

Evaluation non-invasive des Gliomes par Imagerie Résonance Magnétique : Effets des traitements anti-angiogéniques (Avastin) sur la microvascularisation et la microarchitecture tumorale et péritumorale

Michel Sarraf

▶ **To cite this version:**

Michel Sarraf. Evaluation non-invasive des Gliomes par Imagerie Résonance Magnétique : Effets des traitements anti-angiogéniques (Avastin) sur la microvascularisation et la microarchitecture tumorale et péritumorale. Imagerie médicale. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAS040 . tel-02899427

HAL Id: tel-02899427

https://theses.hal.science/tel-02899427

Submitted on 15 Jul 2020

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.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **BIS - Biotechnologie, Instrumentation, Signal et imagerie pour la médecine, la biologie et l'environnement**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016
Présentée par

Michel SARRAF

Thèse dirigée par **Boudewijn VAN DER SANDEN,** chargé de recherche, INSERM, TIMC-IMAG UMR 5525, Grenoble et codirigée par **Teodora-Adriana PERLES-BARBACARU,** maitre de conférence, CRMBM UMR 7339, Marseille.

Préparée au sein du **Laboratoire Technique de l'ingénierie Médicale et de la complexité – Informatique, Mathématique et Application.**

dans l'**École Doctorale : Ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement**

Evaluation non-invasive des Gliomes par Imagerie Résonance Magnétique :

Effets des traitements anti-angiogéniques (Avastin) sur la microvascularisation et la microarchitecture tumorale et péritumorale

Thèse soutenue publiquement le **« 16 décembre 2019 »**,

devant le jury composé de :

Dr. Sylvain, Miraux,		
Directeur de recherche,	CNRS, CRMSB, Bordeaux	**Rapporteur**
Dr. Samuel Valable,		
Directeur de recherche,	CNRS, ISTCT, Caen	**Rapporteur**
Prof. Isabelle Berry,		
PU-PH,	CHU de Toulouse,	**Examinatrice**
Prof. Antoine Delon,		
PU, Université Grenoble Alpes, CNRS, Liphy, Grenoble		**Président**

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Mme Hana Lahrech (HDR) et le Pr François Berger de m'avoir accueilli dans leur unité de recherche à Grenoble Institut des Neurosciences et le Pr. Georges Fares qui m'a accueilli dans son unité de recherche à l'Université Saint Joseph. Je tiens à remercier Pr Fares pour son accompagnement méthodique au cours des premiers trois ans de ma thèse. Je remercie le Pr Philippe Cinquin de m'accueillir dans son laboratoire de recherche TIMC-IMAG.

Je remercie les membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail : Mme Isabelle Berry, M. Sylvain Miraux, M. Samuel Valable et M. Antoine Delon. Je remercie particulièrement les rapporteurs M. Valable et M. Miraux qui ont évalué à deux reprises ce travail. Ceci était particulièrement nécessaire pour améliorer la qualité du manuscrit et à dégager au mieux les résultats obtenus durant la thèse. Je suis très reconnaissant de vos efforts.

Je remercie infiniment tous les membres de l'EDISCE et de l'UGA qui ont participé de proche et de loin à mon parcours doctoral. Particulièrement, la présidente de l'EDISCE Pr Anne Guérin, Pr Jean-Yve Coulon et la directrice Adjointe de l'EDISCE Mme Angélique Stéphanou. Le soutient du Pr Guérin tout au long de mon parcours doctoral, notamment les trois dernières années, a été primordiale pour amener au bord sûr cette thèse. Votre sagesse, patience et esprit positif est un avantage pour tous les étudiants particulièrement pour moi.

Je remercie la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer et l'Association Libanaise pour le Soutient de l'Education Publique présidée par M. Samir El JISSR qui ont participé au financement d'une partie de ma thèse.

Je remercie tous les collègues et les collaborateurs de l'équipe 5 et 7 du Grenoble Institut des Neurosciences et du CEA qui ont laissé leur marque dans cette thèse et dans ma vie de thésard. Particulièrement Ulysse et Flavien, sans vous je ne penses pas pouvoir tenir les 3 premières années. Merci pour votre contribution.
Merci à vous deux mon cousin Philippe et mon pote Dr Khaled de m'épauler avec les ph*autes d'orthograF*e.

Mille merci à Amina de m'accompagner chez Labarère (Fuck qui ?), à Olivier de m'accompagner à la cantine, à Djilali de me faire le tour de la ville de Grenoble en écoutant Georges Brassens, à Gabriel de m'avoir accueilli chez toi quand j'ai besoin, à toi Emma pour les discussions d'anglais. 11 ans de parcours et ça continue !

Je te remercie Boudewijn mon directeur de thèse de m'épauler, soutenir mon projet de recherche et surtout accepter de diriger ma thèse. Merci d'être à l'écoute, tes conseils, nos échanges scientifiques et surtout tes demandes d'analyses supplémentaires à l'∞ ont contribués à ressortir de nouveaux résultats qui ont laissé une marque dans ce travail.

Je te remercie Adriana ma co-directrice de thèse, t'es ma source de motivation pour cette thèse. J'ai usé tes compétences en Médecine, Physique, Informatique, Statistique et en Expérimentation animale. Je m'incline devant tes connaissances, ta patience, ton écoute et ta capacité de canaliser mon énergie et ta capacité à décoder mes pensées sans user mon énergie !

A vous ma famille, mes parents Georges (le têtu comme moi/Force et honneur) et Carmen (la source d'amour inconditionnelle), mes grands-parents Nadia (La persévérance) et Carmen (Le sacrifice), mes tantes et oncles Samar (Le parcours de A à Z), Rahmé, Elisabeth, Zaki et Michel (Le soutient).

A ma sœur et mes frères, mes sources de joie et de réussite, A Nadia la Complice, A Zaki le Protecteur, A César Le fort, A Fadi Le petit rigolo

A ma Mère qui a cultivé en nous le « sacrifice pour l'autre et l'amour de l'autre » notre force et faiblesse.
A toi Dan J, pour que tu saches dans le futur que sans le « sacrifice » de Adriana, ton parrain n'a pas pu rédiger ce dernier *m.o.t.* !

