21
I.3. Déplacement chimique, couplage et formalisme quantique.....	23
I.3.1. Déplacement chimique en RMN du fluor.....	23
I.3.2. Couplage scalaire spin-spin.....	24
I.3.3. Opérateur densité.....	25
I.3.3.1. Formalisme de l’opérateur densité.....	25
I.3.3.2. Cas de deux spins faiblement couplés.....	28
I.4. L’écho de spin.....	29
I.4.1. Principe de la séquence écho de spin.....	30
I.4.2. Extension à la séquence CPMG.....	30
I.5. Application de la RMN à l’imagerie 2D.....	31
I.5.1. Gradients de champ magnétique.....	31
I.5.1.1. Gradient de sélection de coupe.....	31
I.5.1.2. Gradient de lecture.....	32
I.5.1.3. Gradient d’encodage de phase.....	32
I.5.1.4. Gradients et artefacts de déplacement chimique.....	33
I.5.2. Remplissage du plan de Fourier.....	34
I.6. Rapport signal sur bruit et sensibilité.....	35
I.6.1. Signal et maximisation de l’aimantation transverse.....	35
I.6.2. Le bruit en IRM.....	36
I.6.3. Calcul du RSB, effet du moyennage et sensibilité.....	37
I.7. Le fluor en IRM.....	40
I.7.1. Le fluor dans l’environnement et en biologie.....	40
I.7.2. IRM du $^{19}\text{F}$ : avantages et limitations.....	41

## **Chapitre II – Contexte : détection des tumeurs cérébrales par IRM du fluor 19...43**

II.1. Tumeurs cérébrales : physiologie et moyens de détection.....	45
II.1.1. Physiologie des tumeurs cérébrales.....	45
II.1.2. Détection des tumeurs cérébrales : moyens actuel et envisagé.....	46
II.2. Des composés fluorés d'intérêt : les PFC.....	48
II.2.1. Propriétés des PFC.....	48
II.2.2. Applications des PFC en IRM du $^{19}\text{F}$ .....	48
II.2.2.1. Introduction.....	48
II.2.2.2. Devenir d'une émulsion perfluorée <i>in vivo</i> .....	49
II.2.2.3. Utilisation non spécifique des PFC chez le petit animal.....	50
II.2.2.4. Utilisation de nanoparticules de PFC fonctionnalisées.....	50
II.3. Choix d'un PFC pour l'imagerie de l'angiogenèse tumorale : le PFOB.....	51
II.3.1. Présentation.....	51
II.3.2. Imagerie d'émulsions de PFOB non fonctionnalisées.....	52
II.3.3. Imagerie d'émulsions de PFOB ciblées pour l' $\alpha_v\beta_3$ .....	53
II.4. Conclusion.....	53

## **Chapitre III – Imagerie du PFOB par IRM du $^{19}\text{F}$ : méthodologie..... 55**

III.1. Imagerie du PFOB : difficultés et enjeux.....	57
III.1.1. Suppression de l'artefact de déplacement chimique.....	57
III.1.2. Suppression du couplage : théorie.....	58
III.2. Exploration des propriétés RMN du PFOB.....	61
III.2.1. Mise en œuvre expérimentale.....	61
III.2.1.1. Matériel.....	61
III.2.1.2. Protocoles.....	61
III.2.2. Résultats.....	63
III.2.2.1. Effet de la J-modulation sur le signal du $\text{CF}_3$ .....	63
III.2.2.2. Mesure des temps de relaxation du $\text{CF}_3$ .....	64
III.2.3. Discussion.....	66
III.2.3.1. Sur le choix de la bande passante des $180^\circ$ .....	66
III.2.3.2. Sur l'origine physique de l'augmentation du $T_2$ à TE court.....	66
III.3. Imagerie du PFOB : évaluation de la séquence MES.....	69
III.3.1. Simulations numériques.....	69
III.3.2. Mise en œuvre expérimentale.....	70
III.3.3. Résultats.....	72
III.3.4. Discussion.....	73
III.3.4.1. Sur la comparaison MES/FISP.....	73
III.3.4.2. Sur la sensibilité de la séquence MES.....	74
III.4. Conclusion.....	75

<b>Chapitre IV – Imagerie d’émulsions de PFOB : oxymétrie, biodistribution et sensibilité <i>in vivo</i></b> .....	<b>77</b>
IV.1. Injection d’une émulsion de PFOB chez la souris : oxymétrie dans le foie et la rate.....	79
IV.1.1. Contexte.....	79
IV.1.2. Protocole expérimental.....	79
IV.1.2.1. Emulsion de PFOB, animaux et anesthésie.....	79
IV.1.2.2. Imagerie.....	80
IV.1.3. Résultats.....	81
IV.2. Injections d’émulsions de PFOB chez la souris : biodistribution dynamique..	82
IV.2.1. Contexte.....	82
IV.2.2. Protocole expérimental.....	83
IV.2.3. Résultats.....	84
IV.3. Discussion.....	86
IV.3.1. Sur l’absence de synchronisation respiratoire.....	86
IV.3.2. Sur la contribution du signal vasculaire au signal total mesuré dans le foie et la rate.....	87
IV.3.3. Sur l’oxymétrie dans le foie et la rate.....	89
IV.3.4. Sur la biodistribution dynamique.....	90
IV.4. Conclusion.....	92

<b>Chapitre V – Imagerie de l’angiogenèse tumorale dans un modèle souris de glioblastome avec une émulsion de PFOB fonctionnalisée</b> .....	<b>95</b>
V.I. Introduction.....	97
V.2. Protocole expérimental.....	98
V.2.1. Modèle animal.....	98
V.2.2. Emulsions injectées.....	98
V.2.3. Mise en œuvre.....	99
V.2.4. Traitement de données.....	100
V.3. Résultats.....	101
V.3.1. Imagerie <sup>19</sup> F.....	101
V.3.2. Histologie.....	103
V.4. Discussion.....	104
V.4.1. Sur l’influence de la taille de la tumeur sur le signal observé.....	104
V.4.2. Sur l’origine du signal observé.....	105
V.4.3. Sur les résultats des tests statistiques.....	106
V.4.4. Sur les résultats d’histologie.....	110
V.5. Conclusion.....	111

<b>Chapitre VI – Perspectives : spectroscopie de diffusion d’une émulsion de PFOB</b> .....	<b>113</b>
VI.1. Introduction : finalité d’une séquence de spectroscopie de diffusion .....	115
VI.2. Diffusion : principe et mesure en RMN.....	116



VI.3. Protocole expérimental.....	117
VI.3.1. Séquences utilisées.....	117
VI.3.2. Mise en œuvre.....	119
VI.3.3. Traitement de données.....	120
VI.4. Résultats.....	120
VI.5. Discussion.....	122
VI.6. Conclusion.....	123
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>125</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>129</b>
<b>Annexe : publications.....</b>	<b>139</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS & ANNOTATIONS

$^{19}\text{F}$	Fluor 19
$^1\text{H}$	Proton
A	Observable
ADC	Apparent Diffusion Coefficient
AFP	Impulsion de refocalisation Adiabatic Full Passage
AHP	Impulsion d'excitation Adiabatic Half Passage
$b$	Facteur de pondération en diffusion
$B_0$	Champ magnétique statique
$B_1$	Champ magnétique variable
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
$\text{BP}_{\text{acq}}$	Bande passante d'acquisition
$\text{BP}_{\text{p}}$	Bande passante des impulsions
$C_{\infty}$	Concentration finale
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives
COSY	Correlation spectroscopy
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CSI	Chemical Shift Imaging
CT	Computed Tomography (scanner à rayons X)
$\delta$	Déplacement chimique
$\Delta$	Délai séparant les gradients de diffusion
ESMRMB	European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology
FASTMAP	Fast Automatic Shimming Technique by Mapping Along Projections
FOV	Champ de vue (Field Of View)
FID	Signal d'induction libre (Free Induction Decay)
$\gamma$	Rapport gyromagnétique
$G$	Gradient
$H$	Hamiltonien
I	Nombre de spin
$\text{IC}_{50}$	Concentration Inhibitrice 50
IP	Intra péritonéal
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ISMRM	International Society for Magnetic Resonance in Medicine
IV	Intraveineux
J	Couplage scalaire
$k$	Constante d'accumulation
LASER	Localization by Adiabatic SElective Refocusing
LASER_MES	LASER Multi Echos de Spin
LB	Line Broadening
$M_0$	Aimantation initiale

## Abréviations et annotations

$M_{xy}$	Aimantation transverse
$M_z$	Aimantation longitudinale
MES	Multi Echos de Spin
mmHg	Millimètre de mercure (1 bar = 760 mmHg)
$\mu$	Moment magnétique
$N_{acq}$	Nombre d'acquisitions
PEG	Poly Ethylène Glycol
PLGA	Poly Lactic-co-Glycolic Acid
PFC	Perfluorocarbure
PFCE	Perfluoro-Crown-Ether
PFOB	Perfluorooctylbromure
ppm	Partie par million
$pO_2$	Pression partielle d'oxygène
$\psi$	Fonction d'onde
$R_0$	Relaxivité en condition d'anoxie
$R_1$	Relaxivité de l'aimantation longitudinale
$R_2$	Relaxivité de l'aimantation transverse
RF	Radio Fréquence
RGD	Peptide associant l'arginine (R), la glycine (G) et l'acide aspartique (D)
$\rho$	Opérateur densité
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RSB	Rapport Signal sur Bruit
$\sigma$	Ecart-type
SMC	Simulation de Monte-Carlo
$\theta$	Angle de bascule
t	Temps
$T_{acq}$	Temps d'acquisition
$T_1$	Temps de relaxation longitudinale
$T_2$	Temps de relaxation transverse
$T_2^*$	Temps de relaxation transverse apparent
TE	Temps d'Echo
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TR	Temps de Répétition
TrueFISP	True Fast Imaging with Steady state Precession
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
$\omega_0$	Fréquence de précession dans le repère de l'aimant
$\omega_1$	Fréquence de précession générée par une impulsion RF
WMIC	World Molecular Imaging Congress

# **INTRODUCTION GENERALE**

## Introduction générale

## Introduction générale

L'IRM s'impose de plus en plus comme une modalité d'imagerie essentielle dans la détection et la caractérisation de pathologies chez l'homme. Dans sa version la plus classique qui utilise les protons ( $^1\text{H}$ ) des molécules d'eau comme source de signal, l'IRM permet d'obtenir de façon non invasive des images en trois dimensions à haute résolution spatiale et à haut niveau de contraste, avec des temps d'acquisition s'amenuisant à mesure que les innovations techniques apparaissent, comme le renforcement du champ magnétique ou l'imagerie parallèle. Si dans le domaine clinique l'IRM reste globalement limitée au diagnostic par l'imagerie anatomique, le développement des systèmes expérimentaux vise désormais non seulement à voir « mieux », mais aussi à comprendre les phénomènes ayant lieu dans les organismes vivants. L'imagerie préclinique de maladies sur des modèles animaux connaît un essor important, et la dernière décennie a vu en particulier l'émergence de l'imagerie moléculaire, destinée à évaluer les processus biologiques se déroulant à l'échelle de la cellule.

La recherche en imagerie moléculaire s'oriente vers la détection des biomarqueurs. Il peut s'agir aussi bien de changements à l'échelle cellulaire ou tissulaire que de la présence de certaines molécules caractéristiques d'une pathologie. Parmi les pathologies concernées, le cancer est probablement celle pour laquelle l'imagerie moléculaire suscite le plus grand espoir. Cette maladie est aujourd'hui la première cause de mortalité dans le monde. La dégradation des conditions de vie qu'entraînent les tumeurs malignes est difficile à supporter, en particulier lorsque des organes comme le cerveau sont affectés. La détection précoce des tumeurs cérébrales constitue donc un des défis à relever pour l'imagerie moléculaire. A ce jour, c'est principalement sur les marqueurs de l'angiogenèse tumorale, processus de prolifération vasculaire déclenché par la tumeur pour subvenir à ses besoins, que se concentrent les études.

Pour remplir cet objectif, l'IRM peut apparaître comme une modalité d'imagerie moins adaptée que la TEP ou l'imagerie de fluorescence, offrant une plus grande sensibilité. Toutefois, le développement d'agents de contraste ciblés a encouragé à profiter des avantages de l'IRM pour l'imagerie moléculaire. Ces molécules peuvent mettre en évidence la présence de biomarqueurs soit par un effet sur le signal  $^1\text{H}$  (relaxation, transfert d'aimantation), soit par la présence d'un noyau spécifique détectable en IRM dans leur composition ( $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{17}\text{O}$ ...). L'approche la plus prometteuse pour la détection de noyaux X est sûrement l'utilisation d'agents de contraste à base de fluor 19. La détection de ces composés est en effet facilitée par l'absence de signal de fond dans l'organisme du fait de l'absence de fluor endogène visible. Par ailleurs, à champ magnétique équivalent, il fournit un signal plus important que n'importe quel autre noyau X (non hyperpolarisé) utilisable en IRM. Cette modalité est également remarquablement utile lorsqu'il s'agit de réaliser de l'imagerie quantitative puisque les concentrations en fluor sont directement proportionnelles au signal mesuré.

Le travail présenté ici a consisté à développer et à évaluer une méthode de détection de l'angiogenèse des tumeurs cérébrales, via des agents de contraste pour l'IRM du  $^{19}\text{F}$ . Cette étude a été réalisée à NeuroSpin, sur le site du CEA à Saclay, dans le cadre du projet Iseult. Elle a été en outre permise par l'utilisation des hauts champs magnétiques et d'agents de

## Introduction générale

contraste synthétisés par Guerbet. Si la détection des tumeurs cérébrales constitue le fil conducteur de ce travail, ce sujet ne sera traité que beaucoup plus tard dans le manuscrit. Ce travail est plutôt présenté comme un cheminement, avec son lot d'étapes, vers le but ultime de la mise en évidence des biomarqueurs de l'angiogenèse tumorale.

Après une brève présentation du cadre dans lequel se sont tenues les différentes études, un premier chapitre rappellera les bases théoriques de l'IRM, en détaillant les points indispensables à la compréhension du travail réalisé. Les caractéristiques de l'IRM du  $^{19}\text{F}$  seront introduites. Un second chapitre donnera des détails sur la physiologie des tumeurs, sur le moyen de détection envisagé et sur l'agent de contraste qui sera utilisé dans toute la suite du manuscrit. Une synthèse des études déjà effectuées sur le sujet sera aussi proposée afin de replacer le travail dans son contexte scientifique. Un troisième chapitre sera consacré à une étape essentielle à la réussite de notre démarche : la mise en œuvre d'une méthode d'imagerie adaptée à notre agent de contraste. Ses propriétés seront étudiées *in vitro* dans un premier temps, et exploitées ensuite dans une séquence afin que celle-ci offre la plus grande sensibilité. Forts des résultats obtenus, nous nous attacherons dans le quatrième chapitre à une première application de notre séquence chez la souris, en procédant à des mesures d'oxymétrie dans le foie et la rate, ainsi qu'à une étude de biodistribution dynamique. Ces résultats permettront d'évaluer la sensibilité de notre séquence *in vivo*, et également de juger de la furtivité de notre agent de contraste vis-à-vis du système immunitaire, dans l'optique de la détection de l'angiogenèse tumorale. Ce sujet suivra dans un cinquième chapitre, dans lequel nous exploiterons notre séquence et notre agent de contraste, sous sa forme fonctionnalisée ou non, pour mettre en évidence la présence d'un biomarqueur de l'angiogenèse tumorale dans un modèle souris de tumeur cérébrale. L'efficacité de notre méthode et la spécificité de notre agent de contraste seront discutés au travers des résultats de tests statistiques. Dans un sixième et dernier chapitre, nous aborderons sous un autre angle la détection de notre agent de contraste en mettant en œuvre une nouvelle séquence de spectroscopie de diffusion, reprenant des caractéristiques de la séquence d'imagerie implémentée au chapitre III. Le but de cette séquence est à terme de supprimer le signal provenant des agents de contraste circulant dans le sang.

On trouvera enfin en annexe le détail des articles et communications ayant été produits pendant la thèse.

## **PREAMBULE : ENVIRONNEMENT EXPERIMENTAL**

### **Le projet ISEULT**

Le projet ISEULT/INUMAC (Imaging of Neuro disease Using high field MR And Contrastophores) est un consortium franco-allemand entre le CEA, les industriels Guerbet, Siemens et Bruker ainsi que l'université de Fribourg-en-Brisgau (Allemagne). Il vise à développer de nouveaux outils de diagnostic des pathologies cérébrales par l'IRM à haut champ. Ce projet comprend la construction à NeuroSpin d'un IRM corps entier à 11,7 Teslas, la création de nouveaux protocoles d'imagerie, et le développement d'agents de contraste fonctionnalisés pour détecter trois pathologies représentant un enjeu en santé publique : la maladie d'Alzheimer, les tumeurs cérébrales et les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Trois types d'agents de contraste, synthétisés par Guerbet, sont en jeu : des agents de contraste à base de gadolinium, des agents de contraste CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer), et des agents de contraste à base de fluor. C'est autour de ce dernier point que s'articule le travail présenté.

### **IRM petit animal à NeuroSpin**

NeuroSpin abrite quatre IRM en fonctionnement : deux sont des scanners cliniques Siemens Avanto à 3 et 7 T (Siemens, Erlangen, Allemagne), et deux sont des scanners petit animal Bruker à 7 et 17 T (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne). Le travail présenté a été effectué grâce au 7 T Bruker. Il s'agit d'un système de la gamme PharmaScan dont le champ précis est de 7,05 T, ce qui conduit à une fréquence de Larmor de 300,31 MHz pour le proton et 282,55 MHz pour le fluor. Le diamètre interne de l'aimant est de 8 cm. Les gradients ont une intensité maximale de 752 mT/m et un temps de montée de 100  $\mu$ s. Le système est piloté par une console Linux via le logiciel Paravision de Bruker (versions 5.0 et 5.1).



*Figure 1. IRM Bruker 7T petit animal de NeuroSpin*



### Sondes de radiofréquence

Les études ont été menées avec deux antennes émettrices/réceptrices réalisées au laboratoire d'électronique de NeuroSpin. La première, utilisée pour l'optimisation de la séquence MES, pour l'imagerie des tumeurs cérébrales et pour la spectroscopie de diffusion, est une antenne type cage d'oiseau double accord proton/fluor, linéaire, ayant un diamètre interne de 2,6 cm et une longueur utile de 3,7 cm. La seconde antenne ne diffère de la première que par sa taille : un diamètre interne de 3,2 cm et une longueur utile de 5 cm. Cette sonde a été utilisée pour l'imagerie abdominale de la souris. A vide, ces antennes présentent des facteurs de qualité élevés ( $Q > 100$ ), mais cette donnée change avec la charge. Si la charge influe peu sur le facteur de qualité de l'antenne tête, elle le fait chuter dans le cas de l'antenne corps entier. Cette différence provient du fait que les deux antennes ne sont pas conçues de la même façon, l'antenne tête étant à match capacitif alors que l'antenne corps entier est à match inductif.

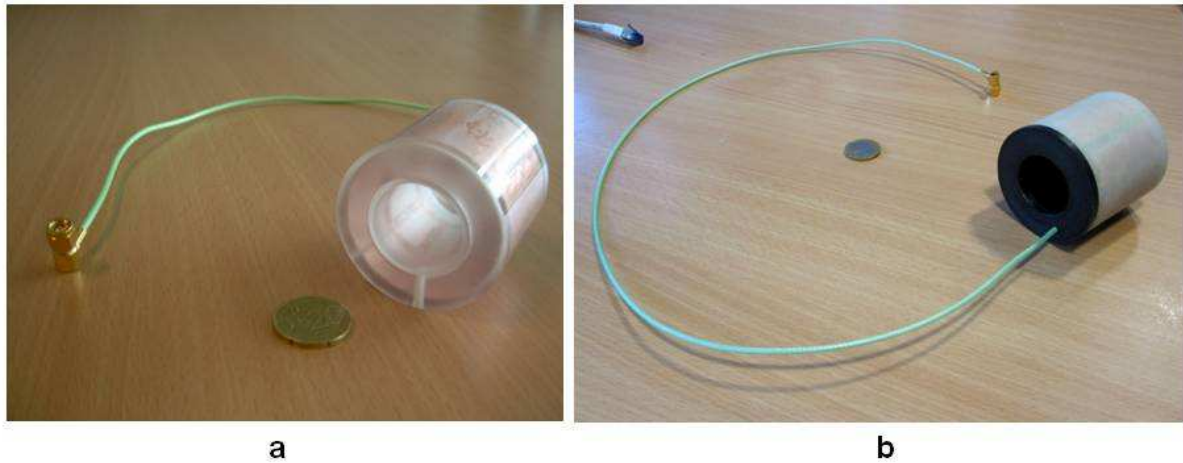


Figure 2. Antennes utilisées pour les études présentées : (a) antenne tête, (b) antenne corps entier.

# **CHAPITRE I**

## **IRM du fluor : bases théoriques et enjeux**



La résonance magnétique nucléaire a été décrite pour la première fois en 1946, par Bloch à Stanford et Purcell à Harvard [Bloch 1946, Purcell 1946]. En 1973, la première image RMN est réalisée par Lauterbur [Lauterbur 1973].

Cette première partie a pour but d'introduire, de façon concise, les principes physiques de l'IRM, ses particularités en fluor, ainsi que les notions très utilisées dans la suite comme celle de rapport signal sur bruit. Les phénomènes propres à la RMN seront décrits principalement à l'aide de la mécanique classique, avec une digression toutefois en mécanique quantique concernant l'opérateur densité. On recommandera aux lecteurs désireux d'en savoir davantage de se tourner vers les innombrables ouvrages traitant de RMN et de son application à l'imagerie (par exemple [Haacke 1999]).

### I.1. NOYAUX, SPINS ET AIMANTATION MACROSCOPIQUE

Le noyau d'un atome peut être considéré en première approximation comme une sphère chargée positivement et tournant sur elle-même. La rotation de ces charges induit un champ magnétique appelé moment magnétique nucléaire, noté  $\vec{\mu}$ . Le comportement de  $\vec{\mu}$  peut être décrit à l'aide du nombre de spin  $I$ , qui détermine le nombre d'orientations possibles qu'un noyau peut adopter lorsqu'il est plongé dans un champ magnétique externe  $\vec{B}_0$  (par défaut, on considérera dans la suite que  $\vec{B}_0$  est orienté selon  $\vec{z}$  dans un repère orthonormé). La valeur de la projection de  $\vec{\mu}$  selon  $\vec{z}$  est quantifiée par le nombre  $m_z$ , qui peut prendre  $2I+1$  valeurs comprises entre  $+I$  et  $-I$ . En présence d'un champ magnétique  $\vec{B}_0$ , une interaction survient entre  $\vec{B}_0$  et  $\vec{\mu}$ , et l'énergie de cette interaction est :

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 \quad (\text{I-1})$$

On assiste alors à une levée de dégénérescence de  $m_z$ , c'est-à-dire une séparation des niveaux d'énergie (effet Zeeman). Cette séparation vaut :

$$\Delta E = \frac{\mu B_0}{I} \quad (\text{I-2})$$

où  $\mu = \gamma \hbar I$ ,  $\hbar$  est la constante de Planck réduite ( $\hbar = \frac{h}{2\pi}$  où  $h=6,63 \cdot 10^{-34}$  J.s.).

A l'équilibre thermique, le système est ainsi distribué sur les différents niveaux d'énergie conformément à la loi de distribution de Boltzmann. Pour des noyaux comme le proton ou le fluor de spin  $I = \frac{1}{2}$ , la répartition des populations se fait sur deux niveaux. Le premier, de moindre énergie comporte les noyaux ayant un spin parallèle à  $\vec{B}_0$  (état « up »), le second comporte les noyaux ayant un spin antiparallèle (état « down »). Ces niveaux ne sont pas également peuplés, le niveau le plus peuplé étant le niveau de moindre énergie. Les moments magnétiques des

spins parallèles et antiparallèles ne se compensant pas totalement, une aimantation  $\overline{M}_0$  non nulle apparaît alors selon  $\overline{B}_0$  (Figure. I.1), de valeur :

$$M_0 = P_0 \frac{\gamma^2 \hbar^2}{4 kT} B_0 \quad (\text{I-3})$$

Où  $P_0$  désigne le nombre de spins dans l'objet considéré,  $k$  est la constante de Boltzmann ( $k=1,38.10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ),  $T$  est la température en K. En revanche, il n'existe aucune résultante de l'aimantation dans le plan transversal xy du fait du déphasage des spins entre eux.

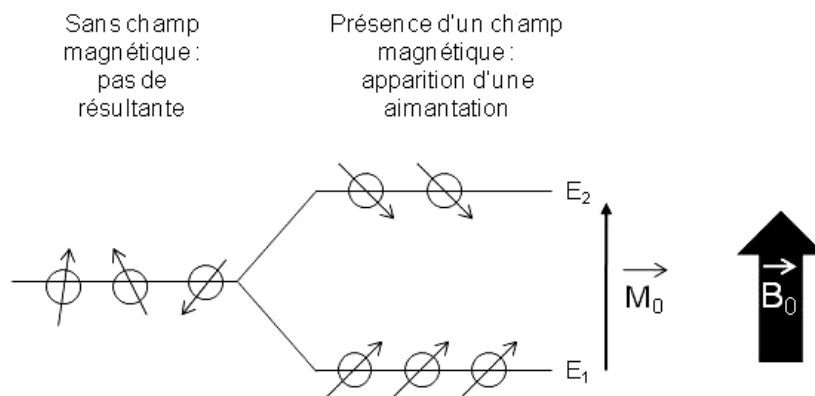


Figure I.1. Répartition des spins sur les niveaux d'énergie et apparition d'une aimantation  $\overline{M}_0$  en présence d'un champ  $\overline{B}_0$ .

## I.2. FORMALISME VECTORIEL DE LA RMN

### I.2.1. Précession de l'aimantation

La figure I.1. indique que les spins plongés dans le champ  $\overline{B}_0$  ne sont pas parfaitement alignés dans la direction du champ. Ils ont en fait un mouvement de précession autour de  $\overline{B}_0$  à la fréquence donnée par l'équation de Larmor :

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (\text{I-4})$$

Où  $\omega_0$  est la fréquence de précession de Larmor en  $\text{rad.s}^{-1}$ , et  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique du noyau considéré en  $\text{rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$ . On trouve aussi souvent l'expression avec  $\frac{\gamma}{2\pi}$  donnant alors la fréquence de Larmor en Hz. Pour les champs usuels en IRM, les fréquences de précession appartiennent au domaine des radiofréquences (RF).

Le mouvement de l'aimantation peut être décrit de plusieurs manières. La plus commode est d'utiliser le formalisme vectoriel, qui consiste à décrire l'aimantation macroscopique globale de l'échantillon à l'aide de vecteurs. Précisons que ce formalisme comporte des limites, il est par exemple inapproprié pour décrire l'évolution d'un système de spins couplés entre eux (cf. partie I.3). Nous l'utiliserons pour décrire la précession des spins autour de  $\vec{B}_0$ , ainsi que pour donner l'évolution de l'aimantation soumise à une impulsion radiofréquence (cf. partie suivante). Dans la suite, l'aimantation est donc désignée par un vecteur  $\vec{M}$  (de projections  $\vec{M}_x = M_x \vec{x}$ ,  $\vec{M}_y = M_y \vec{y}$  et  $\vec{M}_z = M_z \vec{z}$  dans le repère du laboratoire), et on néglige la relaxation dans un premier temps. Ainsi, l'équation du mouvement de précession de l'aimantation plongée dans un champ  $\vec{B} = B \vec{e}$  quelconque s'écrit :

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \wedge \vec{B} = \gamma B \vec{M} \wedge \vec{e} \quad (\text{I-5})$$

L'aimantation tourne donc autour de  $\vec{B}$  à la fréquence  $\gamma B$ . Le mouvement de précession autour de  $\vec{B}$  est illustré pour un spin individuel de moment magnétique  $\vec{\mu}$  sur la figure I.2.

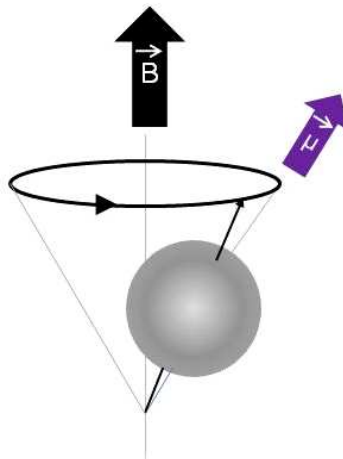


Figure I.2. Mouvement de précession d'un spin de moment magnétique  $\vec{\mu}$  autour d'un champ magnétique  $\vec{B}$  quelconque.

## I.2.2. La résonance magnétique

### I.2.2.1. Perturbation par impulsion de radiofréquence

Pour mesurer  $M_0$ , une solution consiste à appliquer une onde électromagnétique de fréquence  $\omega_0$  dans le plan transverse à  $\vec{B}_0$ . Cette onde est en réalité un champ oscillant  $\vec{B}_1 = B_1 \cos(\omega_0 t) \vec{x} + B_1 \sin(\omega_0 t) \vec{y}$  produit par un courant circulant dans une bobine (appelée antenne dans la suite). Cette impulsion va induire des transitions du niveau d'énergie  $E_1$  au niveau d'énergie  $E_2$  : du fait de l'égalisation des populations de spins sur les niveaux d'énergie, la

composante  $M_z$  de l'aimantation va décroître, et l'aimantation globale va basculer dans le plan  $xy$  (Figure I.3). Pour simplifier l'équation du mouvement, plaçons-nous dans le référentiel tournant à la fréquence de Larmor. Dans ce nouveau repère, on a :

$$\begin{aligned}\vec{x}' &= \cos(\omega_0 t) \vec{x} + \sin(\omega_0 t) \vec{y} \\ \vec{y}' &= -\sin(\omega_0 t) \vec{x} + \cos(\omega_0 t) \vec{y} \\ \vec{z}' &= \vec{z}\end{aligned}$$

L'équation du mouvement <I-5> devient alors dans le référentiel tournant :

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \wedge \vec{B}_1 = \gamma B_1 \vec{M} \wedge \vec{x}' \quad (\text{I-6})$$

Les spins sont alors animés d'un mouvement de précession de fréquence  $\gamma B_1 = \omega_1$  autour du champ  $\vec{B}_1$ . La solution de cette équation est :

$$\begin{aligned}M_{x'}(t) &= M_{x'}(0) \\ M_{y'}(t) &= M_{y'}(0) \cos(\omega_1 t) + M_{z'}(0) \sin(\omega_1 t) \\ M_{z'}(t) &= -M_{y'}(0) \sin(\omega_1 t) + M_{z'}(0) \cos(\omega_1 t)\end{aligned}$$

L'aimantation va s'écarter de  $\vec{B}_0$  d'un angle (appelé angle de nutation)  $\theta = \int \omega_1(t) dt$ , soit pour un champ  $\vec{B}_1$  appliqué pendant une durée  $\tau$  (Figure I.3) :

$$\theta = \gamma B_1 \tau \quad (\text{I-7})$$

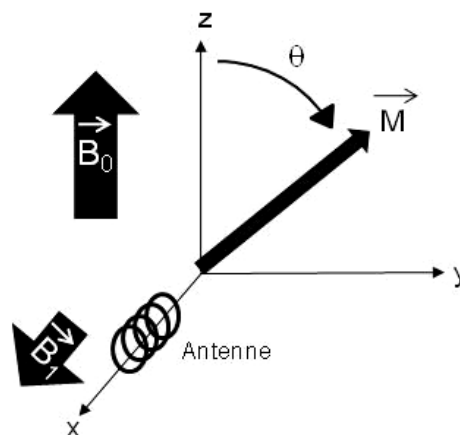


Figure I.3. Effet d'une impulsion RF sur l'aimantation : initialement selon  $z$ , elle est basculée d'un angle  $\theta$  par le biais du champ magnétique  $\vec{B}_1$  généré par une antenne radiofréquence (par souci de lisibilité, la précession simultanée selon  $z$  à la fréquence  $\omega_0$  n'est pas représentée).

L'angle de bascule des impulsions est variable suivant les séquences utilisées. On peut choisir de basculer l'aimantation longitudinale en partie dans le plan transversal (angle de  $30^\circ$  par exemple), totalement dans le plan transversal (angle de  $90^\circ$ ) ou de l'inverser (angle de  $180^\circ$ ).

### 1.2.2.2. Précession libre et relaxation

Sitôt l'excitation terminée, les moments magnétiques retournent à l'équilibre en effectuant un mouvement de précession autour de  $\vec{B}_0$  à la fréquence de Larmor. On peut décomposer à tout moment l'aimantation  $\vec{M}$  en deux aimantations distinctes :

- l'aimantation longitudinale  $\vec{M}_z$  qui, à l'état d'équilibre, correspond à l'aimantation disponible  $\vec{M}_0$
- l'aimantation transversale  $\vec{M}_{xy} = \vec{M}_x + \vec{M}_y$

Chacune de ces aimantations suit un comportement propre lors du retour à l'équilibre. L'équation de Bloch décrit la relaxation à l'aide de deux constantes de temps  $T_1$  et  $T_2$  :

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{B} \wedge \vec{M} + \frac{1}{T_1} (\vec{M}_0 - \vec{M}_z) - \frac{1}{T_2} \vec{M}_{xy} \quad (\text{I-8})$$

En considérant un champ statique  $\vec{B}_0$ , et pour une impulsion de  $90^\circ$ , on arrive à :

$$M_z(t) = M_0 \left( 1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \right) \quad (\text{I-9})$$

$$M_{xy}(t) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{T_2} + i \omega_0 t\right) \quad (\text{I-10})$$

avec  $M_{xy} = M_x + iM_y$ .

On assiste donc à une repousse de  $M_z$  et une décroissance de  $M_{xy}$ , dues à des transitions inverses de l'état d'énergie  $E_2$  vers l'état d'énergie  $E_1$ . Dans le cas de la repousse de  $M_z$ , le phénomène décrit ci-dessus s'accompagne d'une dissipation d'énergie dans l'environnement moléculaire, ce qui vaut à la constante  $T_1$  d'être également appelée temps de relaxation spin-réseau. Dans le cas de la décroissance de  $M_{xy}$ , les spins se déphasent rapidement, et au phénomène de transition inverse s'ajoutent des interactions entre dipôles magnétiques de spins voisins. On désigne ainsi  $T_2$  par le temps de relaxation spin-spin. Cette dernière particularité implique que l'on a toujours pour un composé donné  $T_2 \leq T_1$ .

Toutefois, la décroissance de  $M_{xy}$  ne trouve pas son origine seulement dans la relaxation transverse du système de spins, mais également dans l'inhomogénéité propre de  $\vec{B}_0$  sur le volume observé et dans d'autres phénomènes pouvant faire fluctuer localement le champ (anisotropie...). Cette inhomogénéité induit une dispersion des fréquences de résonance, et donc un déphasage des spins. C'est pourquoi le temps de relaxation  $T_2^*$  a été



introduit pour décrire la décroissance de l'aimantation transverse en présence d'inhomogénéités du champ magnétique  $\Delta B_0$ :

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma}{2\pi} \Delta B_0 \quad (\text{I-11})$$

La constante  $T_2^*$  caractérise typiquement le temps de vie de la FID (Free Induction Decay ou Signal d'Induction Libre) et est en général très inférieur à  $T_2$ . Il est possible de s'affranchir de ces inhomogénéités de champ magnétique par le biais d'une séquence que nous présentons plus loin.

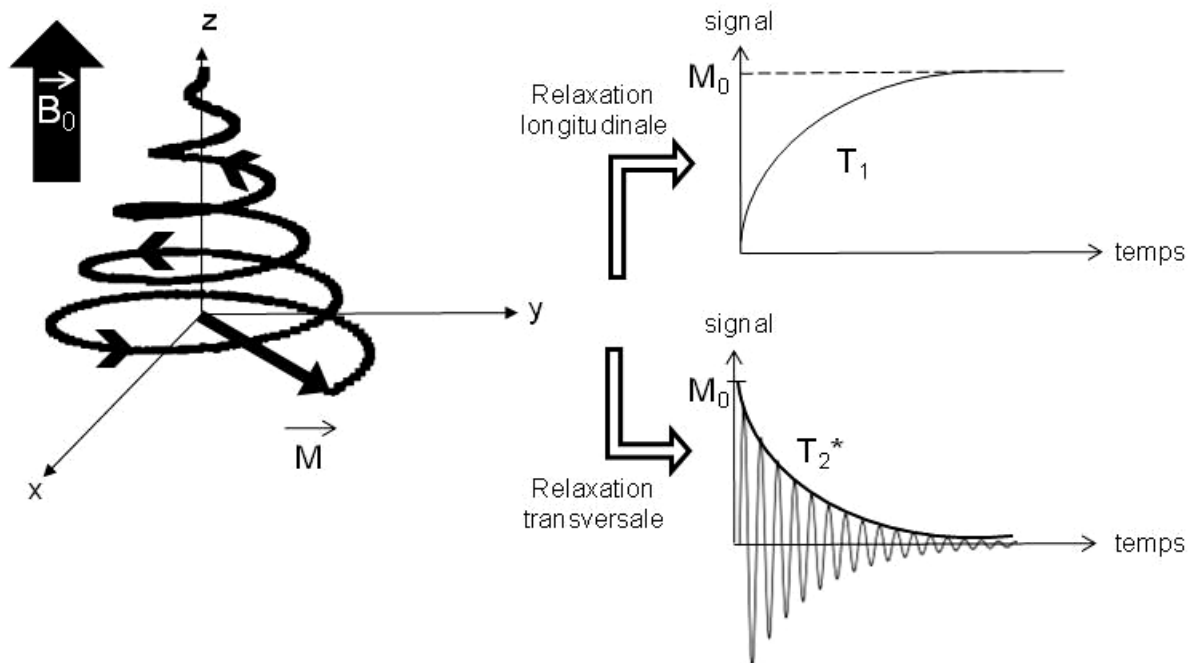


Figure I.4. Relaxation de l'aimantation après une impulsion d'angle  $90^\circ$ . Selon  $z$ , le signal repousse selon la constante  $T_1$  jusqu'à retrouver sa valeur initiale, alors que dans le plan  $xy$ , le signal décroît selon la constante  $T_2^*$  jusqu'à s'annuler. La relaxation s'accompagne d'une précession autour de l'axe  $z$  selon lequel est dirigé  $\vec{B}_0$ .

Le phénomène de précession nous amène à l'observation du signal RMN. Effectivement, la précession de  $\vec{M}$  dans le plan  $xy$  induit un flux magnétique variant périodiquement, et ce dernier va générer dans l'antenne une force électromotrice se traduisant par un courant alternatif de fréquence  $\omega_0$  et d'amplitude proportionnelle à  $M$ . Après démodulation et numérisation, on recueille un signal complexe : le signal RMN. Si l'on applique à ce signal une transformée de Fourier, qui permet d'établir la correspondance entre l'espace temporel et l'espace fréquentiel, on obtient un spectre montrant différentes résonances aux fréquences de Larmor contenues dans l'échantillon.

### I.3. DEPLACEMENT CHIMIQUE, COUPLAGE ET FORMALISME QUANTIQUE

Le fluor entre dans la composition de nombreuses molécules de par sa forte électronégativité. Au sein de ces molécules, il trouve différents environnements chimiques et peut interagir avec certains autres noyaux de spin non nul. Les paragraphes suivants introduisent les notions de déplacement chimique et de couplage, très présentes en RMN du fluor. Par suite on présentera l'opérateur densité, nécessaire à la compréhension de la séquence présentée au chapitre III.

#### I.3.1. Déplacement chimique en RMN du fluor

Le déplacement chimique correspond à la modification de la fréquence de résonance des noyaux de fluor en fonction de leurs liaisons chimiques. Effectivement, les noyaux ne subissent pas tous le même champ magnétique  $B_0$  du fait que les électrons autour d'eux engendrent localement des champs magnétiques induits opposés à  $B_0$ . Il existe alors un blindage électronique, et le champ effectif  $B_{\text{eff}}$  vu par les noyaux comprend une constante d'écran  $\sigma$  :

$$B_{\text{eff}} = B_0(1-\sigma) \quad (\text{I-12})$$

La fréquence de Larmor des noyaux devient alors :

$$\omega_{\text{eff}} = \gamma B_{\text{eff}} \quad (\text{I-13})$$

Le phénomène de déplacement chimique se traduit sur un spectre par la présence de plusieurs pics, représentant les différentes fréquences de résonance. Il est connu pour être responsable en IRM d'un artefact faisant apparaître sur l'image des répliqués de l'objet imagé dans la direction de lecture.

Pour mesurer le déplacement chimique, on définit le paramètre  $\delta$ , indépendant du champ magnétique extérieur, par rapport à un noyau de référence :

$$\delta = 10^6 \frac{\omega - \omega_{\text{ref}}}{\omega_{\text{ref}}} \quad (\text{I-14})$$

La référence utilisée en  $^{19}\text{F}$  est le trichlorofluorométhane  $\text{CCl}_3\text{F}$ . La différence de fréquence de résonance est exprimée en parties par millions ou ppm. Avec 7 électrons sur sa couche externe, le fluor est très sensible à son environnement chimique. Les composés fluorés comportent souvent plusieurs atomes de fluor, qui possèdent rarement le même environnement chimique au sein de la molécule. Les plages de déplacement chimique sont ainsi très élevées en RMN du  $^{19}\text{F}$  (plusieurs centaines de ppm), et sont susceptibles d'entraîner des artefacts de localisation.

### I.3.2. Couplage scalaire spin-spin

Au sein d'une molécule peuvent survenir des interactions entre noyaux atomiques de groupements chimiques voisins, via les électrons de liaison. Ces interactions surviennent entre noyaux de même nature (fluor/fluor) ou de nature différente (fluor/proton). Il ne s'agit plus d'une modification locale du champ magnétique comme dans le cas du déplacement chimique, mais d'une multiplication des niveaux d'énergie, ce que les spectres RMN traduisent par un éclatement des raies en un petit nombre de raies d'intensités relatives et d'espacements caractéristiques (cf. Figure I.5). On parle de doublet, de triplet, de multiplet : c'est le couplage scalaire spin-spin, également appelé couplage  $J$ . L'espacement entre les pics a une valeur en fréquence fixe, appelée constante de couplage  $J$ , indépendante du champ magnétique.

Ainsi pour un noyau A couplé à  $n$  noyaux X de spin I, la résonance de A est éclatée en  $(2nI+1)$  raies également espacées de  $J_{AX}$  (dans le cas d'un couplage avec un noyau de spin  $1/2$ , l'amplitude des raies est donnée par la  $n+1^{\text{ème}}$  ligne du triangle de Pascal). Le couplage entre deux noyaux A et X est dit faible lorsque se vérifie la condition :

$$|\omega_A - \omega_X| \gg J_{AX}$$

Où  $\omega_A$  et  $\omega_X$  sont les fréquences de Larmor des noyaux A et X. Dans le cas contraire, le couplage est dit fort. Déterminer les noyaux couplés entre eux se fait dans la pratique par spectroscopie de corrélation (ou expérience 2D COSY : COrrélation SpectroscopY).

Les couplages sont problématiques en RMN dans la mesure où ils sont responsables d'une perte considérable de signal. Il est toutefois possible de s'en affranchir par différentes méthodes. Nous illustrons l'une d'elle au chapitre suivant.

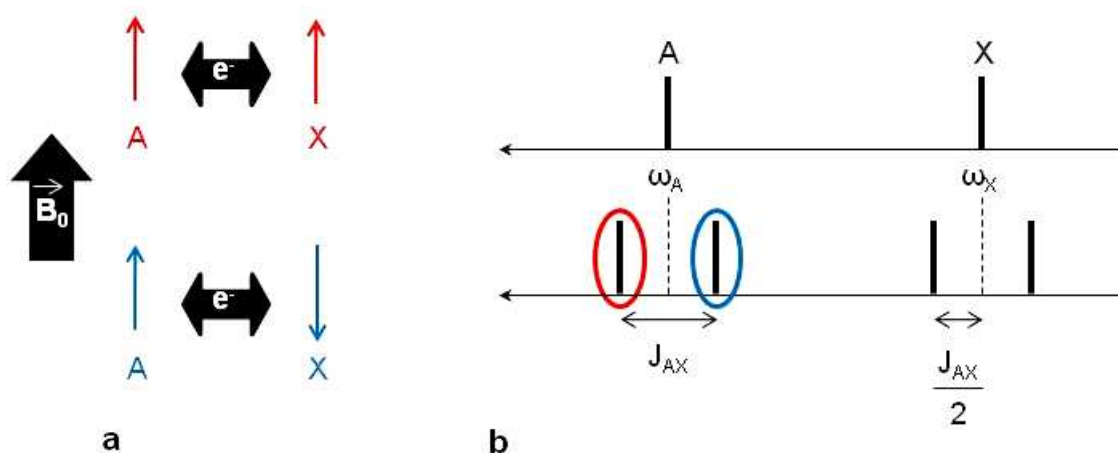


Figure I.5. Couplage entre 2 noyaux de spin  $1/2$ . (a) On se place dans la situation où A est parallèle à  $\vec{B}_0$ . Dans la première configuration, X est également parallèle à  $\vec{B}_0$  alors qu'il lui est antiparallèle dans la seconde configuration. Le premier état est de niveau d'énergie légèrement plus haut que le second, ce qui se traduit sur l'axe des fréquences (b) par l'apparition de 2 raies de même intensité séparées de  $J_{AX}$ . Le même raisonnement peut être appliqué pour le noyau X.