The path
Life is a long path in **W**hich we g**R**ow, meet obstacles, st**R**uggle to achieve our dreams a**ND** become wise**R** by all go**I**ng in th**E** same directio**N**. **O**ur stay is limite**D**, but this do**E**sn't mean we must live passively oppressed by our destiny. **O**n the contrary, we must try to get the best out o**F** existence (**C**a**R**men lorenzo).
Alw**A**ys choose the path that seems the best eve**N** if it s**E**ems the most difficult: habit will soon make it pleasant. (pythagoras)
Dawn cannot be reached without going through the paths of the night. (khalil **G**ibran)
The most important thing in life is to choose one direction, and forget the others. (kasturba gandhi)
life is like riding a bicycle. to stay in balance, you have to keep moving. (**A**lbert **E**instein)
Some wrongs need to be done, bringing experience to its person and lighting the roads to the others. (michel sarraf)

Table des Matières

Liste des acronymes et des abréviations **11**

Introduction générale **16**

I. Chapitre 1 : ETAT DE L'ART **21**

I.1. Contexte médical du cancer **22**

I.1.1. Les cancers **22**

I.1.2. Statistique des cancers et coût économique **23**

I.1.3. Tumeurs du système nerveux central **27**

I.1.3.1. Le système nerveux **27**

I.1.3.2. La barrière hémato-encéphalique **28**

I.1.3.3. Tumeurs du système nerveux central **30**

I.1.3.3.a. Classification des gliomes OMS 2016 30

I.1.3.3.b. Le glioblastome multiforme 31

I.2. La prise en charge thérapeutique du glioblastome **33**

I.2.1. La chirurgie **33**

I.2.2. La thérapie par rayonnement ionisant **35**

I.2.3. La chimiothérapie **37**

I.2.4. Thérapie anti-angiogénique **38**

I.2.4.1. Angiogenèse tumorale **38**

I.2.4.2. Traitements anti-angiogéniques et leur mode d'action **40**

I.2.4.3. Traitement par Bevacizumab **42**

I.2.4.4. Traitement par Bevacizumab par injection intratumorale ou CED **45**

I.3. Suivi thérapeutique du glioblastome par imagerie **47**

I.3.1. IRM de la microvascularisation cérébrale **49**

I.3.1.1. Technique dynamique de susceptibilité magnétique **49**

I.3.1.1.a. Technique dynamique du premier passage 50

I.3.1.1.a.1. Conversion du signal IRM en concentration d'agent de contraste 50

I.3.1.1.a.2. Volume sanguin cérébral relatif 53

I.3.1.1.a.3. Volume sanguin cérébral absolu 54

I.3.1.1.b. Volume sanguin et perméabilité vasculaire en cas d'extravasation de l'agent de contraste 55

I.3.1.1.b.1. Modèle bi-compartimental ... 55

I.3.1.1.c. Limites de la technique dynamique de susceptibilité magnétique ... 56

I.3.1.2. Technique dynamique de rehaussement de contraste pondérée T_1 57

I.3.1.3. Fonction d'entrée artérielle 58

I.3.1.4. Rapid steady state T_1 59

I.3.1.4.a. Origine du signal rapide stady state T_1 ... 60

I.3.1.4.a.1. Séquence d'imagerie IR-FLASH 2D ... 61

I.3.1.4.a.2. Signal $RSST_1$ ... 63

I.3.1.4.a.3. M_z en fonction du TR, T_{inv} et T_1 ... 64

I.3.1.4.b. Détermination de la concentration de l'agent de contraste ... 66

I.3.1.4.c. Mesure du volume sanguin par la méthode $RSST_1$ ... 66

I.3.1.4.c.1. Volume sanguin et perméabilité vasculaire en cas d'extravasation de l'AC 68

I.3.2. IRM de la microstructure cérébrale 69

I.3.2.1. IRM du tenseur de diffusion 71

I.3.2.1.a. Diffusion Brownienne de la molécule d'eau ... 71

I.3.2.1.b. Mesure des paramètres de diffusion ... 73

I.3.2.1.b.1. Déphasage de spins par gradients de phases ... 73

I.3.2.1.b.2. Méthode de Stejskal et Tanner ... 74

I.3.2.1.b.3. Atténuation du signal et coefficient de diffusion ... 75

I.3.2.1.b.4. Paramètres du tenseur de diffusion ... 77

I.3.2.2. IRM FLAIR 78

I.3.2.3. Apports de l'imagerie FLAIR et des paramètres DTI dans la neuro-oncologie clinique 80

I.3.3. Etude préclinique de la microvascularisation et de la microachitecture tumorale et péritumorale sous traitement anti-angiogéniques 83

II. Chapitre 2 : PROBLEMATIQUES DE LA METHODE $RSST_1$: choix de la séquence d'imagerie et quantification du signal $RSST_1$ en cas d'extravasation de l'agent de contraste 97

II.1. Objectifs de l'étude 98

II.2. Matériels et méthodes 99

II.2.1. Imageur IRM Bruker 99

II.2.2. Modèles animaux 99

II.2.3. Agent de contraste 99

II.2.4. Séquences IRM 100

II.2.4.1. Inversion récupération spin écho-rapide 100

II.2.4.2. Spin écho rapide $T_{1\text{-map}}$ 100

II.2.4.3. Turbo RARE écho de spin.....101

II.2.4.4. IR-MDEFT 3D 101

II.2.5. Simulation théorique de l'aimantation longitudinale.....104

II.2.6. Le rapport signal sur bruit (RSB) théorique 105

II.2.7. Traitement des données IRM.....107

II.2.7.1. Quantification du VSC 107

II.2.7.2. Mesure expérimentale du rapport signal sur bruit 107

II.3. Protocoles expérimentaux.....107

II.3.1. Etude in vitro.....107

II.3.1.1. Préparation des échantillons de différents T_1.....107

II.3.1.2. Etude expérimentale IRM 108

II.3.1.2.a. Mesure du temps de relaxation longitudinal T_1 109

II.3.1.2.b. Mesure du signal $RSST_1$ par la séquence IR-MDEFT 3D 109

II.3.2. Etude in vivo.....110

II.3.2.1. Préparation des animaux pour imagerie IRM 111

II.3.2.2. Préparation des concentrations de l'agent de contraste 111

II.3.2.3. Etude expérimentale IRM 112

II.3.2.3.a. Détermination du T_{inv} qui minimise l'aimantation du tissu cérébral 112

II.3.2.3.b. Maximisation de l'aimantation vasculaire cérébrale 113

II.3.2.3.c. Signal vasculaire cérébrale et RSB : IR-FLASH versus IR-MDEFT 3D114

II.3.2.3.d. RSB théorique versus expérimental 115

II.4. Résultats 118

II.4.1. Simulation de l'aimantation longitudinale: IR-MDEFT 3D versus IR-FLASH 2D 118

II.4.2. Comparaison théorique du RSB : imagerie 2D versus 3D.....121

II.4.3. Mise en place de l'IR-MDEFT 3D : comparaison à l'IR-FLASH 2D.....121

II.4.3.1. Mesure in vitro du temps de relaxation longitudinal T_1.....122

II.4.3.2. Mesure in vitro du signal $RSST_1$ par la séquence IR-MDEFT 3D 123
II.4.3.3. Détermination du T_{inv} qui minimise l'aimantation du tissu cérébral ...125
II.4.3.4. Maximisation de l'aimantation vasculaire cérébrale 127
II.4.3.5. Signal vasculaire cérébral et RSB : IR-FLASH 2D versus MDEFT 3D 128
II.4.3.6. RSB théorique verus expérimental 133
II.4.4. Stratégies d'amélioration de la résolution spatiale 136
II.4.5. Théorie du modèle mathématique développé pour la quantification des paramètres vasculaires tumoraux 141
II.5. Discussion et conclusion 148
III. Chapitre 3 : Modélisation du signal d'extravasation RSST1 et quantification des paramètres vasculaires tumoraux 152
III.1. Objectifs de l'étude 153
III.2. Matériels et méthodes 154
III.2.1. Lignées cellulaires 154
III.2.2. Modèles animaux 155
III.2.3. Culture cellulaire 155
III.2.4. Agents de contraste 156
III.2.5. Séquences IRM utilisées 156
III.2.5.1. IR-MDEFT 3D 156
III.2.5.2. Multi Gradient Echo 157
III.2.5.3. Turbo RARE écho de spin 157
III.2.6. Traitements des données IRM 158
III.2.6.1. Analyse du signal $RSST_1$ 158
III.2.6.2. Analyse du signal de susceptibilité magnétique ΔR_2^* 159
III.2.6.3. Conditions d'exclusion des valeurs de VS 159
III.2.7. Histologie et immunohistologie 160
III.2.7.1. Coloration hématoxyline-Erythrosine 160
III.2.7.2. Marquage immunohistologique 160
III.2.7.3. Marquage Hoechst 160
III.2.7.4. Acquisition et traitement des données immunohistologiques 161
III.2.8. Analyses statistiques 162
III.3. Protocoles expérimentaux 162

III.3.1. Etude in vivo 162
III.3.1.1. Implantation intracrânienne des cellules tumorales 162
III.3.1.2. Préparation des animaux pour imagerie IRM 163
III.3.1.3. Etude expérimentale IRM 163
III.3.2. Etude ex vivo 165
III.3.2.1. Protocole immunohistologique 165
III.4. Résultats 167
III.4.1. Objectif 1 : Mise au point du protocole d'analyse semi-automatique pour la modélisation du signal $RSST_1$ tumoral. 167
III.4.1.1. Détermination des paramètres d'entrée du modèle mathématique ..167
III.4.1.2. Conditions d'application du modèle mathématique et critères d'accéptation des résultats. 173
III.4.2. Objectifs 2 : TBVf de la tumeur C6 obtenu par le modèle mathématique versus la méthode de susceptibilité magnétique et l'histologie. 180
III.5. Discussion et conclusion 185
IV. Chapitre 4 : $RSST_1$ pour le suivi quantitatif des paramètres vasculaires : reproductibilité de la méthode et sensibilité aux effets du Bevacizumab. Comparaison avec une analyse par microscopie à deux photons. 193
IV.1. Objectifs de l'étude 194
IV.2. Matériels et méthodes 195
IV.2.1. Modèles animaux 195
IV.2.2. Traitement anti-angiogénique dirigé contre l'U87 195
IV.2.3. Séquences IRM utilisées 196
IV.2.3.1. FLASH 196
IV.2.3.2. IR-MDEFT 3D 196
IV.2.3.3. Turbo RARE écho de spin 197
IV.2.3.4. Spin écho rapide $T_{1\text{-map}}$ 197
IV.2.3.5. Inversion récupération spin écho rapide 197
IV.2.4. Traitements des données IRM 197
IV.2.5. Microscopie à deux photons 198
IV.2.5.1. Marquage Ant2-PHEA 199
IV.2.5.2. Acquisitions et traitements des données par microscopie à deux photons 199

IV.2.6. Analyses statistiques 201

IV.3. Protocoles expérimentaux 201

IV.3.1. Etude in vivo 201

IV.3.1.1. Etude expérimentale IRM 202

IV.3.2. Etude ex vivo 204

IV.4. Résultats 204

IV.4.1. Etude pilote de détermination du temps d'élimination de Gd-DOTA permettant la répétition de la mesure d'IRM $RSST_1$ 204

IV.4.2. Objectif 1 : Etude de reproductibilité de la méthode $RSST_1$ 206

IV.4.2.1. Mesure de reproductibilité du signal $RSST_1$ et des paramètres vasculaires 206

IV.4.2.2. Comparaison TBVf : IRM $RSST_1$ 3D vs imagerie microscopique à deux photons 3D 212