### I.3.3. Opérateur densité

#### I.3.3.1. Formalisme de l'opérateur densité

L'opérateur densité permet de résumer l'ensemble des états quantiques d'un système à un instant donné. Cette entité mathématique est très utile pour décrire un système de 2 spins couplés comme vu au paragraphe précédent. Un certain nombre de notions gravitent autour de celle de l'opérateur densité : nous ne les introduirons pas de façon exhaustive ici, afin de ne pas alourdir les explications. Le lecteur avide d'en savoir davantage est invité à ouvrir l'excellent ouvrage de Munowitz sur les aspects quantiques de la RMN [Munowitz 1988].

En mécanique quantique, la mesure d'une grandeur physique est représentée par une observable. Il s'agit d'un opérateur hermitien, caractérisé par des valeurs propres représentant les valeurs possibles de cette grandeur, et par des vecteurs propres représentant les états associés. Ainsi, la description d'un système se fait grâce à un vecteur d'état  $|\psi\rangle$ , développé sur la base des vecteurs propres  $|\Phi_n\rangle$  d'une observable  $A$  :

$$|\psi\rangle = \sum_n c_n |\Phi_n\rangle \quad (\text{I-15})$$

Où les coefficients  $c_n$  désignent les amplitudes de probabilité. La valeur moyenne de l'observable  $A$  s'écrit alors :

$$\langle A \rangle = \langle \psi | A | \psi \rangle \quad (\text{I-16})$$

L'évolution temporelle du vecteur d'état est donnée par l'équation de Schrödinger :

$$\frac{d}{dt} |\psi\rangle = -iH |\psi\rangle \quad (\text{I-17})$$

où  $H(t)$  est l'hamiltonien du système. Cet opérateur traduit l'énergie totale du système.

Pour un système contenant de nombreuses particules se trouvant dans un mélange d'états quantiques  $|\psi_i\rangle$  de probabilité  $p_i$  (proportion des particules se trouvant dans l'état  $i$ ), l'opérateur densité est défini par :

$$\rho = \sum_i p_i |\psi_i\rangle \langle \psi_i| \quad (\text{I-18})$$

En RMN, cette équation traduit le fait que l'information est mesurée comme une moyenne d'ensemble sur les spins individuels. La valeur moyenne de l'observable de l'équation <I-16> sur l'ensemble des spins du système pour un état quelconque s'exprime en fonction de  $\rho$  par :

$$\langle A \rangle = \text{Tr}(A\rho) \quad (\text{I-19})$$

où  $\text{Tr}$  représente la trace (*i.e.* la somme des éléments diagonaux) de l'opérateur.

L'équation du mouvement de  $\rho$  s'écrit d'après <I-18> :

$$\frac{d}{dt}\rho = \sum_i p_i \frac{d}{dt} |\psi_i\rangle \langle \psi_i|$$

Qui devient :

$$\frac{d}{dt}\rho = \sum_i p_i \left( \frac{d}{dt} |\psi_i\rangle \langle \psi_i| + |\psi_i\rangle \frac{d}{dt} \langle \psi_i| \right)$$

Soit d'après l'équation <I-17> :

$$\frac{d}{dt}\rho = \sum_i p_i (-iH |\psi_i\rangle \langle \psi_i| + i |\psi_i\rangle \langle \psi_i| H) \quad (\text{I-20})$$

On obtient l'équation d'évolution (dite de Liouville-von Neumann) :

$$\frac{d}{dt}\rho = i(\rho H - H\rho) \quad (\text{I-21})$$

Dont la solution est :

$$\rho(t) = e^{-iHt} \rho(0) e^{iHt} \quad (\text{I-22})$$

La matrice obtenue est hermitienne, définie positive (ses valeurs propres sont positives ou nulles), et sa trace, somme des probabilités des différents états du système, est égale à 1. Ses différentes composantes sont appelés modes de cohérence. Le formalisme de l'opérateur densité permet ainsi de résumer en une seule matrice l'état du système à tout moment. La terminologie « opérateur densité » est en fait assez mal choisie dans notre cas puisque  $\rho$  correspond à un opérateur statistique apportant des informations sur les phases.

Les observables les plus courantes en RMN sont l'aimantation longitudinale  $M_z$ , associée à l'opérateur  $I_z$ , et les aimantations transversales  $M_x$  et  $M_y$ , associées aux opérateurs  $I_x$  et  $I_y$  respectivement. Expérimentalement, si l'on appelle  $I_+$  l'opérateur correspondant à  $I_x + iI_y$ , la RMN consiste en la détection et la mesure du signal provenant de l'aimantation  $M_+ = M_x + iM_y$ . Le signal de précession libre est alors proportionnel à (équation <I-19>) :

$$\langle I_+ \rangle(t) = \text{Tr}(I_+ \rho(t))$$

L'hamiltonien prédit quant à lui le comportement des spins, en décrivant à la fois les interactions internes (couplages) et les interactions externes (champ magnétique ambiant, impulsions RF). Pour dresser un parallèle avec le formalisme vectoriel, il peut être utilisé pour traduire en terme d'énergie l'interaction entre le moment magnétique (et à plus large échelle l'aimantation) et le champ magnétique dans lequel sont plongés les spins. Un tel hamiltonien s'écrit :

$$H_0 = \omega_0 \cdot I_z \quad (\text{I-23})$$

Où  $I_z$  désigne l'opérateur de projection du spin  $I$  sur l'axe  $z$ .

De la même façon, l'hamiltonien décrivant l'interaction entre le moment magnétique et le champ radiofréquence  $B_1$ , appliqué par exemple selon  $y$ , s'écrit :

$$H_1 = \omega_1 \cdot I_y \quad (\text{I-24})$$

Durant l'impulsion il est possible, en première approximation, de négliger l'interaction avec  $B_0$ . Cela consiste, comme au paragraphe I.2.2.1, à supposer l'aimantation à la résonance, c'est-à-dire dans le référentiel tournant à la fréquence de Larmor. L'hamiltonien se réduit alors à l'expression ci-dessus. Si comme précédemment on suppose le champ  $B_1$  appliqué pendant une durée  $\tau$ , l'opérateur densité s'écrit :

$$\rho(\tau) = e^{-i\omega_0\tau I_z} I_y e^{i\omega_0\tau I_z} \quad (\text{I-25})$$

Soit d'après l'équation <I-7> :

$$\rho(\tau) = e^{-i\theta I_y} I_z e^{i\theta I_y} \quad (\text{I-26})$$

L'expression précédente correspond à la rotation d'un angle  $\theta$  selon l'axe  $y$ , et peut donc s'écrire :

$$\rho(\tau) = \cos(\theta) I_z + \sin(\theta) I_x \quad (\text{I-27})$$

Si l'on suppose l'application d'un angle de  $90^\circ$ , alors on a :

$$\rho(\tau) = I_x$$

Ainsi, on retrouve un résultat donné précédemment, à savoir qu'à la fin de l'impulsion, l'aimantation a été basculée intégralement selon l'axe  $x$ .

On peut continuer à suivre l'évolution de l'opérateur densité se plaçant à  $t=0$  juste après l'impulsion : les spins ne sont soumis désormais qu'au champ  $B_0$ , et grâce aux équations <I-22> et <I-23>, on obtient :

$$\rho(t) = e^{-i\omega_0 t I_z} I_x e^{i\omega_0 t I_z} = \cos(\omega_0 t) I_x + \sin(\omega_0 t) I_y \quad (\text{I-28})$$

L'opérateur densité décrit ici la précession de l'aimantation basculée dans le plan transverse.

### 1.3.3.2. Cas de deux spins faiblement couplés

Les derniers points présentés ici peuvent être aisément décrits par le formalisme vectoriel comme cela a été démontré aux parties précédentes. Venons-en à un cas pour lequel utiliser le formalisme de l'opérateur densité est une nécessité. Supposons un système de deux spins  $\frac{1}{2}$  I et S faiblement couplés, précessant autour de  $\overline{B}_0$  à leur fréquence de Larmor respectives  $\omega_0^I$  et  $\omega_0^S$ . On note J leur constante de couplage. L'hamiltonien de leur interaction s'écrit :

$$H = \omega_0^I I_z + \omega_0^S S_z + 2\pi J I_z S_z \quad (\text{I-29})$$

Plaçons-nous dans le cas où l'on ne souhaite observer que le spin I. Ce dernier est excité sélectivement (en fréquence) par une impulsion de  $90^\circ$  appliquée selon y. Considérons la fin de l'impulsion comme l'instant 0 de l'observation, on a alors (équation <I-27>) :

$$\rho(0) = I_x$$

En précession libre, l'opérateur densité évolue ensuite comme :

$$\rho(t) = e^{-iHt} I_x e^{iHt} \quad (\text{I-30})$$

Lorsque deux opérateurs appartiennent à des spins différents I et S, ils commutent et l'opérateur rotation associé à l'un des spins n'a pas d'effet sur l'autre opérateur, ce qui plus simplement signifie :

$$e^{-i\theta S} I e^{i\theta S} = I \quad (\text{I-31})$$

On peut donc simplifier immédiatement l'expression de l'opérateur densité en supprimant le terme associé à  $S_z$  :

$$\rho(t) = e^{-i(\omega_0^I t + 2\pi J S_z t) I_z} I_x e^{i(\omega_0^I t + 2\pi J S_z t) I_z} = \cos(\omega_0^I t + 2\pi J S_z t) I_x + \sin(\omega_0^I t + 2\pi J S_z t) I_y \quad (\text{I-32})$$

Si on se place dans le repère tournant à la fréquence  $\omega_0^I$ , on obtient :

$$\rho(t) = \cos(2\pi J S_z t) I_x + \sin(2\pi J S_z t) I_y \quad (\text{I-33})$$

Par ailleurs, on a les relations ( $u$  ne comportant aucun opérateur du spin considéré) :

$$\begin{cases} \cos(2uI_z) = \cos(u)\hat{E} \\ \sin(2uI_z) = 2\sin(u)I_z \end{cases}$$

où  $\hat{E}$  désigne l'opérateur identité. Leur application permet d'aboutir à l'expression simplifiée de  $\rho$  :

$$\rho(t) = \cos(\pi Jt)I_x + \sin(\pi Jt)2I_yS_z \quad (\text{I-34})$$

Cette dernière équation montre que  $\rho$  oscille à la fréquence  $J/2$  entre deux modes de cohérence que sont  $I_x$  et  $2I_yS_z$ . Le mode  $2I_yS_z$  correspond à un mode non observable du fait des états opposés de spins qui le constituent (cf. Figure I.6). On l'appelle traditionnellement mode antiphase. Le signal dans le plan transverse s'annule donc complètement à chaque passage par ce mode antiphase. Dans la pratique lors d'une acquisition, on constate une décroissance du signal en  $T_2$  modulée par ces annulations périodiques : la J-modulation. Ce point sera détaillé et illustré au chapitre III.

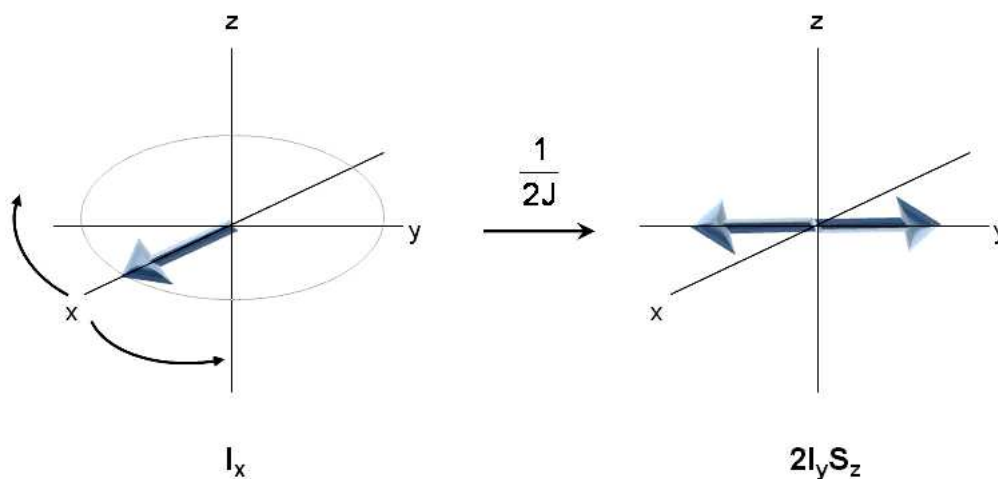


Figure I.6. Evolution de l'opérateur densité en présence d'un couplage  $J$  : après une impulsion de  $90^\circ$ , les spins sont dans l'état de cohérence  $I_x$  (composantes en phase). Ce dernier va évoluer sous l'effet du couplage jusqu'à être dans le mode antiphase  $2I_yS_z$  après un temps  $t=1/2J$ . Ses composantes étant en opposition de phase dans le plan transverse, il n'en résulte aucun signal mesurable.

#### I.4. L'ECHO DE SPIN

De nombreuses séquences permettent d'obtenir une image en IRM. On en distingue deux types : les séquences d'écho de gradient, et les séquences d'écho de spin, qui retiendront notre attention dans la suite.



### I.4.1. Principe de la séquence écho de spin

Nous avons vu au paragraphe I.2. qu'après une excitation, la relaxation de l'aimantation transverse était due à des transitions inverses entre les niveaux d'énergie, à des interactions entre les spins, ainsi qu'à des inhomogénéités de  $\overline{B_0}$ . Ces inhomogénéités induisent une perte de cohérence des spins, et par conséquent une relaxation selon une constante  $T_2^*$  plus courte que le  $T_2$ , mais elles ne sont pas inéluctables. Il est effectivement possible de s'en affranchir après une impulsion RF : Hahn a proposé pour cela la méthode de l'écho de spin, qui consiste à faire succéder à une impulsion de  $90^\circ$  une impulsion de  $180^\circ$  au temps  $t = \tau$  [Hahn 1950]. L'impulsion de  $90^\circ$  permet de basculer l'aimantation dans le plan transversal. Les phases des aimantations élémentaires se dispersent ensuite dans le plan transversal à cause des inhomogénéités de champ magnétique, causant une disparition du signal en  $T_2^*$ . Si on applique alors une impulsion de  $180^\circ$ , les spins se refocalisent pour former un écho (voir figure) au temps  $t = 2\tau = \text{TE}$ .

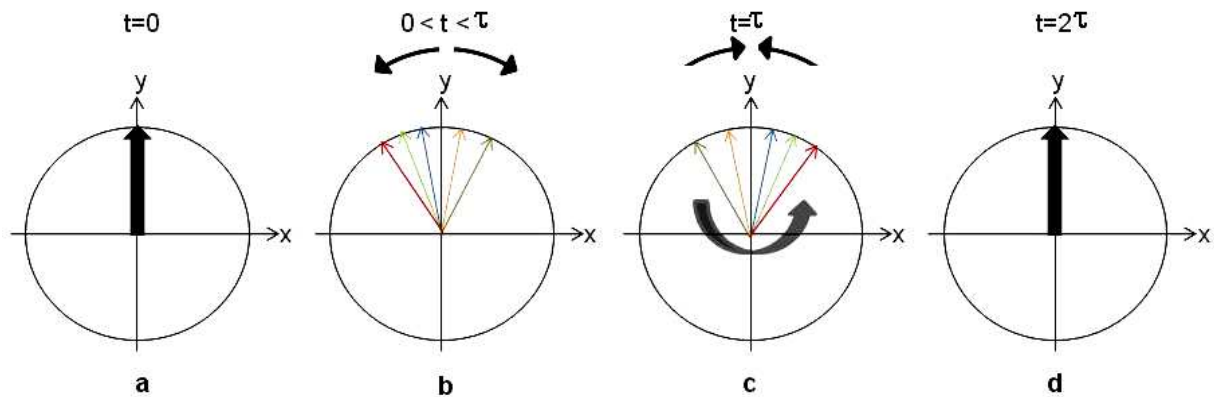


Figure I.7. Principe de l'écho de spin. A  $t=0$ , les spins sont basculés dans le plan transversal à la suite d'une impulsion de  $90^\circ$  selon  $x$  (a). Pendant la relaxation, ils se déphasent selon leurs fréquences de Larmor respectives jusqu'au temps  $t=\tau$  (b) auquel intervient une impulsion de  $180^\circ$  selon  $y$ , qui va avoir pour conséquence d'inverser leur phase (c). Ainsi, au temps  $t=2\tau$ , les spins sont tous en phase, et donnent lieu à un écho (d).

### I.4.2. Extension à la séquence CPMG

Il existe des variantes de la séquence écho de spin, comme celle qui consiste à refocaliser les spins à intervalles réguliers  $\text{TE}$ , en appliquant des impulsions de  $180^\circ$  successives. Ce type de séquence donne donc lieu un train d'échos de spin.

Il existe différents types de séquence multi-échos de spins, qui diffèrent par la phase de l'impulsion de refocalisation. La plus couramment utilisée est la séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) décrite sur la figure I.8 [Meiboom 1958]. Cette séquence est une modification de la séquence Carr Purcell incorporant une différence de phase de  $90^\circ$  entre l'impulsion de  $90^\circ$  et celles de  $180^\circ$  (typiquement appliquer un angle de  $90^\circ$  selon  $x$  et les angles de  $180^\circ$  selon  $y$ ) visant à réduire les effets de l'accumulation d'impulsions de  $180^\circ$  imparfaites. Par exemple, dans le cas où les impulsions de refocalisation sont faites selon le même axe que l'excitation et font moins de  $180^\circ$ , l'aimantation est basculée « au-dessus » du

plan transverse et les impulsions successives ont un effet cumulatif. A l'inverse, une même impulsion imparfaite opérée avec une phase de  $90^\circ$  par rapport à l'excitation sera corrigée par l'impulsion suivante : l'aimantation sera de nouveau basculée dans le plan transverse. Cette méthode est utilisée comme référence pour la mesure du  $T_2$ , et nous intéressera particulièrement dans la suite.

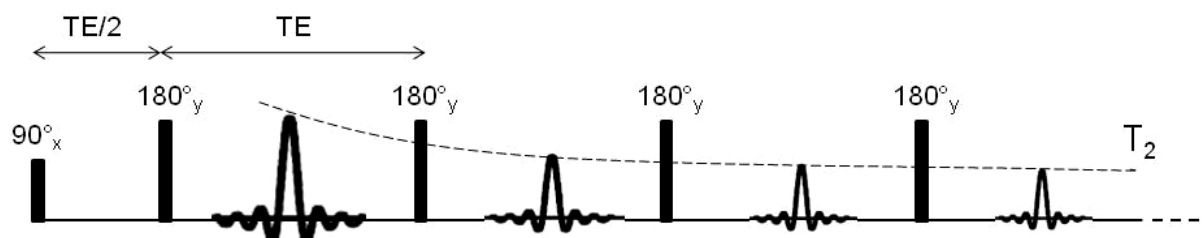


Figure I.8. Principe de la séquence CPMG : une impulsion de  $90^\circ$  selon  $x$  à  $t=0$  est suivie d'impulsions de  $180^\circ$  selon  $y$  survenant à intervalles réguliers  $TE$ . Chaque impulsion de  $180^\circ$  génère un écho. La mesure du signal obtenu à chaque écho permet la mesure du  $T_2$ .

## I.5. APPLICATION DE LA RMN A L'IMAGERIE 2D

Les bases de la RMN étant posées, nous pouvons aborder son application à l'imagerie. Pour réaliser une image, il est d'abord nécessaire de localiser la provenance du signal. La fréquence de précession dépendant du champ local, il est possible de coder l'espace en appliquant un champ magnétique variant en chaque endroit de l'espace à imager. Il est ensuite possible de distinguer des signaux provenant de différents emplacements en fonction de leur fréquence.

### I.5.1. Gradients de champ magnétique

#### I.5.1.1. Gradient de sélection de coupe

La première étape pour obtenir une image consiste à sélectionner une coupe dans l'objet à imager. On applique pour cela un gradient de champ magnétique  $G_z$ . La valeur du champ local en  $z$  devient alors :

$$B(z) = B_0 + G_z z \quad (\text{I-35})$$

Et par conséquent, la fréquence de précession devient :

$$\omega(z) = \frac{\gamma}{2\pi} B(z) = \frac{\gamma}{2\pi} (B_0 + G_z z) \quad (\text{I-36})$$

Ce gradient est appliqué durant l'émission RF : ainsi, seuls les spins situés dans la région où le champ magnétique correspond à une résonance dans le spectre de l'onde RF vont

subir le basculement dans le plan transversal, ce qui permet la sélection d'une coupe perpendiculaire à la direction z.

La relation de Larmor permet d'évaluer le gradient appliqué en fonction de l'épaisseur de coupe choisie  $e$  :

$$G_z = \frac{2\pi \cdot BP_p}{\gamma e} \quad (\text{I-37})$$

Où  $BP_p$  désigne la bande d'émission en Hz de l'impulsion RF.

Dans le cas d'une excitation sélective, le gradient de sélection de coupe est suivi d'un gradient de polarité inverse appelé gradient rephaseur. Ce gradient sert à corriger le déphasage qui survient dans le plan transverse du fait de l'application du gradient de sélection de coupe. Considérant que les spins sont basculés instantanément dans le plan transverse au centre de l'impulsion d'excitation, le déphasage ne survient que pendant la seconde moitié du gradient. Pour que les spins soient de nouveau en phase, il est donc d'usage d'appliquer un gradient de polarité inverse dont l'aire est égale à la moitié de l'aire du gradient de sélection de coupe.

#### *1.5.1.2. Gradient de lecture*

L'échantillonnage des données dans le plan se fait par convention en appliquant un gradient de lecture selon x, et d'un gradient d'encodage de phase selon y.

Le gradient de lecture  $G_x$  est appliqué pendant l'enregistrement du signal et permet la localisation dans l'espace du signal en fonction de sa fréquence. Si on note  $FOV_x$  le champ de vue sélectionné dans la direction x, et  $BP_{acq}$  la bande passante d'acquisition, on a la relation :

$$G_x = \frac{2\pi}{\gamma FOV_x} BP_{acq} \quad (\text{I-38})$$

La résolution de l'image dans cette dimension est :

$$\Delta x = \frac{FOV_x}{N_x} \quad (\text{I-39})$$

Où  $N_x$  désigne le nombre de pixels de l'image dans la direction x.

#### *1.5.1.3. Gradient d'encodage de phase*

Pour encoder la deuxième direction de l'image, on a recours à l'application d'un gradient  $G_y$  entre la sélection de coupe et la lecture du signal. L'aimantation d'une colonne subit ainsi un déphasage proportionnel à sa position en y. Si on note  $FOV_y$  le champ de vue sélectionné dans la direction y, et  $\tau_{ph}$  la durée d'application du gradient  $G_y$  on a la relation :

$$G_y = \frac{2\pi}{\gamma FOV_y \tau_{ph}} \quad (\text{I-40})$$

Comme précédemment, on obtient une résolution dans la direction y :

$$\Delta y = \frac{FOV_y}{N_y} \quad (\text{I-41})$$

Où  $N_y$  désigne le nombre de pixels dans la direction y. Dans la pratique, le gradient d'encodage de phase est répété à intervalles de temps TR (Temps de Répétition), et ceci conduit à un temps d'acquisition de l'image :

$$T_{acq} = N_y \cdot TR \quad (\text{I-42})$$

#### 1.5.1.4. Gradients et artefacts de déplacement chimique

L'artefact de déplacement chimique est la conséquence de variations de la fréquence de résonance de noyaux placés dans des environnements chimiques différents (cf. paragraphe I.3.1). Lors de l'application de gradients de localisation basés sur une sélection en fréquence (direction de lecture et de coupe), les noyaux subissent une variation linéaire de leur fréquence de résonance en fonction de leur position (équation <I-36> et figure I.9). D'après l'équation de Larmor <I-4> et l'équation <I-35> (l'expression est valable pour z et pour x), la relation suivante lie le décalage spatial  $\Delta z$  au décalage en fréquence  $\Delta\omega$  :

$$\Delta z = \frac{\Delta\omega}{\gamma G_z} \quad (\text{I-43})$$

On peut ramener cette expression en fonction de l'épaisseur de coupe choisie  $e$  (équation <I-37>) :

$$\Delta z = \frac{e}{2\pi B P_p} \Delta\omega \quad (\text{I-44})$$

Lorsqu'on opère une sélection de coupe par une impulsion sélective en présence d'un gradient, sur une même image peuvent donc se retrouver superposées des résonances provenant de différents plans de coupe.

Par ailleurs, l'artefact de déplacement chimique se traduit dans la direction de lecture par l'apparition de répliqués, si la bande passante d'acquisition par pixel est inférieure à l'écartement entre les deux résonances.

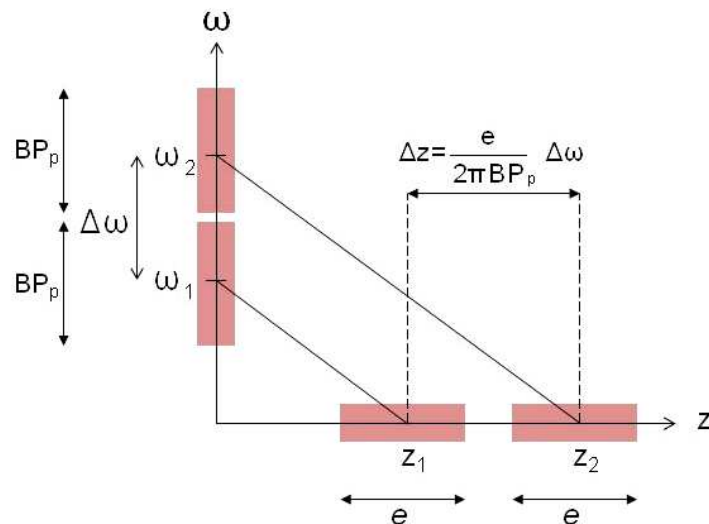


Figure I.9. Correspondance entre les fréquences et les positions dans l'espace : aux fréquences de résonance  $\omega_1$  et  $\omega_2$  correspondent 2 coupes de positions  $z_1$  et  $z_2$ .

### I.5.2. Remplissage du plan de Fourier

Suite à une excitation, le signal provenant d'une coupe et mesuré dans le plan transverse peut être exprimé d'après l'équation (I-3) en fonction d'aimantation transverse P dans la coupe considérée (incluant les effets  $T_1$ ) :

$$S(t) = \iint P(x, y) e^{i \int_0^t a_{\rho t'} dt'} dx dy \quad (\text{I-45})$$

Si on démodule ce signal à la fréquence de Larmor, et en considérant le cas de gradients variables quelconque (dont les gradients de lecture et de phase présentés à la partie précédente sont une réalisation courante) alors on obtient :

$$S(t) = \iint P(x, y) e^{i \gamma \int_0^t (G_x x + G_y y) t' dt'} dx dy \quad (\text{I-46})$$

On peut alors exprimer le signal comme :

$$S(k_x, k_y) = \iint P(x, y) e^{i 2\pi (k_x x + k_y y)} dx dy \quad (\text{I-47})$$

On introduit ici la fréquence spatiale  $k(t) = \frac{\gamma}{2\pi} \int_0^t G(\tau) d\tau$ , soit dans le cas présent

$k_x(t) = \frac{\gamma}{2\pi} G_x t$  et  $k_y(t) = \frac{\gamma}{2\pi} G_y t$ . L'expression précédente montre que le signal  $S(k_x, k_y)$  est en fait la transformée de Fourier de la densité de spins contenue dans l'échantillon. Inversement, si on effectue la transformée de Fourier de ce signal, on peut obtenir la densité de spins à partir du signal recueilli, c'est-à-dire l'image de l'objet recherchée. L'originalité de l'IRM

réside donc dans le fait que l'acquisition ne retranscrit pas directement l'objet imagé. Elle consiste d'abord à remplir un espace réciproque, appelé plan de Fourier ou espace-k [Ljunggren 1983, Twieg 1983], échantillonné à intervalles  $\Delta k_x = \frac{2\pi}{\text{FOV}_x}$  et  $\Delta k_y = \frac{2\pi}{\text{FOV}_y}$ .

La figure I.10 donne un exemple de remplissage de plan de Fourier dans le cas d'une séquence d'écho de spin.

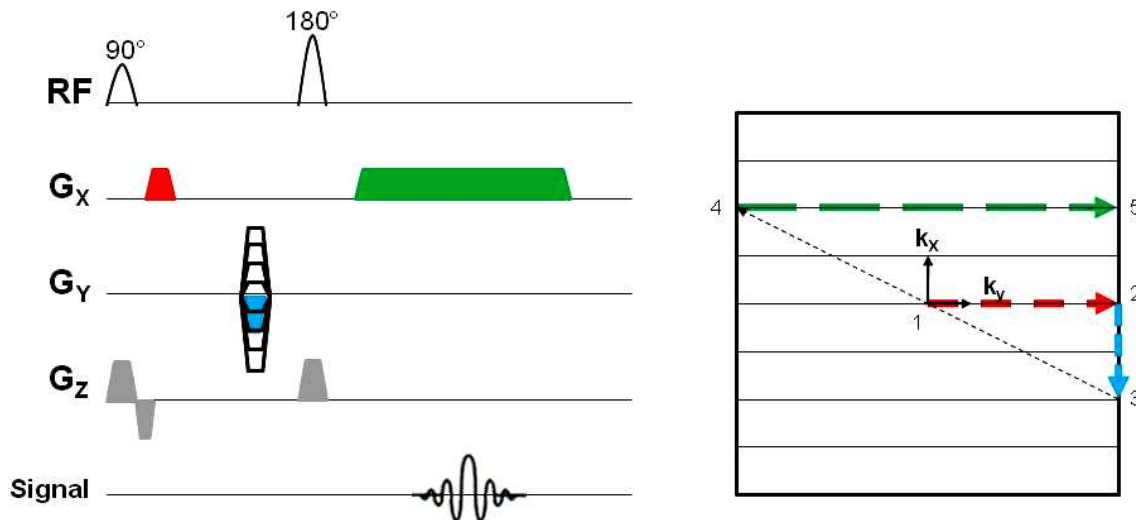


Figure I.10. Remplissage du plan de Fourier dans le cas d'une séquence écho de spin : à gauche, chronogramme de la séquence, à droite, plan de Fourier. Après bascule de l'aimantation, on se trouve au centre du plan de Fourier (1). Un premier gradient selon  $x$  provoque un déplacement horizontal (2). Le gradient de phase provoque un déplacement selon  $y$  (3). L'impulsion de  $180^\circ$  inverse les phases acquises en  $x$  et en  $y$  (4). Le gradient de lecture selon  $x$  permet l'acquisition de la ligne correspondante.

Les équations précédentes semblent indiquer que seule la densité de spins a une influence sur le signal reçu pour une résolution spatiale donnée ; en réalité, le signal reçu est bien entendu modulé par les temps de relaxation et d'autres paramètres dont nous allons parler à présent.

## I.6. RAPPORT SIGNAL SUR BRUIT ET SENSIBILITE

Le rapport signal sur bruit (RSB) est une notion cruciale en IRM dans la mesure où il permet d'évaluer la qualité d'une image et d'ajuster des paramètres d'une séquence pour en tirer les meilleurs résultats. Nous détaillerons dans la suite l'expression du signal, les sources de bruit affectant la mesure, le calcul du RSB et par suite la sensibilité d'une méthode.

### I.6.1. Signal et maximisation de l'aimantation transverse

Nous venons de voir que le signal recueilli dépendait, entre autres, de paramètres comme la densité de spins de l'échantillon. D'autres facteurs intrinsèques interviennent dans

l'intensité du signal, notamment la nature du noyau, l'intensité du champ magnétique, ou les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$ . Certains facteurs présentent l'avantage de pouvoir être plus facilement ajustés par l'opérateur, comme le temps d'acquisition (voir partie I.6.3), les paramètres de la séquence TE, TR, l'angle de bascule, le volume du voxel, la bande passante de la chaîne d'acquisition, la qualité de l'antenne...

En général, afin d'obtenir le meilleur signal dans le temps d'acquisition le plus court possible, il est avantageux d'utiliser des séquences à TR court. Dans la pratique, pour toute combinaison d'un temps de relaxation  $T_1$  donné et d'un TR choisi, il existe un angle de bascule  $\theta$  permettant l'obtention du signal maximal à l'état stationnaire lorsqu'il y a répétition d'impulsions d'excitation. Cet angle est appelé angle de Ernst et s'obtient grâce à la relation [Ernst 1966] :

$$\cos \theta = e^{-\frac{TR}{T_1}} \quad (\text{I-48})$$

Cet ajustement est en fait un compromis entre une repousse maximale de l'aimantation selon  $\vec{z}$  et l'obtention d'un signal disponible maximal dans le plan transverse (Figure I.11). On fait ici l'hypothèse que  $T_2 \ll T_1$ , que l'acquisition est réalisée aussitôt après l'excitation et que la repousse en  $T_1$  s'effectue donc sur toute la durée du TR.

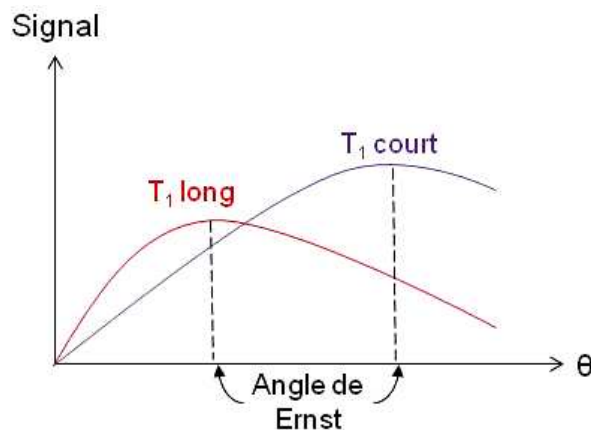


Figure I.11. Exemples d'angles de Ernst pour un TR choisi en fonction du  $T_1$  de l'objet imagé (séquence d'imagerie rapide à TR court). Le signal est d'autant plus important que l'angle est élevé.

### I.6.2. Le bruit en IRM

Le signal récupéré en IRM est un voltage induit dans l'antenne par la précession des spins dans le plan transverse, entaché d'un certain bruit. Ce bruit est principalement d'origine thermique (bruit Johnson) et apparaît dès lors qu'il existe une résistance dans un système.

Il provient d'une part de l'agitation thermique des porteurs de charge dans l'antenne, c'est-à-dire les électrons, et d'autre part de l'échantillon placé dans l'antenne. Ce dernier est couplé à l'antenne par induction et se comporte comme une résistance. Ces sources de bruit étant indépendantes, elles s'additionnent et on obtient l'écart-type du bruit  $\sigma$  :

$$\sigma = \sqrt{4kT.R.BP_{acq}} \quad (\text{I-49})$$

Où R désigne la résistance totale du système (électronique + échantillon).

Le bruit relevé sur chaque voie (réelle et imaginaire) est généralement gaussien : il suit une loi normale et est identique quelle que soit la fréquence. La transformée de Fourier étant linéaire, ce bruit est également gaussien sur les images réelle et imaginaire. Pour le mesurer, on utilise généralement les pixels dans les coins de l'image, bien à l'écart de l'objet pour éviter toute pollution par la fonction d'étalement du point (ou PSF : Point Spread Function). L'image étant visualisée en module, la mesure du bruit se fait également en module et ce dernier suit dans ce cas une statistique ricienne (Figure I.12).

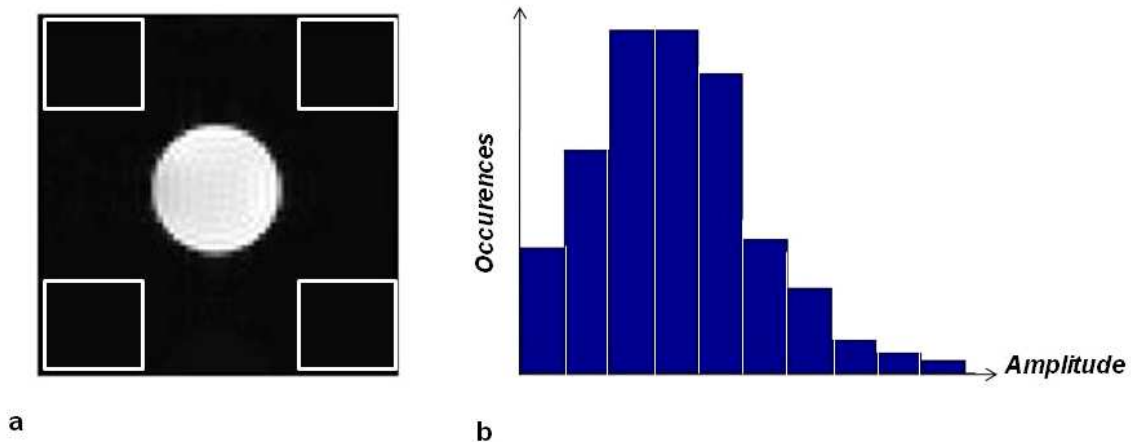


Figure I.12. Exemple de mesure du bruit dans les coins d'une image en module (a) et histogramme correspondant montrant une distribution ricienne du bruit (b).

### I.6.3. Calcul du RSB, effet du moyennage et sensibilité

On définit le RSB comme le rapport entre l'amplitude moyenne du signal reçu et l'écart type du bruit défini au paragraphe précédent :

$$RSB = \frac{\langle \text{Signal} \rangle}{\sigma} \quad (\text{I-50})$$

Le signal moyen est évalué sur une région d'intérêt dans l'objet à considérer (par exemple on prendra les pixels au centre de la section représentée Figure I.12).

Du fait des basses concentrations locales *in vivo* en agents de contraste, il est impératif d'optimiser les séquences utilisées pour obtenir le meilleur RSB. Nous allons montrer qu'obtenir des images *in vivo* avec un RSB correct ( $>5$ ) en IRM du  $^{19}\text{F}$  passe par le moyennage du signal sur un grand nombre de répétitions de la séquence, et donc par un temps d'acquisition long, et qu'il est en général avantageux dans ce cas de travailler avec des séquences à TR court. Plaçons-nous dans le plan de Fourier. Le signal total mesuré  $S$  peut être décrit comme un signal effectif  $s$  additionné d'un bruit blanc gaussien  $\xi$  :



$$S(k) = s(k) + \zeta(k) \quad (\text{I-51})$$

Pour un échantillon donné dont l'acquisition est répétée  $N_{acq}$  fois, le signal moyen  $S_m(k)$  obtenu correspond à :

$$S_m(k) = \frac{1}{N_{acq}} \sum_{i=1}^{N_{acq}} S_i(k) \quad (\text{I-52})$$

D'après <I-51>, on en déduit la valeur moyenne :

$$\overline{S_m(k)} = \frac{1}{N_{acq}} \sum_{i=1}^{N_{acq}} \overline{S_i(k)} = \frac{1}{N_{acq}} \sum_{i=1}^{N_{acq}} \overline{s_i(k) + \varepsilon(k)}$$

Le bruit étant blanc gaussien lorsqu'il est complexe, on obtient :

$$\overline{S_m(k)} = \frac{1}{N_{acq}} \sum_{i=1}^{N_{acq}} \overline{s_i(k)} = \frac{1}{N_{acq}} (N_{acq} s(k)) = s(k) \quad (\text{I-53})$$

Le bruit est supposé statistiquement indépendant d'une acquisition à l'autre et de variance  $\sigma^2$ . Dans ce cas, la variance de la moyenne des  $N_{acq}$  acquisitions s'écrit :

$$\text{Var}(S_m(k)) = \sigma_m^2 = \frac{\sigma^2(k)}{N_{acq}} \quad (\text{I-54})$$

Par conséquent, l'écart-type du bruit est :

$$\sigma_m = \frac{\sigma(k)}{\sqrt{N_{acq}}} \quad (\text{I-55})$$

On constate donc que, contrairement au signal qui est directement proportionnel au nombre d'acquisitions (équation <I-53>), le bruit augmente avec la racine carrée de  $N_{acq}$ . Finalement, le RSB dans le plan de Fourier après  $N_{acq}$  acquisitions est :

$$RSB(k) = \frac{\overline{S_m(k)}}{\sigma_m} = \sqrt{N_{acq}} \frac{S_m(k)}{\sigma(k)} \quad (\text{I-56})$$

Le RSB augmente donc en racine carrée du nombre d'acquisitions, et par conséquent, en racine carrée du temps d'acquisition  $T_{acq}$ .

Lorsqu'on veut confronter différentes séquences et évaluer leurs efficacités respectives, il est utile de se ramener à la notion de sensibilité. Le RSB augmentant en racine

carrée du temps d'acquisition, cette sensibilité s'exprime comme la normalisation du RSB par la racine carrée du temps d'acquisition :

$$SN = \frac{RSB}{\sqrt{T_{acq}}} \quad (\text{I-57})$$

Le RSB dépend du signal mesuré, lui-même dépendant de la quantité d'aimantation dans le plan transverse. Cette quantité est proportionnelle à l'angle de bascule  $\theta$  appliqué, et on a en particulier d'après l'équation <I-56> :

$$RSB \propto \sin \theta \sqrt{N_{acq}}$$

Par ailleurs, le temps d'acquisition  $T_{acq}$  est proportionnel à la durée  $N_{acq} \cdot TR$  (équation <I-42>), on peut donc écrire d'après les équations <I-56> et <I-57> pour un nombre d'acquisitions  $N_{acq}$  :

$$SN \propto \frac{\sqrt{N_{acq}} \sin \theta}{\sqrt{N_{acq} TR}} = \frac{\sin \theta}{\sqrt{TR}} \quad (\text{I-58})$$

D'après la formule de l'angle de Ernst (équation <I-48>), la sensibilité d'une séquence est proportionnelle à :

$$SN \propto \frac{\sin(\arccos(e^{-\frac{TR}{T_1}}))}{\sqrt{TR}} \quad (\text{I-59})$$

Les hypothèses sont les mêmes que celles de l'équation <I-48>. La figure I.13 illustre l'évolution de la sensibilité en fonction des valeurs prises par le TR, pour quatre  $T_1$  différents (100, 500, 1000 et 4000 ms). On constate sur cette figure que la sensibilité est d'autant plus importante que le TR est court, quel que soit le  $T_1$ , et confirme l'assertion selon laquelle il est avantageux de choisir un TR court afin d'obtenir le meilleur RSB dans le temps d'acquisition le plus court possible.

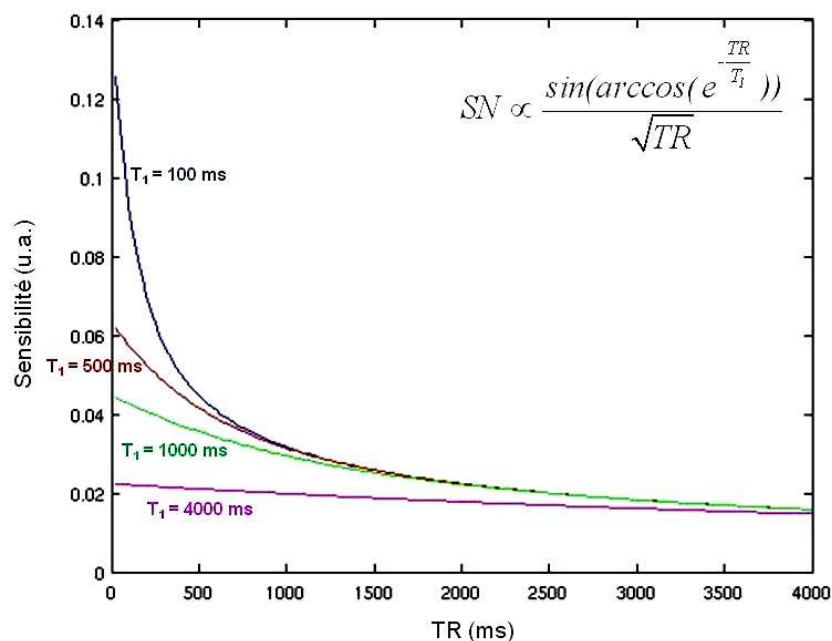


Figure I.13. Estimation de la sensibilité d'une séquence en fonction du TR pour 4 valeurs de  $T_1$  différentes.