IV.4.3. Objectifs 2 : Etude de suivi tumoral 215

IV.4.3.1. Suivi qualitatif du signal $RSST_1$ 216

IV.4.3.2. Suivi quantitatif du TBVf et de K_{model} 219

IV.5. Discussion et conclusion 227

V. Chapitre 5 : Imagerie du tenseur de diffusion pour la caractérisation tumorale et péritumorale sous traitement par Bevacizumab par voie intraveineuse versus intratumorale (CED) 236

V.1. Objectifs de l'étude 237

V.2. Matériels et méthodes 238

V.2.1. Modes d'injection du Bevacizumab 238

V.2.2. Séquences IRM utilisées 238

V.2.2.1. FLASH 238

V.2.2.2. Acquisition du tenseur de diffusion 239

V.2.2.3. Turbo RARE écho de spin 239

V.2.2.4. Inversion récupération spin écho rapide 239

V.2.3. Traitements des données IRM 240

V.2.4. Analyses statistiques 241

V.3. Protocoles expérimentaux 241

V.3.1. Etude in vivo 241

V.3.1.1. Etude expérimentale IRM 242

V.4. Résultats 243

V.5. Discussion et conclusion 254

VI. Discussion générale 261

VII. Conclusion et perspectives 263

VIII. Publications 267

IX. Communications orales et poster 267

X. Annexes 270

X.1. Où et comment mesurer l'AIF 270

X.2. Source d'erreurs obtenues lors de la mesure de l'AIF 270

X.3. Injection en i.v chez la souris et le rat 273

X.4. Relation hypothétique entre K_{model} et K^{trans} 275

X.5. Curriculum vitea 280

Références 283

Liste des acronymes et des abréviations

AC	Agent de contraste
ADC	Apparent diffusion coefficient
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Arterial input function
CASL	Continuous arterial spin labeling
B_0	Champ magnétique statique
BHE	Barrière hémato-encéphalique
VSC	Volume sanguin cérébral
CE	contrast enhancement
C_{ev}	Concentration de l'AC dans le compartiment extravasculaire extracellulaire
CBF	Débit sanguin cérebral
C_p	Concentration de l'AC dans le compartiment intravasculaire
CED	Convection-enhanced delivery
CT-Scan	Computed tomography
$D_{//}$	Diffusivité longitudinale (Diffusivité parallèle)
$D^{\perp}$	Diffusivité transversale (Diffusivité perpendiculaire)
DCE-T_{1w}	Dynamic contrast enhancement T_1 weighted
DSC-$T_2^*{}_w$	Dynamic susceptibility contrast T_2^* weighted
DTI	Diffusion tensor imaging
EES	Extravascular extracellular space
EG	Echo de gradient
EPI	Echo planar imaging
ev	extravasculaire
EVP	Effet de volume partiel
FA	Facteur d'anisotropie
F_p	Flux plasmatique
FLAIR	Fluid attenuation inversion recovery
GBM	Glioblastome multiforme
Gd-DOTA	Gadolinium tetraazacyclododecane tetraacetic acid

Gr	Gradient de champ magnétique radial (linéaire)
INCA	Institut national du cancer
IRM	Imagerie par résonance magnétique
iv	intravasculaire
k^{ep}	Taux d'échange d'AC entre le compartiment vasculaire et extravasculaire extracellulaire
K_{model}	Coefficient apparent d'accumulation d'AC (méthode $RSST_1$)
K^{trans}	Constante de transfert d'AC entre le compartiment vasculaire et extravasculaire extravcellulaire
Kx	Direction x dans le plan de Fourier
Ky	Direction y dans le plan de Fourier
MD	Mean diffusivity
MDEFT	Modified driven equilibrium Fourier transform
M_0	Aimantation longitudinale à l'équilibre thermodynamique
M_z	Aimantation longitudinale
OMS	Organisation mondiale de la santé
PS	Perméabilité surfacique
R	Fonction de résidu de l'AC dans un voxel en fonction du temps
R_1	Vitesse de relaxation longitudinale
r_1	Relaxivité longitudinale
r_2	Relaxivité transverse
R_2^*	Vitesse de relaxation transverse
rVSC	Volume sanguin cérébral relatif
RCP	Réunion de concertation pluridisciplinaire
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROI	Région d'intérêt
RSB	Rapport signal sur bruit
$RSST_1$	Rapid steady state T_1
S_{iv}	Signal $RSST_1$ intravasculaire normalisé (i.e V_p, i.e TBVf chez la méthode $RSST_1$)
S_L	Signal $RSST_1$ extravasculaire extracellulaire affecté par l'agent de contraste (i.e V_e chez la méthode $RSST_1$)
SN	Système nerveux

SNC	Système nerveux central
S_{norm}	Signal $RSST_1$ normalisé
SNP	Système nerveux périphérique
SE	Spin écho
t_0	Temps d'arrivée de l'AC au voxel de mesure
$T_{1/2}$	Période de demi-vie
T_1	Constante de temps de relaxation longitudinale
T_{1c}	Limite supérieure du temps T_1 correspondant à un signal $RSST_1$ maximal
T_{1cut}	Limite inférieure du temps T_1 correspondant à un signal $RSST_1$ nul
T_{1W}	Imagerie pondérée T_1
$T_{1w\text{-}Gd\text{-}DOTA}$	Imagerie pondérée T_1 avec injection du Gd-DOTA
T_2^*	Constante de temps de relaxation transverse dans un champ magnétique inhomogène
T_2	Constante de temps de relaxation transverse
T_{2w}	Imagerie pondérée T_2
TBVf	Tumor blood volume fraction (absolu)
T_c	Temps de transit de l'AC dans les capillaires pour chaque voxel de l'image
TD	Delay time
TE	Temps d'écho
T_{inv}	Temps d'inversion
TEP	Tomographie par émission de positons
TF	Transformée de Fourier
TR	Temps de répétition
TR_{FLASH}	Temps de répétition entre les gradients de la séquence IR-MDEFT 3D
t_{RSS}	Durée du plateau du signal $RSST_1$
t_{RSS1}	Temps au moment du début du plateau du signal $RSST_1$
t_{RSS2}	Temps au moment de la fin de plateau du Signal $RSST_1$
TTM	Temps de transit moyen
TTP	Time to peak
USPIO	Ultra small particle of iron oxide
V_e	Volume extravasculaire
V_p	Volume intravasculaire (plasmatique)

VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R	Vascular endothelial growth factor receptors
W_0	Fréquence de Larmor
x_{AIF}	Inverse de la relaxivité transversale
γ	Rapport gyromagnétique du proton
$\Delta\chi$eff	Différence de susceptibilité magnétique effective
ϕ	Phase du spin

Introduction générale

Les gliomes, tumeurs malignes du système nerveux central (SNC), représentent en France une pathologie relativement rare mais avec un taux de mortalité très élevé pouvant atteindre les 60 % des cas diagnostiqués. Les glioblastomes multiformes (GBMs) représentent le stade de gravité le plus élevé des tumeurs gliales du SNC, la survie moyenne après diagnostic étant de seulement 14 mois.