Dans notre cas, afin de pouvoir comparer différentes méthodes d'acquisition en tenant compte à la fois du temps d'acquisition mais également de la taille des voxels et des concentrations d'agent de contraste en présence, nous avons ajouté à l'équation <I-57> le terme  $n$ , représentant la quantité de matière par voxel. Nous nous ramènerons donc systématiquement dans la suite à une sensibilité exprimée comme :

$$SN = \frac{RSB}{n\sqrt{T_{acq}}} \quad (\text{I-60})$$

Cette sensibilité s'exprimera en  $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1/2}$ .

## I.7. LE FLUOR EN IRM

Ce premier chapitre a pour le moment mis en avant des notions sur l'IRM en général. Quelques précisions sont à apporter sur l'IRM du  $^{19}\text{F}$ , afin de justifier son choix par le projet Iseult.

### I.7.1. Le fluor dans l'environnement et en biologie

Dans la classification périodique, le fluor est un élément chimique de la famille des halogènes, de symbole F et de numéro atomique 9. Le seul isotope stable présent naturellement sur terre est le  $^{19}\text{F}$ , que l'on retrouve notamment dans la croûte terrestre à hauteur de 0,3 g/kg. Le fluor étant l'élément le plus électronégatif de la classification

périodique, il se lie très facilement aux autres éléments avec lesquels il forme une gamme de composés très variée. Le fluor est utilisé en proportion non négligeable dans l'industrie, notamment en pharmacie et en agrochimie. On estime ainsi que 25% des médicaments et 50% des composés agrochimiques présents sur le marché contiennent du fluor.

Le fluor joue toutefois un rôle mineur en biologie. Il n'est présent qu'à l'état de trace chez les organismes vivants : un adulte en comprend environ 2 grammes répartis entre les dents, les os et les ligaments, pour une concentration globale inférieure à  $10^{-6}$  M (ou  $10^{-6}$  mol.L $^{-1}$ , par comparaison l'hydrogène est présent à hauteur de 88 M). Si c'est un oligo-élément célèbre pour son pouvoir protecteur sur la carie dentaire, il s'avère également toxique lorsqu'il est consommé en excès. La principale pathologie qui lui est liée est la fluorose dentaire, mais à des doses très élevées peuvent survenir des retards de croissance, des dysfonctionnements rénaux, voire la mort.

### I.7.2. IRM du $^{19}\text{F}$ : avantages et limitations

Du point de vue de la RMN, le noyau de l'atome de fluor possède comme le proton un spin  $1/2$ . Son rapport gyromagnétique  $\frac{\gamma}{2\pi}$  est également proche de celui du proton puisqu'il est de 40,08 MHz/T (42,57 MHz/T pour le proton). L'intensité du signal RMN étant directement proportionnelle au rapport gyromagnétique, le fluor (désignant le noyau de l'atome par abus de langage dans la suite) constitue le noyau naturel qui possède la plus grande sensibilité en RMN après le proton, avec une sensibilité relative de 83%. Tirant parti de cet avantage, Holland obtient en 1977 la première image  $^{19}\text{F}$  sur un tube de fluorure de sodium [Holland 1977], soit 4 ans après l'obtention par Lauterbur de la première image  $^1\text{H}$ . L'IRM du  $^{19}\text{F}$  connaît par la suite un essor grâce au principal avantage de la technique *in vivo* : l'absence de fluor dans les tissus, et donc de signal de fond. Lors d'une injection d'un agent de contraste à base de fluor, la provenance d'un signal  $^{19}\text{F}$  *in vivo* est ainsi sans équivoque. De ce fait, la méthode ne requiert pas d'image pré-injection, puisque l'absence d'agent de contraste se traduit par une image de bruit. Un autre atout non négligeable de la technique réside dans le fait que le signal mesuré est directement proportionnel à la concentration en agent de contraste (ce qui n'est pas le cas par exemple avec des agents de contraste paramagnétiques en IRM du  $^1\text{H}$ ). L'IRM du  $^{19}\text{F}$  est donc une modalité parfaitement appropriée pour réaliser de l'imagerie quantitative.

Toutefois, en raison des faibles concentrations locales en fluor retrouvées *in vivo* après injection d'un agent de contraste, la méthode requiert une résolution spatiale basse ainsi que des temps d'acquisition assez longs pour recueillir un signal. Suivant les méthodes utilisées et les conditions expérimentales, les études réalisées en  $^{19}\text{F}$  jusqu'à aujourd'hui permettent de détecter *in vivo* des concentrations de l'ordre du millimolaire (mM) en fluor avec des temps d'acquisition proches d'une heure et des voxels de taille  $\sim 10$   $\mu\text{L}$ . Si la quantification est simple en IRM du  $^{19}\text{F}$ , elle souffre d'effets de volume partiel importants lorsqu'il s'agit de détecter des traces ponctuelles d'agent de contraste. Dans de telles situations, l'IRM du  $^{19}\text{F}$  peut paraître plus adaptée pour attester de la présence de fluor dans les tissus que pour sa quantification. Obtenir un RSB suffisant en un temps d'acquisition « raisonnable » après injection d'une dose d'agents de contraste écartant les problèmes de toxicité et les

perturbations physiologiques, voici les principaux enjeux auxquels il a fallu faire face dans le travail présenté.

L'IRM du fluor reste une modalité encore marginale, absente dans le domaine clinique. Elle requiert effectivement un matériel spécifique (amplificateurs sur le système IRM, antennes adaptées...), et comme précisé au paragraphe I.3, l'imagerie d'agents de contraste à base de fluor peut s'avérer problématique du fait des artefacts de déplacement chimiques et des couplages. Ainsi, comme pour la plupart des noyaux autres que le proton (phosphore 31, carbone 13...), la littérature fournit principalement des résultats obtenus dans des études précliniques sur l'animal. Nous pouvons à présent dresser le contexte dans lequel le travail présenté a été effectué, ainsi qu'un état de l'art de ce qui se fait aujourd'hui en IRM du fluor.

## **CHAPITRE II**

**Contexte : détection des tumeurs cérébrales par IRM  
du fluor 19**



## II. 1. TUMEURS CEREBRALES : PHYSIOLOGIE ET MOYENS DE DETECTION

### II.1.1. Physiologie des tumeurs cérébrales

On parle de cancer lorsque l'on assiste à une prolifération anarchique de cellules dans un tissu sain aboutissant à la formation d'une tumeur. Les cellules tumorales présentent la particularité d'être indépendantes de leur environnement : elles sont indifférentes aux signaux inhibiteurs et à l'apoptose, et ont un potentiel de réplication illimité.

Les tumeurs cérébrales ont pour principale origine les cellules gliales, ou cellules de soutien. Ces dernières représentent une large part des cellules cérébrales (elles sont 10 fois plus nombreuses que les neurones). Elles assurent bon nombre de fonctions, notamment d'isolation physique des neurones en formant la barrière hémato-encéphalique (BHE). Le développement d'un cancer au niveau de la glie engendre une tumeur appelée gliome. Si en se développant une telle tumeur détruit les tissus sains environnants, on parle alors de gliome malin, ou plus généralement de glioblastome. Ces tumeurs sont connues pour être extrêmement agressives et de croissance rapide, et il n'existe malheureusement à ce jour aucun moyen permettant d'anticiper leur apparition par dépistage. Leur cause est incertaine, mais les facteurs génétiques et/ou environnementaux comme l'exposition à des perturbateurs endocriniens sont suspectés. Les tumeurs cérébrales malignes touchent plus de 4000 personnes chaque année, et 50 à 60% de ces tumeurs sont des glioblastomes. Les traitements pour les soigner sont généralement lourds (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie), et les récurrences fréquentes. En moyenne, la survie après traitement ne dépasse pas 14 mois.

Comme toute tumeur, les glioblastomes nécessitent oxygène et nutriments pour se développer. Les travaux de Folkman sur la croissance tumorale [*Folkman 1971*] ont montré qu'une tumeur ne pouvait grossir au-delà d'une taille de 2 mm si elle n'était pas alimentée par son propre réseau vasculaire. A cette taille, une zone d'hypoxie apparaît au sein de la tumeur et pour y pallier, cette dernière déclenche le phénomène de néoangiogenèse, c'est-à-dire le développement de nouveaux vaisseaux sanguins destinés à l'irriguer. Les cellules tumorales sécrètent une protéine, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) et l'angiogenèse s'amorce à partir des vaisseaux préexistants (Figure II.1).

La vascularisation tumorale ne répond généralement à aucune logique, et les capillaires se développent de façon anarchique. La perfusion est médiocre du fait de l'inégale répartition des vaisseaux, de leur tortuosité, des shunts artério-veineux, et de l'absence de gradients de pression. Au cours de la croissance, la zone d'hypoxie prend de l'ampleur au centre de la tumeur malgré l'angiogenèse, et de la nécrose apparaît, souvent accompagnée d'hémorragies. Le glioblastome faisant partie des tumeurs les plus vascularisées, la progression et l'architecture de son angiogenèse sont largement documentées dans la littérature [*Hsu 2006, Onishi 2011*].

Les tumeurs cérébrales présentent par ailleurs une BHE altérée. Une BHE saine comporte normalement des pores de taille inférieure au nanomètre, permettant le passage vers les neurones de l'eau et des nutriments mais empêchant le passage de la plupart des autres substances circulant dans le réseau sanguin (agents pathogènes, toxines, hormones...). Cette



protection ne remplit plus son rôle dans le cas d'une tumeur, les pores pouvant atteindre une taille de 100 nanomètres dans le cas du glioblastome [Hobbs 1998].

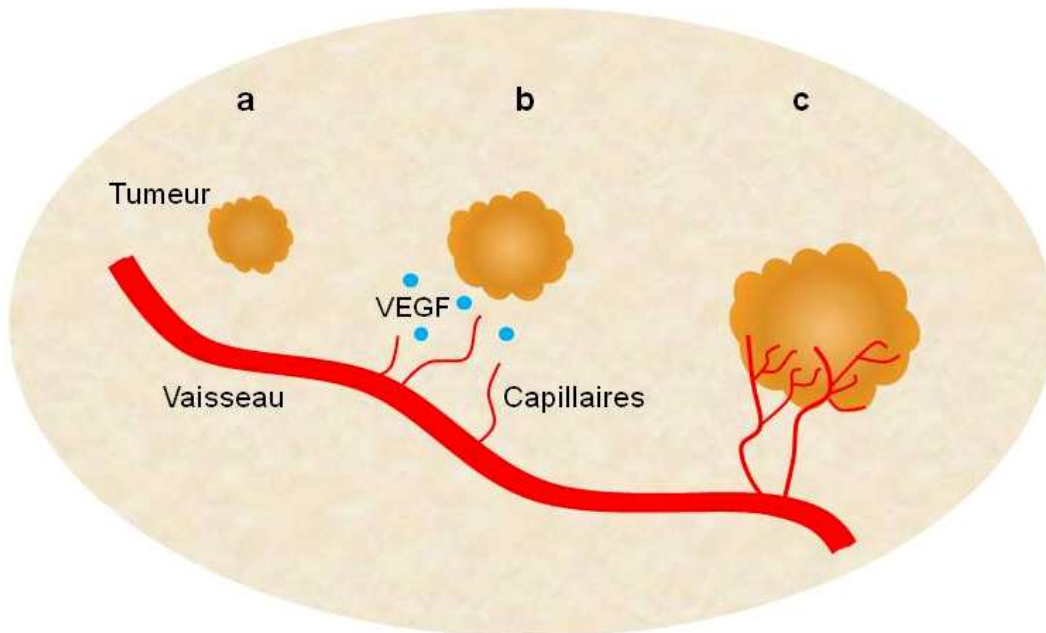


Figure II.1. Mécanismes de l'angiogenèse tumorale : la tumeur (a) grossit jusqu'à un certain stade auquel elle sécrète le VEGF qui va déclencher l'angiogenèse pour l'alimenter (b). Les capillaires sanguins irriguant la tumeur se densifient dans sa périphérie et permettent sa croissance rapide, tandis qu'une zone d'hypoxie dépourvue de capillaires se crée au centre de la tumeur (c).

### II.1.2. Détection des tumeurs cérébrales : moyens actuel et envisagé

Il est aujourd'hui possible en routine clinique de dépister les tumeurs cérébrales en utilisant des séquences IRM pondérées en  $T_2$ , ou le plus souvent des séquences IRM pondérées en  $T_1$  avec injection préalable d'un agent de contraste paramagnétique (typiquement des chélates de gadolinium, voir Figure II. 2).

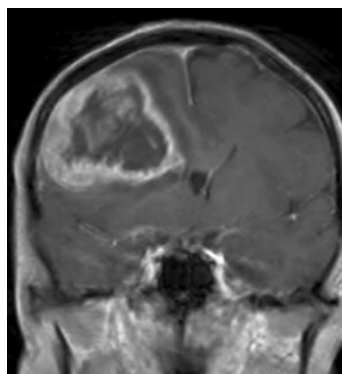


Figure II.2. Image IRM  $^1\text{H}$  pondérée  $T_1$  acquise chez un patient après injection de gadolinium, faisant ressortir la périphérie de la tumeur dans l'hémisphère gauche du cerveau.

Cette méthode est non spécifique et tire parti de la déficience de la BHE des tumeurs : l'agent de contraste injecté n'est plus confiné à l'intérieur du réseau capillaire et s'accumule dans le tissu tumoral, modifiant sa relaxivité. Une séquence IRM pondérée en  $T_1$  fait apparaître la tumeur en hypersignal sur l'image. Il est possible également en routine clinique d'avoir recours à l'IRM de perfusion, permettant la mise en évidence des tumeurs via des augmentations de volume sanguin.

Dans le cas du projet Iseult, une autre option est envisagée pour la détection des tumeurs cérébrales. Il s'agit de cibler de manière spécifique l'angiogenèse tumorale en détectant des biomarqueurs caractéristiques. En effet, les vaisseaux sanguins nouvellement créés sont tapissés sur leur face interne de cellules endothéliales sur-exprimant des intégrines (protéines de surface). Parmi ces intégrines, l' $\alpha_v\beta_3$  est particulièrement intéressante car elle est absente chez les cellules matures. Cette molécule joue un rôle prépondérant dans le processus de néo-angiogenèse, en fournissant un signal de survie aux cellules endothéliales. L' $\alpha_v\beta_3$  constitue donc un des marqueurs moléculaires de l'angiogenèse tumorale accessible par voie sanguine, dont le ciblage permettrait de détecter des glioblastomes dès leurs premiers stades de croissance [Brooks 1994]. Le moyen traditionnel auquel recourent les études pour mettre en évidence la présence d'un biomarqueur est de fonctionnaliser des agents de contraste avec un ligand adapté à la cible (anticorps, peptide, aptamère...). Un peptide bien connu pour avoir une forte affinité avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est le peptide RGD (acronyme désignant les acides aminés arginine, glycine et acide aspartique, cf. Figure II.3). Son incorporation au sein d'agents de contraste IRM a déjà permis de mettre en avant l'angiogenèse dans certains types de tumeurs chez l'animal (un état de l'art détaillé est présenté plus loin). Notre stratégie est donc de mettre en évidence la présence d' $\alpha_v\beta_3$  au moyen d'agents de contraste  $^{19}\text{F}$  fonctionnalisés par le peptide RGD.

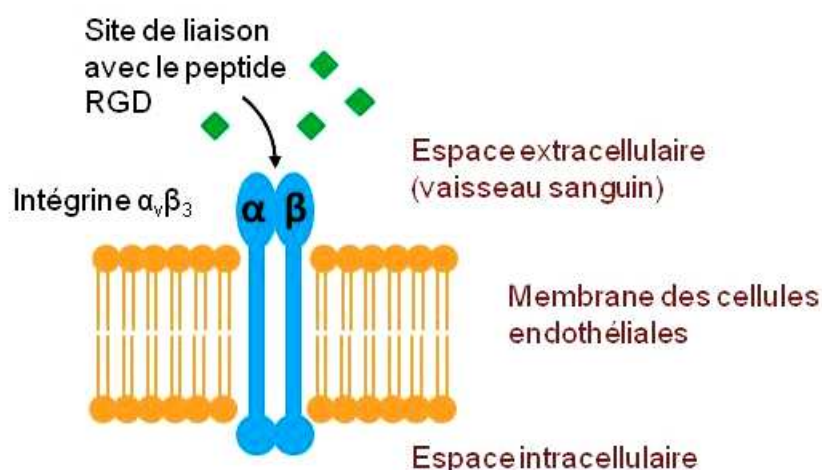


Figure II.3. Représentation schématique de l'intégrine d' $\alpha_v\beta_3$  sur la membrane d'une cellule endothéliale, et de sa liaison possible avec le peptide RGD circulant dans le sang.

Des résultats avec des particules ciblant l' $\alpha_v\beta_3$  dans les glioblastomes ont été obtenus chez l'homme avec du  $^{18}\text{F}$  fonctionnalisé pour la TEP [Schnell 2009], ou en imagerie optique de fluorescence chez l'animal [Hsu 2006]. Voyons ce qu'il en est en IRM.

## **II.2. DES COMPOSES FLUORES D'INTERET : LES PFC**

Nous venons de voir qu'une détection possible des tumeurs cérébrales passait par la mise en évidence de l'angiogenèse tumorale, en fonctionnalisant des agents de contraste avec le peptide RGD. Dans le cas de l'IRM du  $^{19}\text{F}$ , les perfluorocarbures (PFC) sont des composés d'intérêt, et leurs propriétés générales sont présentées. Un soin particulier sera ensuite apporté à la description du perfluorooctyl bromure (PFOB), omniprésent dans le reste du manuscrit.

### **II.2.1. Propriétés des PFC**

Un agent de contraste doit répondre à certaines exigences. Outre le fait de mettre en évidence certaines structures du corps, il est nécessaire qu'il soit bien toléré par l'organisme aux doses injectées et qu'il s'élimine facilement.

Nous allons donc nous pencher dans la suite sur une gamme particulière d'agents de contraste fluorés : les perfluorocarbures (PFC). Ces liquides synthétiques sont étudiés depuis plus de 40 ans. Ils possèdent une structure très stable semblable à celle des hydrocarbures, à la différence près que les atomes d'hydrogène sont remplacés par des atomes de fluor. Les PFC présentent donc l'avantage en IRM du  $^{19}\text{F}$  de comporter de nombreux noyaux sur lesquels faire l'acquisition.

Le domaine biomédical s'est particulièrement intéressé aux PFC pour leurs propriétés, notamment le fait qu'ils sont inertes biologiquement : ils ne sont pas métabolisés et sont donc peu toxiques même à haute dose. Ces composés sont cependant hautement hydrophobes et lipophobes, et ne sont donc pas miscibles avec le sang : ils requièrent par conséquent une émulsification avant injection par voie intraveineuse (IV). Par ailleurs, les PFC présentent la particularité de dissoudre de grandes quantités de gaz, jusqu'aux deux tiers de leur volume (par comparaison le sang ne peut contenir que 20 % de son volume en oxygène). Cette solubilité trouve son origine dans la structure des PFC qui n'interagit pas avec l'oxygène, facilitant les échanges gazeux rapides par simple diffusion, contrairement aux atomes de fer de l'hémoglobine qui forment une liaison chimique forte avec l'oxygène. Clark et Gollan ont ainsi montré qu'une souris pouvait survivre plusieurs heures en étant immergée dans un bain de PFC saturé en oxygène [Clark 1966]. Le premier usage de ces liquides dans le domaine biomédical fut donc en tant que substituts sanguins et pour la ventilation liquidienne [Riess 2006, Krafft 2001].

### **II.2.2. Applications des PFC en IRM du $^{19}\text{F}$**

#### *II.2.2.1. Introduction*

Les PFC ont trouvé de nombreuses applications en tant qu'agent de contraste, sous forme d'émulsions ou bien sous forme de nanocapsules (sauf précision, le tout sera désigné dans la suite du chapitre sous le terme générique « nanoparticules »). D'une manière générale, la taille des particules vouées à l'imagerie va de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres. Dans la littérature, la taille la plus fréquente se situe autour de 200 nm. Ces

particules comportent un cœur composé d'un PFC, emprisonné soit sous une couche de phospholipides lorsqu'il s'agit d'une émulsion, soit dans une coque fait d'un polymère biocompatible lorsqu'il s'agit d'une nanocapsule. La signature spectrale du PFC n'est pas modifiée par l'encapsulation. Suivant l'usage envisagé, les nanoparticules de PFC peuvent être utilisées telles quelles, ou bien fonctionnalisées avec divers agents pour l'imagerie moléculaire. Les applications des PFC en imagerie médicale ne se limitent pas à l'IRM, ils ont par exemple été employés pour la tomographie à rayons X ou l'ultrasonographie [Mattrey 1994]. Nous ne détaillerons toutefois pas leur usage dans ces modalités et nous nous limiterons à leur utilisation en IRM par voie intraveineuse.

### II.2.2.2 Devenir d'une émulsion perfluorée in vivo

L'organisme réagit à l'injection de nanoparticules dans la circulation sanguine par le biais du système réticuloendothélial. Il s'agit d'un ensemble de cellules disséminées dans l'organisme et dont la fonction est l'épuration du sang (corps étrangers, cellules anciennes ou anormales...). Ces cellules sont regroupées dans divers organes tels que le foie, la rate, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, le thymus... Ce sont principalement le foie et la rate qui interviennent pour capter les nanoparticules.

Au niveau du foie, deux types de cellules captent les nanoparticules. Il s'agit d'une part des hépatocytes, cellules à fonction métabolique, et des cellules de Kupffer, qui correspondent aux macrophages du foie. Dans la rate, ce sont les macrophages, présents en grande quantité au niveau de la pulpe rouge, qui captent les nanoparticules (Figure II.4). Une fois endocytées, les nanoparticules sont dégradées, et les débris sont relargués dans la circulation sanguine, en particulier les molécules de PFC. Les PFC étant très volatiles, les molécules sont excrétées via l'expiration lors de leur passage dans les poumons.

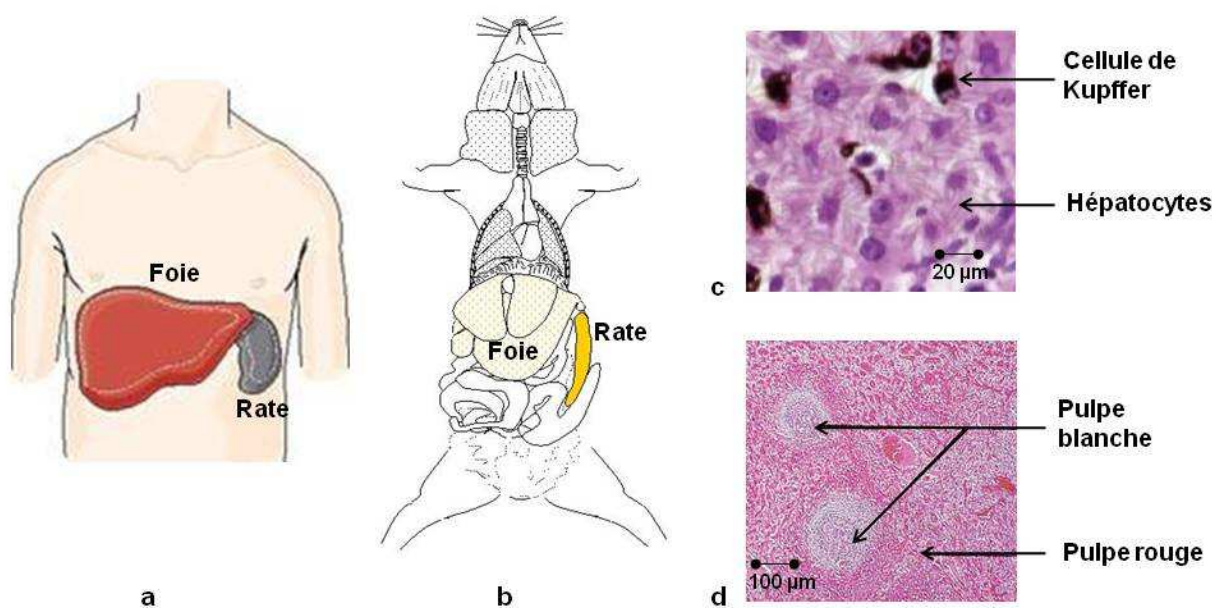


Figure II.4. Place du foie et de la rate chez l'homme (a) et chez la souris (b). Microscopie montrant pour le foie les cellules de Kupffer et les hépatocytes (c), et pour la rate les deux tissus principaux que sont la pulpe rouge, majoritaire, et la pulpe blanche (tissu lymphoïde).

### II.2.2.3. Utilisation non spécifique des PFC chez le petit animal

Les nanoparticules de PFC ont trouvé une première application en IRM du  $^{19}\text{F}$  pour l'oxymétrie des tissus sains ou pathologiques. En effet, le  $T_1$  des PFC a la caractéristique de dépendre directement de la pression partielle d'oxygène à une température donnée :

$$R_1 = R_0 + k \cdot pO_2 \quad (\text{II-1})$$

Où  $R_1 = \frac{1}{T_1}$  désigne la relaxivité du PFC ( $\text{s}^{-1}$ ),  $R_0$  est la relaxivité du PFC en l'absence d'oxygène (température dépendante) et  $pO_2$  désigne la pression partielle d'oxygène à laquelle est soumis le PFC (160 mmHg dans le cas de l'air ambiant sous pression atmosphérique). La pente  $k$  varie selon la sensibilité à l'oxygène du PFC utilisé. L'émulsification n'affecte pas la propriété traduite par l'équation <II-1> [Kong 1984].

Dès lors, des mesures d'oxygénation ont pu être établies chez le petit animal à des champs variant de 1,4 à 4,7 T. Les valeurs de  $pO_2$  ont été rapportées notamment dans le foie et la rate du fait de l'accumulation des nanoparticules dans ces organes, ainsi que dans le réseau vasculaire [Holland 1993, Fishman 1987, Börnert 1993, Nöth 1995]. Par ailleurs des études ont été menées pour caractériser l'hypoxie dans des tumeurs de l'abdomen, soit par injection d'une grande quantité de nanoparticules dans le sang [Dardzinski 1994, Hees 1993, Robinson 2004], soit par injection intratumorale de PFC pur [Mason 1996, Jordan 2009].

Les nanoparticules de PFC sont également utilisées pour le suivi de cellules (« cell tracking »). Elles peuvent par exemple marquer les macrophages présents au niveau d'une inflammation sur certains modèles animaux [Nöth 1997, Flögel 2008]. Récemment, des études ont montré qu'il était possible de marquer des cellules *ex vivo*, puis de les implanter et suivre leur migration dans l'organisme [Ahrens 2005, Partlow 2007].

### II.2.2.4. Utilisation de nanoparticules de PFC fonctionnalisées

Nous avons vu qu'il était possible d'accrocher à la surface des nanoparticules des ligands pour le ciblage de biomarqueurs présents dans certains tissus malades, comme l' $\alpha_v\beta_3$ . Ainsi, le premier article faisant état de la détection de l' $\alpha_v\beta_3$  par IRM met en évidence une néovascularisation sur la cornée de lapin au moyen de nanoparticules paramagnétiques incorporant un anticorps associé [Anderson 2000]. A l'instar de la publication d'Anderson et al., une large part des études cherchant à détecter l'angiogenèse tumorale utilisent les nanoparticules de PFC comme un simple « support » pour le ligand, et rajoutent à leur surface du gadolinium pour le rehaussement du signal  $^1\text{H}$  sans faire d'imagerie du  $^{19}\text{F}$  [Winter 2003, Schmieder 2005].

Plusieurs études récentes tirent néanmoins parti des avantages du  $^{19}\text{F}$  pour indiquer la présence de l' $\alpha_v\beta_3$ . Le PFC à l'honneur dans ces communications est le perfluorocrownether (PFCE, ou plus connu sous le nom éther couronne  $\text{C}_{10}\text{F}_{20}\text{O}_5$ ). Ce composé est cyclique et, contrairement à la plupart de ses homologues perfluorés, il ne comporte qu'un seul pic : il est

donc très simple à imager puisqu'il ne pose aucun problème d'artefact de déplacement chimique. Des chélates de gadolinium sont greffés à la surface des nanoparticules. Cet ajout permet de faire de l'imagerie  $^1\text{H}$  et parallèlement de réduire le  $T_1$  du PFCE (~400 ms), permettant de multiplier par deux le signal  $^{19}\text{F}$  [Neubauer 2008]. Les auteurs [Keupp 2009, Rahmer 2009] mettent en évidence à 3 T un signal fluor au niveau d'un carcinome implanté dans une patte de lapin au moyen d'une séquence d'écho de gradient 3D à encodage radial. Une autre étude [Lamerichs 2010] montre des résultats semblables avec une séquence d'imagerie spectroscopique, également à encodage radial (F-uTSI). Par ailleurs, Waters et al. utilisent des particules de PFCE sans gadolinium ainsi qu'une séquence de spectroscopie pondérée en diffusion dans le cas d'une tumeur de l'oreille de souris [Waters 2008a]. En éliminant le signal non spécifique provenant du sang (particules circulantes), les gradients de diffusion permettent la quantification directe des nanoparticules liées.

Précisons que l' $\alpha_v\beta_3$  ne s'exprime pas seulement lors du phénomène d'angiogenèse, mais également lors de toute forme d'inflammation vasculaire, notamment l'athérosclérose (épaississement de l'endothélium vasculaire). A ce titre, certaines études ont montré, toujours avec des nanoparticules de PFCE, que l'on pouvait mettre en évidence *ex vivo* la présence de l'intégrine dans la valve aortique de lapin ayant subi un régime hypercholestérolémiant (séquence d'écho de spin à 11,7 T) et quantifier leur concentration dans les tissus [Waters 2008b].

### II.3. CHOIX D'UN PFC POUR L'IMAGERIE DE L'ANGIOGENESE TUMORALE: LE PFOB

#### II.3.1 Présentation

Les PFC utilisés dans les études précliniques en IRM sont nombreux. Les plus courants sont le PFCE, présenté au paragraphe précédent, le FTBA (perfluorotributylamine), le FTPA (perfluorotripropylamine), le PFD (perfluorodécane)... le choix est vaste. L'un des PFC s'est cependant fait remarquer au début des années 80 : le perfluorooctyl bromure, ou PFOB (perfluorooctylbromide ou perflubron pour les anglophones). Son principal atout réside dans son excellente biocompatibilité et son caractère volatile modéré, minimisant le risque d'emphysème pulmonaire lorsqu'il est excrété par la respiration. Le PFOB, sous forme d'émulsion, a subi les tests cliniques de phase II et III (notamment l'émulsion Oxygent<sup>TM</sup>, mise au point par Alliance) en tant que substitut sanguin temporaire pendant les actes chirurgicaux [Spahn 1999]. Il a été également testé en clinique sous sa forme pure pour le traitement du stress respiratoire pendant la ventilation liquidienne [Leach 1996].

Le PFOB, de formule  $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{Br}$ , comporte toutefois plusieurs résonances en RMN du  $^{19}\text{F}$ , comme la plupart des PFC (Figure II.5). Le spectre comprend ainsi une résonance pour le groupe  $\text{CF}_3$ , arbitrairement assignée au déplacement chimique 0. Un massif de 6 résonances, les  $\text{CF}_2$ , est présent entre -36 et -45 ppm (soit éloignées de -10 à -13 kHz du pic du  $\text{CF}_3$  à 7 T), et un dernier pic, celui du groupement  $\text{CF}_2\text{Br}$ , se situe à +18 ppm (soit à +5 kHz du  $\text{CF}_3$  à 7 T). Le PFOB apparaît donc plus compliqué à imager que son homologue PFCE du fait des problèmes potentiels d'artefacts de déplacement chimique. A cela s'ajoutent des couplages

entre certaines résonances, pouvant causer des pertes de signal dont nous reparlerons [Sotak 1993].

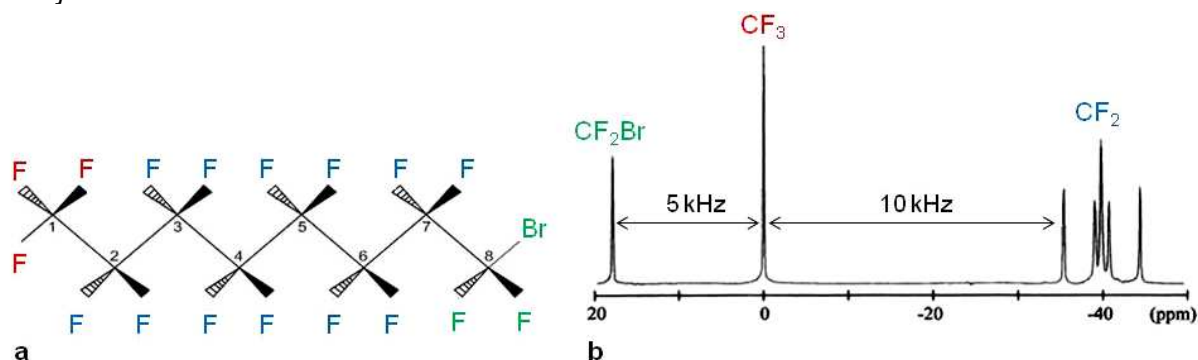


Figure II.5. Représentation de Cram de la molécule de PFOB (a) et spectre  $^{19}\text{F}$  correspondant (b). Les couleurs indiquent la correspondance entre les groupements chimiques et les résonances, les valeurs de déplacement chimique en fréquence sont indiquées pour un champ magnétique de 7 T.

Choisir un PFC facile à imager comme le PFCE peut donc apparaître dans ces conditions comme la décision la plus commode. Nous avons cependant choisi de privilégier le caractère biocompatible du PFOB, le PFCE n'ayant pour le moment passé aucun test clinique attestant de son innocuité chez l'homme.

### II.3.2. Imagerie d'émulsions de PFOB non fonctionnalisées

Le PFOB a été utilisé en premier lieu comme agent de contraste ultrasonore et pour la tomographie à rayons X [Mattrey 1989]. Le PFOB, comme les autres PFC, présente en effet une forte échogénicité du fait de sa masse volumique élevée (1,9 g/mL), qui fournit une impédance acoustique supérieure de 30% à celle des tissus mous. Une émulsion de PFOB permet donc l'obtention d'un signal ultrasonore augmenté dans le foie et la rate où elle s'accumule, mais également dans le réseau vasculaire, améliorant la qualité des images Doppler.

En tomographie à rayons X, le PFOB présente l'avantage de comporter un atome de brome qui le rend radio-opaque. A l'inverse de l'ultrasonographie, il opacifie particulièrement le foie et la rate, ainsi que le réseau vasculaire [Mattrey 1984, Harned 1995]. Par ailleurs, il permet de mettre en évidence, quelques jours après injection, la présence de tumeurs chez le lapin [Young 1981, Mattrey 1982]. L'atténuation est en partie due à l'inflammation locale, impliquant la présence de macrophages en périphérie de la tumeur qui absorbent les nanoparticules.

Concernant l'IRM du  $^{19}\text{F}$ , les applications du PFOB sont semblables à celles des PFC. Le PFOB a été le premier PFC utilisé pour imager le système réticulo-endothélial par IRM, via une séquence d'écho de spin [Ratner 1987]. Il est particulièrement apprécié pour l'oxymétrie du fait de sa sensibilité accrue à la pression partielle d'oxygène, mais également parce qu'il est relativement insensible à la température [Shukla 1995]. Des mesures de  $\text{pO}_2$

avec l'émulsion Oxygent ont été réalisées dans le foie et la rate de souris à 4,7 T au moyen d'une séquence IR-EPI n'excitant que le pic du  $\text{CF}_3$  [Barker 1994], ainsi que dans le sang de rat à 4,7 T avec une séquence de spectroscopie CPMG précédée d'un module OSIRIS pour la localisation [Girard 1994]. Par ailleurs, Shukla et al. ont saturé le sang de rats d'une émulsion PFOB, ce qui a permis *ex vivo* et par une séquence de spectroscopie de mesurer la  $\text{pO}_2$  dans le tissu myocardique soumis à une perfusion normale et en situation d'ischémie [Shukla 1996].

### II.3.3. Imagerie d'émulsions de PFOB ciblées pour l' $\alpha_v\beta_3$

Il existe à ce jour peu de publications faisant état de la détection d' $\alpha_v\beta_3$  par le biais de nanoparticules de PFOB fonctionnalisées. Toutefois, des communications au congrès de l'ISMRM ont récemment présenté des premiers résultats *in vivo* chez l'animal. Keupp et al. ont ainsi utilisé des nanoparticules de PFOB fonctionnalisées à 3 T afin de mettre en évidence des carcinomes dans la patte de lapin, via une séquence d'écho de gradient n'excitant que les résonances  $\text{CF}_2$  du spectre du PFOB [Keupp 2010a]. Par ailleurs, la même équipe a testé pour la même situation une séquence d'écho de gradient utilisant des impulsions multi-bandes type Hadamard, permettant d'exciter simultanément les différentes résonances qui sont ensuite combinées pour obtenir l'image finale [Keupp 2010b]. Un troisième protocole a été cette fois testé avec des nanoparticules de PFOB fonctionnalisées, porteuses ou non de chélates de gadolinium, pour une détection en  $^1\text{H}$  et en  $^{19}\text{F}$ . L'étude suggère que l'imagerie  $^{19}\text{F}$ , réalisée cette fois avec une séquence UTE-SSFP (Ultra short Echo Time Steady State Free Precession) sur les  $\text{CF}_2$ , se suffit à elle-même pour détecter l'angiogenèse [Keupp 2011].

Comme dans le cas des PFC, les nanoparticules de PFOB fonctionnalisées peuvent servir dans d'autres contextes que celui des tumeurs. Yildirim et al. ont par exemple cherché à mettre en évidence à 3 T la présence d'angiogenèse pendant les cycles menstruels de la souris, via les  $\text{CF}_2$  et par la séquence d'imagerie spectroscopique F-uTSI évoquée au paragraphe II.3.2.3 [Yildirim 2010].

## II.4. CONCLUSION

Le fluor a été désigné dans le projet Iseult comme une modalité susceptible de permettre la détection de l'angiogenèse tumorale. Un certain nombre d'études aujourd'hui font état de la mise en évidence d' $\alpha_v\beta_3$  grâce à des nanoparticules fonctionnalisées à base de PFC. Toutefois, notons que dans la littérature présentée, aucune étude ne s'est penchée sur la détection de l'angiogenèse tumorale dans le cerveau. Si cette dernière n'est *a priori* pas différente de l'angiogenèse dans les autres organes, les protocoles peuvent être plus compliqués à mettre en œuvre (induction du modèle animal ou présence de la BHE par exemple). Nos travaux sur le modèle souris U87 (glioblastome) seront présentés au chapitre V.

Avant de passer à proprement parler à la détection de l'angiogenèse tumorale, une étape cruciale est la mise en place d'une stratégie de détection des nanoparticules



fonctionnalisées. Leur ingrédient de base, le PFOB, a été choisi pour son caractère biocompatible avéré. Toutefois, nous avons souligné les difficultés qui émanent de ce choix, du fait de son spectre complexe et de l'existence de couplages. Les méthodes pour imager le PFOB sont d'ailleurs nombreuses, allant de l'écho de gradient à l'imagerie spectroscopique, et n'utilisent pas les mêmes résonances pour obtenir un signal. Compte-tenu des faibles concentrations en agent de contraste auquel il nous faudra faire face *in vivo*, en particulier lorsqu'il s'agira d'imager des marqueurs moléculaires de l'angiogenèse tumorale, l'implémentation d'une séquence d'imagerie la plus sensible possible est décisive. Ce travail fait l'objet du prochain chapitre.

## **CHAPITRE III**

### **Imagerie du PFOB par IRM du $^{19}\text{F}$ : méthodologie**



Le chapitre précédent a montré que le PFOB présentait des intérêts pour l'IRM du  $^{19}\text{F}$ . Toutefois, nous rencontrerons inmanquablement des difficultés lorsqu'il s'agira de l'imager *in vivo*, d'abord du fait des basses concentrations locales. Par ailleurs, choisir une séquence d'imagerie adaptée n'est pas simple du fait des nombreuses résonances de la molécule et des couplages pouvant les lier : la diversité des protocoles utilisés dans les différentes études en témoigne. Nous nous attachons donc dans ce chapitre à explorer les propriétés RMN du PFOB, afin d'en faire ressortir une stratégie d'imagerie offrant la meilleure sensibilité.

### III.1. IMAGERIE DU PFOB : DIFFICULTES ET ENJEUX

#### III.1.1. Suppression de l'artefact de déplacement chimique

Lorsqu'un spectre comporte plusieurs résonances se pose toujours la question de l'artefact de déplacement chimique. On peut éviter l'apparition des répliqués dans la direction de lecture par diverses méthodes. On peut notamment faire le choix de n'imager qu'un seul pic du spectre du PFOB. En nombre de noyaux fluor, il peut paraître plus avantageux d'imager le massif des  $\text{CF}_2$  situé autour de -40 ppm sur la figure II.4.b. Toutefois ces résonances sont étroitement couplées entre elles, elles fournissent donc un signal peu intense. Par ailleurs, elles s'étalent sur près de 3 kHz à 7 T. Afin d'éviter l'apparition de répliqués, la bande passante par pixel devrait donc inclure toutes les résonances, ce qui impliquerait, pour une matrice de 64 pixels dans la direction de lecture, l'utilisation d'une bande passante d'acquisition proche de 200 kHz, résultant en un temps de lecture très court et délétère pour le RSB. Utiliser tous les noyaux fluor serait donc encore plus critique, avec une bande passante d'acquisition supérieur à 1 MHz. Le plus simple consiste à choisir le pic central présentant la plus grande intensité, le  $\text{CF}_3$ . On s'affranchit des autres résonances soit en excitant de façon sélective le  $\text{CF}_3$ , soit en saturant les résonances indésirables, soit en choisissant une bande passante d'acquisition suffisamment étroite pour exclure ces résonances.

Cette méthode implique cependant de n'observer que 3 noyaux fluor sur les 17 que compte la molécule. Il est possible d'éviter ce sacrifice de signal en utilisant une technique comme le CSI (Chemical Shift Imaging). Les séquences CSI consistent à collecter les spectres d'un plan de coupe et ne comportent que des encodages en phase, supprimant par conséquent les répliqués dans la direction de lecture. Néanmoins, cet avantage est à tempérer par des temps d'acquisition longs et une méthode de quantification spectrale entièrement dépendante de l'utilisateur. Mentionnons par ailleurs que s'il y a sélection de coupe, cette méthode requiert des gradients et une bande passante d'acquisition démesurément élevés afin d'éviter un artefact de déplacement chimique dans la direction de coupe entre les résonances les plus éloignées du PFOB, le  $\text{CF}_2\text{Br}$  et les  $\text{CF}_2$  (écartées d'environ 60 ppm). A titre d'exemple, pour obtenir un artefact de déplacement chimique inférieur à 10%, la séquence CSI nécessite à 7 T pour le PFOB une bande passante de 170 kHz pour les impulsions (équation <I-44>), nécessitant un gradient de 840 mT/m pour une coupe de 5 mm.

Dans la suite, nous concentrerons notre intérêt sur l'imagerie du  $\text{CF}_3$  du PFOB.

### III.1.2. Suppression du couplage : théorie

La molécule de PFOB comporte plusieurs couplages entre ses résonances. Ces couplages sont visibles par une expérience COSY, montrant en particulier un couplage J entre le  $\text{CF}_3$  et un des  $\text{CF}_2$  situé à -41 ppm (soit 11,5 kHz à 7 T, cf. Figure III-1) [Shukla 1995]. Les valeurs de ce couplage varie entre 10 et 14 Hz selon les auteurs [Girard 1994, Sotak 1993, Shukla 1995] : il s'agit donc ici d'un couplage faible. En observant de plus près le pic du  $\text{CF}_3$ , on s'apercevra ainsi qu'il ne s'agit pas d'un singulet, mais d'un triplet.

Copyright Shukla 1995

*Figure III.1. Résultat d'une expérience COSY 2D montrant les couplages agissant entre les différentes résonances du PFOB (a) avec un zoom sur le massif des  $\text{CF}_2$  (b). On retiendra en particulier le couplage liant le  $\text{CF}_3$  à 0 ppm et le  $\text{CF}_2$  à -41 ppm, repéré par la lettre  $\xi$  (d'après [Shukla 1995]).*

Comme annoncé au paragraphe I.3, ce couplage va modifier la décroissance du signal. Une étude, celle de Babcock et al., s'est attachée à montrer sur d'autres PFC présentant également des couplages scalaires que cette décroissance n'est plus exponentielle comme le veut traditionnellement l'équation <I-10>, mais présente une perte d'intensité très rapide, ainsi qu'une modulation du signal ponctuée de complètes annulations lorsque le TE est un multiple impair de  $1/2J$ , si J désigne la constante de couplage [Babcock 1991]. Il s'agit en fait de la conséquence directe du couplage évoqué au paragraphe I.3, du fait de l'oscillation de l'opérateur densité entre deux modes de cohérence, dont l'un est non observable.

A première vue, ce phénomène limite fortement l'utilisation de TE longs ou de séquences multi-échos. Cependant, Babcock et al. montrent également que, dans une séquence d'écho de spin, le couplage peut être supprimé par un choix judicieux de la bande passante des impulsions, ne comprenant pas la résonance couplée à la résonance d'intérêt.

Afin d'expliquer comment intervient la suppression du couplage, revenons à l'opérateur densité présenté au paragraphe I.3.3. On souhaite imager les noyaux fluor du groupement  $\text{CF}_3$  du PFOB. Pour cela, plaçons-nous dans la situation d'un système de 2 spins couplés I (appartenant ici au groupement  $\text{CF}_3$ ) et S (appartenant au groupement  $\text{CF}_2$  à -41 ppm). On cherche donc dans le cas présent à observer le spin I. Nous avons montré que, dans le référentiel tournant et après une impulsion sélective de  $90^\circ$  plaçant l'opérateur densité dans l'état de cohérence  $I_x$ , ce dernier oscillait entre 2 modes de cohérence  $I_x$  et  $2I_yS_z$  à la fréquence  $J/2$  (équation <I-34> et figure III.2) :

$$\rho(t) = \cos(\pi Jt)I_x + \sin(\pi Jt)2I_yS_z$$

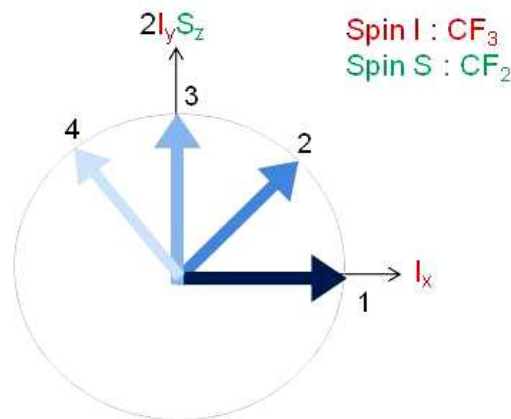


Figure III.2. Oscillation de l'opérateur densité  $\rho$  (flèches bleues) entre les modes de cohérence  $I_x$  et  $2I_yS_z$ . On observe le spin I : après une impulsion de  $90^\circ$ ,  $\rho$  est selon  $I_x$  (1). Sous l'effet du couplage  $J$ ,  $\rho$  évolue au cours du temps jusqu'à être complètement dans le mode non observable  $2I_yS_z$  (2 et 3). Le signal commence à réapparaître lorsque  $\rho$  continue d'évoluer et s'écarte de ce mode (4).

Plaçons-nous dans la situation où une impulsion de  $180^\circ$  sélective (concrètement dont la bande passante n'inclut que le  $\text{CF}_3$ ) selon x survient à l'instant  $t=\tau$ . On a juste avant l'impulsion à  $t=\tau^-$  :

$$\rho(\tau^-) = \cos(\pi J\tau^-)I_x + \sin(\pi J\tau^-)2I_yS_z \quad (\text{III-1})$$

L'impulsion de  $180^\circ$  selon x a pour conséquence de transformer y en  $-y$  pour I mais n'agit pas sur S. On a ainsi juste après l'impulsion :

$$\rho(\tau^+) = \cos(\pi J\tau^+)I_x - \sin(\pi J\tau^+)2I_yS_z \quad (\text{III-2})$$

Le système va ensuite évoluer en partant de l'état précédent pendant une nouvelle durée  $\tau$ . A l'écho, l'expression de l'opérateur densité est (équation <III-3>) :

$$\rho(2\tau) = \cos(\pi J\tau) \left[ \cos(\pi J\tau) I_x - \sin(\pi J\tau) 2I_y S_z \right] - \sin(\pi J\tau) \left[ \cos(\pi J\tau) 2I_y S_z - \sin(\pi J\tau) I_x \right]$$

Quelques simplifications et formules de trigonométrie plus loin, au temps  $t=2\tau$ , c'est-à-dire à l'écho, on a :

$$\rho(2\tau) = I_x \quad (\text{III-4})$$

Les effets du couplage sont donc supprimés à l'écho, et l'opérateur densité est revenu à son état initial  $I_x$ .

A l'inverse, si l'impulsion de  $180^\circ$  n'est pas sélective (bande passante incluant le  $\text{CF}_3$  et le  $\text{CF}_2$  à  $-41$  ppm), la conséquence est de transformer  $y$  en  $-y$  pour I et pour S, et l'expression juste après l'impulsion est :

$$\rho(\tau^+) = \cos(\pi J\tau^+) I_x + \sin(\pi J\tau^+) 2I_y S_z \quad (\text{III-5})$$

L'impulsion de  $180^\circ$  n'a donc pas d'effet sur l'opérateur densité ! On en déduit aisément son expression à l'écho :

$$\rho(2\tau) = \cos(2\pi J\tau) I_x + \sin(2\pi J\tau) 2I_y S_z \quad (\text{III-6})$$

Le couplage n'est pas supprimé à l'écho, et on observe toujours une oscillation de l'opérateur densité entre les modes de cohérence  $I_x$  et  $2I_y S_z$ . Plus généralement, on retrouve ici le résultat de Babcock et al. : le signal présente une J-modulation, et s'annule lors du passage par le mode antiphase  $2I_y S_z$ , c'est-à-dire lorsque le TE est un multiple impair de  $1/2J$ .

On mesure ici l'importance de choisir soigneusement la bande passante des impulsions de  $180^\circ$ . Supprimer le couplage à l'écho est un énorme avantage puisque l'on s'affranchit d'une décroissance rapide et de la modulation délétère du signal : il est possible dans ce cas de tirer profit de la persistance du signal pour adopter une stratégie multi-échos. Toutefois, ceci n'a d'intérêt que pour des composés présentant des  $T_2$  relativement longs.

En ce qui concerne le PFOB, il est difficile de savoir si cette méthode serait appropriée dans la mesure où la littérature ne s'accorde pas sur la valeur du  $T_2$  du  $\text{CF}_3$ . En se plaçant à la pression atmosphérique, les valeurs données couvrent un éventail beaucoup plus large que ce que permettent les variations du champ magnétique utilisé d'une étude à l'autre. Ainsi, Özdemirel et al. annonce un  $T_2$  de 435 ms à 1,5 T, sans précision sur la façon dont la mesure a été effectuée [Özdemirel 1992]. Certaines études utilisent des impulsions sélectives et un fit suivant un modèle exponentiel standard : c'est le cas de Girard et al., donnant une valeur de 1540 ms à 4,7 T [Girard 1994], ou de Pisani et al., donnant une valeur de 320 ms à 9,4 T [Pisani 2008]. D'autres études utilisent des impulsions non sélectives, et en conséquence un fit sur un modèle incluant une fonction cosinus pour tenir compte de la J-modulation : par

exemple, Sotak et al. annoncent un  $T_2$  de 147 ms à 1,5 T [Sotak 1993] et pour Girard et al, on trouve 490 ms à 4,7 T [Girard 1994].

Ces divergences sont le résultat probable d'une méconnaissance ou d'une prise en compte inappropriée des couplages agissant au sein de la molécule, et révèlent un réel besoin d'explorer les propriétés RMN du PFOB. C'est ce à quoi nous nous sommes attachés dans la suite, afin de pouvoir choisir une stratégie d'acquisition adaptée. Nous nous sommes penchés plus particulièrement sur la faisabilité d'une séquence multi échos de spin avec suppression du couplage J.

## III.2. EXPLORATION DES PROPRIETES RMN DU PFOB

### III.2.1. Mise en œuvre expérimentale

#### III.2.1.1. Matériel

Les produits à l'étude dans ce qui suit sont respectivement le PFOB sous sa forme pure (Fluorochem, Derbyshire, UK), ainsi que des nanocapsules de PFOB fournies par la faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry (Figure III.3). Ces dernières sont composées d'un cœur de PFOB, encapsulé dans une coque faite d'un polymère biocompatible et biodégradable, le PLGA (Poly Lactic-co-Glycolic Acid). Elles sont à usage potentiel comme agent de contraste en ultrasonographie et en IRM du  $^{19}\text{F}$  [Pisani 2008]. Leur synthèse est détaillée dans la littérature [Pisani et al. 2006]. Selon les auteurs, l'encapsulation du PFOB ne modifie pas ses propriétés de relaxation. Ces nanoparticules sont diluées à 20 mg/mL dans une matrice d'agarose pour éviter la sédimentation lors des acquisitions. Les deux fantômes sont saturés d'air à la pression atmosphérique. L'antenne utilisée est l'antenne tête de diamètre interne 2,6 cm présentée dans le préambule.

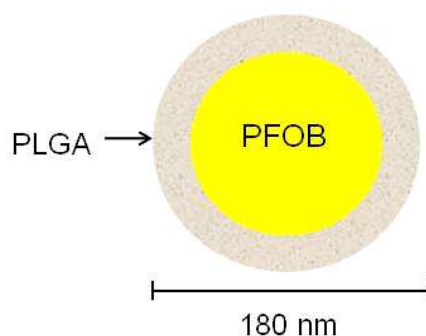


Figure III.3. Schéma d'une nanocapsule de PFOB.

#### III.2.1.2. Protocoles

On s'intéresse en premier lieu aux effets de la J-modulation sur la décroissance du signal du  $\text{CF}_3$ , ainsi qu'à la manière de s'en affranchir. Pour cela, des spectres sont acquis via



une séquence écho de spin sur le fantôme de PFOB pur. La valeur du TE varie de 4 à 128 ms par incrément de 4 ms. L'excitation est effectuée par une impulsion de  $90^\circ$  type sinus cardinal non sélective, l'impulsion de refocalisation est également un sinus cardinal centré sur le  $\text{CF}_3$ , dont la bande passante est fixée à 26 kHz, 12,5 kHz, et 3 kHz en dernier lieu. Ces bandes passantes ont été choisies pour inclure respectivement toutes les résonances du spectre du PFOB, le  $\text{CF}_3$  et le  $\text{CF}_2\text{Br}$ , et seulement le  $\text{CF}_3$ .

En second lieu, on cherche à mesurer les temps de relaxation du  $\text{CF}_3$  dans le cas du PFOB pur, ainsi que dans le cas des nanocapsules. Le  $T_1$  est évalué à l'aide d'une séquence de spectroscopie comportant une impulsion carrée de  $90^\circ$  non sélective, avec un TR variable de manière à créer différentes saturations. Le signal est moyenné sur 64 acquisitions, avec 5 dummy scans préalables le temps que l'aimantation se stabilise. L'estimation du  $T_1$  est faite en mesurant la hauteur du pic du  $\text{CF}_3$  pour chaque saturation, et en ajustant ces données dans Matlab par la méthode des moindres carrés, sur le modèle de repousse :

$$M_{xy} = M_{eq} \frac{1 - e^{-\frac{TR}{T_1}}}{1 - \cos\theta e^{-\frac{TR}{T_1}}} \sin\theta \quad (\text{III-6})$$

Où  $M_{eq}$  désigne l'aimantation longitudinale atteinte à l'état stationnaire (c'est-à-dire après les dummy scans) et  $\theta$  désigne l'angle de bascule pour lequel le meilleur fit est obtenu ( $\theta \sim 90^\circ$ ).

Le  $T_2$  est évalué via une séquence multi échos de spin (MES) type CPMG, comportant des impulsions hermitiennes de bande passante 3 kHz pour assurer une refocalisation sélective du  $\text{CF}_3$ . La bande passante d'acquisition est choisie égale à 5 kHz pour exclure le  $\text{CF}_2\text{Br}$  et les  $\text{CF}_2$ . Pour le PFOB pur, les paramètres d'imagerie sont une matrice de  $64 \times 64$  pixels couvrant un champ de vue de  $25,6 \times 25,6 \text{ mm}^2$ , avec une épaisseur de coupe de 1 mm. Ces paramètres permettent de choisir un TE minimum de 15,5 ms. Pour les nanocapsules, une matrice de  $32 \times 32$  pixels couvrant un champ de vue de  $32 \times 32 \text{ mm}^2$  est choisie, avec une épaisseur de coupe de 8 mm. Ces paramètres donnent un TE minimum de 10,5 ms.

Afin de tester une influence du TE sur le  $T_2$  du  $\text{CF}_3$ , dix TE différents allant de 15,5 ms à 240 ms sont expérimentés pour le PFOB pur, et huit TE allant de 10,5 à 160 ms sont expérimentés pour les nanocapsules. Le TR est fixé à 4000 ms pour toutes les acquisitions. Pour chaque écho, une image de la coupe est reconstruite, et le signal est mesuré dans l'objet d'intérêt. Les impulsions de  $180^\circ$  étant sélectives, on suppose le couplage J supprimé. Dans ce cas, le modèle de décroissance exponentielle classique est valide, et le signal de la coupe au  $n^{\text{ième}}$  écho est proportionnel à  $\exp(-\frac{n.TE}{T_2})$ . Les données sont ajustées sur ce modèle par la méthode des moindres carrés pour en dériver le  $T_2$ . Les mesures sont effectuées à température ambiante ( $20^\circ\text{C}$ ) ainsi qu'à  $37^\circ\text{C}$  via une circulation d'eau chaude pour se placer dans des conditions physiologiques.

### III.2.2. Résultats

#### III.2.2.1. Effet de la J-modulation sur le signal du $\text{CF}_3$

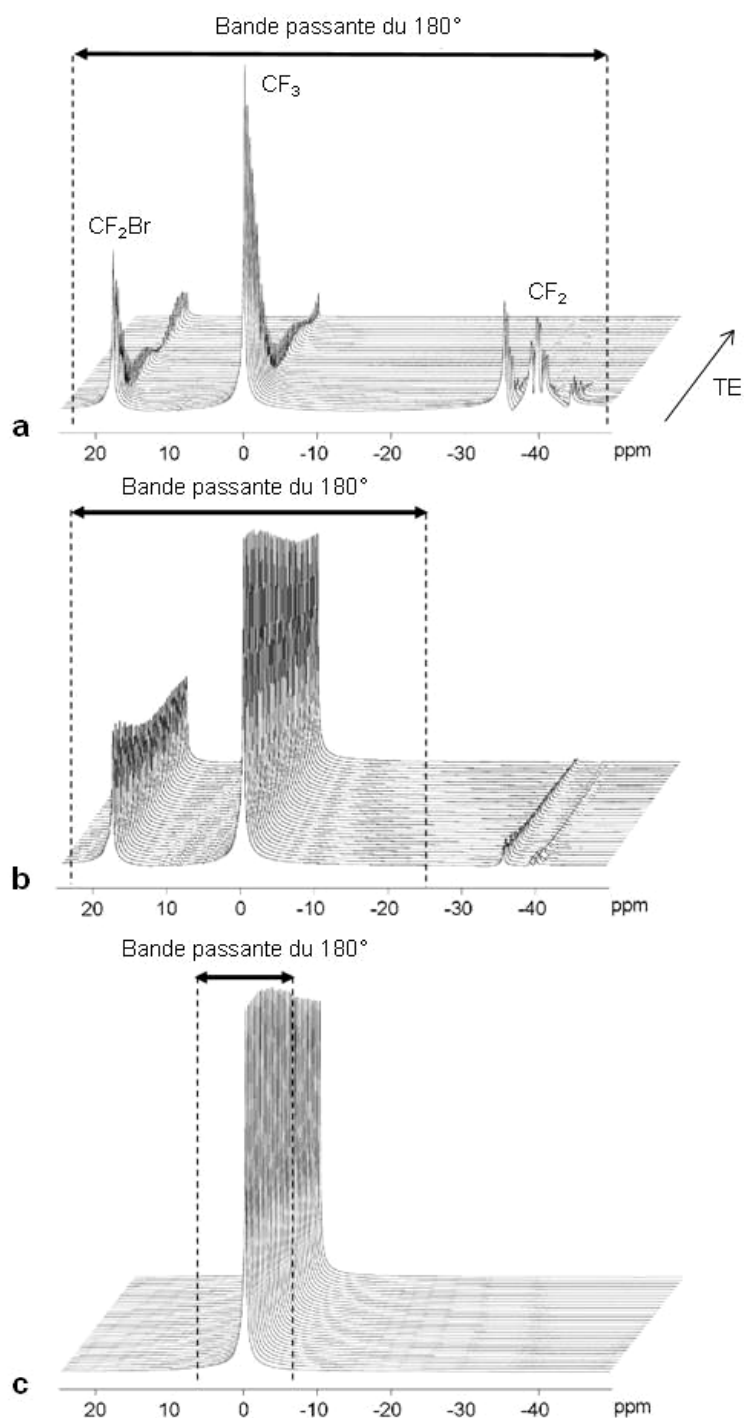


Figure III.4. Spectres successifs acquis avec une séquence d'échos de spin, où TE varie de 4 à 128 ms par incrément de 4 ms. La bande passante de l'impulsion de 180° détermine la décroissance du signal du  $\text{CF}_3$ , très rapide et montrant une J-modulation lorsque toutes les résonances y sont comprises (a). Le signal est nettement persistant lorsque les  $\text{CF}_2$  en sont exclus (b et c).

Les spectres acquis en faisant varier le TE et la bande passante des  $180^\circ$  sont représentés sur la figure III.4. On constate immédiatement une perte drastique de signal lorsque la bande passante inclut toutes les résonances du spectre, avec la décroissance très rapide et l'ondulation du signal, caractéristique de la J-modulation (Figure III.4.a). Ces effets peuvent être évités en choisissant une bande passante excluant les  $\text{CF}_2$  (Figure III.4.b et .c). Dans ce cas, le signal du  $\text{CF}_3$  montre une persistance intéressante, et reste élevé même pour un TE de 128 ms (réduction du signal de  $\sim 30\%$  seulement).

### III.2.2.2. Mesure des temps de relaxation du $\text{CF}_3$

Les résultats des fits sont très satisfaisants pour la mesure du  $T_1$  ( $\theta$  donné par le fit supérieur à  $85^\circ$ ). Les valeurs trouvées sont indiquées dans le Tableau III.1. On observe peu de différence entre le PFOB et les nanocapsules, bien que le  $T_1$  soit plus élevé pour les nanocapsules quelle que soit la température. L'augmentation de cette dernière induit un  $T_1$  plus long dans les deux cas. A  $20^\circ\text{C}$ , on trouve un résultat pour les nanocapsules proche de celui donné par Pisani et al. [Pisani 2008].

	20°C			37°C		
	$T_1$ (ms)	TE (ms)	$T_2$ (ms)	$T_1$ (ms)	TE (ms)	$T_2$ (ms)
PFOB pur	$1254 \pm 25$	15,5	$930 \pm 6$	$1656 \pm 40$	15,5	$1015 \pm 13$
		20	$880 \pm 5$		20	$965 \pm 11$
		40	$715 \pm 4$		40	$795 \pm 13$
		60	$600 \pm 5$		60	$685 \pm 14$
		80	$500 \pm 6$		80	$595 \pm 11$
		100	$460 \pm 5$		100	$535 \pm 11$
		120	$435 \pm 6$		120	$505 \pm 9$
		160	$436 \pm 6$		160	$500 \pm 17$
		200	$455 \pm 5$		200	$515 \pm 15$
		240	$430 \pm 13$		240	$490 \pm 27$
Nanocapsules de PFOB	$1305 \pm 27$	10,5	$775 \pm 31$	$1955 \pm 75$	10,5	$945 \pm 48$
		20	$695 \pm 33$		20	$845 \pm 39$
		40	$575 \pm 39$		40	$680 \pm 44$
		60	$470 \pm 34$		60	$585 \pm 45$
		80	$420 \pm 31$		80	$495 \pm 44$
		100	$400 \pm 36$		100	$465 \pm 39$
		120	$370 \pm 39$		120	$445 \pm 54$
		160	$395 \pm 54$		160	$475 \pm 69$

Tableau III.1. Temps de relaxation mesurés pour le PFOB pur et les nanoparticules à 20 et  $37^\circ\text{C}$ . L'écart-type du  $T_1$  a été calculé par une simulation de Monte-Carlo. La moyenne et l'écart-type des  $T_2$  ont été calculés sur les pixels de l'objet. Le nombre d'échos était respectivement 60, 60, 30, 20, 15, 12, 10, 8, 8 et 8 pour les TE de 15,5 (10,5), 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200 et 240 ms (voir figure suivante).

Les résultats obtenus pour la mesure du  $T_2$  sont également indiqués dans le Tableau III.1. Comme dans le cas du  $T_1$ , on observe des valeurs proches entre le PFOB pur et les nanocapsules, le  $T_2$  des nanocapsules étant toutefois légèrement inférieur. Par ailleurs, comme pour le  $T_1$ , l'augmentation de la température induit des  $T_2$  plus longs.

Passées ces premières constatations, on remarque la principale caractéristique de ces résultats : le  $T_2$  varie avec le TE. Ainsi, pour des TE courts et à  $37^\circ\text{C}$ , le  $T_2$  atteint une seconde. Il diminue progressivement avec l'augmentation du TE jusqu'à se stabiliser autour de la moitié de la valeur maximale ( $\text{TE} > 120$  ms). La figure III.5 illustre cette dépendance. Nous essaierons de comprendre dans la suite l'origine de la dépendance du  $T_2$  au TE.

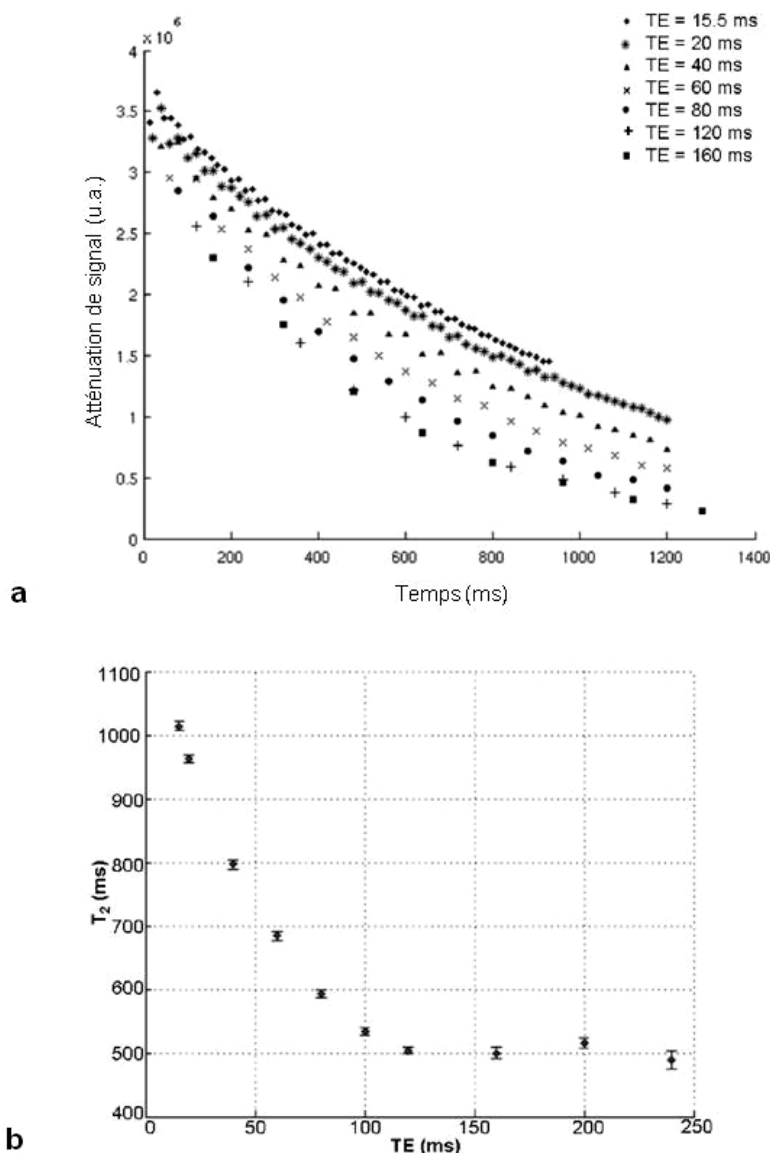


Figure III.5. (a) Décroissance du signal du  $\text{CF}_3$  à  $37^\circ\text{C}$  dans le plan transverse (PFOB pur) en fonction du temps pour les différents TE (les courbes à  $\text{TE} = 200$  et  $240$  ms ne sont pas représentées pour une meilleure lisibilité de la figure). Chaque point correspond au signal acquis à l'écho. On constate la décroissance plus rapide du signal à mesure que le TE augmente. La figure (b) reprend les données de la figure (a) pour traduire la dépendance du  $T_2$  au TE.

### III.2.3. Discussion

#### III.2.3.1. Sur le choix de la bande passante des $180^\circ$

Il est maintenant établi que le couplage J conduit à une réduction substantielle du signal du  $\text{CF}_3$  si dans une séquence d'écho de spin les impulsions de  $180^\circ$  ne sont pas sélectives et inversent également les  $\text{CF}_2$ . Sachant que le signal s'annule lorsque le TE est un multiple impair de  $1/2J$ , nous avons pu évaluer à environ 10 Hz la valeur du couplage liant le  $\text{CF}_3$  au  $\text{CF}_2$  situé à -41 ppm (Figure III.4.a). Cette valeur rejoint celles que nous avons trouvées dans la littérature (paragraphe III.1.2).

En conclusion, il est donc important dans la suite de choisir une bande passante pour les  $180^\circ$  excluant les  $\text{CF}_2$ . Dans notre cas, les séquences comportent des gradients de sélection de coupe : en se supposant centré sur la fréquence du  $\text{CF}_3$ , cela implique de choisir une bande passante inférieure à la différence de fréquence entre le  $\text{CF}_3$  et le  $\text{CF}_2$  couplé, soit inférieure à 11,5 kHz (en effet, les résonances sont étalées sur toute la largeur de la bande passante lorsqu'un gradient de sélection de coupe est appliqué).

#### III.2.3.2. Sur l'origine physique de l'augmentation du $T_2$ à TE court

Les TE courts sont en général favorables dans les séquences MES : ils limitent les pertes de signal dues à la diffusion des molécules dans le champ magnétique ou dues aux échanges chimiques. Toutefois, il serait hâtif de conclure que la réduction de ces effets est responsable de l'augmentation du  $T_2$  dans le cas du PFOB. En effet, la diffusion du PFOB est lente, en particulier lorsqu'il est contenu dans des nanocapsules elles-mêmes emprisonnées dans un gel d'agarose. Le PFOB ne peut *a priori* pas diffuser davantage que le diamètre de la nanocapsule (180 nm), ce qui exclut toute perte de signal par ce phénomène. Par ailleurs, l'hypothèse de la réduction des échanges chimiques est également exclue : les liaisons covalentes entre les atomes de carbone et de fluor sont effectivement connues pour leur stabilité, et rendent improbables les échanges chimiques entre les atomes de fluor.

Une origine possible de l'augmentation du  $T_2$  réside dans le phénomène de spin-locking pendant un train d'impulsions CPMG. Il consiste à maintenir l'aimantation le long de l'axe sur lequel l'impulsion de  $180^\circ$  est appliquée, et dans notre cas lorsque le TE décroît, il pourrait rapprocher le  $T_2$  du temps de relaxation spin réseau dans le repère tournant, appelé  $T_{1\rho}$ . Afin de tester la présence d'un éventuel spin-locking, des mesures de  $T_2$  ont été réalisées avec la séquence MES présentée dans les protocoles (paragraphe III.2.1.2), la seule différence étant que le train CPMG a été modifié pour devenir un train CPFH (Carr-Purcell-Freeman-Hill), où les  $180^\circ$  sont appliquées alternativement selon y et -y. Cette séquence permet d'éviter le spin-locking [Santyr 1988]. Toutefois, aucune différence n'a été constatée : les  $T_2$  étant semblables à ceux trouvés précédemment aux différents TE, l'hypothèse du spin-locking a été exclue.

Nous fournissons ici l'explication que les variations du  $T_2$  sont dues à un mécanisme d'origine quantique. Revenons une nouvelle fois à notre opérateur densité  $\rho$  oscillant entre les

modes de cohérence  $I_x$  et  $2I_yS_z$  (équation <I-34>). Chacun de ces modes a sa propre relaxivité  $R_2 = \frac{1}{T_2}$ , que nous nommerons dans la suite  $R_2(I_x)$  et  $R_2(2I_yS_z)$ . Quand l'oscillation entre ces modes est libre, c'est-à-dire en l'absence d'écho ou d'impulsion de  $180^\circ$  sélective, ou quand le TE est long comparé à  $1/2J$  (noté  $TE^{++}$ ),  $\rho$  passe autant de temps dans chaque mode. Dans ce cas, la relaxivité apparente est la moyenne arithmétique des relaxivités de chacun des modes :

$$R_2(TE^{++}) = \frac{1}{2} (R_2(I_x) + R_2(2I_yS_z)) \quad (\text{III-7})$$

A l'inverse, lorsqu'une impulsion de  $180^\circ$  inverse sélectivement le spin I et que le TE est court, en particulier  $TE \ll 1/2J$ ,  $\rho$  s'éloigne peu de l'état de cohérence  $I_x$  (la projection de  $\rho$  sur  $2I_yS_z$  est inférieure ou égale à  $\sin(\pi J \frac{TE}{2})$ ). Lorsque le TE est très court (noté  $TE^{-}$ ), on peut alors approximer la relaxivité apparente par la relaxivité de  $I_x$  :

$$R_2(TE^{-}) = R_2(I_x) \quad (\text{III-8})$$

A TE long, nous avons mesuré pour le PFOB pur un  $T_2$  de l'ordre de 500 ms, ce qui implique  $R_2(TE^{++}) = 2$  Hz. Nous ne disposons pas de la valeur de  $R_2(I_x)$ , mais cette dernière peut être estimée en fonction des résultats de relaxation obtenus : une valeur raisonnable est comprise entre le  $T_2$  mesuré le plus long (1015 ms) et le  $T_1$  (1650 ms). Par conséquent, on a  $0,6 \text{ Hz} < R_2(I_x) < 1 \text{ Hz}$ , et dans ce cas, la valeur théorique du  $T_2$  du mode de cohérence  $2I_yS_z$  est tirée de l'équation <III-7> :  $280 \text{ ms} < T_2(2I_yS_z) < 330 \text{ ms}$ .

Nous avons voulu confirmer cette estimation en mesurant directement  $T_2(2I_yS_z)$ . Cet état est non observable, mais une solution pour y avoir accès consiste à rajouter dans la séquence MES un délai  $1/2J = 50$  ms avant le train d'échos, et le même délai avant la dernière impulsion de  $180^\circ$ . On permet ainsi à l'opérateur  $\rho$  d'évoluer complètement dans le mode  $2I_yS_z$  grâce au délai de 50 ms, puis de le garder « bloqué » autour de ce mode pendant le train CPMG. Le second délai de 50 ms permet un retour au mode observable  $I_x$ , et donc de récupérer un signal seulement sur le dernier écho. L'expérience est donc menée avec  $TE = 15,5$  ms et 6 nombres d'échos différents : 3, 9, 15, 23, 33 et 45. Nous disposons donc de 6 points définissant la décroissance de  $2I_yS_z$ , et comme précédemment ces données sont ajustées sur le modèle de décroissance exponentielle classique (cf. Figure III.6.a). Nous obtenons alors  $T_2(2I_yS_z) = 299 \pm 17$  ms. Ce résultat est cohérent avec l'intervalle prédit plus haut et confirme notre hypothèse sur l'origine du phénomène : un TE court permet de rester proche du mode de cohérence « long »  $I_x$ , tandis qu'un TE plus long implique une évolution moyenne entre le mode « long »  $I_x$  et le mode « court »  $2I_yS_z$  (cf. Figure III.6.b). La différence de relaxivité entre ces deux modes est attribuable au fait que, lorsque des mécanismes autres que l'interaction dipôle-dipôle entre I et S contribuent à la relaxation (par exemple l'anisotropie de

déplacement chimique dans le cas du PFOB), les mécanismes de relaxation s'ajoutent, d'où une relaxivité supérieure pour le mode  $2I_yS_z$ .

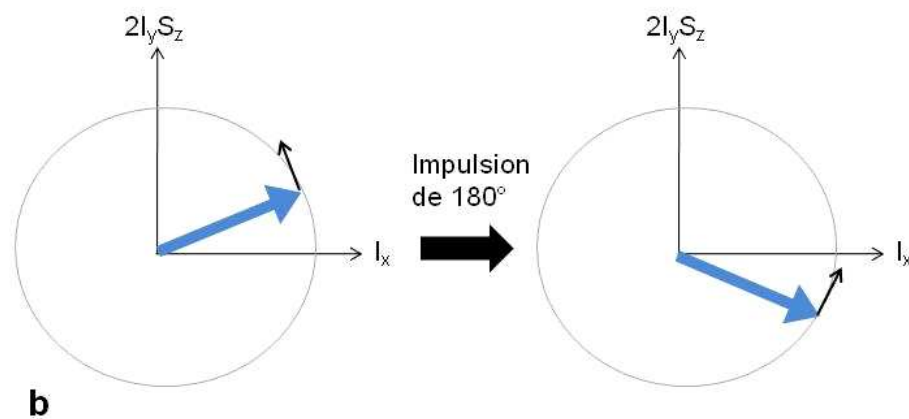
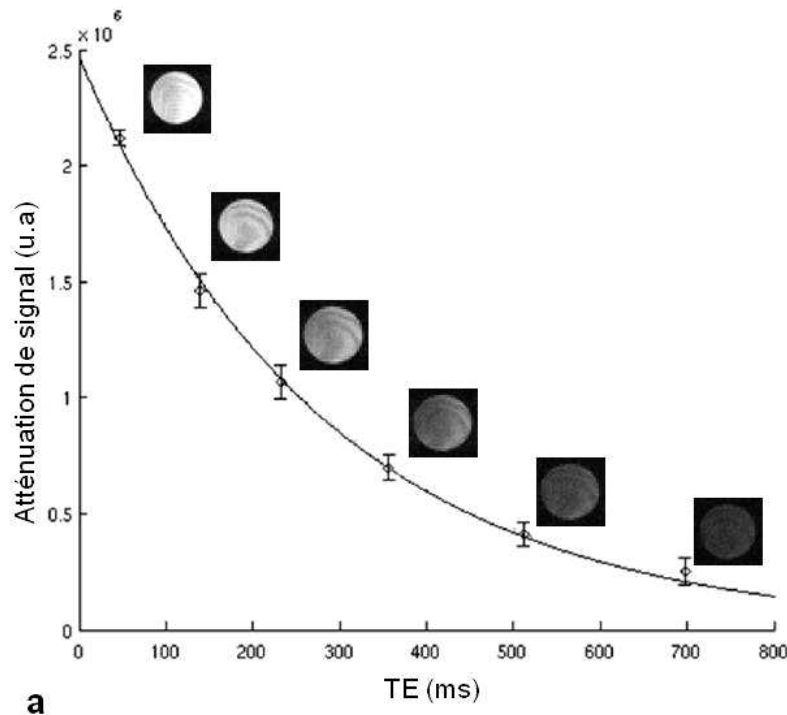


Figure III.6. (a) Atténuation de signal en fonction du délai inter-impulsion  $TE$ , à  $37^\circ\text{C}$  pour le PFOB pur lorsque le système de spin évolue autour de la cohérence  $2I_yS_z$ . Les données expérimentales sont données par les cercles vides (les images obtenues figurent au dessus de chaque point), les barres d'erreur représentent les écarts-types calculés sur les pixels de l'objet, la courbe correspond au meilleur fit basé sur le modèle de décroissance exponentielle classique en  $\exp(-\frac{n.TE}{T_2})$ . (b) Evolution de l'opérateur densité (représenté par la flèche

bleue), oscillant entre les cohérences  $I_x$  et  $2I_yS_z$ . Dans le cas d'un  $TE$  court, l'opérateur densité s'écarte peu de la cohérence  $I_x$ . Au temps  $\tau=TE/2$ , l'impulsion de  $180^\circ$  inverse les spins : ces derniers restent « bloqués » autour de la cohérence  $I_x$ , ayant la relaxivité la plus faible.

Grâce aux résultats évoqués, nous disposons à présent d'informations cruciales pour paramétrer une séquence MES adaptée à l'imagerie du PFOB. En choisissant soigneusement une bande passante sélective pour les impulsions de  $180^\circ$  ainsi qu'un TE court, nous avons pu mesurer un  $T_2$  dépassant la seconde pour le  $\text{CF}_3$ . Cette particularité est bien entendu une aubaine pour faire de l'imagerie MES, et nous nous employons à l'exploiter dans la partie suivante.

### **III.3. IMAGERIE DU PFOB : EVALUATION DE LA SEQUENCE MES**

#### **III.3.1. Simulations numériques**

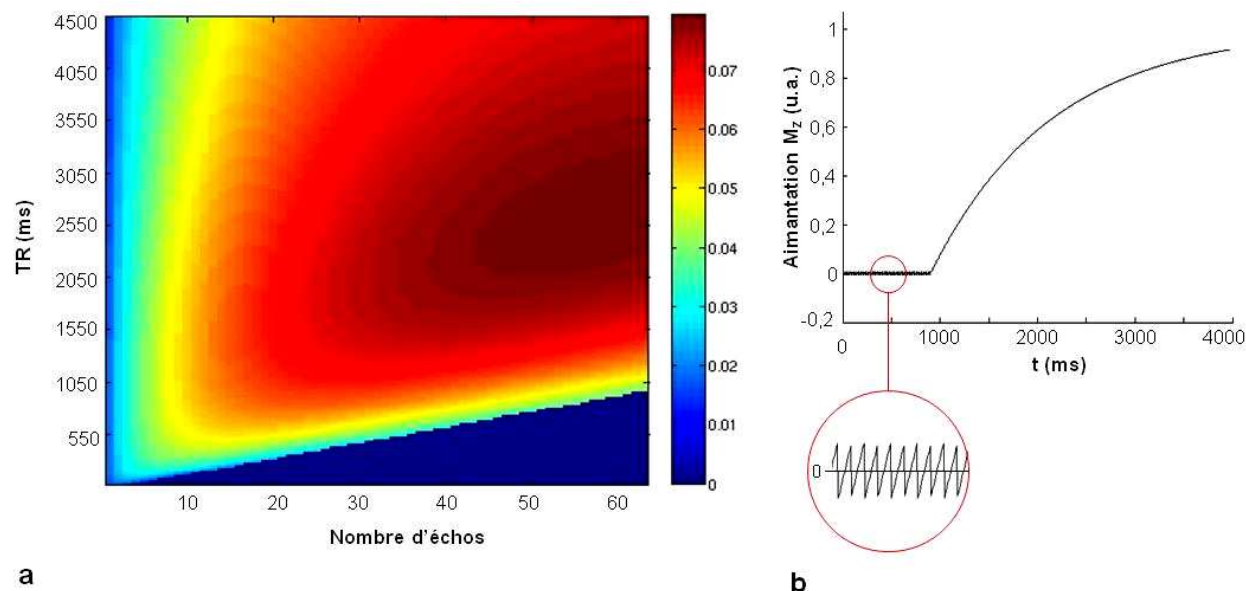
Nous avons indiqué au chapitre I qu'il était généralement favorable de travailler à TR court pour obtenir le RSB le plus élevé. Toutefois, nous souhaitons ici exploiter le très long  $T_2$  du PFOB dans une séquence MES. Afin d'éviter un tâtonnement sur le paramétrage de cette séquence, des simulations ont été faites pour indiquer la combinaison du nombre d'échos  $n_e$  et du TR à choisir pour maximiser le RSB. Ces simulations ont été faites sous Matlab via un programme principal calculant une sensibilité normalisée par la racine carrée du TR sur un grand nombre de combinaison  $n_e/\text{TR}$ ,  $n_e$  étant compris entre 1 et 63 (nombre maximal d'échos permis par la machine) et TR étant compris entre 50 et 4500 ms (incrément 25 ms). Cette sensibilité est calculée comme la somme des signaux dans le plan transverse à chaque écho. Le programme principal fait appel à des programmes annexes permettant de calculer l'évolution des aimantations longitudinale et transverse en fonction des impulsions intervenant dans la séquence, d'évaluer l'aimantation longitudinale à l'état stationnaire, et d'en tirer l'angle de bascule optimal pour obtenir l'aimantation la plus importante dans le plan transverse.

Le TE est choisi le plus court possible, soit 15,5 ms (cf. partie III.2.1.2). Pour la simulation, le  $T_1$  et le  $T_2$  sont indiqués égal à 1250 et 930 ms respectivement, conformément aux résultats du paragraphe III.2.2.2. La sensibilité normalisée optimale est obtenue pour un nombre d'échos de 59 et un TR de 2675 ms, pour un angle de bascule optimal de  $92^\circ$ . La figure III.7.a illustre les résultats pour les différentes combinaisons, et indique que le maximum de signal est obtenu pour un grand nombre d'échos et pour un TR légèrement supérieur à la médiane des valeurs testées. A l'inverse, des approches à TR court donnent un faible signal.

Nous avons choisi de modifier légèrement les paramètres optimaux donnés par la simulation. En effet, ces paramètres laissent un délai mort de 1760 ms après le train d'échos (de durée 914,5 ms si on choisit 59 échos séparés de 15,5 ms), permettant l'acquisition d'une seule coupe supplémentaire. Nous avons jugé utile de rallonger le TR afin de pouvoir réaliser davantage de coupes. Grâce aux résultats de la figure III.7, nous avons observé qu'un train de 60 échos et un TR de 4000 ms ne conduisait qu'à une perte de signal de 5% par rapport au signal maximum. Ce paramétrage permet l'acquisition de 4 coupes dans l'échantillon avec une perte de sensibilité mineure. Par ailleurs (et nous aurons l'occasion d'en reparler aux prochains chapitres), si les tests que nous réalisons pour évaluer notre séquence *in vitro* sont



faits dans la partie suivante à  $20^\circ\text{C}$  et sous pression atmosphérique, il n'en sera pas de même lors du passage à *l'in vivo*. Du fait de l'augmentation de la température et surtout d'une oxygénation plus faible dans les tissus, le  $T_1$  se trouve rallongé ( $T_1 > 2000$  ms), et un TR plus long, permettant une repousse plus importante de l'aimantation longitudinale, nous sera donc favorable. Nous avons donc décidé de conserver la combinaison  $n_e/\text{TR} = 60/4000$  ms.



**a** *Figure III.7. (a) Simulation de la sensibilité normalisée obtenue pour les différentes combinaisons  $n_e/\text{TR}$ , avec les temps de relaxation trouvés à  $20^\circ\text{C}$ . La zone bleue sombre en bas correspond aux combinaisons  $n_e/\text{TR}$  impossibles (durée du train d'échos supérieure au TR) (b) Evolution de l'aimantation  $M_z$  pour la combinaison choisie 60 échos/4000 ms, avec détail de son oscillation pendant le train d'échos.*

### III.3.2. Mise en œuvre expérimentale

La qualité de la séquence MES est évaluée sur le fantôme de PFOB pur à  $20^\circ\text{C}$ . Les paramètres d'imagerie donnés au paragraphe III.1.3.1 pour la mesure du  $T_2$  sont conservés, en accord avec les résultats de la simulation du paragraphe précédent : impulsions hermitiennes de bande passante 3 kHz, bande passante d'acquisition 5 kHz, TR = 4 s, champ de vue  $25,6 \times 25,6$  mm<sup>2</sup>, matrice  $64 \times 64$  pixels, épaisseur de coupe 1 mm. Le TE le plus court permis par ces paramètres est de 15,5 ms, et conformément à l'argumentation du paragraphe précédent, on choisit 60 échos (Figure III.8).