Actuellement les méthodes de diagnostique et de suivi thérapeutique des GBMs ne répondent pas parfaitement aux besoins médicaux. Le développement de nouvelles méthodes quantitatives et non invasives est nécessaire pour un meilleur suivi des patients permettant d'évaluer les stratégies thérapeutiques émergentes, comme les anti-angiogéniques.

Des telles méthodes doivent également être mises au point pour le rongeur, l'expérimentation animale étant une étape incontournable pour l'évaluation de l'efficacité des traitements, de leur index thérapeutique et de leurs effets secondaires avant leurs mises en marché.

Les enjeux sont nombreux :

1- Suivi de l'efficacité des thérapies anti-angiogénique en préclinique avant leurs mises en marché par une méthode de référence non invasive.
2- Suivi des effets indésirables des thérapies anti-angiogénique en préclinique avant leurs mises en marché.
3- Adapter les décisions thérapeutiques grâce à un suivi longitudinal personnalisé de l'efficacité des traitements anti-angiogéniques afin d'améliorer la survie et/ou la qualité de vie des patients.
4- Enjeux socio-économique, car le traitement par des anti-angiogéniques et le suivi thérapeutique sont chers. Une méthode de référence non invasive permet d'aider à prendre une décision d'arrêter ou de poursuivre le traitement.

Le projet de cette thèse est à la fois méthodologique et appliqué. La thèse a été menée dans un esprit multidisciplinaire dans le but de développer une méthode pour caractériser l'environnement des tumeurs cérébrales en termes de ''microvascularisation'' et de

''microarchitecture'' notamment pour l'évaluation des traitements anti-angiogéniques en préclinique.

- Verrous 1: La biopsie tissulaire est considérée comme méthode de référence, mais a plusieurs limites : 1) Caractère invasif, 2) échantillonnage potentiellement non-représentatif, 3) analyse qualitative ou quantification relative.
- ✓ Solution 1: Les techniques d'imagerie assurent une acquisition non invasive couvrant la totalité de la lésion, du tissu environnant et potentiellement sain pour comparaison. L'imagerie par résonance magnétique est particulièrement adaptée pour des acquisitions répétées lors d'un suivi car dépourvue d'effets secondaires, et plusieurs techniques quantitatives sont déjà utilisées en recherche et en clinique.

- Verrous 2: En ce qui concerne la microvascularisation, la quantification des paramètres vasculaires tel que le volume sanguin cérébral par IRM se fait actuellement avec des méthodes dites « de perfusion » utilisant une mesure indirecte qui repose sur une modélisation complexe du signal RMN et sur des hypothèses plus ou moins validées dans le tissu vivant et pathologique et/ou qui nécessite des mesures complémentaires difficilement reproductibles.
- ✓ Solution 2: Une méthode d'IRM pour la mesure directe du volume sanguin cérébral a été developpée au laboratoire, la méthode $RSST_1$ (Rapid-Steady State T_1). Notamment, elle ne nécessite pas la mesure de la concentration de l'agent de contraste (AC) au cours du temps.

- Verrous 3: Néanmoins, elle requière une optimisation de la séquence utilisée pour atteindre un rapport signal sur bruit (RSB) suffisant dans le cas d'une imagerie cérébrale chez la souris, et pour minimiser les biais systématiques de la mesure. Pour la quantification du volume vasculaire, la méthode requière le confinement de l'AC dans le compartiment vasculaire, ce qui n'est pas assurée dans les vaisseaux tumoraux, même avec des ACs concus pour avoir une rémanence vasculaire.
- ✓ Solution 3: Montrer que la séquence d'imagerie 3D « IR-MDEFT 3D » à la place de la séquence d'imagerie 2D « IR-FLASH 2D » utilisée auparavant dans notre équipe permet

un meilleur RSB, un signal $RSST_1$ indépendant du flux sanguin et une mesure moins affectée par le signal résiduel observé chez la séquence IR-FLASH 2D.

- ✓ Proposer un modèle mathématique qui modélise le signal $RSST_1$ lors de l'extravasation de l'AC vers le compartiment extravasculaire extracellulaire afin de pouvoir quantifier avec la méthode d'IRM $RSST_1$ le volume sanguin tumoral en présence de l'extravasation et ceci sans avoir recours à la fonction d'entrée artérielle (AIF).

- ➢ Verrous 4: En ce qui concerne la microstructure, le suivi de l'infiltration des cellules tumorales, suite au traitement anti-angiogénique, par imagerie de tenseur de diffusion est toujours en cours de validation car les résultats actuels montrent une sensibilité et une spécificité faible de cette méthode.
- ✓ Solution 4: Proposer une nouvelle stratégie d'analyse des paramètres du tenseur de diffusion dans la région péritumorale en effectuant une étude rétrospective de la région péritumorale tout en se basant sur différentes modalités d'imagerie IRM. Confronter ces résultats avec une étude histologique pour évaluer la spécificité des paramètres DTI.

Dans **le chapitre 1** de cette thèse, nous allons introduire le contexte médical du cancer du système nerveux central et la prise en charge actuelle des GBMs. Nous exposerons ainsi les problématiques sous-jacentes au niveau des traitements préconisés notamment en ce qui concerne les traitements anti-angiogéniques. Ensuite nous allons décrire les techniques d'imagerie ayant une utilité pour le suivi thérapeutique ; les principales techniques IRM pour l'évaluation des paramètres microvasculaires et microarchitecturales du tissu cérébral sont exposées, tout en soulignant leurs limites dans le cas des GBMs.

Le chapitre 2 comporte d'une part une étude théorique et expérimentale du signal $RSST_1$ obtenue par la séquence IR-MDEFT 3D. La quantification du volume sanguin par cette séquence ainsi que le RSB sont étudiés. Une comparaison avec la séquence IR-FLASH 2D est réalisée. D'autre part, le chapitre 2 expose l'origine du modèle mathématique proposé pour la modélisation du signal $RSST_1$ dans le cas de l'extravasation de l'AC.

Le chapitre 3 expose les différentes étapes d'application du modèle mathématique et les critères de rejet et d'acceptante des résultats dans le cas de tumeurs gliales chez la souris et le rat. Le chapitre comporte également une étude de faisabilité de la mesure du volume sanguin tumoral (TBVf) en appliquant ce modèle mathématique sur le signal $RSST_1$ obtenus avec la séquence IR-MDEFT 3D dans le cas d'une tumeur gliale chez le rat.

Le chapitre 4 comporte une étude de la reproductibilité des mesures du TBVf et du coefficient apparent de l'accumulation de l'AC (K_{model}) avec la méthode $RSST_1$ ainsi qu'une étude de la sensibilité de la méthode $RSST_1$ à détecter des changements du TBVf et de K_{model} dans le cas d'une tumeur gliale d'origine humaine en présence et en absence du traitement anti-angiogénique mimant le cas clinique.

Le chapitre 5 comporte une étude comparative des paramètres de DTI dans la région péritumorale d'une tumeur gliale sans et avec traitement anti-angiogénique administré par voie i.v versus CED. Les régions peritumorales sont délinées d'une façon individuelle par une étude rétrospective en se basant sur l'imagerie anatomique $T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ et sur l'imagerie FLAIR.

Enfin, les résultats, les limites et les avancées concernant la méthode $RSST_1$, la validité du modèle mathématique, la méthodologie préconisée pour analyser les paramètres de DTI dans les régions péritumorales ainsi que les perspectives et les améliorations envisageables sont discutées.

I. Chapitre 1 :

ETAT DE L’ART

I.1. Contexte médical du cancer

I.1.1. Les cancers

Les cancers, qu'ils s'agissent de tumeurs solides ou d'hémopathies, mettent en jeu une prolifération cellulaire anormale et incontrôlée dans l'organisme (Hanahan and Weinberg 2000). Ces états pathologiques résultent d'un dysfonctionnement de la fonction cellulaire et sa communication avec l'environnement dû à une ou plusieurs mutations de l'ADN cellulaire. Les cellules concernées sont dotées d'une autosuffisance en signaux de croissance, insensibles aux signaux inhibiteurs de la croissance, prolifèrent à l'infini et perdent leur capacité à déclencher l'apoptose, leur propre mort. Ces cellules sont capables d'induire l'angiogénèse et peuvent acquérir un pouvoir invasif et ainsi produire des métastases.

La transformation néoplasique est d'origine multifactorielle ; le dysfonctionnement cellulaire peut être causé et/ou accentué par des interactions entre les facteurs génétiques propres au sujet et des agents extérieurs comme les cancérogènes physiques (les irradiations ionisantes), les cancérogènes chimiques (l'amiante, les composants de la fumée du tabac) et les cancérogènes biologiques (les virus, bactéries…).

En réaction à l'altération du patrimoine génétique (ADN, chromosome, gène) la cellule peut réagir de trois façons essentiellement :

- Réaliser une réparation intégrale permettant la reprise de divisions normales.
- Effectuer des réparations fautives pouvant entraîner l'arrêt des cycles cellulaires (en G1) et/ou une mort par apoptose …; de tels évènements peuvent d'ailleurs se propager aux cellules voisines (effets bystander (Nagasawa and Little 1992) bien connus lors d'irradiations ionisantes) ;
- Des réparations fautives peuvent aboutir à des mutations produisant des cellules anormales, donnant naissance aux cellules/lignées/tumeurs cancéreuses (**figure I.1**).

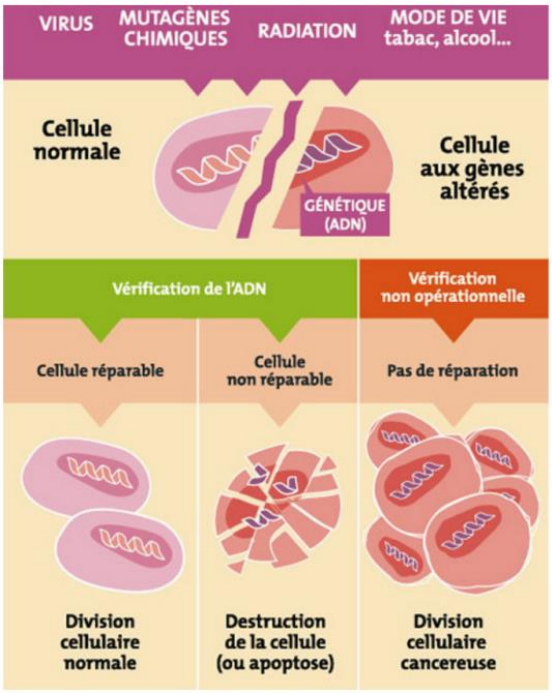


Figure I.1 : schéma illustrant la naissance des cellules cancéreuses (source : Fondation ARC)

I.1.2. Statistique des cancers et coût économique

Pour l'année 2012, L'agence internationale de recherche sur le cancer dans le Projet GLOBOCAN-2012 (Ferlay J 2013) estimait à 8,2 millions le nombre de décès suites aux cancers, ce qui en fait la première cause de mortalité au monde.