Les images sont reconstruites via Matlab en faisant la somme complexe des 60 échos acquis (afin de limiter le niveau de bruit, ce dernier n'augmente qu'en racine carré du nombre d'échos, cf. chapitre I). Le RSB est ensuite mesuré sur le module de l'image obtenue conformément à l'équation <I-50>, en prenant le signal moyen sur les pixels de l'objet et le bruit dans les coins de l'image.

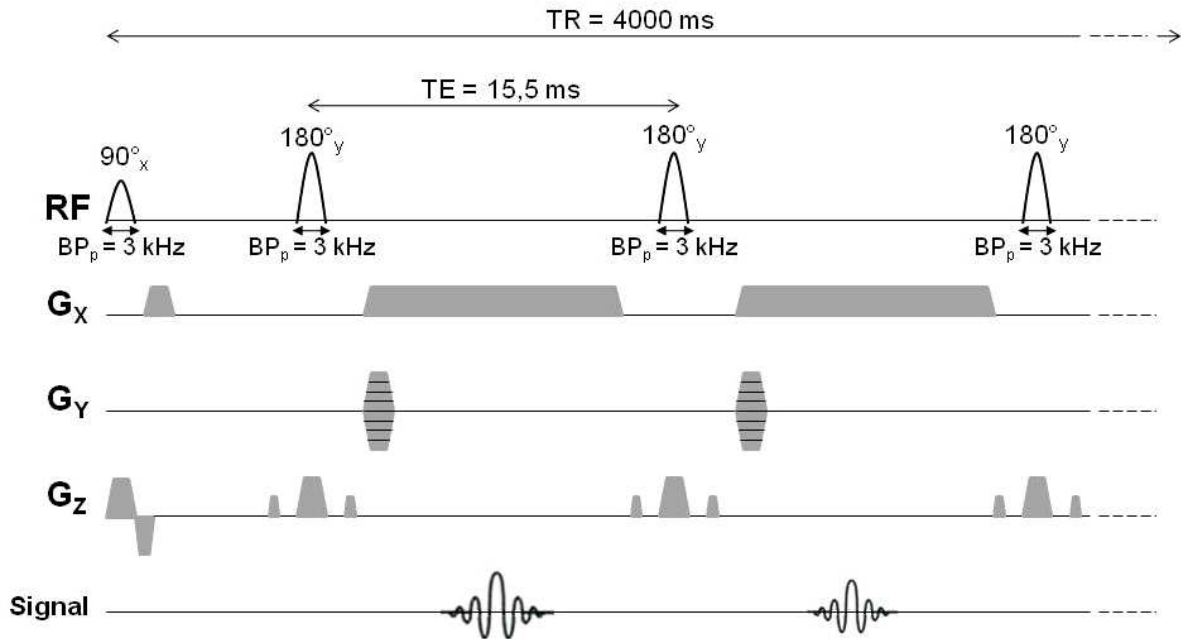


Figure III.8. Chronogramme de la séquence MES optimisée pour l'imagerie du  $\text{CF}_3$  du PFOB. Le chronogramme complet comprend 60 impulsions de  $180^\circ$ , de bande passante ( $BP_p$ ) 3 kHz afin de n'inverser que le  $\text{CF}_3$ , et espacées de 15,5 ms pour bénéficier d'un  $T_2$  long. Par ailleurs, la bande passante d'acquisition faible de 5 kHz permet d'acquérir le signal sur une durée d'environ 12 ms, soit 80% du TE (axe  $G_x$ ).

Afin d'établir une comparaison avec des méthodes traditionnelles d'imagerie, trois autres séquences sont testées. On choisit pour chacun d'elle le même champ de vue, la même résolution et la même épaisseur de coupe que pour la séquence MES. La première consiste en une séquence d'écho de gradient, de bande passante d'acquisition 5 kHz pour n'observer que le  $\text{CF}_3$ . Afin de dresser une comparaison avec une stratégie à TE et TR court, on choisit un TE de 15,5 ms et un TR de 25,5 ms. L'angle de bascule de la séquence est choisi égal à  $11,5^\circ$  conformément à l'équation <I-48>.

La deuxième séquence est une séquence CSI comportant des impulsions de bande passante 26 kHz et une bande passante d'acquisition de 30 kHz afin d'inclure toutes les résonances du PFOB. On choisit un TE de 1,9 ms et un TR de 141 ms. Les images sont reconstruites à partir de la matrice de spectres acquise, en intégrant sur chaque résonance puis en sommant ces intégrales, afin d'obtenir de signal dans chaque pixel. Différentes bornes d'intégration sont testées et les meilleures sont retenues pour sommer le moins de bruit possible et obtenir ainsi le RSB le plus élevé.

La troisième et dernière séquence est une séquence TrueFISP (pour True Fast Imaging with Steady State Precession). La séquence TrueFISP est une séquence d'écho de gradient qui utilise une inversion du gradient de phase après l'application du gradient de lecture, afin de rephaser l'aimantation transverse résiduelle et ainsi la renforcer par écho stimulé. On choisit pour cette séquence  $TE=7$  ms et  $TR=14$  ms, une bande passante de 5 kHz pour les impulsions et une bande passante d'acquisition de 6 kHz.

Le nombre d'acquisitions est ajusté de manière à obtenir des temps d'acquisition proches (~10 minutes). Afin de chiffrer précisément la sensibilité de chaque méthode en  $\mu\text{mol}^{-1}.\text{min}^{-1/2}$ , on applique la formule <I-60> (où  $n$  désignera dans la suite la quantité de matière en  $\mu\text{mol}$  de PFOB) :

$$SN = \frac{RSB}{n\sqrt{T_{acq}}}$$

### III.3.3. Résultats

Les 60 échos acquis avec la séquence MES sont indiqués Figure III.9.a, et leur somme Figure III.9.b. On observe un excellent signal sur les échos individuels, y compris les derniers. La sensibilité mesurée est en conséquence élevée : on obtient  $530 \mu\text{mol}^{-1}.\text{min}^{-1/2}$ .

La figure III.10 regroupe les quatre séquences testées. Les sensibilités des séquences d'écho de gradient, CSI et FISP s'élèvent respectivement à 150, 95 et  $550 \mu\text{mol}^{-1}.\text{min}^{-1/2}$ . Si les sensibilités des séquences écho de gradient et CSI ne représentent respectivement que 28% et 18% de la sensibilité de la séquence MES, il apparaît également que la séquence FISP fournit de très bons résultats et « concurrence » la séquence MES. Nous discutons au point suivant les forces et surtout les faiblesses de chaque méthode afin d'opérer un choix.

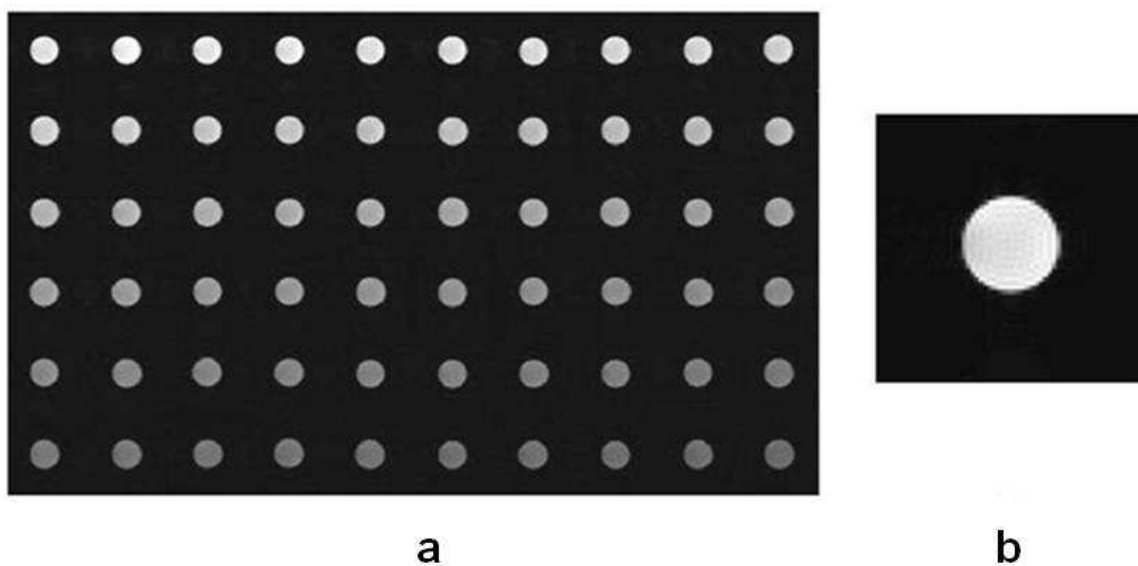


Figure III.9. Les 60 échos obtenus avec la séquence MES (a) et l'image résultante après somme des 60 échos (b).

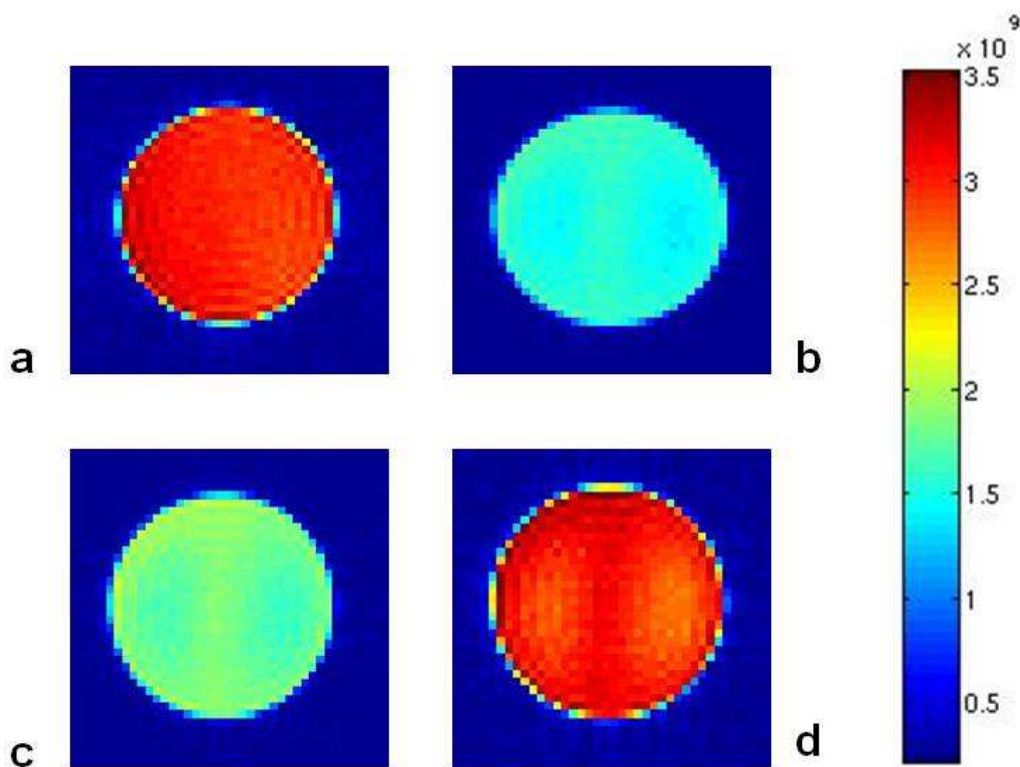


Figure III.10. Images obtenues sur un fantôme de PFOB pur par la séquence MES (a), la séquence CSI (b), la séquence d'écho de gradient (c) et la séquence TrueFISP (d), pour un temps d'acquisition d'environ 10 minutes pour chaque méthode. Les images MES et FISP se distinguent par leur signal élevé dans l'objet, nettement supérieur à ceux des images CSI et écho de gradient (cf. échelle de signal à droite)

### III.3.4. Discussion

#### III.3.4.1. Sur la comparaison MES/FISP

Les séquences MES et TrueFISP fournissent toutes les deux d'excellentes sensibilités sur un fantôme de PFOB homogène. Gardons à l'esprit néanmoins que le but de la séquence sera l'imagerie d'agents de contraste *in vivo*. Il peut donc s'avérer utile de tester la robustesse de l'une et l'autre méthode vis-à-vis de perturbations rencontrées au sein d'un être vivant (mouvements physiologiques, inhomogénéités de champ magnétique...).

Pour cela, un capillaire vide est inséré dans un fantôme de PFOB afin de perturber localement le champ magnétique. Les séquences, paramétrées comme précédemment, sont tour à tour acquises (temps d'acquisition 3 minutes). Après reconstruction, on constate une différence majeure entre les images MES et TrueFISP : la seconde présente un artefact de susceptibilité magnétique sévère (Figure III.11) induisant une division par 2 du RSB. Cette différence est imputable au caractère écho de spin de la séquence MES, moins sensible aux inhomogénéités de champ magnétique qu'une séquence d'écho de gradient comme la TrueFISP.

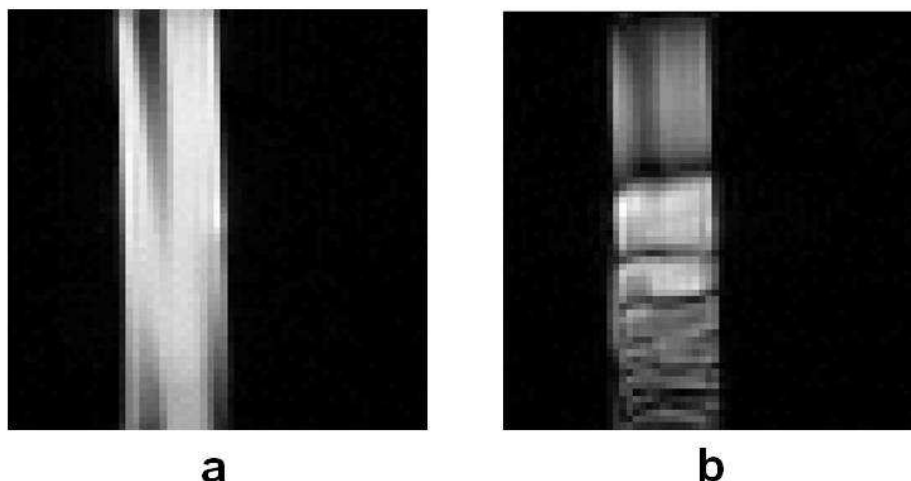


Figure III.11. Image MES (a) et TrueFISP (b) du fantôme de PFOB comprenant le capillaire vide. La qualité de l'image MES où le capillaire apparaît simplement en noir contraste avec celle de l'image TrueFISP, très artefactée du fait de l'inhomogénéité de champ magnétique.

Notre séquence MES semble donc plus appropriée pour l'imagerie *in vivo* : outre son excellente sensibilité, elle paraît robuste, et sera donc la méthode de choix à utiliser pour les études sur petit animal.

#### III.3.4.2. Sur la sensibilité de la séquence MES

Afin d'obtenir le RSB le plus élevé possible, nous avons montré au chapitre I qu'il est en général profitable de limiter le nombre d'échos dans une séquence et de choisir un TR court. Ceci prévaut pour des composés dont le  $T_2$  est très inférieur au  $T_1$ , comme l'eau par exemple (cf. hypothèses dans le cas de l'angle de Ernst, équations <I-48> et <I-59>). Cependant, cette méthode n'est pas intéressante dans le cas du PFOB, qui dispose d'un  $T_2$  très long lorsque le TE est court. Nous avons décidé d'exploiter cette particularité et les résultats sont sans équivoque : parmi les quatre méthodes testées, un long train d'échos est plus efficace en terme de sensibilité que des petits angles et des approches à TE et TR courts. Si la séquence TrueFISP fait exception, elle a dû être écartée en raison de son manque de robustesse.

Les simulations effectuées au paragraphe III.3.1 nous ont permis de paramétrer notre séquence MES de façon à obtenir une excellente sensibilité. Le TR optimal donné par ces simulations était certes plus court, mais le fait d'avoir choisi un TR de 4 s nous apporte un atout supplémentaire par rapport aux autres séquences testées : le délai mort de  $\sim 3$  ms suivant le train d'échos (930 ms) pouvant être exploité pour faire de l'imagerie multi-coupes, jusqu'à un nombre total de quatre (cet avantage est d'ailleurs utilisé au chapitre suivant), et ce sans perte de sensibilité. A l'inverse, les autres séquences testées ne laissent aucun délai mort, ce qui signifie que l'acquisition de coupes supplémentaires résulterait en une perte de sensibilité équivalente à la racine carré du nombre de coupes acquises.

### III.4. CONCLUSION

Ce chapitre a permis de mettre en avant les difficultés liées à l'imagerie du PFOB et de proposer une méthode inédite adaptée à ses contraintes. Nous disposons à présent d'une meilleure connaissance des propriétés RMN du PFOB, et par voie de conséquence, d'une séquence prometteuse pour l'imagerie *in vivo* d'émulsions ou de nanocapsules. Il est par ailleurs envisageable que cette séquence soit applicable à d'autres PFC. La plupart sont en effet sujets à des couplages, et il est possible que certains possèdent des modes de relaxation semblables à ceux du PFOB.

Supprimer le couplage J en n'inversant que le pic du  $\text{CF}_3$ , et choisir un TE court pour obtenir un  $T_2$  long, le tout dans une séquence MES : notre stratégie est établie et fournit une excellente sensibilité *in vitro*. Nous arrivons maintenant à une autre étape : l'imagerie *in vivo*. Comme évoqué précédemment, le PFOB ne peut être injecté pur, les agents de contraste que nous utilisons dans la suite sont donc plus faiblement concentrés. D'autre part, ces agents de contraste sont injectés par voie intraveineuse, et donc « dilués » dans l'organisme, ce qui conduit à des concentrations très basses en PFOB. Afin de tester la qualité de notre séquence MES et d'anticiper l'usage d'agents de contraste ciblés pour l'angiogenèse tumorale, une première étude a consisté à réaliser des mesures de biodistribution et d'oxygénation dans le foie et la rate de souris.

Un article sur la séquence MES a été publié en 2010 dans la revue *Magnetic Resonance in Medicine* (en annexe). Par ailleurs, les points évoqués dans ce chapitre ont fait l'objet d'un oral à l'ESMRMB en 2009 (Antalya, Turquie), et d'un poster à l'ISMRM en 2010 (Stockholm, Suède).



## **CHAPITRE IV**

**Imagerie d'émulsions de PFOB : oxymétrie,  
biodistribution et sensibilité *in vivo***





Nous disposons à présent d'une méthode adaptée à l'imagerie du PFOB. Ce chapitre a deux objectifs principaux :

*i)* en premier lieu tester les performances de notre séquence MES par des mesures d'oxymétrie faites dans le foie et la rate de souris ayant reçu une émulsion de PFOB

*ii)* ces résultats établis, évaluer de manière dynamique la biodistribution des émulsions afin d'anticiper leur cinétique lorsqu'il s'agira de mettre en évidence l'angiogenèse tumorale

Nous présenterons séparément le contexte et les résultats de chacun des deux points évoqués. Des explications étant à fournir sur les implications de notre séquence à la fois en oxymétrie et en biodistribution, une discussion commune suivra.

## **IV.1. INJECTION D'UNE EMULSION DE PFOB CHEZ LA SOURIS : OXYMETRIE DANS LE FOIE ET LA RATE**

### **IV.1.1. Contexte**

Une application classique des émulsions de PFC dans la littérature consiste en des mesures d'oxymétrie dans le foie et la rate. Ces mesures sont facilitées par l'accumulation des nanoparticules dans les deux organes, absorbées par des cellules métaboliques, les hépatocytes, et des cellules immunitaires, les macrophages. Nous avons vu par ailleurs que la relaxivité  $R_1$  des PFC présentait une dépendance directe à la pression d'oxygène  $pO_2$  (équation <II-1>).

Les études répertoriées dans la littérature utilisent des injections répétées d'émulsion chez le petit animal, saturant le foie et la rate en nanoparticules de manière à obtenir des RSB élevés permettant des mesures à la fois rapides et précises [Börnert 1993, Barker 1994, Holland 1993]. Outre l'injection de quantités élevées d'agent de contraste (jusqu'à 55 mL/kg au total chez le rat répartis sur 3 jours pour [Börner 1993]), cette façon de procéder implique de patienter plusieurs jours avant de pouvoir réaliser la mesure. Le foie et la rate étant des organes très vascularisés, il faut en effet attendre la disparition des nanoparticules du milieu sanguin, qui peut s'avérer sinon comme une source de signal biaisant les résultats (l'oxygénation du sang étant différente de l'oxygénation du parenchyme hépatosplénique).

Notre protocole expérimental varie par rapport à ces études : nous essayons de réaliser des mesures d'oxygène dans le foie et la rate après une injection unique d'une émulsion de PFOB, et seulement quelques heures après injection.

### **IV.1.2. Protocole expérimental**

#### *IV.1.2.1. Emulsion de PFOB, animaux et anesthésie*

L'émulsion de PFOB, synthétisée par Guerbet, comprend 20% en masse de PFOB correspondant à une concentration de 20 nM en nanoparticules. Les particules, de taille environ 180 nm, sont par ailleurs greffées de PEG 2000 (Poly Ethylène Glycol de masse molaire ~2000 g/mol, 5% en concentration dans le cas présent), leur permettant une meilleure

furtivité vis-à-vis du système immunitaire (voir détails au paragraphe IV.2). Les propriétés de relaxation de ces nanoparticules sont proches de celle du PFOB.

Les animaux utilisés sont des souris mâles type « Swiss » (souris blanches, provenance Janvier, France), de masse 30 à 35 grammes. Ces dernières reçoivent avant imagerie une injection intrapéritonéale (IP) d'un mélange kétamine/domitor, permettant une anesthésie d'environ 3 heures. Pendant l'expérience, leur température corporelle est maintenue autour de 37°C grâce à un système insufflant de l'air chaud asservi en température.

#### IV.1.2.2. Imagerie

Les mesures d'oxygène sont réalisées sur deux souris. Environ quatre heures avant imagerie, les animaux reçoivent lentement (~60 µL/min) 300 µL de l'émulsion de PFOB présentée au paragraphe précédent par une des veines de la queue.

Les souris sont ensuite placées dans l'antenne corps entier (diamètre 3,2 cm) présentée dans le préambule, dont l'accord est ajusté, et dans laquelle est également insérée une référence d'émulsion (~30 µL) utilisée pour la calibration du signal. Une image anatomique <sup>1</sup>H est tout d'abord acquise avec une séquence multi-coupes multi-échos, paramétrée comme suit : TE = 8 ms, TR = 2500 ms, 12 échos, 20 coupes coronales d'épaisseur 1 mm, champ de vue de 40 × 60 mm<sup>2</sup> couvert par une matrice 96 × 128 pixels.

Avant d'acquérir les images servant aux mesures d'oxymétrie, des images préalables ont été acquises afin de vérifier que le signal dans le foie et la rate avait atteint un plateau, cette précaution évitant d'introduire un biais dans la mesure du T<sub>1</sub>. Ces images ont été acquises avec notre séquence MES, où les paramètres suivants ont été choisis : TE = 10,5 ms, TR = 3000 ms, 60 échos, champ de vue 40 × 60 mm<sup>2</sup> couvert par une matrice 32 × 32 pixels. Une coupe coronale unique d'épaisseur 5 mm a été sélectionnée au centre de l'animal, comprenant le foie, la rate et la référence d'émulsion.

La même séquence est ensuite acquise en faisant varier le TR de manière à créer différentes saturations. Sept valeurs de TR sont choisies : 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000 et 10000 ms. Le signal est moyenné sur deux acquisitions, ce qui conduit à un temps d'acquisition totale pour la série de 25,5 minutes.

Les images sont ensuite reconstruites avec Matlab, et le signal brut est mesuré dans chaque pixel du foie, de la rate et de la référence d'émulsion. Un T<sub>1</sub> moyen sur les pixels est mesuré en fittant par la méthode des moindres carrés les courbes expérimentales obtenues sur le modèle de repousse de l'aimantation donnée par l'équation <III-6>. La pO<sub>2</sub> moyenne est finalement évaluée en utilisant l'équation <II-1> :

$$R_I = R_0 + k \cdot pO_2$$

Cette formule est applicable à tous les PFC, et dans le cas du PFOB, on a R<sub>0</sub>=0,29 s<sup>-1</sup>, et k=2,28.10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>.mmHg<sup>-1</sup>. Ces valeurs ont été mesurées par Shukla et al. à 7 T et à 37°C sur l'émulsion Oxygent<sup>TM</sup> [Shukla 1995]. Comme précisé au chapitre II, l'émulsification ne modifie pas les propriétés de relaxation du PFOB, et nous avons donc considéré que ces valeurs étaient valides pour notre étude.

### IV.1.2. Résultats

Les souris présentent un RSB élevé dans le foie et la rate 4 heures après injection de l'émulsion, en moyenne 45 dans le foie et 120 dans la rate pour TR = 3000 ms, soit un temps d'acquisition de 3 minutes. Grâce à ces valeurs élevées, les valeurs de  $T_1$  ont pu être facilement mesurées et les valeurs de  $pO_2$  déduites. Ces résultats sont regroupés dans le tableau IV.1. On constate des valeurs semblables dans la référence d'émulsion, cohérentes avec la  $pO_2$  de l'atmosphère (160 mmHg, soit 21 % de la pression atmosphérique). Bien que les valeurs ne diffèrent pas de façon significative du fait d'inhomogénéités au sein des organes, la  $pO_2$  montre une tendance à être plus élevée dans la rate que dans le foie. Une carte de  $pO_2$ , masquée pour une meilleure lisibilité, illustre ces résultats pour une des deux souris à la figure IV.1.a, et est accompagnée de l'histogramme des valeurs correspondant à la figure IV.1.b. Des exemples de courbes de repousse de l'aimantation ayant servi à calculer le  $T_1$  dans des pixels donnés sont représentés figure IV.1.c. On remarquera le faible niveau de bruit et la précision des mesures.

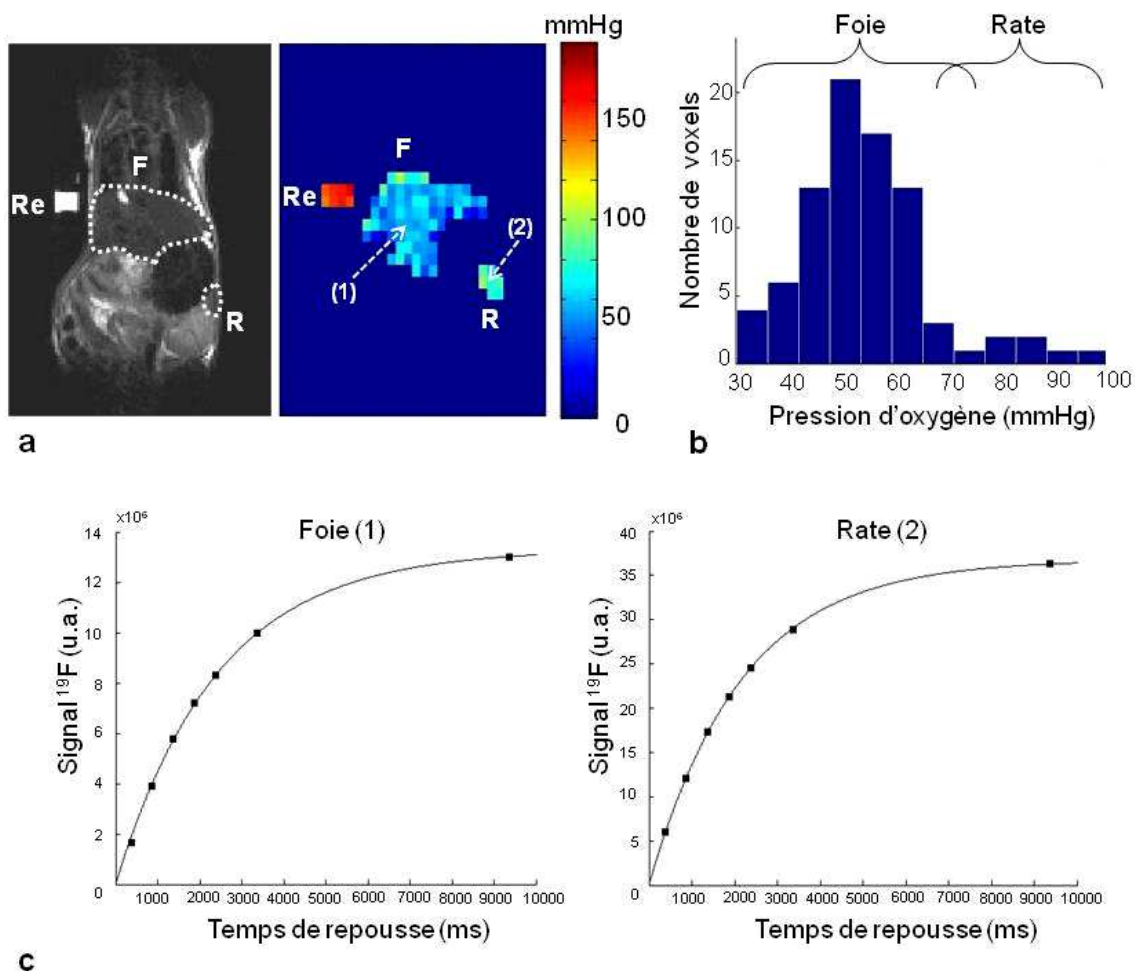


Figure IV.1. (a) Carte de pression partielle d'oxygène d'une souris montrant le foie (F), la rate (R) et la référence d'émulsion (Re), avec l'image anatomique  $^1H$  correspondante pour l'orientation (le foie et la rate sont délimités en pointillés). (b) Histogramme de la carte  $pO_2$  précédente. (c) Courbes de repousse du signal dans un pixel du foie (flèche 1) et dans un pixel de la rate (flèche 2), illustrant l'excellente précision de nos mesures. Le temps de repousse correspond au TR duquel est soustrait la durée du train d'échos (630 ms).

Souris 1				Souris 2			
	$T_1$ (ms)	$pO_2$ (mmHg)	% $p_{atm}$		$T_1$ (ms)	$pO_2$ (mmHg)	% $p_{atm}$
Foie	2694±135	37±14	5±2	Foie	2432±185	55±16	7±2
Rate	2245±220	70±19	9±3	Rate	2131±120	79±11	10±1
Référence	1565±112	153±21	20±3	Référence	1560±52	154±10	20±1

Tableau IV.1. Valeurs de  $T_1$  et de  $pO_2$  obtenues après fit et déduction de l'équation <III-6> (moyenne ± écart-type). La moyenne et l'écart-type sont calculés pour chaque cas sur l'ensemble des pixels du foie, de la rate ou de la référence d'émulsion.  $p_{atm}$  désigne le pourcentage de la pression atmosphérique (760 mmHg).

## IV.2. INJECTIONS D'ÉMULSIONS DE PFOB CHEZ LA SOURIS : BIODISTRIBUTION DYNAMIQUE

### IV.2.1. Contexte

Nous savons qu'après injection intraveineuse, les mécanismes de l'immunité se mettent en marche dans l'organisme pour capter les nanoparticules d'émulsion, principalement dans le foie et la rate. Ainsi, la demi-vie des émulsions dans le sang est généralement de quelques heures, mais reste étroitement liée à la taille des nanoparticules ainsi qu'au volume injecté. Keipert et al. montrent par exemple chez le rat que pour une injection d'émulsion de PFOB de 3 mL/kg, la demi-vie sanguine de particules de taille 630 nm est d'environ une heure, tandis que pour des particules de taille 120 nM, elle dépasse 6 heures [Keipert 1994]. L'IRM du  $^{19}F$  ainsi que la tomographie à rayons X indiquent par ailleurs que les émulsions de PFOB peuvent mettre en évidence l'espace vasculaire pendant plusieurs heures [Ratney 1987, Harned 1995, Mattrey 1984], et le foie et la rate pendant plusieurs jours [Barker 1994, Mattrey 1982] voire plusieurs semaines lorsqu'elles sont injectées à haute dose [Young 1981].

Néanmoins, aucune mesure quantitative n'a jamais été réalisée dans les minutes suivant l'injection. Ces données sont pourtant primordiales lorsque l'émulsion est injectée pour agir sur une cible particulière, et précisément dans notre cas lorsque les particules auront vocation à se lier à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  pour la détection de l'angiogenèse tumorale. L'absorption des nanoparticules par le foie et la rate devient dans ce cas problématique puisqu'en réduisant la concentration en agent de contraste dans le sang, elle réduit les chances de liaison entre les particules et la cible.

Il existe heureusement certaines méthodes pour limiter l'absorption des particules par le foie et la rate, et la plus commune consiste à greffer du PEG à leur surface [Owens 2006]. Il s'agit d'un polymère biocompatible et biodégradable qui rend les particules furtives vis-à-vis du système immunitaire. Une fois dans le sang, les particules rencontrent en effet des opsonines, protéines ayant vocation à se lier à des antigènes pour permettre une reconnaissance rapide par les macrophages. Lorsque les particules sont greffées de PEG à leur

surface, les opsonines ne peuvent se fixer à leur surface, et la reconnaissance des particules par le système immunitaire se trouve ralentie.

Nous réalisons ici une étude de biodistribution dynamique d'émulsions de PFOB aussitôt après injection. Nous utilisons des émulsions contenant des quantités de PEG différentes afin d'évaluer leur furtivité et quantifier la cinétique d'absorption des particules par le foie et la rate. Cette étude constitue également un autre test de notre séquence MES dans un contexte de faible concentration en émulsion fluorée.

#### IV.1.2. Protocole expérimental

Trois émulsions différentes sont testées, elles comprennent respectivement 0, 5 et 50% de PEG 2000 en concentration, et toujours 20% en masse de PFOB. Trois souris sont injectées pour chaque quantité de PEG, soit un total de neuf souris. Ces dernières sont anesthésiées selon le protocole du paragraphe IV.1. Un cathéter est introduit dans une des veines de la queue, et les animaux sont placés dans l'antenne corps entier avec la référence d'émulsion. Une image anatomique  $^1\text{H}$  est acquise comme décrit précédemment. Les animaux reçoivent ensuite un bolus de 200  $\mu\text{L}$  d'émulsion de PFOB grâce au cathéter implanté. Aussitôt après, les acquisitions  $^{19}\text{F}$  sont lancées avec notre séquence MES. Les paramètres choisis sont  $\text{TE} = 10,5$  ms,  $\text{TR} = 3000$  ms, 60 échos, un champ de vue  $40 \times 60$  mm<sup>2</sup> couvert par une matrice  $32 \times 32$  pixels. Le délai mort suivant le train d'échos est cette fois-ci exploité pour acquérir 4 coupes coronales d'épaisseur 5 mm, permettant de couvrir l'animal du ventre jusqu'au dos. La séquence est moyennée 4 fois, conduisant à un temps d'acquisition de 6 min 30. Une image est acquise toutes les 7 minutes, pour un temps d'acquisition total de 84 minutes.

Les images sont ensuite reconstruites comme indiqué précédemment. Le signal (somme complexe sur les pixels) est mesuré dans le foie et la rate pour chaque pas de temps et comparé au signal dans la référence d'émulsion pour en tirer les concentrations. Le  $T_1$  étant plus élevé dans les organes que dans la référence d'émulsion (voir partie précédente), la repousse n'est pas identique dans les deux cas. Cette différence est donc prise en compte pour corriger les valeurs de concentration. Les données sont finalement ajustées par la méthode des moindres carrés sur un modèle pharmacocinétique empirique qui décrit l'accumulation des nanoparticules dans les organes après une injection intraveineuse [Fan 2004] :

$$C(t) = C_{\infty}(1 - e^{-kt}) \quad (\text{IV-1})$$

où  $C(t)$  désigne la concentration en nanoparticules dans l'organe au temps  $t$  (exprimée dans la suite en nM),  $C_{\infty}$  est la concentration finale (nM) et  $k$  désigne la constante d'accumulation ( $\text{min}^{-1}$ ). Le fit permet d'avoir accès aux constantes  $C_{\infty}$  et  $k$ .

Les acquisitions étant réalisées pour des concentrations initialement faibles dans les organes, les erreurs de mesure ont été évaluées sur les données individuelles par une simulation de Monte-Carlo (SMC). Cette simulation consiste à recalculer les constantes  $C_{\infty}$  et  $k$  après avoir introduit un bruit aléatoire, dont l'écart-type est celui de la différence entre les données réelles et la courbe correspondant au meilleur ajustement. Elle permet ainsi de donner une incertitude pour les valeurs mesurées.

### IV.2.2. Résultats

Les souris injectées présentent toutes un signal  $^{19}\text{F}$  dans le foie et dans la rate. Pour quatre d'entre elles, on observe également un signal  $^{19}\text{F}$  au niveau de la colonne vertébrale. Ce signal émane probablement de la moelle osseuse, riche en cellules immunitaires.

Le signal est visible dans les organes dès la première image quelle que soit la coupe, et on constate son augmentation progressive au fil des acquisitions. La figure IV.2.a traduit cette augmentation en image pour un animal et la figure IV.2.b est la courbe de concentration correspondante. Selon les animaux, le RSB à la dernière acquisition ( $t=84$  min) est mesuré entre 10 et 25 dans le foie et entre 20 et 60 dans la rate. Les résultats des constantes  $k$  et  $C_{\infty}$ , estimées par le fit sur le modèle de l'équation <IV-1>, ainsi que la marge d'erreur évaluée par la SMC sont présentées dans le tableau IV.2.

En parcourant ces valeurs, on constate que la moyenne de  $k$  est toujours plus élevée dans le foie que dans la rate, et, comme on peut s'y attendre, que cette moyenne diminue lorsque la quantité de PEG dans l'émulsion injectée augmente. On note toutefois que les écarts-types finaux sont élevés (dernière colonne à droite), du fait de la grande variabilité des valeurs d'une souris à l'autre pour une même quantité de PEG. Notons également que les SMC donnent des valeurs nettement plus faibles, ce qui reflète une précision de mesure tout à fait satisfaisante.

Ces remarques sont valables également concernant l'estimation des  $C_{\infty}$ , avec des écarts-types finaux élevés du fait de la variabilité inter-animale, mais des erreurs de mesure basses données par les SMC. Dans ce cas, l'augmentation de la quantité de PEG dans l'émulsion semble conduire à des concentrations finales plus importantes dans les organes, à l'exception du foie pour l'émulsion à 50% de PEG. Par ailleurs, à l'exception de deux souris ayant reçu l'émulsion à 5% de PEG, la concentration en nanoparticules est toujours plus élevée dans la rate que dans le foie.

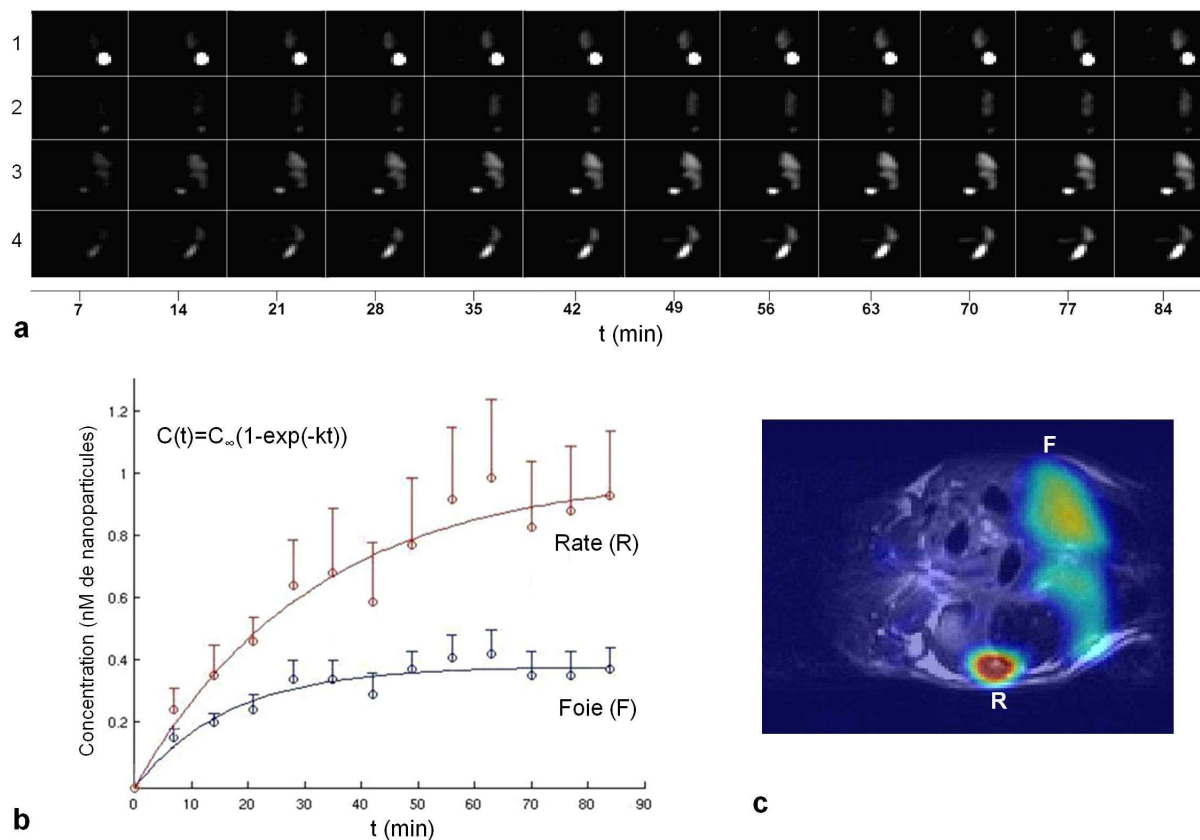


Figure IV.2. (a) Evolution du signal  $^{19}\text{F}$  en fonction du temps dans le foie et la rate d'une souris injectée par l'émulsion de PFOB contenant 50% de PEG. Les coupes vont du ventre (1) jusqu'au dos (4). Le point blanc observé sur la coupe 1 correspond à la référence d'émulsion placée dans l'antenne pour la calibration du signal. (b) Courbe de concentration correspondante dans le foie et la rate donnant les points expérimentaux (cercles) et le meilleur fit (trait plein). Les barres d'erreur représentent les écarts-types calculés sur les pixels de l'organe considéré. (c) Superposition de l'image  $^{19}\text{F}$  (coupe 3) à  $t=84$  min après injection avec l'image anatomique  $^1\text{H}$  (effectuée avec le logiciel BrainVISA/Anatomist mis au point à NeuroSpin).



<b>k (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Exp 1</b>		<b>Exp 2</b>		<b>Exp 3</b>		<b>Moy.</b>	<b>E.T.</b>
	<i>SMC</i>		<i>SMC</i>		<i>SMC</i>			
<b>PEG 50%</b>								
Foie	0.060	±0.003	0.027	±0.001	0.089	±0.005	<b>0.059</b>	<b>0.031</b>
Rate	0.032	±0.001	0.029	±0.002	0.012	±0.001	<b>0.024</b>	<b>0.011</b>
<b>PEG 5%</b>								
Foie	0.058	±0.003	0.132	±0.010	0.190	±0.021	<b>0.126</b>	<b>0.066</b>
Rate	0.054	±0.003	0.087	±0.009	0.076	±0.003	<b>0.072</b>	<b>0.017</b>
<b>PEG 0%</b>								
Foie	3.452	±1.406	0.183	±0.019	0.418	±0.078	<b>1.35</b>	<b>1.822</b>
Rate	0.223	±0.031	0.158	±0.014	0.044	±0.002	<b>0.142</b>	<b>0.091</b>

<b>C<sub>∞</sub> (nM)</b>	<b>Exp 1</b>		<b>Exp 2</b>		<b>Exp 3</b>		<b>Moy.</b>	<b>E.T.</b>
	<i>SMC</i>		<i>SMC</i>		<i>SMC</i>			
<b>PEG 50%</b>								
Foie	0.503	±0.007	0.388	±0.008	0.526	±0.006	<b>0.472</b>	<b>0.074</b>
Rate	1.192	±0.016	0.784	±0.011	4.185	±0.036	<b>2.054</b>	<b>1.857</b>
<b>PEG 5%</b>								
Foie	0.605	±0.005	0.428	±0.005	1.121	±0.013	<b>0.718</b>	<b>0.360</b>
Rate	1.331	±0.012	0.326	±0.005	0.929	±0.012	<b>0.862</b>	<b>0.506</b>
<b>PEG 0%</b>								
Foie	0.333	±0.005	0.204	±0.002	0.203	±0.004	<b>0.247</b>	<b>0.075</b>
Rate	1.064	±0.014	0.464	±0.006	0.768	±0.009	<b>0.765</b>	<b>0.300</b>

Tableau IV.2. Valeurs de  $k$  et de  $C_{\infty}$  obtenues après la procédure de fit sur le modèle donné par l'équation IV.1 et correction pour la saturation du  $T_1$  (à partir des valeurs du tableau IV.1). Exp 1, Exp 2 et Exp 3 désignent chacune des trois expériences menées pour les différentes quantités de PEG. La moyenne (Moy.) et l'écart-type (E.T.) sont donnés pour chaque quantité de PEG, et une SMC est réalisée pour chaque expérience.