L'incidence estimée en Europe figure parmi les plus élevées dans le monde (**figure I.2**). L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que le nombre de nouveaux cas devrait augmenter de 70% (22 millions) environ au cours des deux prochaines décennies (Le Congrès Mondial contre le cancer à Paris en 2016).

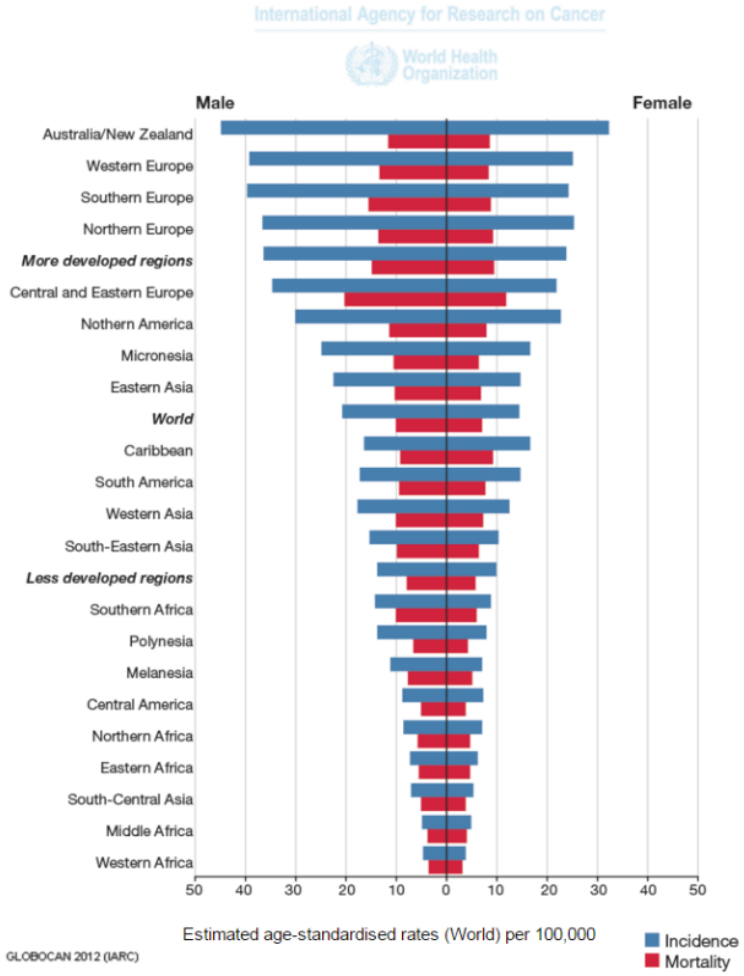


Figure I.2: répartition de l'incidence des cancers dans le monde et de leur mortalité. Valeurs obtenues pour 100 000 personnes (Ferlay J 2013).

En France, les chiffres officiels montrent que le taux d'incidence des cancers progresse annuellement de 3% environ (**figure I.3**) d'où une augmentation de 86% entre 1980 et 2005 (Belot and others 2008) alors que la croissance de la population n'a été que de 13%. Pas moins de 350 000 cas diagnostiqués et environ 150 000 décès en 2012, soit 30%, sont liés aux cancers tous types confondus (Binder-Foucard and others 2013). Les cancers sont donc un enjeu de santé publique et beaucoup d'efforts ont été mobilisés en France pour prévenir et lutter contre cette maladie.

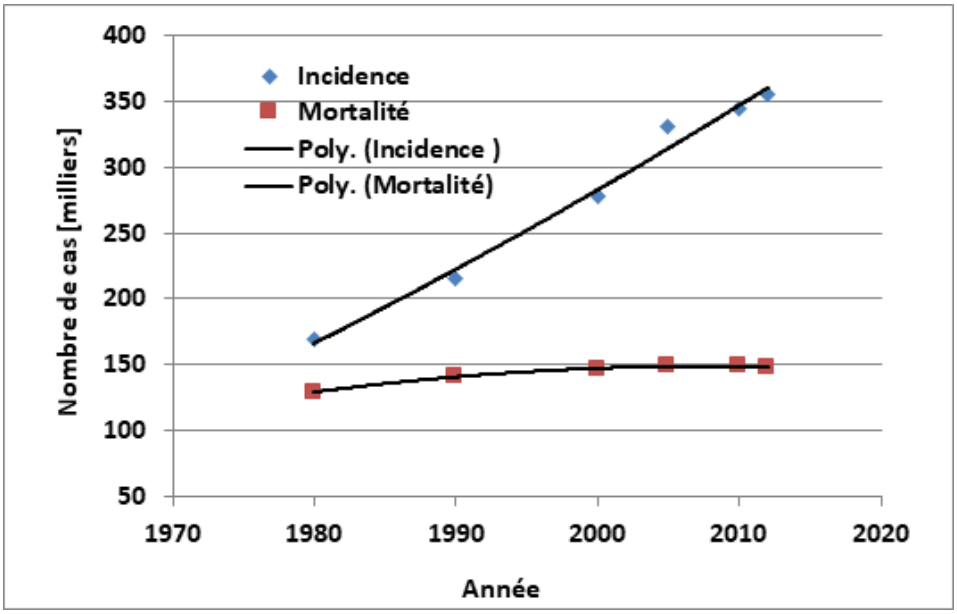


Figure I.3: Evolution de l'incidence et de la mortalité des cancers en France entre 1980 et 2005 (Binder-Foucard and others 2013).

Dans un contexte plus particulier, l'incidence des gliomes, tumeurs malignes du système nerveux (SN), est estimée à 5,1/100 000 habitants par an, avec une mortalité annuelle d'environ 60% des cas diagnostiqués, ce qui associe à cette pathologie relativement rare une mortalité très importante. De nouveaux traitements et méthodes de diagnostiques ainsi que des améliorations des stratégies thérapeutiques et de suivi des traitements ont été développés. Ceci a contribué à atteindre une stabilité, voir une petite baisse de mortalité entre 2005 et 2012 par rapport aux années entre 1980 et 2005 (**figure I.4**).