### IV.3. DISCUSSION

#### IV.3.1. Sur l'absence de synchronisation respiratoire

Lors d'une imagerie abdominale et dans le cas de séquences sensibles au mouvement, la respiration des animaux peut induire des artefacts qui peuvent conduire à une mauvaise estimation du  $T_1$  et des concentrations dans les organes. Nous n'avons pas utilisé de système permettant la synchronisation de la respiration avec l'acquisition, car les mouvements des souris n'ont dans notre cas pas été problématiques. Les images anatomiques  $^1\text{H}$ , également acquises avec une séquence multi-échocs de spin, ne montrent en effet aucun phénomène de floutage ou de ghosting dû au mouvement, bien que la résolution de ces images soit supérieure à celle des images  $^{19}\text{F}$ .

Nous expliquons l'absence d'artefact de mouvement par le protocole d'anesthésie utilisé. Contrairement à la majorité des études qui utilisent l'isoflurane lors d'expériences sur rongeur, nos animaux sont anesthésiés avec un mélange kétamine/domitor qui ne présente aucun risque de contamination du signal  $^{19}\text{F}$ . Nous avons pu constater qu'avec ce protocole, la respiration des souris présentait un rythme beaucoup plus rapide qu'avec l'isoflurane ( $\sim 180 \text{ min}^{-1}$ ), et par conséquent une très faible amplitude de mouvements, sans conséquence sur la qualité des images.

#### **IV.3.2. Sur la contribution du signal vasculaire au signal total mesuré dans le foie et la rate**

Notre protocole diffère sensiblement des protocoles rencontrés dans la littérature dans la mesure où nous réalisons les acquisitions aussitôt ou peu de temps après injection, alors que la plupart des études attendent généralement plusieurs jours avant imagerie afin que l'émulsion ait disparu de l'espace vasculaire. Cela implique dans notre cas que le sang constitue une source de signal pouvant potentiellement biaiser nos mesures, puisque des nanoparticules d'émulsion y sont encore présentes. Le foie et la rate sont des organes très vascularisés, et certains auteurs comme Fishman et al. ont fait des mesures d'oxygénation du sang dans ces organes 4 heures après injection de l'émulsion [Fishman 1987]. Il existe toutefois une différence majeure entre l'étude de Fishman et al. et la nôtre : nous ne voyons aucun signal dans le cœur et les poumons des animaux, alors qu'ils sont clairement visibles chez Fishman et al. Ce signal ne provient pas dans ce cas de nanoparticules captées par le parenchyme des organes, mais des grandes quantités de sang présentes. Il semble donc que notre méthode soit insensible au signal vasculaire.

Afin d'évaluer précisément la contribution du signal sanguin au signal trouvé dans le foie et la rate, la moyenne du bruit a été mesurée dans les coins de l'image à l'écart de l'animal, puis comparée au signal moyen mesuré dans la région du cœur et des poumons pour le cas le plus critique, c'est-à-dire 7 minutes après injection de l'émulsion. Il s'avère que le signal moyen au niveau du cœur et des poumons est 10 à 40% supérieur à la moyenne du bruit dans les coins de l'image. Cette valeur reste très faible, et ne contribue finalement qu'à 5% du signal du foie et de la rate au premier temps de mesure (en supposant un volume vasculaire semblable).

Cette faible sensibilité au signal sanguin est imputable au caractère multi-échos de notre séquence (contrairement à Fishman et al. qui utilisent une séquence d'écho de spin simple). Rappelons que notre étude utilise ici un train d'échos de durée 630 ms (60 échos de 10,5 ms). Ainsi, les spins présents dans le sang et circulant perpendiculairement à la coupe sélectionnée vont progressivement en sortir au cours de la longue succession d'impulsions, ils ne seront donc pas refocalisés pendant la totalité du train d'échos et remplacés peu à peu par des spins n'ayant pas subi l'excitation de  $90^\circ$ , et ne fournissant donc aucun signal (phénomène à rapprocher de celui de sortie de coupe bien connu en angiographie, voir Figure IV.3.a).

Les pertes de signal lorsqu'on se place parallèlement à la coupe sont dues quant à elles à des déphasages intervenant pendant le train d'échos. Dans la direction de phase, les spins statiques conservent la même phase pour chacun des 60 échos survenant pendant le train

d'échos pour une coordonnée, et la somme des 60 échos conduit à un moyennage cohérent, sans perte de signal. A l'inverse, les spins mobiles dans le sang acquièrent à chaque écho des phases différentes sous l'effet du gradient d'encodage en phase, menant à une somme incohérente des 60 échos, et donc à des pertes de signal (Figure IV.3.b). Dans la direction de lecture, les pertes sont probablement imputables à deux effets cumulatifs : d'une part, l'emploi de gradients relativement longs (en effet pour un flux laminaire les pertes de signal sont proportionnelles au sinus cardinal de  $\gamma\alpha G\tau^2$ , où  $\alpha$  dépend du flux,  $G$  est l'intensité du gradient et  $\tau$  est la durée du gradient, ici  $\sim 7$  ms [Haacke 1999]), et d'autre part à un moyennage incohérent des échos lors de la reconstruction des lignes de l'espace de Fourier, la vitesse du flux n'étant probablement pas constante pendant les 630 ms du train d'échos.

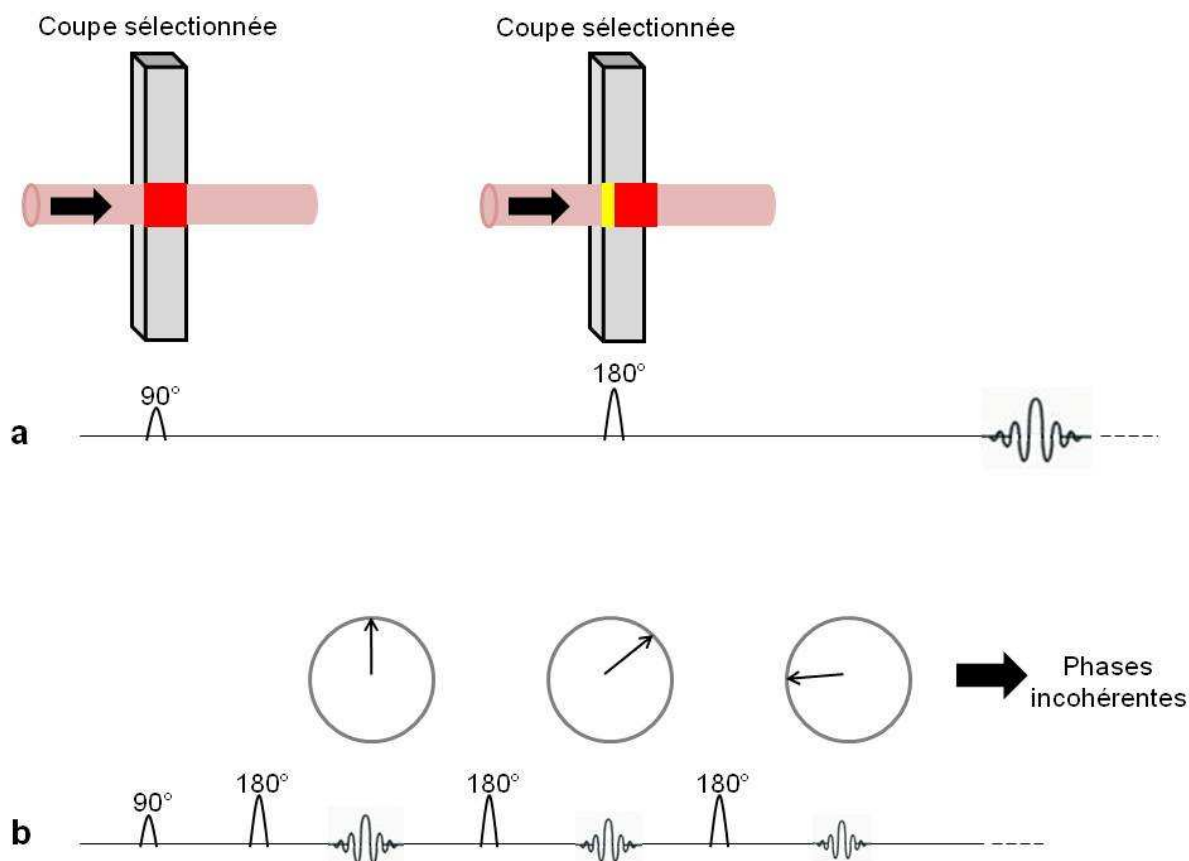


Figure IV.3. (a) Illustration du phénomène responsable de la perte de signal pour un flux perpendiculaire à la direction de coupe : les spins présents dans le sang (en rouge) sont excités par l'impulsion de 90°. Au temps  $TE/2$  survient la première impulsion de 180°, qui ne refocalise qu'une partie des spins excités, une proportion d'entre eux ayant déjà quitté la coupe, et agit sur des spins n'ayant pas été excités, en dehors de la coupe au moment de l'impulsion de 90° (en jaune). Ce phénomène réduit drastiquement le signal acquis au fur et à mesure des échos. (b) Illustration du phénomène responsable de la perte de signal pour un flux parallèle à la direction de coupe : la phase des spins (repérée sur le cercle) varie d'un écho à l'autre en raison des mouvements dans le flux sanguin, et la somme finale des échos conduit à la somme de signaux incohérents, de module quasi-nul.

Afin de démontrer nos propos, une expérience complémentaire a été effectuée. Une souris ayant reçu 200  $\mu\text{L}$  de l'émulsion PFOB à 5% de PEG a été sacrifiée 15 minutes après injection. L'animal a été ensuite imagé suivant le protocole utilisé pour la biodistribution ( $T_{\text{acq}} = 30 \text{ min}$ ). L'image obtenue présente du signal dans le foie et la rate, mais également de façon importante dans la région du cœur et des poumons, alors que cette distribution n'a jamais été constatée jusqu'ici sur les animaux vivants (Figure IV.4). Le motif observé semble indiquer que le signal provient des artères et veines importantes irriguant le cœur et les poumons. Cette étude complémentaire suggère que le PFOB est présent dans le sang en grande quantité 15 minutes après injection de l'émulsion, mais qu'il n'est visible que lorsque le flux sanguin est arrêté. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle notre séquence MSE est peu sensible au signal sanguin *in vivo* du fait de son caractère multi-échocs, limitant fortement le signal provenant des spins circulants.

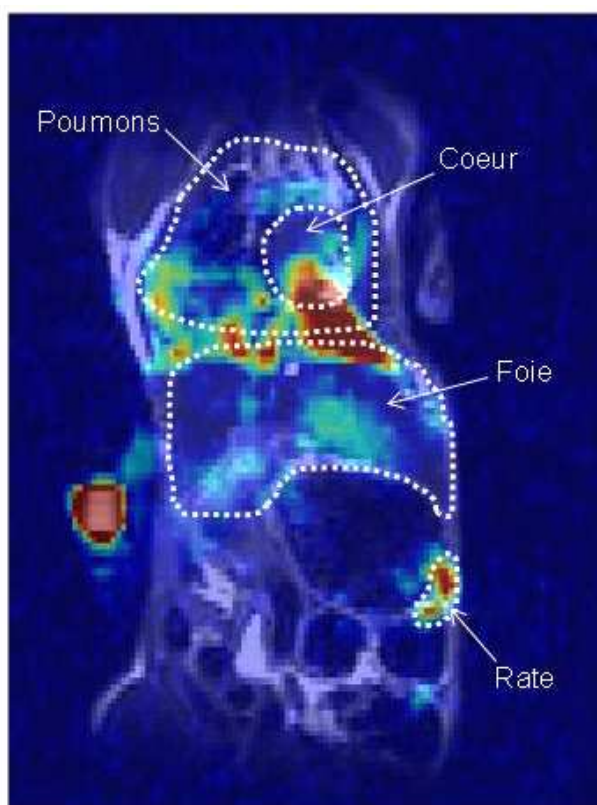


Figure IV.4. Superposition de l'image  $^{19}\text{F}$  sur l'image anatomique  $^1\text{H}$  d'une souris sacrifiée 15 minutes après injection d'une émulsion de PFOB. Contrairement à ce qui est observé chez les animaux vivants, un signal  $^{19}\text{F}$  est clairement visible au niveau du cœur et des poumons de l'animal quand le flux sanguin est arrêté.

### IV.3.3. Sur l'oxymétrie dans le foie et la rate

Nos valeurs de  $p\text{O}_2$  dans les organes sont proches de celles données dans la littérature, qui s'étalent de 30 [Barker 1994] à 98 mmHg [Holland 1993] chez le petit animal (rat et souris). Précisons que les études ne font généralement pas la distinction entre le foie et la rate, et donnent donc une  $p\text{O}_2$  globale. Notre étude tend à montrer que la  $p\text{O}_2$  est plus élevée dans

la rate que dans le foie, et ce phénomène peut être expliqué par un approvisionnement en sang différent dans les deux organes. Effectivement, le foie reçoit en majeure partie (~80%) du sang veineux appauvri en oxygène, tandis que la rate est alimentée par du sang d'origine majoritairement artérielle, fournissant de l'oxygène en plus grande quantité pour le tissu splénique.

Notre méthode permet d'obtenir des RSB élevés dans le foie et la rate, et ainsi une estimation très précise du  $T_1$  dans les organes grâce au faible niveau de bruit (Figure IV.1.C). Cette précision est d'ailleurs confirmée par les  $pO_2$  trouvées dans la référence d'émulsion, correspondant à la pression partielle d'oxygène de l'atmosphère. Certaines études rapportent des temps d'acquisition plus courts, en particulier l'étude de Barker et al. qui obtiennent sur la souris une carte de  $pO_2$  en 5,5 minutes après injection de l'émulsion de PFOB Oxygent™ au moyen d'une séquence EPI (Echo Planar Imaging) d'inversion-récupération [Barker 1994]. Ce temps d'acquisition presque 5 fois plus court que le nôtre est à tempérer par l'utilisation de pixels nettement plus gros (94  $\mu\text{L}$  contre 12  $\mu\text{L}$  dans notre cas), d'une émulsion beaucoup plus concentrée en PFOB (~90% en masse contre 20% dans notre cas) et de quatre injections de PFOB de 250  $\mu\text{L}$  chacune (une seule injection de 300  $\mu\text{L}$  dans notre cas). Ce dernier paramètre, ainsi que l'utilisation d'une séquence qui n'est *a priori* pas insensible au flux sanguin, imposent aux auteurs de patienter une semaine avant de réaliser les acquisitions, afin que les nanoparticules d'émulsion aient disparu du milieu vasculaire. Dans notre cas, les nanoparticules circulantes ne sont pas un obstacle puisque notre séquence y est très peu sensible, la principale contrainte reste donc de réaliser les mesures une fois que les concentrations ont atteint un niveau constant dans les organes. Notre étude de biodistribution dynamique garantit que 4 heures après injection les concentrations en nanoparticules ont atteint un plateau dans le foie et la rate, et que la  $pO_2$  peut par conséquent être calculée sans crainte de voir les résultats biaisés par une accumulation continue dans les organes. En conclusion, notre séquence MES convient parfaitement pour les mesures d'oxygénation dans le foie et la rate dans un temps d'acquisition très raisonnable, et présente l'avantage de réduire nettement le délai d'attente avant imagerie, contrairement aux études menées jusque'ici.

#### IV.3.4. Sur la biodistribution dynamique

Les images de biodistribution acquises indiquent une activation immédiate des cellules hépatospléniques après injection, quelle que soit la quantité de PEG dans l'émulsion. Ce résultat est très différent de celui de Ratner et al. qui n'observent du signal qu'à partir d'une heure après injection de leur émulsion de PFOB, probablement du fait d'un RSB plus faible [Ratner 1987]. Les volumes du foie et de la rate étant calculés en intégrant sur les pixels des images anatomiques, la quantité totale de PFOB captée par les organes a pu être évaluée. Nous trouvons ainsi que 84 minutes après injection, cette quantité varie entre le huitième et la moitié de la dose totale injectée (en moyenne un quart), selon les animaux et la quantité de PEG contenue dans l'émulsion. Cet éventail est cohérent avec la demi-vie sanguine de 4 heures annoncée par Keipert et al. pour des émulsions de taille 180 nm [Keipert 1994].

Un des objectifs de cette étude était de chercher à évaluer par IRM la furtivité d'émulsions contenant différentes proportions de PEG, caractérisée par la constante d'accumulation  $k$  dans notre modèle. En dépit de la grande variabilité de valeurs trouvée (cf.

Tableau IV.2), un test de rang de Wilcoxon unilatéral [*Wilcoxon 1945*] (test choisi en raison de l'absence d'hypothèses vérifiables sur la distribution des valeurs) indique que  $k$  est significativement plus faible ( $p = 0,05$ ) dans le foie et la rate des souris ayant reçu l'émulsion à 50% de PEG lorsque comparé aux souris ayant reçu l'émulsion non pegylée. Les autres  $p$ -valeurs données par le test (comparaison 50% de PEG / 5% de PEG et 5% de PEG / 0% de PEG) s'avèrent certes légèrement plus élevées que le seuil traditionnel de rejet de 5%, mais notre méthode tend néanmoins à confirmer que la constante d'accumulation  $k$  dépend de la quantité de PEG incorporée dans l'émulsion. Par ailleurs, les faibles incertitudes de mesure données par les SMC indiquent que la variabilité trouvée n'est pas due à un manque de précision de notre méthode, mais plutôt à une variabilité inter-animale.

Cette variabilité inter-animale explique également les écarts-types relativement importants trouvés pour les concentrations finales dans les organes.  $C_{\infty}$  tend à être plus élevée lorsque la quantité de PEG augmente dans l'émulsion ( $p = 0,05$  dans le foie lorsque l'on compare les émulsions à 50 et 5% de PEG par rapport à l'émulsion non pegylée). Cette différence est probablement imputable à des temps de circulation plus longs des nanoparticules dans le sang, minimisant la saturation des cellules du foie et de la rate grâce à une absorption plus graduelle, et aboutissant finalement à une accumulation plus élevée des particules dans les organes.

Pour la plupart des animaux, nous avons constaté que la concentration en nanoparticules était plus élevée dans la rate que dans le foie, et ce résultat est en accord avec ceux trouvés dans des études antérieures [*Ratner 1987, Holland 1993, Harned 1995*]. Cette disparité entre les deux organes est sans doute le résultat d'une composition cellulaire différente : le foie est en effet majoritairement composé d'hépatocytes, à fonction métabolique, et seulement en second lieu de macrophages, tandis que la rate comporte une densité très élevée de macrophages au niveau de la pulpe rouge (cf. Chapitre II). Le processus de phagocytose est connu pour être relativement « lent » du fait de l'intervention du système du complément pour sa mise en route, il est donc probable que les hépatocytes, ne faisant quant à eux intervenir aucun phénomène annexe et n'étant pas voués à l'immunité, captent plus vite les nanoparticules, et dans des proportions plus faibles. A l'inverse, la rate ne puise les particules que par l'intermédiaire de ses nombreux macrophages, d'où une absorption plus lente mais plus importante de nanoparticules. Nos résultats sont très proches de ceux de Harned et al., qui montrent une différence nette entre les courbes d'atténuation en CT dans le foie et la rate [*Harned 1995*], courbes très similaires à celles que nous présentons Figure IV.2.b (cf. Figure IV.5).

Un autre objectif de notre étude dans ce chapitre était de tester la sensibilité de notre séquence *in vivo*. En dépit d'une grande variabilité inter-animal et de concentrations en nanoparticules parfois très basses en début d'expérience, le RSB dans les organes était supérieur ou égal à 4 à  $t = 7$  minutes après injection. En prenant en compte le fait que nos émulsions sont moins concentrées en agent fluoré que la plupart des émulsions de PFC connues (comme Oxygent<sup>TM</sup>), et que nos souris ont reçu des doses d'émulsions plus faibles que celles traditionnellement administrées dans les autres études, nous pouvons sans hésiter conclure à la sensibilité accrue de notre séquence, adaptée pour l'imagerie *in vivo* d'émulsions de PFOB, et permettant une quantification précise des concentration en nanoparticules dans le

Copyright Harned 1995

*Figure IV.5. Courbes indiquant l'opacification du foie, de la rate et de l'aorte en CT en fonction du temps après injection IV d'une émulsion de PFOB chez le singe (HU = Hounsfield Unit). On notera la similitude de ces courbes avec celles obtenues en IRM dans ce chapitre pour le foie et la rate (d'après [Harned 1995]).*

foie et la rate en quelques minutes. Cette méthode permet ainsi l'estimation de ces concentrations sans recourir au sacrifice des animaux à des temps successifs. Il s'agit ici de la première expérience de biodistribution dynamique réalisée avec succès en IRM du <sup>19</sup>F.

#### IV.4. CONCLUSION

Ce chapitre a démontré que la séquence mise au point pour l'imagerie du PFOB offrait d'excellents résultats *in vivo*, en permettant notamment la quantification d'émulsion dans le foie et la rate à des concentrations de l'ordre nanomolaire. Des cartes d'oxygénation peuvent être obtenues après une injection unique d'émulsion, et sans besoin d'attendre plusieurs jours avant imagerie contrairement aux études menées jusqu'ici, grâce à la relative insensibilité de notre séquence au signal sanguin. L'étude de biodistribution dynamique a quant à elle montré que l'accumulation des nanoparticules pouvait être suivie dans les organes juste après injection avec une bonne résolution temporelle, permettant en particulier de mettre en évidence des différences de furtivité entre des émulsions incorporant différentes quantités de PEG.

Les RSB élevés obtenus sont prometteurs pour l'étude sur laquelle nous allons nous pencher au chapitre suivant : il s'agit désormais de mettre en œuvre notre séquence afin de détecter l'angiogenèse tumorale. Les quantités d'agent de contraste à mettre en évidence seront nettement moins élevées que les quantités mises en jeu ici, puisqu'il s'agit à présent de détecter des biomarqueurs à la surface de néo-vaisseaux irriguant une tumeur cérébrale. Cette étude a également été bénéfique dans la mesure où nous avons pu évaluer la cinétique des émulsions de PFOB dans le sang, donnée importante pour la mise en œuvre du protocole expérimental.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés dans la revue *NMR in Biomedicine* en 2011 (voir annexe), et ont fait l'objet de posters à la conférence WMIC 2010 (World Molecular Imaging Congress) à Kyoto (Japon), ainsi qu'à l'ISMRM 2011 à Montréal (Canada).





## **CHAPITRE V**

**Imagerie de l'angiogenèse tumorale dans un modèle souris de glioblastome par une émulsion de PFOB fonctionnalisée**

Chapitre V – Imagerie de l'angiogenèse tumorale dans un modèle souris de glioblastome par  
une émulsion de PFOB fonctionnalisée

Les chapitres précédents ont brossé le décor dans lequel se tient à présent notre étude sur l'angiogenèse tumorale. Nous disposons des principaux outils nécessaires à cette étude : une séquence ayant fourni d'excellents résultats *in vivo* pour la détection d'émulsions de PFOB, et des données sur la cinétique de telles émulsions une fois qu'elles sont injectées chez la souris.

L'objectif est ici d'essayer de mettre en évidence la présence de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  surexprimée à la surface des néo-vaisseaux irriguant un glioblastome dans le cerveau de souris, et également de juger de l'efficacité de la méthode utilisée pour cette mise en évidence.

## V.1. INTRODUCTION

Nous avons montré au chapitre II qu'un certain nombre d'études se sont récemment penchées sur la détection d' $\alpha_v\beta_3$  en IRM du  $^{19}\text{F}$ . Ces études utilisent des nanoparticules de PCFE ou de PFOB, fonctionnalisées par l'ajout du peptide RGD ou de vitronectine (ligand endogène de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  contenant le peptide RGD). A l'exception de celle de Waters et al., aucune de ces études ne dressent de comparaison avec des injections de nanoparticules non fonctionnalisées pour vérifier que le signal provient bien de la liaison spécifique avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Des études réalisées en  $^1\text{H}$  avec des nanoparticules paramagnétiques indiquent pourtant qu'il existe un rehaussement de signal dans les tumeurs même lorsque les nanoparticules sont non fonctionnalisées. C'est le cas par exemple pour l'étude de Winter et al. qui montrent dans un carcinome, à 1,5 T et chez le lapin que l'augmentation de signal est sensiblement la même jusqu'à 90 minutes après injection, et que des différences n'apparaissent qu'à partir de 2 heures entre les deux groupes d'animaux [Winter 2003]. Schmieder et al. montrent quant à eux pour un mélanome chez la souris à 1,5 T que les animaux ayant reçu les nanoparticules fonctionnalisées présentent 30 minutes après injection un rehaussement de signal dans la tumeur significativement plus élevé que le rehaussement fourni par les particules non fonctionnalisées, mais également que les nanoparticules non fonctionnalisées conduisent à une augmentation du contraste équivalente à la moitié de l'augmentation fournie par les nanoparticules fonctionnalisées [Schmieder 2005]. Les auteurs attribuent ce rehaussement de signal non spécifique à l'extrême perméabilité des néo-vaisseaux, permettant l'extravasation transitoire des nanoparticules dans le tissu tumoral.

Précisons que dans notre cas les conditions expérimentales sont différentes, puisque les nanoparticules sont en théorie confinées dans l'espace vasculaire du fait de la présence de la BHE dans le cerveau. Nous avons certes indiqué au chapitre II qu'elle était largement déficiente au niveau des tumeurs, mais nous utilisons toutefois ici des particules de taille 190 nm (cf. partie suivante), probablement trop grosses pour être extravasées.

Si l'on considère ce phénomène écarté, il faut néanmoins garder à l'esprit que des liaisons non spécifiques peuvent intervenir : les nanoparticules peuvent être captées par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  malgré l'absence de RGD à leur surface, aussi bien que par d'autres récepteurs présents dans les néo-vaisseaux pour lesquels elles peuvent présenter une affinité

inattendue (cette dernière assertion pouvant également s'appliquer aux nanoparticules fonctionnalisées). Par ailleurs, nous avons évoqué au chapitre précédent les contraintes observées par certaines études pour éviter la pollution du signal par celui des nanoparticules circulantes. Nous avons montré que notre séquence était très peu sensible au signal sanguin dans l'abdomen chez l'animal sain. Le contexte est ici tout autre puisque nous nous concentrons sur un tissu malade dans le cerveau, présentant une vascularisation totalement atypique : le sang peut donc constituer une autre source de signal non spécifique.

L'objectif de notre étude étant de détecter de manière spécifique la présence d' $\alpha_v\beta_3$ , les expériences sont donc menées sur deux groupes d'animaux, les premiers recevant une émulsion de PFOB fonctionnalisée, les seconds une émulsion non fonctionnalisée. Les concentrations en nanoparticules seront suivies dans la tumeur juste après injection. La comparaison des résultats permettra de déterminer l'efficacité avec laquelle nous pouvons mettre en évidence l'angiogenèse tumorale.

## **V.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

### **V.2.1. Modèle animal**

Les animaux utilisés pour cette étude sont des souris « nude » (Janvier, France). Il s'agit d'animaux immunodéprimés car naturellement dépourvus de thymus. Cette différence se traduit chez ces souris par une absence de lymphocytes T, principaux responsables des rejets de greffe.

Le modèle de tumeur choisi est le modèle glioblastome humain U87-MG. La lignée de cellules U87 a été cultivée à NeuroSpin. Lorsque les cellules sont en nombre suffisant, les souris sont anesthésiées par une injection IP de kétamine/xylazine. Le crâne est percé en des coordonnées précises au niveau de l'hémisphère droit du cerveau, et environ 120 000 cellules sont injectées dans le parenchyme cérébral via une seringue Hamilton. Le trou est fermé par de la cire à os pour éviter des excroissances de la tumeur en dehors du crâne et les animaux sont placés en couveuse jusqu'à leur réveil. La croissance de la tumeur est surveillée par IRM. L'angiogenèse ne se développe qu'à partir d'une taille de tumeur de 2 millimètres [Folkman 1971], ce qui implique un délai minimal de 2 semaines avant de pouvoir utiliser l'animal pour notre étude.

### **V.2.2. Emulsions injectées**

Comme expliqué dans l'introduction, le but de notre étude est de détecter la présence de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , et ce de manière spécifique. Deux émulsions de PFOB ont donc été synthétisées.

La première émulsion, fonctionnalisée, comprend 40% en masse de PFOB (concentration en nanoparticules ~90 nM) et 5% de PEG 2000 en concentration. D'après les résultats du chapitre précédent, cette proportion de PEG permet un temps de demi-vie dans le

sang des nanoparticules suffisant pour qu'elles se fixent aux récepteurs  $\alpha_v\beta_3$  avant d'être captées par le foie et la rate (> 1 h 30). On incorpore d'autre part de la rhodamine à cette émulsion afin de réaliser après imagerie une microscopie de fluorescence sur des coupes histologiques de cerveau. La fonctionnalisation des nanoparticules est obtenue par greffage de peptides RGD à l'extrémité des PEG 2000 (voir Figure V.1). Leur affinité  $IC_{50}$  (Concentration Inhibitrice 50 : concentration nécessaire pour occuper 50% des récepteurs), mesurée *in vitro* par un test de compétition sur cellules endothéliales HUVEC, est excellente puisqu'elle est inférieure au nanomolaire. Cette émulsion sera appelée émulsion RGD dans la suite.

La seconde émulsion est non fonctionnalisée : sa composition est identique à celle de l'émulsion précédente, à la différence que l'on n'incorpore pas de RGD. Cette émulsion sera désignée dans la suite comme l'émulsion contrôle.

Des mesures de taille après synthèse indiquent que les nanoparticules mesurent environ 190 nm dans les deux cas.

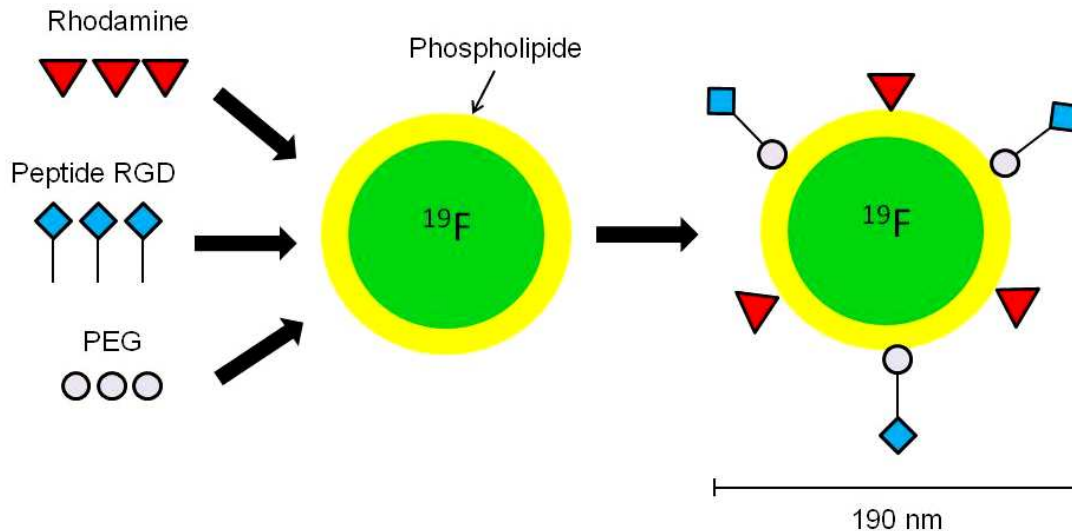


Figure V.1. Schéma d'une nanoparticule d'émulsion fonctionnalisée : elle comprend un cœur de PFOB emprisonné sous une couche de phospholipides, et on incorpore à sa surface du PEG pour la furtivité vis-à-vis du système immunitaire, de la rhodamine pour la microscopie de fluorescence postérieure à l'imagerie, et des peptides RGD pour le ciblage spécifique de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . L'émulsion contrôle ne comporte pas les peptides RGD.

### V.2.3. Mise en œuvre

L'étude a été menée sur 26 souris au total, de masse 25 à 30 grammes. Deux à trois semaines après induction de la tumeur par l'injection intracérébrale de cellules U87, les animaux sont anesthésiés par injection IP du mélange kétamine/domitor. Un cathéter est inséré dans une des veines de la queue. La tête de l'animal est placée dans l'antenne tête présentée au préambule, avec une référence d'émulsion diluée au  $1/10^{\text{ème}}$  (~30  $\mu\text{L}$  concentrée à 9 nM en nanoparticules). Les souris sont maintenues à 37°C grâce au système d'air chaud présenté au chapitre précédent.

## Chapitre V – Imagerie de l'angiogenèse tumorale dans un modèle souris de glioblastome par une émulsion de PFOB fonctionnalisée

Une image anatomique  $^1\text{H}$  est tout d'abord acquise avec une séquence multi-coupe multi-échocs et avec les paramètres suivants : TE = 8 ms, TR = 2500 ms, 12 échocs, 9 coupes coronales d'épaisseur 0,7 mm, champ de vue de  $32 \times 32 \text{ mm}^2$  couvert par une matrice  $128 \times 128$  pixels. Cette image permet la mesure de la taille de la tumeur.

On administre ensuite aux animaux grâce au cathéter implanté un bolus de 200  $\mu\text{L}$  de l'émulsion RGD ou de l'émulsion contrôle. Au total, 14 souris reçoivent l'émulsion RGD (taille des tumeurs  $4.4 \pm 1.2 \text{ mm}$ ), et 12 souris reçoivent l'émulsion contrôle (taille des tumeurs  $3.8 \pm 1.5 \text{ mm}$ ). Aussitôt après, les acquisitions  $^{19}\text{F}$  sont lancées avec notre séquence MES. Les paramètres choisis sont TE = 15,5 ms, TR = 4000 ms, 60 échocs, un champ de vue  $32 \times 32 \text{ mm}^2$  couvert par une matrice  $64 \times 64$  pixels, et une coupe coronale unique de 6 mm englobant le cerveau. Une image est acquise toutes les 4 minutes 30, et le suivi se fait sur 90 minutes (total 20 acquisitions).

Les animaux sont euthanasiés après imagerie par dislocation cervicale. Les cerveaux sont prélevés avec ou sans exsanguination préalable de l'animal par injection intracardiaque de paraformaldéhyde (PFA), et placés 24 heures dans du PFA à 4% pour fixation des tissus. Les cerveaux fixés sont ensuite plongés 12 heures dans un bain de sucrose à 15%, et 24 heures dans un bain de sucrose à 30% avant d'être congelés à  $-80^\circ\text{C}$ . Un marquage CD31 permettant la mise en évidence des cellules endothéliales (vaisseaux sanguins) est effectué sur une partie des cerveaux. L'imagerie de fluorescence (rhodamine et CD31) est réalisée avec un microscope Carl Zeiss sur des coupes histologiques d'épaisseur 20  $\mu\text{m}$ .

### V.2.4. Traitement de données

Les images sont reconstruites avec Matlab. Pour les acquisitions  $^{19}\text{F}$ , les images sont sommées en complexe par groupe de 4 afin de réduire le bruit, ce qui permet d'avoir une donnée toutes les 18 minutes. Le signal moyen est mesuré à chaque pas de temps (18, 36, 54, 72 et 90 minutes après injection) sur l'ensemble des pixels de la tumeur (coordonnées obtenues via l'image anatomique) ainsi que dans une région d'intérêt de même taille dans la zone controlatérale. Par souci de précision, le signal du bruit, obtenu par mesure dans les coins de l'image, est soustrait. Le signal obtenu est ensuite comparé au signal de la référence d'émulsion afin d'évaluer les concentrations en nanoparticules dans les deux zones.

Comme au chapitre précédent, les concentrations obtenues doivent être corrigées dans la mesure où le  $T_1$  du PFOB n'est pas le même dans les tissus et dans la référence d'émulsion, leur oxygénation étant différente. Nous avons considéré que la pression partielle d'oxygène dans les vaisseaux irriguant le cerveau et la tumeur était celle du sang. Duong et al rapportent chez le rat une fraction volumique de sang artériel égale à 29% du volume sanguin cérébral total [Duong 2000] et, compte-tenu des valeurs de  $p\text{O}_2$  des sangs artériel et veineux (respectivement 160 mmHg et 60 mmHg), la valeur moyenne de la  $p\text{O}_2$  du sang dans le cerveau est proche de 85 mmHg. Nous avons considéré que cette valeur de  $p\text{O}_2$  était applicable pour le sang irriguant le cerveau et la tumeur chez la souris. Le  $T_1$  du PFOB dans ces conditions a donc été calculé avec la formule <II-1>, et les concentrations ont été ré-estimées en conséquence.

Ces corrections effectuées, la moyenne et l'écart-type sont calculés pour chaque pas de temps et sur l'ensemble de la cohorte dans chaque groupe d'animaux (RGD et contrôle). Le test statistique utilisé pour comparer les concentrations trouvées est un test de Wilcoxon bilatéral [Wilcoxon 1945]. Ce test a été choisi en raison de l'absence d'hypothèses vérifiables sur la distribution des valeurs. Par ailleurs, ce test, connu pour sa sensibilité et sa spécificité, est particulièrement robuste lorsque l'on compare des données présentant une grande variabilité, comme c'était le cas au chapitre précédent.

### V.3. RESULTATS

#### V.3.1. Imagerie $^{19}\text{F}$

Sur les 26 souris utilisées pour notre étude, 20 présentent un signal  $^{19}\text{F}$  au niveau de la tumeur. Parmi elles, 11 souris ont reçu l'émulsion RGD et 9 ont reçu l'émulsion contrôle. Les souris ne présentant aucun signal ont toutes des tumeurs de petite taille (diamètre inférieur à 3 mm). Par ailleurs, les 26 animaux injectés présentent un signal relativement intense à l'arrière des yeux (cf. Figure V.2)

Pour les animaux présentant un signal, le RSB obtenu dans la tumeur en sommant l'ensemble des acquisitions compris entre 4 et 15, et le RSB dans la zone controlatérale est proche de 2. La figure V.2 présente une image  $^{19}\text{F}$  brute ainsi que cette même image superposée à une image anatomique. On constate notamment sur cette image un signal inhomogène au sein de la tumeur, et une quasi-absence de signal dans le reste du cerveau. On remarquera la présence du signal à l'arrière des yeux de l'animal évoqué au paragraphe précédent.

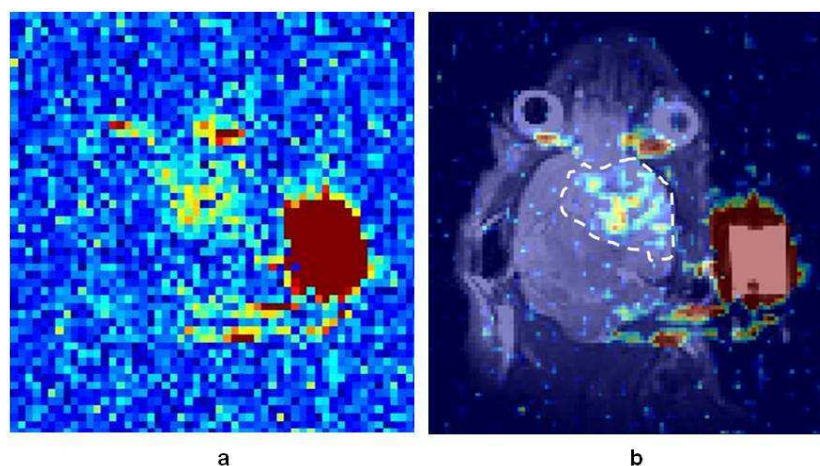


Figure V.2. Image  $^{19}\text{F}$  brute (a) et superposition de la même image lissée sur l'image anatomique  $^1\text{H}$  (b) pour une souris injectée avec l'émulsion RGD. On distingue nettement du signal au niveau de la tumeur (délimitée en blanc), et également à l'arrière des yeux de l'animal. Le signal observé dans le reste du cerveau est très faible. Le gros spot rouge visible à droite est la référence d'émulsion placée dans l'antenne pour la calibration du signal (superposition effectuée avec le logiciel BrainVISA/Anatomist développé à NeuroSpin).



Le but étant de voir s’il existe une différence dans la tumeur entre animaux du groupe RGD et animaux du groupe contrôle, les tests statistiques ont été réalisés sur les 20 animaux présentant un signal dans la tumeur. Les tailles de tumeur (moyenne  $\pm$  écart-type) sont respectivement  $4,9 \pm 0,7$  mm pour le groupe RGD et  $4,5 \pm 0,9$  mm pour le groupe contrôle. Les figures V.3.a et V.3.b comparent les deux groupes d’animaux par les concentrations relevées dans la tumeur (a) d’une part et dans la zone controlatérale d’autre part (b).

Pour le groupe RGD et dans la tumeur, la concentration en nanoparticules fluctue autour d’une valeur moyenne dans le temps de 95 pM. Cette concentration est plus faible pour le groupe contrôle, avec une valeur moyenne dans le temps de 66 pM. Dans la zone controlatérale, la concentration moyenne pour le groupe RGD est de 14 pM, tandis qu’elle est de 16 pM pour le groupe contrôle. Ces concentrations sont relativement faibles en raison d’un effet de volume partiel important, les voxels étant grands ( $0,5 \times 0,5 \times 6$  mm<sup>3</sup>) par rapport au volume occupé par les vaisseaux.

On remarque par ailleurs des écarts-types très élevés pour les valeurs de concentration relevées aux différents pas de temps. Ces écarts-types, presque aussi importants que la valeur de la moyenne pour certains points, sont dus à une extrême variabilité des concentrations trouvées dans les groupes d’animaux. Cette remarque est valable autant pour les groupes d’animaux ayant reçu l’émulsion RGD que pour les animaux ayant reçu l’émulsion contrôle, et à la fois dans la tumeur et la zone controlatérale.

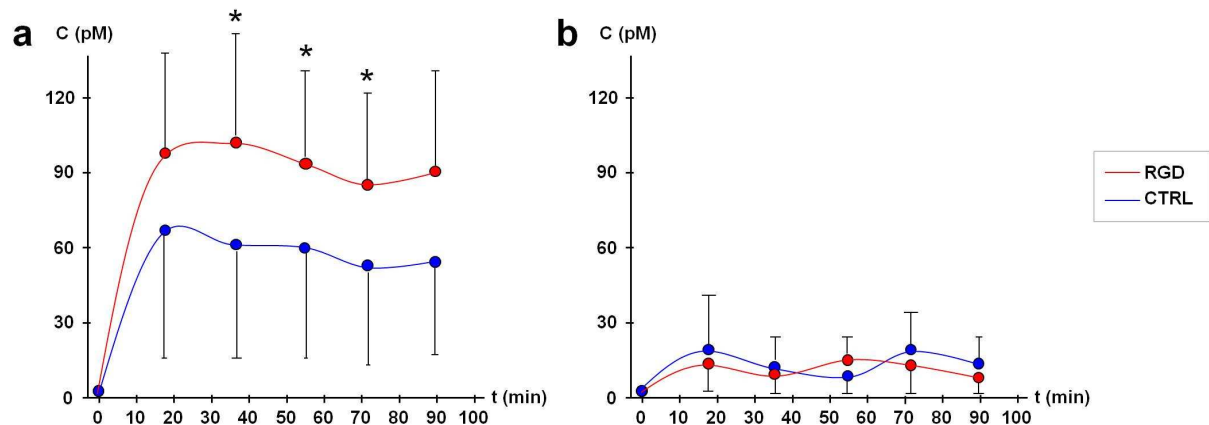


Figure V.3. Comparaison des concentrations en nanoparticules trouvées pour les groupes RGD et contrôle («CTRL») dans la tumeur (a) et la zone controlatérale (b). Le groupe RGD comprend 11 animaux, et le groupe contrôle, 9 animaux. Les différences de concentration significatives (test de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) sont indiquées aux pas de temps par un astérisque (\*).

Malgré les écarts-types élevés, les tests statistiques indiquent que la concentration dans la tumeur est significativement différente aux temps 36, 54 et 72 minutes après injection entre les animaux ayant reçu l’émulsion RGD et ceux ayant reçu l’émulsion contrôle (Figure V.3.a). En revanche, aucune distinction ne peut être faite entre les concentrations trouvées dans les zones controlatérales (Figure V.3.b).

### V.3.2. Histologie

Les résultats d'histologie présentés ont été obtenus sur des animaux ayant reçu l'émulsion RGD. La figure V.4.a présente la microscopie de fluorescence réalisée sur une coupe du cerveau de la souris présentée figure V.2. L'animal n'ayant pas été perfusé, un signal intense est observé dans la tumeur et sur sa périphérie, provenant probablement à la fois de particules liées aux récepteurs  $\alpha_v\beta_3$  et de particules non liées présentes dans le sang. La distribution de signal hétérogène est proche de celle observée sur la figure V.2, on distingue notamment les larges vaisseaux tortueux irriguant le tissu tumoral. A l'inverse, le signal se dégageant du cerveau sain est très faible.

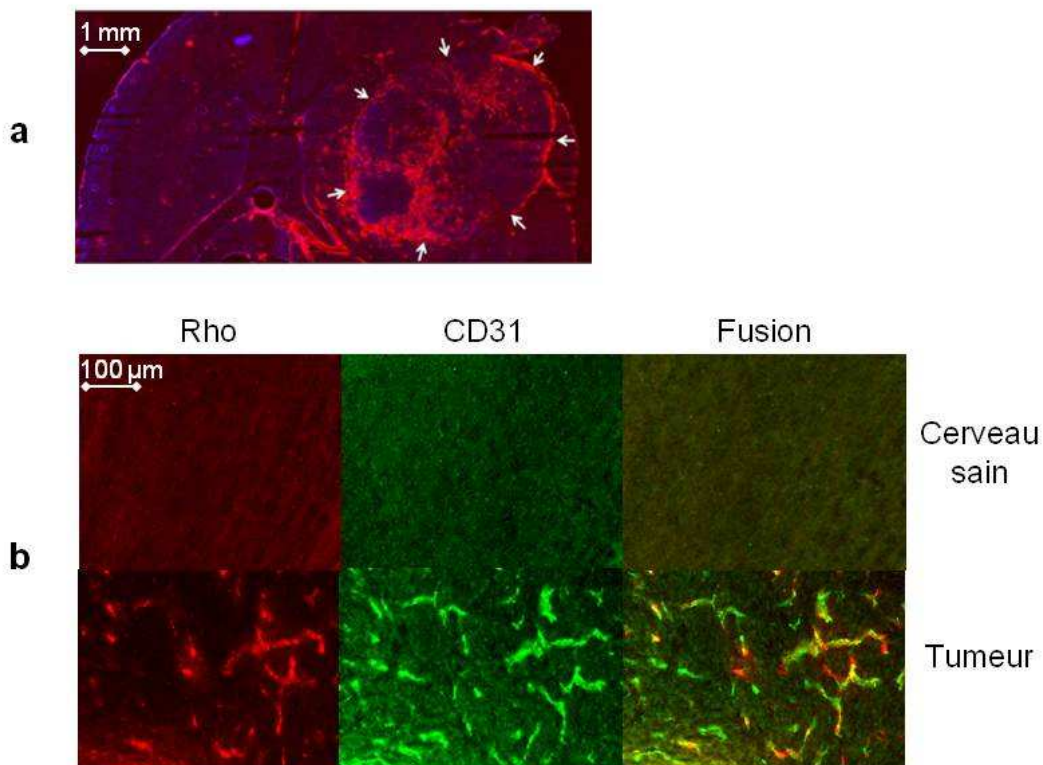


Figure V.4. Microscopies de fluorescence réalisées sur des souris ayant reçu l'émulsion RGD. (a) Coupe du cerveau présentée à la figure V.3 (non perfusé). Alors qu'un signal faible émane du cerveau sain, un signal intense est visible dans la tumeur (délimitée par les flèches blanches), attestant d'une quantité de nanoparticules importante dans les vaisseaux sanguins du tissu tumoral. (b) Signal rhodamine (Rho) et signal CD31 montrant la vascularisation importante du tissu tumoral par rapport au cerveau sain, et la présence de rhodamine dans les vaisseaux en dépit de la perfusion de l'animal.

La figure V.4.b présente, pour un animal perfusé cette fois, la microscopie de fluorescence réalisée en rhodamine et pour le marquage CD31, ainsi que la fusion des 2 images. La vascularisation du tissu tumoral, très importante et anarchique, contraste avec celle du cerveau sain, presque indécélable (marquage CD31). Par ailleurs, on constate que malgré

l'exsanguination de l'animal, des quantités remarquables de rhodamine (Rho) subsistent. Ce signal rhodamine est bien colocalisé avec le signal CD31 sur l'image de fusion.

#### **V.4. DISCUSSION**

##### **V.4.1. Sur l'influence de la taille de la tumeur sur le signal observé**

D'après les résultats, les tumeurs de petite taille semblent ne pas permettre la détection de signal  $^{19}\text{F}$ . La taille de ces tumeurs variait de 1,5 à 2,5 mm. Ces résultats sont en accord avec les études faisant état du déclenchement de l'angiogenèse pour les tumeurs dont la taille atteint 2 mm. L'absence de signal se comprend immédiatement pour les tumeurs dont le diamètre est compris entre 1,5 et 2 mm, puisque ces dernières n'ont pas encore développé leur propre réseau vasculaire. Pour les tumeurs de diamètre compris entre 2 et 2,5 mm, l'absence de signal est probablement due un développement vasculaire encore minime, impliquant une faible perfusion sanguine du tissu tumoral. Il n'est pas exclu que des nanoparticules fonctionnalisées aient pu se fixer sur les récepteurs  $\alpha_v\beta_3$ , toutefois ce phénomène a vraisemblablement engendré un signal trop ténu pour être détecté.

Par ailleurs, nous avons indiqué que les tailles de tumeur n'étaient pas exactement les mêmes pour les deux groupes comparés ( $4,9 \pm 0,7$  mm pour le groupe RGD et  $4,5 \pm 0,9$  mm pour le groupe contrôle). On peut supposer que ce phénomène a une influence sur les différences de concentrations trouvées dans les tumeurs entre groupes contrôle et RGD, puisque dans le groupe RGD les tumeurs occupent en moyenne une proportion plus importante de la coupe. La figure V.5 montre les concentrations moyennes dans le temps trouvées dans les différentes tumeurs en fonction de leur taille, pour le groupe RGD (rouge) et le groupe contrôle (bleu). Le coefficient de corrélation calculé est de 0,4, indiquant que le lien entre taille de la tumeur et concentration en nanoparticules est limité. Ce résultat peut paraître surprenant dans la mesure où la croissance de la tumeur passe par un développement de plus en plus important de l'angiogenèse. Toutefois, cette croissance s'accompagne également de nécrose dans le centre de la tumeur, limitant la perfusion en sang, et donc la présence de signal  $^{19}\text{F}$  dans cette zone : les tumeurs les plus grosses ne sont donc pas systématiquement celles où l'on retrouve le plus de signal (on rappelle que la concentration en nanoparticules est moyennée sur l'ensemble des pixels de la tumeur). Par ailleurs, un autre point déjà mentionné est à prendre en compte : il existe une variabilité importante d'une tumeur à l'autre, ne dépendant pas uniquement de sa taille mais aussi de son « schéma » de vascularisation, etc.

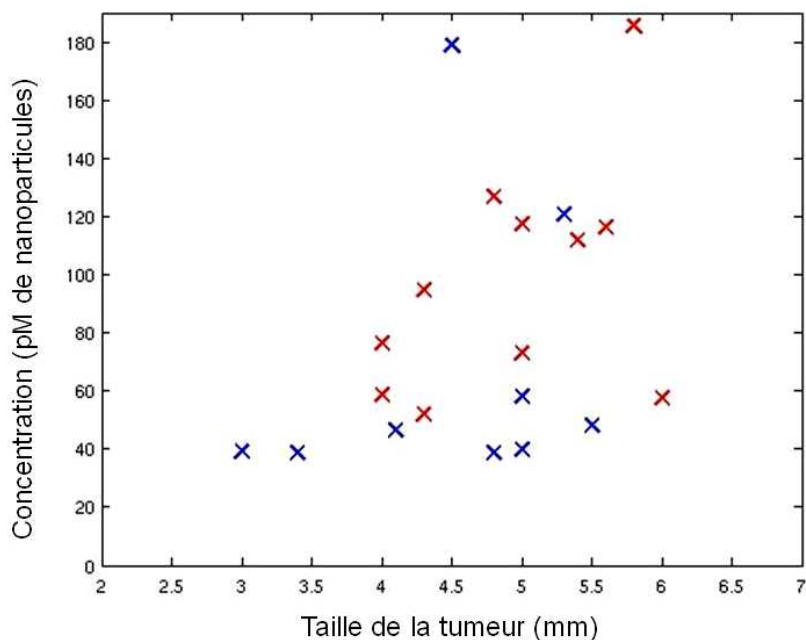


Figure V.5. Concentrations moyennes (sur la région d'intérêt et dans le temps) trouvées dans les tumeurs en fonction de leur taille (en rouge : tumeurs du groupe RGD, en bleu : tumeurs du groupe contrôle). Le coefficient de corrélation est de 0,4.

#### V.4.2. Sur l'origine du signal observé

Nous avons évoqué dans l'introduction la possibilité que le signal détecté chez les animaux ayant reçu l'émulsion RGD puisse être en partie d'origine non spécifique, du fait de liaisons des nanoparticules avec des récepteurs autres que l' $\alpha_v\beta_3$ , ou de la présence des particules non liées dans le sang. Cette hypothèse semble s'avérer exacte, puisqu'on retrouve un signal non négligeable dans les tumeurs des animaux ayant reçu l'émulsion contrôle, bien que les concentrations soient en moyenne plus faibles.

Il est probable que le signal non spécifique soit en majeure partie d'origine vasculaire. Comme évoqué au chapitre II, les glioblastomes présentent des perfusions médiocres du fait du réseau sanguin anarchique qui les irrigue. Les capillaires sont certes très nombreux en périphérie, mais également très tortueux, dénués en certains endroits de gradients de pression, et comportent des occlusions. Ces anomalies sont responsables d'un ralentissement important du flux sanguin au sein de la tumeur, voire localement de son annulation [Baish 2000]. Notre séquence MES a démontré dans le chapitre précédent sa faible sensibilité au signal vasculaire dans un tissu sain et pour un flux sanguin « normal ». Cette faible sensibilité a été expliquée d'une part dans la direction transverse à la coupe par des phénomènes de sortie de coupe, et d'autre part dans la direction de la coupe par un moyennage incohérent des 60 échos, les spins circulants acquérant des phases différentes au cours du train d'échos. Le phénomène de sortie de coupe est inexistant pour la présente étude, puisque le cerveau tout entier est inclus dans la coupe, la perte de signal est donc nulle dans la direction transversale. Par ailleurs, il est probable que les déphasages subis par les spins soient ici limités, dans la mesure où les flux sanguins au sein de la tumeur ne sont pas comparables à ceux des tissus sains car très ralentis.

La somme des échos n’est alors pas incohérente, et les nanoparticules présentes dans le sang deviennent en conséquence une source de signal notable. Il s’agit vraisemblablement de l’effet ayant la plus grande incidence sur la présence du signal vasculaire, puisque le cerveau sain, normalement perfusé, fournit un signal quasiment imperceptible (cf. Figure V.2). Par ailleurs, mentionnons que les disparités sont grandes au sein du groupe contrôle, suggérant que suivant le schéma de vascularisation de la tumeur, les concentrations provenant du signal vasculaire peuvent varier entre 40 et 180 pM (cf. Figure V.5). Il s’agit ici de concentrations « virtuelles », dépendant de la vascularisation et des flux sanguins au sein de la tumeur.

Reste la présence du signal intense observé derrière les yeux, dont l’origine s’explique par la physiologie de la souris. Ces dernières possèdent à cet endroit une cavité remplie de sang, appelée sinus rétro-orbitaire. Cette réserve est parfois utilisée pour des injections IV ou des prélèvements sanguins. En dépit du flux, il est probable que les nanoparticules injectées y restent stockées de façon transitoire. Leur déplacement étant restreint, les déphasages des spins sont faibles au cours du train d’échos, et le signal émis est donc important. Il a été observé que le signal provenant des sinus rétro-orbitaires est décroissant au cours du temps (Figure V.6), attestant de la baisse de la quantité de nanoparticules dans le sang du fait de leur captage progressif par le foie et la rate.

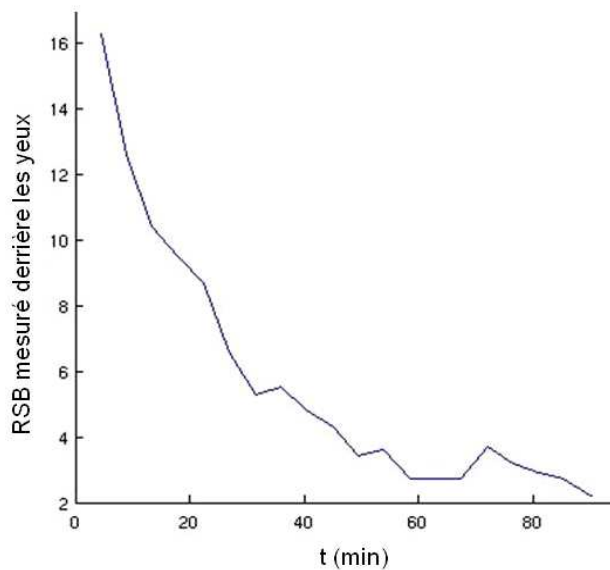


Figure V.6. Exemple de RSB mesuré au cours du temps derrière les yeux d’un animal. On note une décroissance rapide pendant la première moitié de l’expérience, puis nettement plus lente.

#### V.4.3. Sur les résultats des tests statistiques

La présence d’un signal vasculaire important dans la tumeur complique la distinction entre les groupes RGD et contrôle. Cependant, comme illustré par la figure V.3, les tests de Wilcoxon tendent à montrer une différence de concentration entre les deux groupes. Malgré les écarts-types élevés, cette distinction est probablement imputable à des distributions différentes des valeurs de concentration au sein des groupes. En effet, pour les souris RGD la

concentration en nanoparticules médiane calculée dans la cohorte et dans le temps est de 94 pM (proche de la moyenne temporelle 95 pM), alors que la médiane pour les souris contrôle est de 46 pM (moyenne temporelle 66 pM). La différence de distribution se constate avec la figure V.5 : on note que la majorité des concentrations pour le groupe contrôle se situe autour de 50 pM, alors que la répartition des valeurs est plus large pour le groupe RGD.

Les différences de concentration ne sont cependant pas significatives au temps  $t = 18$  minutes et  $t = 90$  minutes après injection (p-valeurs respectives de 0,11 et 0,09). Ces résultats peuvent être interprétés de deux manières différentes.

La différence peut ne pas être significative 18 minutes après injection en raison d'un nombre encore faible de nanoparticules fonctionnalisées liées à l' $\alpha_v\beta_3$  : le signal d'origine vasculaire représente la part la plus importante du signal total. Les nanoparticules se lient progressivement à l' $\alpha_v\beta_3$ , et la différence devient significative aux temps suivants. Toutefois, 90 minutes après injection, on peut supposer que certaines nanoparticules liées commencent à se décrocher ou à se dégrader, et le signal vasculaire reprend l'ascendant sur le signal total.

D'autre part, les écarts-types élevés peuvent être mis en cause. Ils sont le résultat de concentrations hétérogènes au sein des deux groupes (la moyenne sur les cohortes et le temps est donnée Figure V.5). Les p-valeurs des temps significatifs sont relativement proches du seuil de 5% (p-valeurs 0,040, 0,048 et 0,036 pour les temps 36, 54 et 72 minutes), et il peut être supposé que l'hétérogénéité des concentrations aux temps 18 et 90 minutes, légèrement plus élevée qu'aux temps significatifs, puisse être responsable du dépassement du seuil de 5%.

Le but de notre étude est de savoir s'il est possible de distinguer les deux groupes d'animaux avec notre protocole expérimental, et également à partir de quel temps. Nous avons évalué jusqu'ici les données toutes les 18 minutes. Une autre façon de procéder consiste à regarder l'aire sous la courbe V.3.a aux pas de temps successifs pour chaque animal, et de regarder la moyenne et l'écart-type sur chaque groupe. Les résultats sont présentés sur la figure V.7. On voit nettement les écarts entre groupes RGD (en rouge) et contrôle (en bleu) se creuser lorsque les acquisitions s'accumulent. Les écarts-types restent élevés, mais les différences entre groupe RGD et contrôle sont significatives à partir de 36 minutes après injection (test de Wilcoxon bilatéral,  $p < 0,05$ ).

Concrètement, cette méthode sous-entend que notre protocole expérimental peut être envisagé différemment : plutôt que d'évaluer une dynamique de concentration en chiffrant cette dernière toutes les 18 minutes, différencier les groupes RGD et contrôle peut être fait en accumulant des images pendant un temps minimum de 36 minutes. Cette distinction est réalisable probablement grâce à un RSB plus important, marquant une différence plus nette entre les deux groupes.

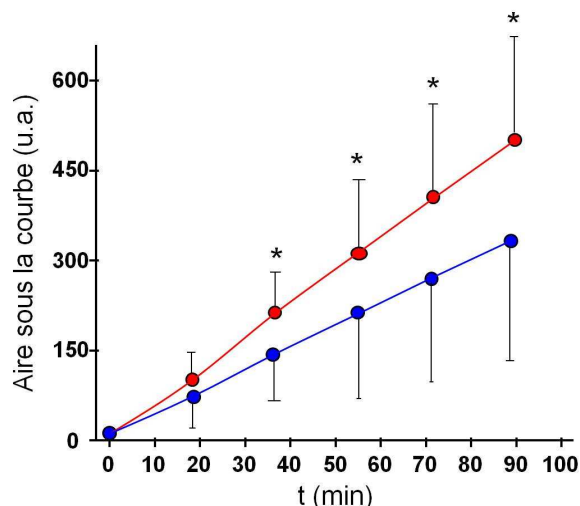


Figure V.7. Aire sous la courbe V.3.a pour chaque groupe d'animaux (rouge : RGD, bleu : contrôle). Les différences de concentration sont significatives à partir de 36 minutes après injection.

Les écarts-types importants restent cependant un point qu'il serait souhaitable d'améliorer. En observant les données de chaque animal, nous avons pu constater qu'il n'y avait pas que les concentrations hétérogènes qui étaient à l'origine de la taille des écarts-types, mais également des comportements atypiques au sein des groupes d'animaux. Nous avons jugé intéressant de retraiter les données sur des groupes d'animaux au comportement plus homogène. Cette méthode suppose une baisse de l'effectif au sein de chaque groupe, et donc une baisse de la puissance des tests statistiques potentiellement délétère, mais cet inconvénient peut être largement compensé si les données sont uniformisées. Des critères ont donc été établis pour opérer un tri sur les animaux.

Le premier critère a été le comportement de la concentration dans la tumeur au cours du temps. Pour une majorité d'animaux, la concentration atteint un maximum aux temps 18 minutes ou 36 minutes, puis diminue progressivement (cf. Figure V.8.a). Cette diminution est probablement le résultat de la baisse de la quantité de nanoparticules dans le sang, captées par le foie et la rate, réduisant peu à peu la part de signal vasculaire. Néanmoins, une partie des animaux présentent une remontée de signal non négligeable sur un ou deux points aux temps 72 ou 90 minutes après injection (cf. Figure V.8.b). Nous avons considéré ces remontées comme des métaboliseurs anormaux, et cinq animaux ont été exclus en conséquence.

Le second critère choisi a été celui de la qualité du RSB. Nous avons effectivement pu constater que pour certains animaux, le RSB mesuré dans la référence d'émulsion était bien plus faible que la moyenne des RSB mesurée sur l'ensemble des animaux (réduit jusqu'à un facteur 2). Cette diminution sous-entendait une baisse de la qualité des acquisitions, deux autres animaux ont été exclus.

Par ailleurs, le dernier critère a été celui du début du temps d'acquisition. Une des souris utilisée pour l'étude ayant été imagée 2 heures après injection, cette dernière a été écartée.

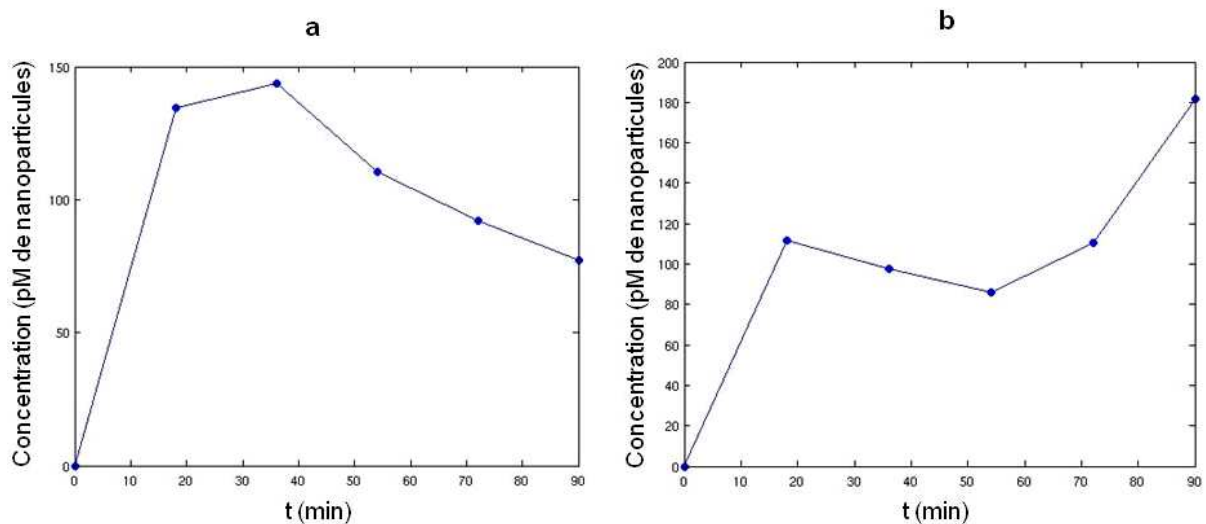


Figure V.8. (a) Exemple de comportement retrouvé le plus souvent chez les animaux : le maximum de concentration dans la tumeur est atteint dans les premiers temps de l'expérience, puis elle diminue progressivement. (b) Exemple de comportement atypique retrouvé chez certains animaux : alors que la concentration a amorcé une baisse, elle remonte de façon inexplicable aux temps 72 et 90 minutes après injection (problème d'acquisition ? hémorragie ?), dépassant la valeur initiale.

Une nouvelle étude a donc été réalisée sur 12 animaux, également répartis sur les groupes RGD et contrôle (6 animaux RGD, 6 animaux contrôle). La taille des tumeurs dans le groupe RGD est  $5,0 \pm 0,7$  mm et dans le groupe contrôle  $4,7 \pm 0,8$  mm. La figure V.9 illustre les nouveaux résultats obtenus. On note toujours une concentration plus élevée dans la tumeur avec l'émulsion fonctionnalisée, et les écarts-types ont été réduits. Les différences sont significatives à tous les temps, sauf 54 minutes après injection. Ce nouveau comportement diffère de celui trouvé sur les 20 animaux, où les temps 18 et 90 minutes après injection ne pouvaient être distingués. Homogénéiser le comportement nous informe que les différences significatives peuvent être observées dès le premier point et également en fin d'expérience, mais cette méthode suggère aussi que l'hétérogénéité des concentrations trouvées au sein des groupes d'animaux restent le principal problème en conduisant à des points parfois non significatifs (p-valeur 0,09 à 54 minutes après injection).

Dans ce contexte, un certain nombre de points seraient à améliorer dans notre étude, en particulier augmenter le nombre d'animaux pour obtenir une plus grande puissance statistique et réduire les écarts-types dus à une variabilité inter-animale importante. Il existe également des limitations par rapport au modèle utilisé pour traiter les données. Les concentrations ont été effectivement moyennées sur tous les voxels de la tumeur, alors qu'il est admis qu'il s'agit d'un milieu très hétérogène en termes de vascularisation : la moyenne constitue ici un estimateur biaisé.



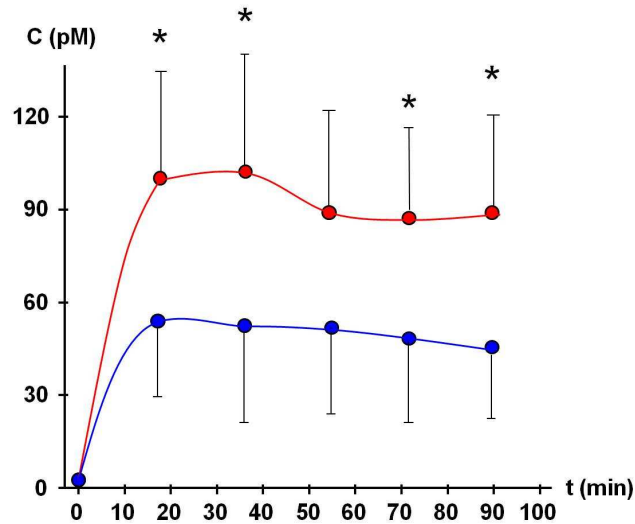


Figure V.9. Concentrations trouvées après tri sur les animaux (6 RGD en rouge, 6 contrôle en bleu). On constate une baisse des écarts-types du fait de l'homogénéisation des comportements dans le temps. La différence entre les deux groupes n'est cependant pas significative 54 minutes après injection.

Rappelons néanmoins que notre étude sur l'angiogenèse tumorale a été menée dans le cadre d'une preuve de concept. Nos différents traitements démontrent que l'utilisation de nanoparticules fonctionnalisées conduit à des concentrations plus élevées dans la tumeur que lors de l'utilisation de particules nues, en faveur d'une liaison spécifique des nanoparticules fonctionnalisées avec l' $\alpha_v\beta_3$ .

#### V.4.4. Sur les résultats d'histologie

Après toutes ces conclusions sur la partie IRM, revenons à l'histologie afin de dresser un parallèle avec l'imagerie  $^{19}\text{F}$ . Les résultats méritant une discussion sont surtout ceux de la figure V.4.b. L'image de fusion indique que des traces d'émulsion subsistent dans les vaisseaux de la tumeur, malgré la perfusion de l'animal. Cette information est rassurante puisqu'elle montre que des nanoparticules fonctionnalisées se sont liées. Toutefois, nous ne pouvons à ce stade prétendre qu'il s'agit d'une liaison avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , dans la mesure où le marquage  $\alpha_v\beta_3$  n'a pas pu être effectué pour vérifier la colocalisation des deux signaux. Il n'est donc pas exclu que certaines des nanoparticules soient liées ici de façon non spécifique à un récepteur quelconque. D'autre part, ajoutons que nous ne disposons pas des données pour les animaux ayant reçu l'émulsion contrôle, et que toute conclusion ne serait envisageable qu'après avoir confronté les deux cas.

Ces résultats restent néanmoins encourageants. Rappelons que l'affinité pour l' $\alpha_v\beta_3$  des nanoparticules fonctionnalisées est excellente, et qu'il est donc recevable de supposer qu'une large part du signal rhodamine observé provient du ciblage spécifique avec l' $\alpha_v\beta_3$ . Ces résultats tendent donc à corroborer ceux de la partie imagerie.

## V.5. CONCLUSION

Ce chapitre a montré que nous étions en mesure de détecter de faibles concentrations en nanoparticules (50-100 pM) dans un modèle de glioblastome chez la souris. La détection spécifique de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a été compliquée par un signal vasculaire important, nuisible à la distinction entre les souris ayant reçu l'émulsion RGD et les souris ayant reçu l'émulsion contrôle. Ce signal sanguin, dépendant du schéma vasculaire de chaque tumeur, est sans doute responsable des concentrations hétérogènes trouvées au sein des groupes d'animaux. Malgré les écarts-types importants qui en résultent, nos traitements convergent vers une différence significative entre les groupes RGD et contrôle, suggérant la liaison spécifique des nanoparticules fonctionnalisées avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Les résultats d'histologie, bien qu'incomplets, semblent confirmer ce constat.

Cette étude indique la faisabilité de mettre en évidence l'angiogenèse tumorale du glioblastome en l'IRM du  $^{19}\text{F}$ , grâce à des nanoparticules de PFOB fonctionnalisées. De nouvelles perspectives sont ouvertes par ces résultats, notamment la délivrance directement à la cible de molécules anti-angiogéniques, prometteuse pour la thérapie du cancer, et permettant par la même occasion de contrôler l'efficacité du traitement par imagerie.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de posters à l'ISMRM 2011 à Montréal (Canada) ainsi qu'à la conférence WMIC 2011 (World Molecular Imaging Congress) à San Diego (Californie, Etats-Unis).

Chapitre V – Imagerie de l'angiogenèse tumorale dans un modèle souris de glioblastome par  
une émulsion de PFOB fonctionnalisée

## **CHAPITRE VI**

**Perspectives : spectroscopie de diffusion d'une émulsion de PFOB**



## **VI.1. INTRODUCTION : FINALITE D'UNE SEQUENCE DE SPECTROSCOPIE PONDEREE EN DIFFUSION**

Nous abordons dans ce chapitre un travail encore en cours, dont le but est la détection des nanoparticules de PFOB par une autre stratégie d'acquisition : celle de la spectroscopie monovoxel pondérée en diffusion.

Nous avons montré au chapitre précédent que les mesures de concentration en nanoparticules liées aux récepteurs  $\alpha_v\beta_3$  pouvaient être polluées par la présence d'un signal non spécifique, provenant des nanoparticules circulant dans le sang. Notre séquence MES présente l'intérêt de restreindre fortement leur contribution dans le cas d'un tissu sain présentant un flux sanguin normal, mais il n'en va pas de même pour les tumeurs, dans lesquelles le flux est très lent.

Il existe une solution pour s'affranchir du signal des spins circulant, même lentement : pondérer la séquence en diffusion. Effectivement, si on considère que la pondération en diffusion n'affecte pas le signal des nanoparticules liées, elle peut permettre de supprimer sélectivement le signal provenant des nanoparticules du sang. Cette stratégie a été implémentée avec succès par Waters et al. pour ne conserver que le signal de nanoparticules de PFCE ciblées pour l' $\alpha_v\beta_3$  dans un carcinome chez la souris [Waters 2008a]. La méthode utilisée est une spectroscopie de diffusion réalisée sur la base d'une séquence d'écho de spin. Les auteurs montrent que le signal dans la tumeur reste relativement stable lorsque les nanoparticules injectées sont fonctionnalisées, même à  $b$  très élevé (jusqu'à 60000 s/mm<sup>2</sup>), alors que le signal décroît très vite lorsque les nanoparticules ne sont pas fonctionnalisées, même pour de faibles pondérations en diffusion.

Etant donné les bons résultats obtenus avec notre séquence MES, il serait à première vue intéressant d'y rajouter des gradients de diffusion afin de ne visualiser que le signal spécifique dans les tumeurs. Nous avons toutefois écarté cette solution qui peut conduire *in vivo* à des artefacts importants entravant l'obtention des résultats. La spectroscopie de diffusion occasionne beaucoup moins d'artefacts, ces derniers se résumant à des déphasages sur les spectres successifs, et permet une localisation du signal plus rigoureuse.

Dans ce contexte, nous avons voulu mettre au point une séquence de spectroscopie de diffusion adaptée aux contraintes du PFOB, afin d'en obtenir les meilleurs résultats. Nous confrontons dans la suite deux méthodes. Elles partent chacune d'une séquence de spectroscopie LASER (Localization by Adiabatic SElective Refocusing) [Garwood 2001]. La première séquence implémentée est la version de la séquence LASER pondérée en diffusion. La seconde séquence utilise un module LASER pondéré en diffusion suivi d'un train CPMG repris de notre séquence MES. Contrairement à notre précédente étude comparant des groupes d'animaux recevant une émulsion fonctionnalisée ou une émulsion contrôle, l'idée est ici de pouvoir distinguer l'angiogenèse tumorale sur chaque cas individuel, grâce à un RSB élevé issu d'un voxel unique incluant toute la tumeur et à un signal spécifique obtenu par pondération en diffusion. Les expériences présentées ne montrent cependant que des résultats sur fantôme, l'application de cette méthode au modèle animal U87 n'ayant pu être testée.

## VI.2. DIFFUSION : PRINCIPES ET MESURE EN RMN

En premier lieu, rappelons les quelques points essentiels en diffusion nécessaires à la compréhension des expériences qui vont suivre.

L’IRM de diffusion a pour but de mettre en évidence les molécules en mouvement. Le principe consiste à rajouter des gradients qui vont avoir pour effet de déphaser les spins en fonction de leur déplacement, le déphasage étant d’autant plus élevé que le déplacement sera important [Stejskal 1965]. Pour une séquence type écho de spin, les gradients de diffusion sont rajoutés de part et d’autres de l’impulsion de 180° (séquence de Stejskal-Tanner, Figure VI.1). Pour les molécules immobiles, le déphasage provoqué par le premier gradient est parfaitement compensé par le deuxième gradient. En revanche, les molécules s’étant déplacées ne verront pas le même champ lors du second gradient et le déphasage ne sera pas totalement compensé. Ceci induit une atténuation du signal caractérisée par l’équation :

$$\frac{S}{S_0} = e^{-b.ADC} \quad (VI-1)$$

où ADC désigne le coefficient de diffusion apparent (Apparent Diffusion Coefficient), qui peut être approximé par :

$$ADC \approx \frac{\langle x^2 \rangle}{2T_d} \quad (VI-2)$$

où  $x$  désigne le déplacement effectué pendant le temps de diffusion  $T_d = \Delta - \frac{\delta}{3}$ .

$S_0$  désigne le signal non atténué par la diffusion et  $b$  la pondération en diffusion donnée par [Le Bihan 1995] :

$$b = \gamma^2 \delta^2 G^2 \left( \Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad (VI-3)$$

où  $G$  désigne la force du gradient en T/m,  $\delta$  la durée du gradient et  $\Delta$  le délai séparant l’application des deux gradients.

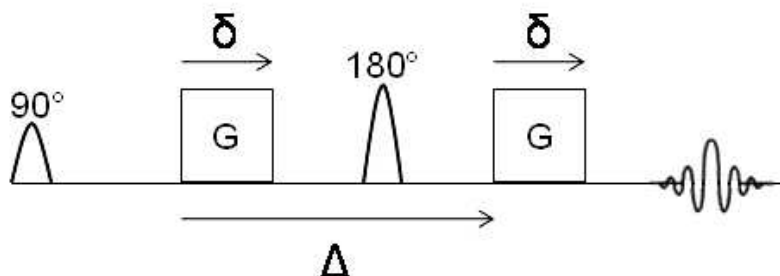


Figure VI.1. Séquence d’écho de spin pondérée en diffusion.

### VI.3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

#### VI.3.1. Séquences utilisées

Comme indiqué au premier paragraphe, nos expériences partent de la séquence de spectroscopie LASER. Cette séquence est reconnue pour la qualité de la localisation du volume sélectionné, grâce à l'emploi d'impulsions adiabatiques insensibles aux inhomogénéités de  $B_1$ . Cette séquence a fait ses preuves à la fois en tant que méthode de spectroscopie monovoxel [Kassem 2003], ainsi qu'en tant que méthode de prélocalisation [McNab 2006]. Dans cette séquence, une impulsion de  $90^\circ$  adiabatique type AHP (Adiabatic Half Passage) est suivie par des impulsions de  $180^\circ$  adiabatiques type AFP (Adiabatic Full Passage). Ces impulsions génèrent des phases non linéaires pouvant entraîner des pertes de signal, elles sont en conséquence toujours utilisées par deux, la seconde impulsion permettant de corriger la phase non linéaire de la première. Ainsi, chacune des trois dimensions est sélectionnée par une paire de pulses adiabatiques (cf. Figure VI.2). Afin de pondérer la séquence en diffusion, des gradients de polarité inverse encadrent chaque paire d'impulsions [Valette 2010]. Ce schéma permet une pondération en diffusion insensible à l'anisotropie avec suppression des termes croisés.

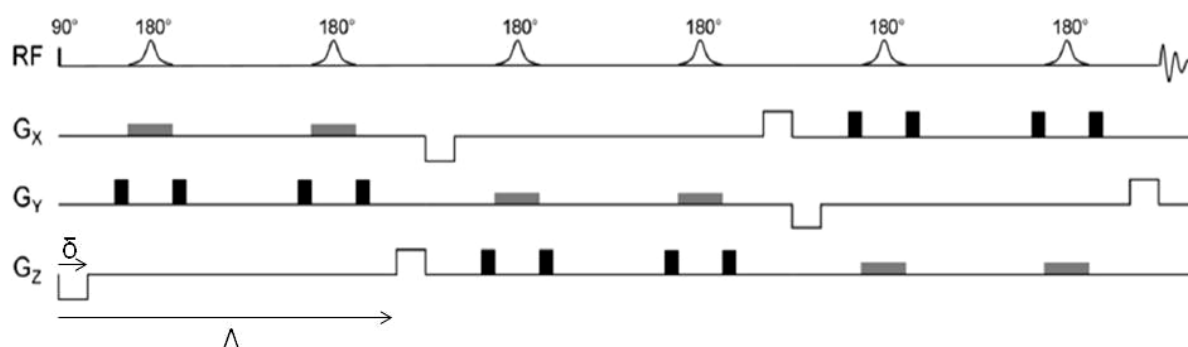


Figure IV.2. Séquence LASER pondérée en diffusion. La sélection s'opère dans un premier temps selon  $x$  avec une pondération en diffusion selon  $z$ , puis une sélection selon  $y$  avec une pondération en diffusion selon  $x$ , et enfin une sélection selon  $z$  et une pondération en diffusion selon  $y$ . Les gradients en noir désignent les spoilers, destinés à éliminer toute trace d'écho stimulé dans le cas de  $180^\circ$  imparfaits. L'acquisition est réalisée à la fin des 6 impulsions de  $180^\circ$ .

Cette séquence constitue la première séquence utilisée. Son chronogramme n'est cependant ici pas « personnalisé » pour le PFOB. Du fait des excellents résultats obtenus avec notre séquence MES, nous avons voulu reprendre cette approche et exploiter ici également le fait de disposer d'un  $T_2$  long par suppression de la J-modulation et choix du TE le plus court possible. Nous avons donc implémenté une seconde séquence reprenant la séquence LASER ci-dessus, à laquelle un train de 30 impulsions de  $180^\circ$  adiabatiques identiques à celles du module LASER a été ajouté (cf. Figure VI.3.b). Le signal total recueilli avec cette séquence correspond à la somme en complexe des 30 échos acquis. Cette séquence sera désignée dans



la suite par l'acronyme LASER\_MES (LASER Multi Echo de Spin). Le schéma d'acquisition des deux séquences étant différent, les résultats présentés n'auront pas la même résolution spectrale : 4096 points pour la séquence LASER, et 64 points pour la séquence LASER\_MES. Les FID acquises avec la séquence LASER\_MES comportent en réalité 102 points, mais en raison des délais d'ouverture et de fermeture de l'ADC (Analog-to-Digital Converter), seuls 64 points comportent de l'information. Le signal ne sera donc analysé dans la suite que sur ces 64 points. Cette dernière résolution spectrale peut paraître basse, mais elle sera suffisante dans la mesure où l'on cherche à ne détecter que le pic intense du  $CF_3$ .

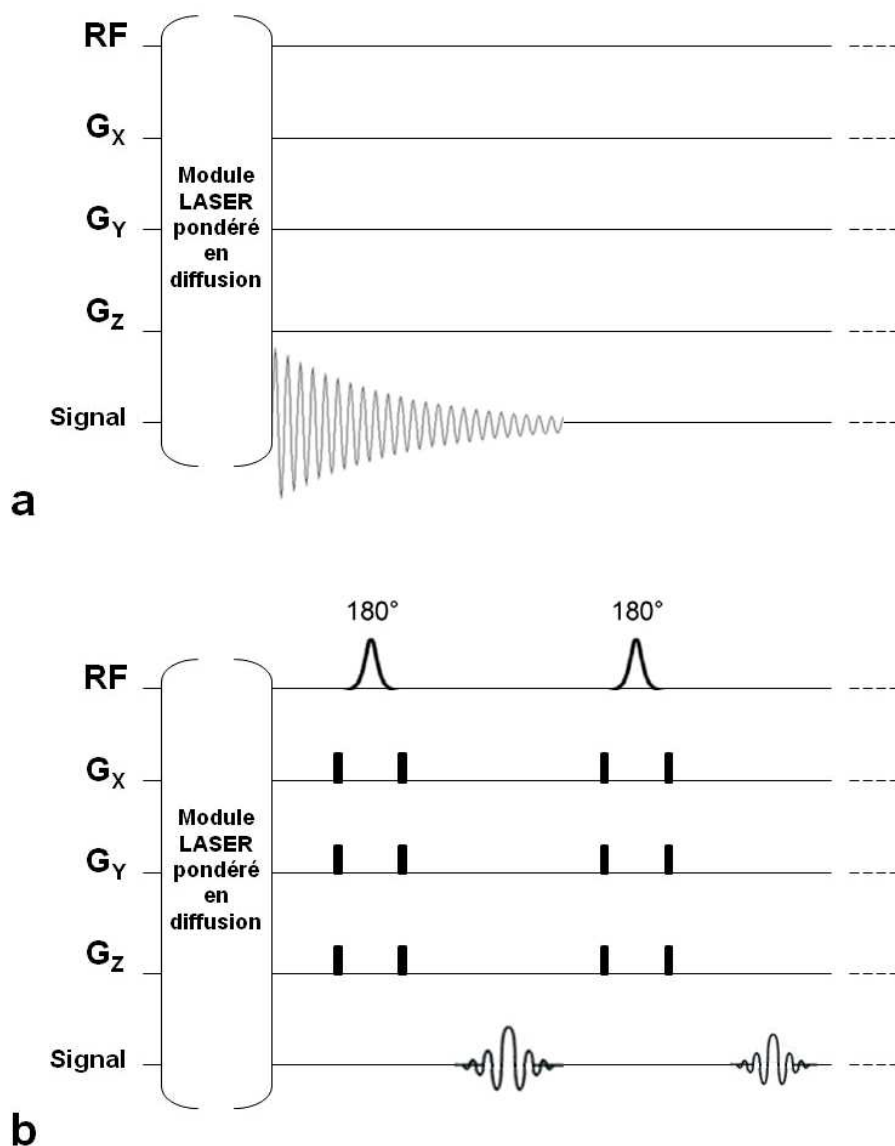


Figure VI.3. Chronogrammes simplifiés des séquences LASER (a) et LASER\_MES (b) montrant leurs schémas d'acquisition différents. Le module LASER (cf. Figure VI.2) permet la localisation du voxel ainsi que la pondération en diffusion. Tandis que pour la séquence LASER l'acquisition est réalisée juste après ce module, 30 impulsions de  $180^\circ$  suivent pour la séquence LASER\_MES. L'acquisition est réalisée après chacune des impulsions. Le signal est la somme des 30 échos acquis.

### VI.3.2. Mise en œuvre

Les expériences sont réalisées à partir de l'émulsion de PFOB utilisée au chapitre précédent (PFOB 40% en masse, concentration ~90 nM en nanoparticules). Afin d'approcher au mieux les conditions *in vivo*, l'émulsion a été diluée d'un facteur 500. Les expériences sont donc menées sur un fantôme de concentration ~180 pM en nanoparticules. L'échantillon est placé dans l'antenne tête.

Dans un premier temps, l'homogénéité du champ dans le volume sélectionné est contrôlée en  $^1\text{H}$  par le protocole FASTMAP (Fast Automatic Shimming Technique by Mapping Along Projections) qui réalise un shim au premier et deuxième ordre [Gruetter 1993], de façon à ce que la largeur à mi-hauteur du pic de l'eau soit inférieure à 10 Hz.

Les acquisitions  $^{19}\text{F}$  sont ensuite réalisées avec la séquence LASER. Dans un premier temps, les gradients de diffusion ont une valeur nulle. La séquence est paramétrée comme suit : TE = 80 ms, TR = 2000 ms, impulsions adiabatiques de bande passante 10 kHz centrées sur la résonance du  $\text{CF}_3$  du PFOB (dans la limite des 11,5 kHz requis pour éviter la présence de J-modulation, cf. chapitre III), bande passante d'acquisition 4 kHz, et voxel sélectionné au milieu de l'échantillon de dimension  $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$ . La concentration en PFOB étant faible, chaque spectre acquis est moyenné 7 fois (temps d'acquisition 14 secondes). Ce spectre moyen est acquis à 64 reprises, pour un temps d'acquisition total de 15 minutes. La même séquence est ensuite acquise avec des gradients de diffusion non nuls. La durée  $\delta$  de ces gradients est fixée à 4 ms, et le TE de 80 ms amène un temps de diffusion  $T_d$  de 23 ms. Les gradients sont ajustés pour obtenir une pondération en diffusion de  $5000 \text{ s/mm}^2$ .

Le même schéma expérimental est ensuite repris pour la séquence LASER\_MES. Les paramètres du module LASER sont ceux décrits ci-dessus. Le délai séparant les impulsions de  $180^\circ$  du train d'échos est fixé à 30 ms. Cette durée correspond à la durée minimale pouvant être choisie (temps d'acquisition 25,5 ms), et conduit à un  $T_2$  à  $20^\circ\text{C}$  de l'ordre de 750 à 800 ms (cf. chapitre III). Une première acquisition est réalisée sans gradients de diffusion, puis avec des gradients de diffusion ajustés pour une pondération en diffusion de  $5000 \text{ s/mm}^2$ .

En ce qui concerne la diffusion, rappelons que les nanoparticules utilisées ont une taille de 190 nm, et correspondent donc à de gros objets, sensés être peu sensibles à la pondération en diffusion en l'absence de flux. Le coefficient de diffusion de ces nanoparticules dans l'émulsion a été évalué autour de  $0,001 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  avec l'équation de Stokes-Einstein ( $D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}$  où  $k$  désigne la constante de Boltzmann,  $T$  la température du fluide,  $\eta$  la viscosité du milieu et  $R_H$  le rayon hydrodynamique de la molécule considérée). Par comparaison, le coefficient de diffusion des molécules d'eau dans l'eau libre est de  $3 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ . Par ailleurs, l'ADC du PFOB dans les nanoparticules est également très faible ( $\sim 0,001 \mu\text{m}^2$  d'après l'équation <VI-2> où  $x$  désigne le diamètre des nanoparticules).

### VI.3.3. Traitement de données

La finalité de notre étude est de comparer les performances de chacune des deux séquences. Le signal étant faible, il convient d'optimiser leurs résultats par un traitement adapté. Le but est de minimiser la déviation standard sur les 64 spectres acquis pour chaque séquence en l'absence de gradient de diffusion. Pour cela, un programme Matlab a été implémenté. Ce dernier applique aux 64 FID (ou à aux 64 FID moyennes obtenues sur les 30 échos dans le cas de la séquence LASER\_MES) un filtre exponentiel décroissant (ou exponentiel croissant avant le sommet de l'écho puis décroissant après pour la séquence MES) caractérisé par un facteur LB (Line Broadening, ou élargissement de la raie). Ce filtrage permet de réduire le bruit en faisant tendre la FID vers 0 quand t augmente, mais il induit en contrepartie un élargissement de la résonance du CF<sub>3</sub>. Différentes bornes d'intégration sur le signal spectral sont ensuite testées et une déviation standard relative sur les 64 spectres est calculée. Au final, le LB et les bornes d'intégration choisis sont ceux qui conduisent à la déviation standard relative la plus faible.

Le RSB est ensuite calculé à b nul comme la moyenne de l'intégrale sur les 64 spectres sur la déviation standard correspondante. La sensibilité de chaque séquence est déduite en reprenant la formule <I-60>.

### VI.4. RESULTATS

La figure VI.4 montre les spectres obtenus par le protocole détaillé à la partie précédente après filtrage. Pour chaque cas (séquence LASER ou séquence LASER\_MES, à b nul ou b=5000 s/mm<sup>2</sup>), les 64 spectres acquis sont présentés, ainsi que leur somme totale. On constate immédiatement une supériorité de la séquence LASER\_MES sur la séquence LASER : la résonance du CF<sub>3</sub> se distingue bien même sur les spectres individuels acquis en 14 secondes (Figure VI.4.a et VI.4.e), alors que cette distinction est nettement moins évidente (Figure VI.4.c), voire impossible (Figure VI.4.g) avec la séquence LASER. En conséquence, le pic du CF<sub>3</sub> ressort nettement sur la somme totale des spectres même avec la pondération en diffusion alors que ce n'est pas le cas avec la séquence LASER (Figure VI.4.h). Par ailleurs, ces résultats sont corroborés par le traitement effectués : la déviation standard relative la plus faible à b nul est de 13% dans le cas de la séquence LASER\_MES (avec LB=80), alors qu'elle est de 47% avec la séquence LASER (LB=40), suggérant que la séquence LASER\_MES est moins bruitée que la séquence LASER dans les mêmes conditions expérimentales.

Les sensibilités calculées sont respectivement de 200  $\mu\text{mol}^{-1}.\text{min}^{-1/2}$  pour la séquence LASER\_MES et 64  $\mu\text{mol}^{-1}.\text{min}^{-1/2}$  pour la séquence LASER. La pondération en diffusion de ces séquences avec un b=5000 s/mm<sup>2</sup> entraîne une baisse de signal d'environ 40% dans les deux cas.

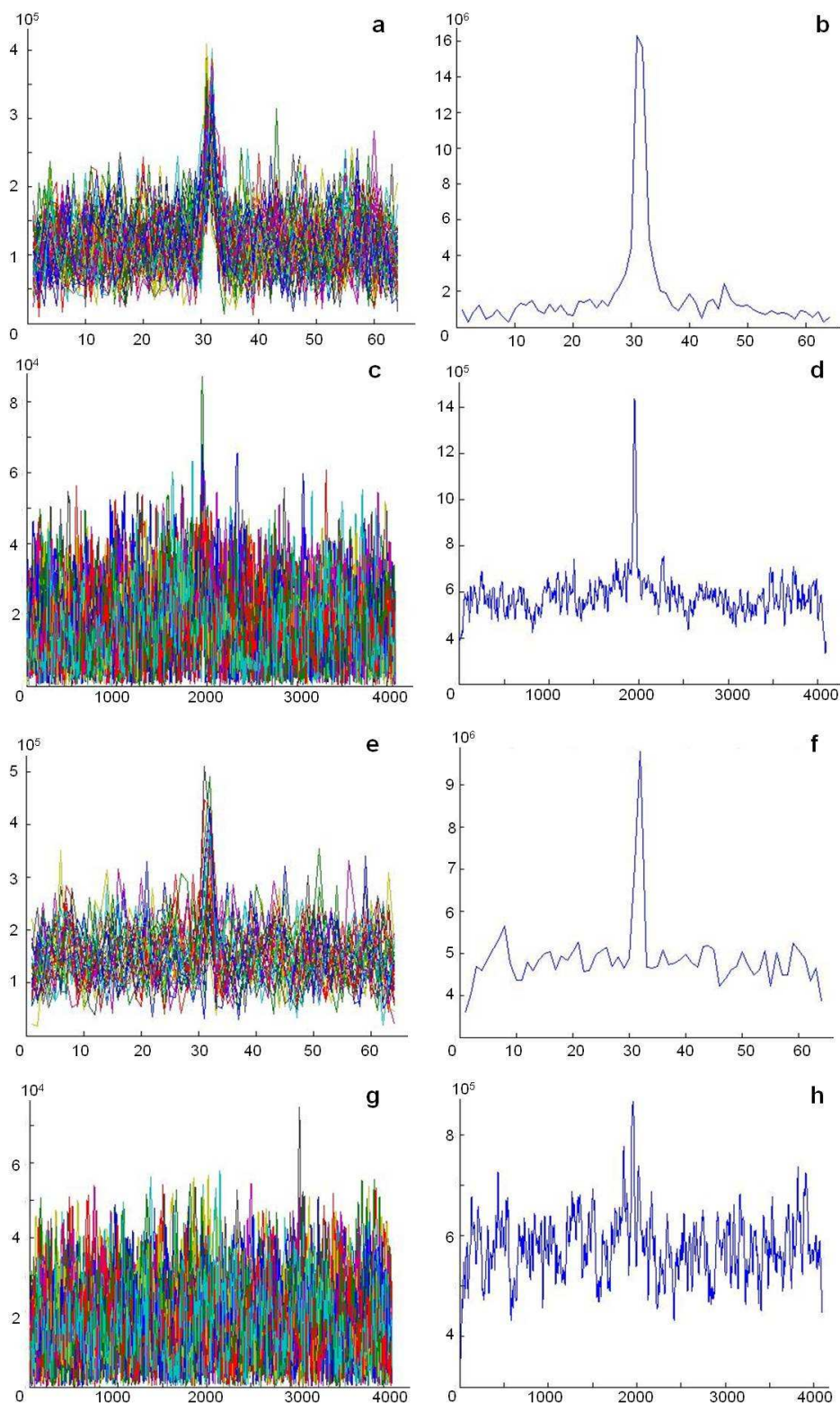


Figure VI. 4. Série de 64 spectres (à gauche) et somme finale (à droite) des 64 spectres acquis sur le fantôme d’émulsion diluée, après filtrage minimisant la déviation standard sur les 64 spectres : (a,b) avec la séquence LASER\_MES à  $b=0$   $s/mm^2$ , (c,d) avec la séquence LASER à  $b=0$   $s/mm^2$ , (e,f) avec la séquence LASER\_MES à  $b=5000$   $s/mm^2$ , (g,h) avec la séquence LASER à  $b=5000$   $s/mm^2$ . On notera l’excellent signal délivré par la séquence LASER\_MES, y compris à  $b=5000$   $s/mm^2$ .

## VI.5. DISCUSSION

La séquence LASER\_MES apparaît comme une séquence prometteuse pour la spectroscopie *in vivo* de nanoparticules de PFOB. En dépit de leur faible concentration, la résonance du CF<sub>3</sub> se distingue sur des spectres individuels acquis en 14 secondes. La sensibilité de la séquence LASER\_MES apparaît certes plus faible que celle de la séquence MES (200 μmol<sup>-1</sup>.min<sup>-1/2</sup> contre 530 μmol<sup>-1</sup>.min<sup>-1/2</sup>, cf chapitre III), et cette différence peut s'expliquer d'une part par le mode d'acquisition : la séquence LASER\_MES implique un délai inter-impulsion de 30 ms, réduisant la valeur du T<sub>2</sub> (par rapport à la séquence MES utilisant un TE = 15,5 ms) et limitant par conséquent le nombre d'échos à 30 (contre 60 échos dans la séquence MES). D'autre part, les sensibilités des deux séquences sont obtenues à partir de méthodes différentes : pour la séquence MES elle est calculée à partir d'un RSB mesuré sur une image, tandis que pour la séquence LASER\_MES elle est calculée à partir d'une erreur mesurée sur des quantifications répétées. Il paraît donc plus juste, pour évaluer l'efficacité de la séquence LASER\_MES, de la comparer à la séquence LASER dont la sensibilité a été calculée par le même procédé. Dans ce dernier cas, on constate une nette supériorité de la séquence LASER\_MES sur la séquence LASER, avec un gain en sensibilité proche de trois. Au vu des résultats constatés sur les spectres individuels, la séquence LASER\_MES peut être utilisée pour mettre rapidement en évidence la présence de nanoparticules au sein d'un organe. En cas de flux vasculaire lent, la pondération en diffusion peut donc être envisagée pour évaluer la part de nanoparticules liées à une cible particulière.

Toutefois, cette quantification en apparence simple doit être nuancée. La baisse de signal de 40% constatée avec une pondération en diffusion de 5000 s/mm<sup>2</sup> peut paraître élevée pour des objets comme les nanoparticules sensées peu diffuser. Cette baisse importante de signal s'explique par l'absence de phasage individuel des 64 spectres. En effet, lors de l'application de gradients de diffusion les spectres acquis présentent des variations de phase en raison de petits mouvements de l'échantillon (vibrations). L'atténuation de signal constatée n'est donc pas seulement liée à la diffusion, mais également à la sommation de spectres de phase différente. Lorsque le signal est suffisamment important, chaque spectre peut être rephasé individuellement [Posse 1993]. Ce phasage individuel est compliqué ici par le fait que les spectres sont bruités en raison des basses concentrations en PFOB. Par ailleurs, les 64 spectres résultent déjà pour chacun d'entre eux d'un moyennage de 7 spectres, et leur phasage conduiraient donc dans tous les cas à une atténuation de signal supérieure à celle provenant de la diffusion.

Ajoutons à cela que les expériences présentées ici ont été réalisées sur fantôme. Il est probable que le passage à l'*in vivo* induise des artefacts supplémentaires en raison des mouvements physiologiques, et conduise à une atténuation de signal encore plus marquée. Dans ce contexte, il peut être favorable d'utiliser une synchronisation cardiaque ou respiratoire (« gating ») pour minimiser les pertes.

Malgré ces inconvénients, le signal total observé avec la séquence LASER\_MES en présence de gradients de diffusion reste de bon augure. Rappelons que le but de cette séquence dans notre cas n'est pas de mesurer un coefficient de diffusion, mais de pouvoir supprimer le signal sanguin pour établir une différence de comportement *in vivo* entre une

émulsion fonctionnalisée et une émulsion non fonctionnalisée. La séquence LASER\_MES pourrait ainsi attester de la spécificité de nanoparticules fonctionnalisées pour une cible comme l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

## VI.6. CONCLUSION

Ce chapitre a mis en avant une nouvelle méthode de détection des nanoparticules de PFOB. Grâce à l'exploitation des propriétés du PFOB, la séquence de spectroscopie LASER\_MES offre un excellent signal en présence de concentrations proches de celles de l'*in vivo*. Cette séquence pourra d'une part permettre la mise en évidence rapide de nanoparticules dans les tissus. D'autre part, grâce à l'utilisation de nanoparticules fonctionnalisées et d'une pondération en diffusion supprimant le signal des nanoparticules circulantes, cette séquence pourrait indiquer la présence de biomarqueurs impliqués dans certaines pathologies comme les tumeurs cérébrales.



## **CONCLUSION GENERALE**



## Conclusion générale

## Conclusion générale

Le but de ce travail de thèse était le développement d'une méthode de détection de l'angiogenèse tumorale par des agents de contraste en IRM du  $^{19}\text{F}$ .

Le choix de l'agent de contraste s'est porté sur un perfluorocarbure connu pour sa biocompatibilité, le PFOB. Une première étape a consisté à développer une méthode d'imagerie adaptée aux contraintes du PFOB, notamment à son spectre complexe et à la présence de couplages liant les différentes résonances. Nous avons pu montrer que dans une séquence multi-échocs de spin (MES) agissant sur la résonance du  $\text{CF}_3$ , un choix minutieux de la bande passante des impulsions de  $180^\circ$  excluant le groupement  $\text{CF}_2$  permettait de s'affranchir du couplage J. Nous avons constaté dans ce cas que le  $T_2$  du  $\text{CF}_3$  était étroitement lié au choix du TE, ce que nous avons expliqué par une oscillation des spins entre deux modes de relaxivité différente. Le choix d'un TE court conduisait notamment à un  $T_2$  très long, proche de la seconde. Ainsi, en dépit du choix de n'imager qu'une seule résonance du spectre, notre séquence MES a montré une sensibilité *in vitro* élevée, très supérieure à celles de séquences d'écho de gradient ou d'imagerie spectroscopique.

La deuxième étape a consisté à évaluer *in vivo* la sensibilité de notre séquence après injection intraveineuse d'émulsions de PFOB chez la souris. Une étude d'oxymétrie dans le foie et la rate, où s'accumulent les nanoparticules d'émulsion après injection, a montré que des cartes d'oxygénation d'une grande précision pouvaient être obtenues dans ces organes grâce aux RSB élevés, en dépit d'une injection unique d'émulsion. Par ailleurs, nous avons réalisé aussitôt après injection une étude de biodistribution dynamique d'émulsions de PFOB incorporant différentes quantités de PEG. Nous avons ainsi pu suivre l'accumulation des nanoparticules dans le foie et la rate, et en ajustant les données sur un modèle pharmacocinétique empirique, nous avons confirmé qu'une quantité croissante de PEG dans les émulsions les rendait plus furtives. La demi-vie sanguine des émulsions a pu être extrapolée à partir des résultats. Ces études ont été rendues possibles par l'insensibilité de notre séquence au signal des nanoparticules circulantes, causée en particulier par la sommation incohérente de signaux de phase différente pendant le train d'échos de notre séquence. Ces applications sont une première dans la mesure où les études s'étaient heurtées jusqu'ici à une pollution des mesures par le signal sanguin.

La troisième étape a consisté à mettre en évidence la présence d'un biomarqueur de l'angiogenèse tumorale, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , dans un modèle souris de glioblastome. Nous avons pour cela comparé les concentrations en nanoparticules trouvées dans la tumeur au cours des 90 minutes suivant l'injection d'une émulsion de PFOB fonctionnalisée avec le peptide RGD, et d'une émulsion non fonctionnalisée. En dépit de la présence d'un signal sanguin important lié à la vascularisation anarchique des tumeurs, nous avons pu observer que les concentrations en nanoparticules étaient significativement plus élevées pour plusieurs pas de temps lorsque l'émulsion injectée était fonctionnalisée, supposant la liaison spécifique des nanoparticules avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Ces résultats ont pu être légèrement améliorés en écartant les animaux au comportement atypique. Les résultats obtenus en histologie, bien qu'incomplets, semblaient confirmer le ciblage spécifique de l' $\alpha_v\beta_3$  dans les néo-vaisseaux tumoraux. Nous avons ainsi démontré la faisabilité de détecter l'angiogenèse tumorale dans le cerveau en IRM du  $^{19}\text{F}$ .

## Conclusion générale

Un dernier point a introduit une nouvelle séquence de spectroscopie de diffusion adaptée à la détection du PFOB. Cette séquence a été implémentée sur la base d'une séquence LASER augmentée d'un train d'échos et une pondération en diffusion a été ajoutée dans le but de s'affranchir du signal vasculaire. Cette séquence a démontré d'excellents résultats en présence de concentrations proches de celles trouvées *in vivo*, et même si ces résultats restent à confirmer sur l'animal, ils paraissent prometteurs pour constituer une autre approche de la détection de nanoparticules de PFOB fonctionnalisées sur des cas individuels.

En résumé, cette thèse a été l'occasion de développer de nouveaux outils d'exploration par l'IRM du  $^{19}\text{F}$ , notamment une séquence dédiée au PFOB, mais dont le principe pourrait être appliqué à d'autres PFC ayant des propriétés RMN semblables. Cette séquence a été exploitée sur un système préclinique, mais pourrait être exportée sur imageur clinique, sous réserve de travailler à champ plus faible dans la mesure où la déposition d'énergie à 7 T dépasse les limites imposées.

Cette thèse a également été l'occasion d'appréhender des applications en IRM du  $^{19}\text{F}$  pouvant avoir un impact sur les protocoles traditionnellement utilisés aujourd'hui. Ainsi, les travaux sur la biodistribution ont montré que cette modalité pouvait constituer une alternative aux méthodes de prélèvement actuelles en permettant une évaluation non invasive de la furtivité de certains composés injectés par voie intraveineuse. Cet impact pourra être considéré d'autant plus grand avec l'adjonction de molécules médicamenteuses devant agir sur une cible particulière : il sera ainsi possible de suivre à la fois la pharmacocinétique de telles molécules, de contrôler leur accumulation sur la cible d'intérêt, et de suivre les effets du traitement à l'échelle moléculaire et macroscopique. Il est certes pour le moment peu envisageable de dépister les tumeurs en clinique par l'IRM du  $^{19}\text{F}$  compte-tenu des difficultés techniques et logistiques que la méthode implique ainsi que de ses limitations dues au signal et à la faible résolution spatiale, mais à terme, l'IRM du  $^{19}\text{F}$  pourrait être une alternative à d'autres modalités d'imagerie comme la TEP, et constituer une valeur ajoutée pour la détection et la caractérisation de nombreuses pathologies.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## Bibliographie

## Bibliographie

- Anderson SA**, Rader RK, Westlin WF, Null C, Jackson D, Lanza GM, Wickline SA, Kotyk JJ. *Magnetic resonance contrast enhancement of neovasculature with  $\alpha_v\beta_3$ -targeted nanoparticles*. Magn Reson Med. 44:433-439 (2000)
- Ahrens ET**, Flores R, Xu H, Morel PA. *In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells*. Nat Biotechnol. 23:983-987 (2005)
- Barker BR**, Mason RP, Bansal N, Peshock RM. *Oxygen tension mapping with F-19 echo-planar MR imaging of sequestered perfluorocarbon*. J Magn Reson Imaging. 4:595-602 (1994)
- Baish JW**, Jain RK. *Fractals and cancer*. Cancer Res. 60:3683-3688 (2000)
- Bloch F**. *Nuclear induction*. Phys Rev. 70:460-474 (1946)
- Börnert P**, Norris DG, Koch H, Dreher W, Reichelt H, Leibfritz D. *Fast perfluorocarbon imaging using  $^{19}\text{F}$  U-FLARE*. Magn Reson Med. 29:226-234 (1993)
- Brooks PC**, Clark RA, Cheresch DA. *Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis*. Science 264:569-571 (1994)
- Clark LC Jr**, Gollan F. *Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure*. Science 152:1755-1756 (1966)
- Dardzinski BJ**, Sotak CH. *Rapid tissue oxygen tension mapping using  $^{19}\text{F}$  inversion-recovery echo-planar imaging of perfluoro-15-crown-5-ether*. Magn Reson Med. 32: 88-97 (1994)
- Duong TQ**, Kim SG. *In vivo MR measurements of regional arterial and venous blood volume fractions in intact rat brain*. Magn Reson Med. 43:393-402 (2000)
- Ernst RR**, Anderson WA. *Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance*. Rev Sci Instrum. 37:93-102 (1966)
- Fishman JE**, Joseph PM, Floyd TF, Mukherji B, Sloviter HA. *Oxygen-sensitive  $^{19}\text{F}$  NMR imaging of the vascular system in vivo*. Magn Reson Imaging. 5: 279-285 (1987)
- Flögel U**, Ding Z, Hardung H, Jander S, Reichmann G, Jacoby C, Schubert R, Schrader J. *In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging*. Circulation 118:140-148 (2008)
- Folkman J**. *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med. 285:1182-1186 (1971)

## Bibliographie

**Garwood M**, Delabarre L. *The return of the frequency sweep: designing adiabatic pulses for contemporary NMR*. J Magn Reson. 177:155-177 (2001)

**Girard F**, Poulet P, Namer IJ, Steibel J, Chambron J. *Localized  $T_2$  measurements using an OSIRIS-CPMG method. Application to measurements of blood oxygenation and transverse relaxation free of diffusion effect*. NMR Biomed. 7:343-348 (1994)

**Gruetter R**. *Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils*. Magn Reson Med. 29:804-811 (1993)

**Haacke EM**, Brown RW, Thompson MR, Venkatesan R. *Magnetic resonance imaging: physical principles and sequence design*. New York: John Wiley & Sons (1999)

**Hahn EL**. *Spin echoes*. Phys Rev. 80:580-594 (1950)

**Harned RK 2nd**, Fruman SA, Swenson RB, Bernardino ME. *Time versus density enhancement of liver, spleen, and great vessels following rapid intravenous infusion of perflubron emulsion*. Acad Radiol. 2:38-42 (1995)

**Hees PS**, Sotak CH. *Assessment of changes in murine tumor oxygenation in response to nicotinamide using  $^{19}\text{F}$  NMR relaxometry of a perfluorocarbon emulsion*. Magn Reson Med. 29:303-310 (1993)

**Hobbs SK**, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, Jain RK. *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*. Proc Natl Acad Sci USA. 95:4607-4612 (1998)

**Holland GN**, Bottomley PA, Hinshaw WS.  *$F-19$  magnetic resonance imaging*. J Mag.Res. 28:133-136 (1977)

**Holland SK**, Kennan RP, Schaub MM, D'Angelo MJ, Gore JC. *Imaging oxygen tension in liver and spleen by  $^{19}\text{F}$  NMR*. Magn Reson Med. 29:446-458 (1993)

**Hsu AR**, Hou LC, Veeravagu A, Greve JM, Vogel H, Tse V, Chen X. *In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin  $\alpha\text{v}\beta_3$  in an orthotopic glioblastoma model*. Mol Imaging Biol. 8:315-323 (2006)

**Jordan BF**, Cron GO, Gallez B. *Rapid monitoring of oxygenation by  $^{19}\text{F}$  magnetic resonance imaging: Simultaneous comparison with fluorescence quenching*. Magn Reson Med. 61:634-638 (2009)

## Bibliographie

- Kassem MN**, Bartha R. *Quantitative proton short-echo-time LASER spectroscopy of normal human white matter and hippocampus at 4 Tesla incorporating macromolecule subtraction*. Magn Reson Med. 49:918-927 (2003)
- Keipert PE**, Otto S, Flaim SF, Weers JG, Schutt EA, Pelura TJ, Klein DH, Yaksh TL. *Influence of perflubron emulsion particle size on blood half-life and febrile response in rats*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 22:1169-1174 (1994)
- Keupp J**, Caruthers SD, Rahmer J, Williams TA, Wickline SA, Lanza GM. *Fluorine-19 MR molecular imaging of angiogenesis on Vx-2 tumors in rabbits using  $\alpha_v\beta_3$ -targeted nanoparticles*. Proc Intl Soc Mag Reson Med. 17 (2009)
- Keupp J**, Schmieder SH, Wickline SA, Lanza GM, Caruthers SD. *Target-binding of perfluoro-carbon nanoparticles alters optimal imaging parameters using F-19 molecular MRI: a study using fast in vitro screening and in vivo tumor models*. Proc Intl Soc Mag Reson Med. 18 (2010a)
- Keupp J**, Wickline SA, Lanza GM, Caruthers SD. *Hadamard-type pulse-phase encoding for imaging of multi-resonant fluorine-19 nanoparticles in targeted molecular MRI*. Proc Intl Soc Mag Reson Med. 18 (2010b)
- Keupp J**, Schmieder SH, Williams TA, Allen JS, Wickline SA, Lanza GM, Caruthers SD. *Ultra-short echo time  $^{19}\text{F}/^1\text{H}$  imaging of gadolinium-free perfluoro-carbon nanoparticles: a robust method for in vivo angiogenesis imaging*. Proc Intl Soc Mag Reson Med. 19 (2011)
- Kong CF**, Holloway GM, Parhami P, Fung BM. *Carbon-13 and fluorine-19 nuclear magnetic resonance study of perfluoro chemical emulsions*. J Phys Chem. 88: 6308–6311 (1984)
- Krafft MP**. *Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research*. Adv Drug Deliv Rev. 47:209-228 (2001)
- Lamerichs R**, Yildirim M, Nederveen AJ, Stoker J, Lanza GM, Wickline SA, Caruthers SD. *In vivo 3D  $^{19}\text{F}$  fast spectroscopic imaging (F-uTSI) of angiogenesis on vx-2 tumors in rabbits using targeted perfluorocarbon emulsions*. Proc Intl Soc Mag Reson Med. 18 (2010)
- Lauterbur PC**. *Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance*. Nature 242:190-191 (1973)
- Leach CL**, Greenspan JS, Rubenstein SD, Shaffer TH, Wolfson MR, Jackson JC, DeLemos R, Fuhrman BP. *Partial liquid ventilation with perflubron in premature infants with severe respiratory distress syndrome*. N Engl J Med. 335:761-767 (1996)



## Bibliographie

**Le Bihan D.** *Magnetic resonance imaging of diffusion and perfusion: applications to functional imaging.* New York: Lippincott-Raven Press (1995)

**Ljunggren S.** *A Simple graphical representation of Fourier-based imaging methods.* J. Magn. Reson. 54:338-343 (1983)

**Mason RP, Rodbumrung W, Antich PP.** *Hexafluorobenzene: a sensitive  $^{19}\text{F}$  NMR indicator of tumor oxygenation.* NMR Biomed. 9:125-134 (1996)

**Mattrey RF, Long DM, Multer F, Mitten R, Higgins CB.** *Perfluorooctylbromide: a reticuloendothelial-specific and tumor-imaging agent for computed tomography.* Radiology 145:755-758 (1982)

**Mattrey RF, Long DM, Peck WW, Slutsky RA, Higgins CB.** *Perfluorooctylbromide as a blood pool contrast agent for liver, spleen, and vascular imaging in computed tomography.* J Comput Assist Tomogr. 8:739-744 (1984)

**Mattrey RF.** *Perfluorooctylbromide: a new contrast agent for CT, sonography, and MR imaging.* Am J Roentgenol. 152:247-252 (1989)

**Mattrey RF.** *The potential role of perfluorochemicals in diagnostic imaging.* Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 22:295-313 (1994)

**McNab JA, Bartha R.** *Quantitative short echo-time  $^1\text{H}$  LASER-CSI in human brain at 4 T.* NMR Biomed. 19:999-1009 (2006)

**Meiboom S, Gill D.** *Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times.* Rev. Sci. Instrum. 29:688-691 (1958)

**Munowitz M.** *Coherence and NMR.* John Wiley & Sons (1988)

**Neubauer AM, Myerson J, Caruthers SD, Hockett FD, Winter PM, Chen J, Gaffney PJ, Robertson JD, Lanza GM, Wickline SA.** *Gadolinium-modulated  $^{19}\text{F}$  signals from perfluorocarbon nanoparticles as a new strategy for molecular imaging.* Magn Reson Med. 60:1066-1072 (2008)

**Nöth U, Morrissey SP, Deichmann R, Adolf H, Schwarzbauer C, Lutz J, Haase A.** *In vivo measurement of partial oxygen pressure in large vessels and in the reticuloendothelial system using fast  $^{19}\text{F}$ -MRI.* Magn Reson Med. 34:738-745 (1995)

**Nöth U, Morrissey SP, Deichmann R, Jung S, Adolf H, Haase A, Lutz J.** *Perfluoro-15-crown-5-ether labelled macrophages in adoptive transfer experimental allergic encephalomyelitis.* Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 25:243-254 (1997)

## Bibliographie

**Onishi M**, Ichikawa T, Kurozumi K, Date I. *Angiogenesis and invasion in glioma*. Brain Tumor Pathol. 28:13-24 (2011)

**Osorio JA**, Ozturk-Isik E, Xu D, Cha S, Chang S, Berger MS, Vigneron DB, Nelson SJ. *3D <sup>1</sup>H MRSI of brain tumors at 3.0 Tesla using an eight-channel phased-array head coil*. J Magn Reson Imaging. 26:23-30 (2007)

**Özdemirel B**, Nalcioglu O. *Correction of chemical-shift artifacts in multislice F-19 imaging with perfluorooctyl bromide*. Magn Reson Med. 23:324-332 (1992)

**Partlow KC**, Chen J, Brant JA, Neubauer AM, Meyerrose TE, Creer MH, Nolte JA, Caruthers SD, Lanza GM, Wickline SA. *<sup>19</sup>F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons*. FASEB J. 21:1647-1654 (2007)

**Pisani E**, Tsapis N, Paris J, Nicolas V, Cattel L, Fattal E. *Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization*. Langmuir 22:4397-4402 (2006)

**Pisani E**, Tsapis N, Galaz B, Santin M, Berti R, Taulier N, Kurtisovski E, Lucidarme O, Ourevitch M, Doan BT, Beloeil JC, Gillet B, Urbach W, Lori Bridal S, Fattal E. *Perfluorooctylbromide polymeric capsules as dual contrast agent for ultrasonography and magnetic resonance imaging*. Adv Funct Mater 18:2963-2971 (2008)

**Posse S**, Cuenod CA, Le Bihan D. *Human brain: proton diffusion MR spectroscopy*. Radiology. 188:719-725 (1993)

**Purcell E**, Torrey HC, Pound RV. *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid*. Phys. Rev. 69:37-38 (1946)

**Rahmer J**, Keupp J, Caruthers SD, Lips O, Williams TA, Wickline SA, Lanza GM. *Dual resolution <sup>19</sup>F/<sup>1</sup>H in vivo imaging of targeted nanoparticles*. Proc Intl Soc Mag Reson Med. 17 (2009)

**Ratner AV**, Hurd R, Muller HH, Bradley-Simpson B, Pitts W, Shibata D, Sotak C, Young SW. *<sup>19</sup>F magnetic resonance imaging of the reticuloendothelial system*. Magn Reson Med. 5:548-554 (1987)

**Riess JG**. *Perfluorocarbon-based oxygen delivery*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 34:567-580 (2006)

## Bibliographie

**Robinson SP, Griffiths JR.** *Current issues in the utility of  $^{19}\text{F}$  nuclear magnetic resonance methodologies for the assessment of tumour hypoxia.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 359:987-996 (2004)

**Santyr GE, Henkelman RM, Bronskill MJ.** *Variation in measured transverse relaxation in tissue resulting from spin locking with the CPMG sequence.* J Magn Reson 79:28-44 (1988)

**Schmieder AH, Winter PM, Caruthers SD, Harris TD, Williams TA, Allen JS, Lacy EK, Zhang H, Scott MJ, Hu G, Robertson JD, Wickline SA, Lanza GM.** *Molecular MR imaging of melanoma angiogenesis with  $\alpha_v\beta_3$ -targeted paramagnetic nanoparticles.* Magn Reson Med. 53:621-627 (2005)

**Schnell O, Krebs B, Carlsen J, Miederer I, Goetz C, Goldbrunner RH, Wester HJ, Haubner R, Pöpperl G, Holtmannspötter M, Kretzschmar HA, Kessler H, Tonn JC, Schwaiger M, Beer AJ.** *Imaging of integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression in patients with malignant glioma by [ $^{18}\text{F}$ ] Galacto-RGD positron emission tomography.* Neuro Oncol 11:861-870 (2009)

**Shukla HP, Mason RP, Woessner DE, Antich PP.** *A comparison of three commercial perfluorocarbon emulsions as high-field  $^{19}\text{F}$  NMR probes of oxygen tension and temperature.* J Magn Reson. 106:131-141 (1995)

**Shukla HP, Mason RP, Bansal N, Antich PP.** *Regional myocardial oxygen tension:  $^{19}\text{F}$  MRI of sequestered perfluorocarbon.* Magn Reson Med. 35:827-833 (1996)

**Sotak CH, Hees PS, Huang HN, Hung MH, Krespan CG, Raynolds S.** *A new perfluorocarbon for use in fluorine-19 magnetic resonance imaging and spectroscopy.* Magn Reson Med. 29:188-195 (1993)

**Spahn DR, van Brempt R, Theilmeyer G, Reibold JP, Welte M, Heinzerling H, Birck KM, Keipert PE, Messmer K, Heinzerling H, Birck KM, Keipert PE, Messmer K.** *Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery.* Anesthesiology. 91:1195-1208 (1999)

**Twieg DB.** *The k-trajectory formulation of the NMR imaging process with applications in analysis and synthesis of imaging methods.* Med Phys. 10:610-621 (1983)

**Valette J, Ahmed Ghaly M, Le Bihan D, Lethimonnier F.** *A new volume selective sequence for single-shot diffusion-weighting by the trace of the diffusion tensor.* Proc Intl Soc Mag Reson Med. 18 (2010)

**Waters EA, Chen J, Yang X, Zhang H, Neumann R, Santeford A, Arbeit J, Lanza GM, Wickline SA.** *Detection of targeted perfluorocarbon nanoparticle binding using  $^{19}\text{F}$  diffusion weighted MR spectroscopy.* Magn Reson Med. 60:1232-1236 (2008a)

## Bibliographie

**Waters EA**, Chen J, Allen JS, Zhang H, Lanza GM, Wickline SA. *Detection and quantification of angiogenesis in experimental valve disease with integrin-targeted nanoparticles and 19-fluorine MRI/MRS*. J Cardiovasc Magn Reson. 10:43 (2008b)

**Wilcoxon F**. *Individual comparisons by ranking methods*. Biometrics Bulletin 1:80-83 (1945)

**Winter PM**, Caruthers SD, Kassner A, Harris TD, Chinen LK, Allen JS, Lacy EK, Zhang H, Robertson JD, Wickline SA, Lanza GM. *Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel  $\alpha_v\beta_3$ -targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging*. Cancer Res.63:5838-5843 (2003)

**Winter PM**, Schmieder AH, Caruthers SD, Keene JL, Zhang H, Wickline SA, Lanza GM. *Minute dosages of  $\alpha_v\beta_3$ -targeted fumagillin nanoparticles impair Vx-2 tumor angiogenesis and development in rabbits*. FASEB J. 22:2758-2767 (2008)

**Yildirim M**, De Vries A, Berben M, van Cammen C, Nicolay K, Gruell H, Lamerich R. *In vivo molecular imaging of angiogenesis in murine urogenital organs with targeted perfluorocarbon nanoparticles and  $^{19}\text{F}$  ultrafast turbo spectroscopic imaging (F-uTSI)*. Proc Intl Soc Mag Reson Med. 18 (2010)

**Young SW**, Enzmann DR, Long DM, Muller HH. *Perfluorooctylbromide contrast enhancement of malignant neoplasms: preliminary observations*. Am J Roentgenol. 137:141-146 (1981)

## Bibliographie

## ANNEXE : PUBLICATIONS

### Revues scientifiques :

Giraudeau C, Flament J, Marty B, Boumezbeur F, Mériaux S, Robic C, Port M, Tsapis N, Fattal E, Giacomini E, Lethimonnier F, Le Bihan D, Valette J. *A new paradigm for high sensitivity  $^{19}\text{F}$  MRI of perfluorooctylbromide*, Magn Res Med 63:1119-1124 (2010)

Giraudeau C, Djemaï B, Ghaly MA, Boumezbeur F, Mériaux S, Robert P, Port M, Robic C, Le Bihan D, Lethimonnier F, Valette J. *High sensitivity  $^{19}\text{F}$  MRI of a PFOB emulsion: application to dynamic biodistribution study and oxygen tension mapping in the mouse liver and spleen*. NMR Biomed 2011 (in press)

### Communications orales :

Giraudeau C, Flament J, Marty B, Boumezbeur F, Mériaux S, Robic C, Port M, Tsapis N, Fattal E, Giacomini E, Lethimonnier F, Le Bihan D, Valette J. *A new paradigm for high sensitivity  $^{19}\text{F}$  MRI of perfluorooctylbromide*. Proc. Eur. Soc. Magn. Reson. Med. Biol. 2009, Antalya/TR (oral)

Giraudeau C, Djemaï B, Ghaly MA, Boumezbeur F, Mériaux S, Robert P, Port M, Robic C, Bihan DL, Lethimonnier F, Valette J. *Dynamic and quantitative assessment of the biodistribution of a perfluorooctylbromide emulsion by in vivo  $^{19}\text{F}$  imaging*. Proc. World Molecular Imaging Congress 2010, Kyoto/JP (poster)

Giraudeau C, Flament J, Marty B, Boumezbeur F, Mériaux S, Robic C, Port M, Tsapis N, Fattal E, Giacomini E, Lethimonnier F, Le Bihan D, Valette J. *A new paradigm for high sensitivity  $^{19}\text{F}$  MRI of perfluorooctylbromide*. Proc. Intl. Soc. Magn. Reson. Med. 2010, Stockholm/SE (e-poster)

Giraudeau C, Djemaï B, Ghaly MA, Boumezbeur F, Mériaux S, Robert P, Port M, Robic C, Le Bihan D, Lethimonnier F, Valette J. *High sensitivity  $^{19}\text{F}$  MRI allows dynamic biodistribution study and oxygen tension mapping at pharmaceutical doses of a PFOB emulsion in the mouse reticuloendothelial system*. Proc. Intl. Soc. Magn. Reson. Med. 2011, Montréal/CA, (poster)

Giraudeau C, Geffroy F, Perrin A, Djemaï B, Thézé B, Robert P, Port M, Robic C, Le Bihan D, Lethimonnier F, Valette J. *Brain tumor angiogenesis can be imaged by  $^{19}\text{F}$  MRI: high sensitivity detection of targeted PFOB emulsion in U87 human glioblastoma mouse model*. Proc. Intl. Soc. Magn. Reson. Med. 2011, Montréal/CA (poster)

## Publications

Giraudeau C, Geffroy F, Perrin A, Djemaï B, Thézé B, Robert P, Port M, Robic C, Le Bihan D, Lethimonnier F, Valette J. *Brain tumor can be imaged by  $^{19}\text{F}$  MRI: high sensitivity detection of PFOB emulsion in U87 human glioblastoma mouse model*. Proc. World Molecular Imaging Congress 2011, San Diego/US (poster)

Marty B, Flament J, Giraudeau C, Geffroy F, Médina C, Robert P, Port M, Robic C, Le Bihan D, Valette J, Mériaux S, Boumezbeur F, Lethimonnier F. *Comparaison de trois modalités d'imagerie moléculaire : application à l'imagerie de l'angiogenèse tumorale dans un modèle rongeur de tumeur cérébrale*. Proc GDR Imagiv 2011, Paris/FR (oral)

Diou O, Tsapis N, Delplace V, Nicolas J, Mackiewicz N, Brulet A, Giraudeau C, Valette J, Payen T, Bridal L, Fattal E. *Nanocapsules pegylées de perfluorooctylbromure : de la formulation au ciblage*. Proc GDR Imagiv 2011, Paris/FR (oral)

Giraudeau C, Marty B, Flament J, Geffroy F, Médina C, Robert P, Port M, Robic C, Le Bihan D, Valette J, Mériaux S, Boumezbeur F, Lethimonnier F. *Comparison of three molecular imaging modalities: application to angiogenesis imaging in a brain tumor mouse model*. Proc. Intl. Soc. Magn. Reson. Med. 2012, Melbourne/AU (e-poster)

Giraudeau C, Diou O, Tsapis N, Robert P, Port M, Robic C, Le Bihan D, Lethimonnier F, Valette J. *High sensitivity detection of targeted PFOB nanoparticles binding in a carcinoma mouse model using a new diffusion-weighting spectroscopy sequence*. Proc. Intl. Soc. Magn. Reson. Med. 2012, Melbourne/AU (poster)





## **RMN d'émulsions fluorées : développements méthodologiques et application à l'évaluation de l'oxymétrie et de la biodistribution dans le foie et la rate, et à la détection de l'angiogenèse tumorale dans le cerveau du rongeur**

L'objectif ici était de développer une méthode de détection des tumeurs cérébrales via des agents de contraste pour l'IRM du  $^{19}\text{F}$  à 7 teslas. Nous évaluons en particulier le potentiel de cette méthode à mettre en évidence l'angiogenèse tumorale à l'aide d'agents de contraste fonctionnalisés avec le peptide RGD et ciblant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , biomarqueur surexprimé à la surface des néo-vaisseaux irriguant la tumeur.

Du fait des basses concentrations locales en agent de contraste, les efforts portent dans un premier temps sur l'optimisation d'une séquence multi échos de spin dédiée à l'imagerie du PFOB (perfluorooctyl bromure), perfluorocarbure biocompatible choisi pour constituer la base de nos agents de contraste. Nous montrons qu'un paramétrage minutieux de cette séquence permet la suppression de la J-modulation et un rehaussement du  $T_2$ , conduisant à une excellente sensibilité *in vitro*. La séquence est ensuite testée pour des mesures d'oxygénation dans le foie et la rate chez la souris, après injection d'une émulsion de PFOB. Les résultats indiquent une très bonne précision des mesures après injection d'une seule dose d'émulsion. Notre séquence est également utilisée pour réaliser une étude de biodistribution dynamique, permettant de suivre l'accumulation des nanoparticules d'émulsion dans le foie et la rate juste après injection. Nous montrons par ailleurs qu'il est possible d'évaluer la furtivité d'émulsions contenant différentes quantités de PEG (Poly Ethylène Glycol) en ajustant les données expérimentales sur un modèle pharmacocinétique empirique. La séquence est enfin utilisée pour détecter des nanoparticules d'émulsions fonctionnalisées pour cibler l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  dans un modèle souris U87 de glioblastome. Nous comparons les concentrations en agent de contraste obtenues dans la tumeur avec une émulsion contenant le peptide RGD, et une émulsion contrôle. Les résultats indiquent des concentrations significativement plus élevées avec l'émulsion RGD qu'avec l'émulsion contrôle, supposant un ciblage spécifique d' $\alpha_v\beta_3$  par les nanoparticules fonctionnalisées. Un dernier chapitre est dédié à une nouvelle méthode de spectroscopie de diffusion en  $^{19}\text{F}$ , dont le but est d'éliminer le signal vasculaire provenant des nanoparticules de PFOB circulantes afin d'évaluer le signal ne provenant que des particules liées.

Mots-clés : IRM du fluor, PFOB, séquence multi-échos de spin, sensibilité, oxymétrie, biodistribution dynamique, modèle souris de glioblastome, angiogenèse tumorale, émulsion fonctionnalisée, intégrine  $\alpha_v\beta_3$