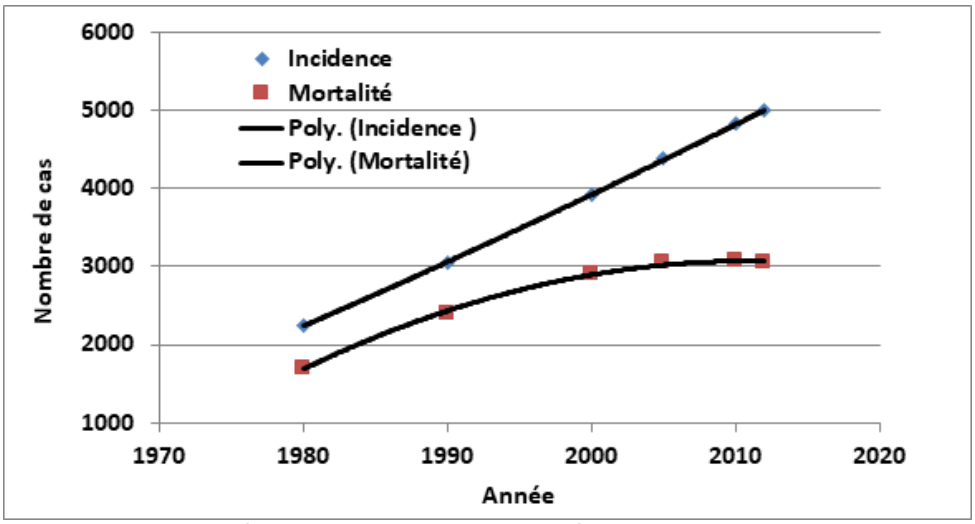


Figure I.4: Evolution de l'incidence et de la mortalité des cancers du SNC en France entre 1980 et 2005 (Binder-Foucard and others 2013).

Cette baisse de mortalité est accompagnée d'un coût économique très élevé. Les dépenses globales pour le lutte contre le cancer en France en 2004 atteignent environ 12 milliards d'euros dont 6.5 % ont été investis dans la recherche scientifique (INCA 2007), avant tout biomédicale, pour développer de nouvelles méthodes diagnostiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, traitements anti-angiogéniques, immunothérapie…).

Notons que le traitement par des médicaments anti-cancéreux occupe une partie non négligeable dans la démarche thérapeutique actuelle, au prix d'un coût (**figure I.5**) qui ne cesse d'augmenter relativement à celui du reste des médicaments de soin. Par exemple une des thérapies préconisées pour traiter les GBMs (gliomes stade IV), qui est toujours en cours d'évaluation, appuie l'utilisation des médicaments anti-angiogéniques qui n'ont à l'heure actuelle pas faits leurs preuves dans l'amélioration de la survie globale des patients et dont le coût est très important.

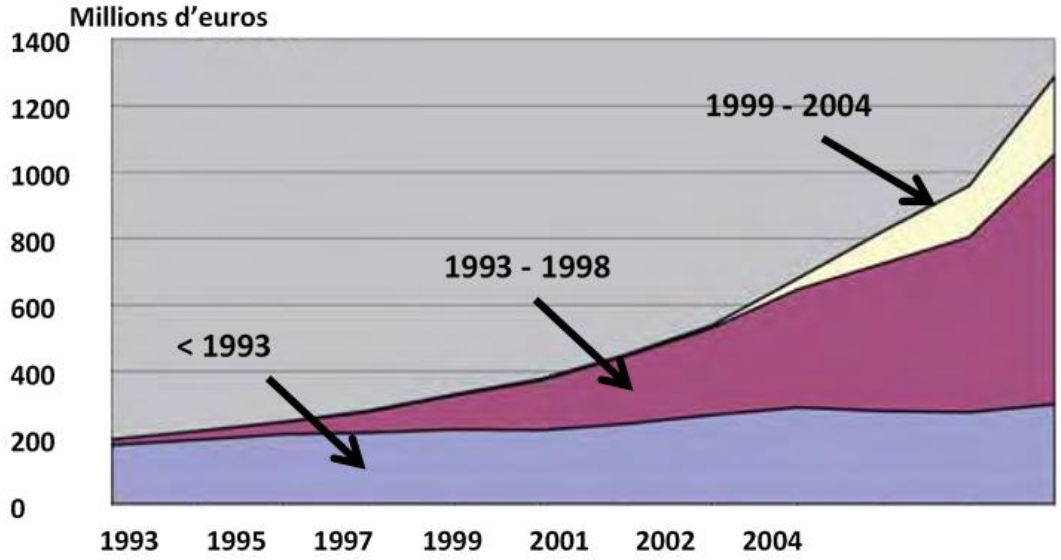


Figure I.5: Dépenses en médicaments anticancéreux en France selon la date de leur mise sur le marché (Analyse économique des coûts du cancer en France INCA-2007, référant à l'analyse faite par Wilking et al (Wilking and Jonsson 2005).

I.1.3. Tumeurs du système nerveux central

I.1.3.1. Le système nerveux

Le système nerveux est présent et indispensable dans tout l'organisme nécessaire pour la réception, le traitement, l'intégration et l'émission des messages nerveux. On y distingue le système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP). Le SNP a un rôle de messager de l'information de la périphérie vers le SNC et du SNC vers les organes effecteurs. Il est formé de ganglions et de nerfs.

Les tumeurs dites cérébrales sont les tumeurs qui touchent le SNC. Il est lui-même composé de deux parties, l'encéphale regroupant le cerveau, le tronc et le cervelet, et la moelle épinière comme le montre la **figure I.6 a**. Le SNC est composé de deux catégories cellulaires, les neurones qui sont spécialisés dans la neurotransmission et les cellules gliales qui jouent deux rôles principaux 1) assure le soutien, la protection immunitaire et le bon fonctionnement des neurones 2) rôle fonctionnel dans la transmission du signal intercellulaire gliale-gliale et gliale-neuronale (Blomstrand and others 2004; Meme and others 2009; Rouach and others 2008).

Les cellules gliales représentent environ 50 % des cellules du cerveau. On retrouve quatre principaux types de cellules gliales (**figure I.6 b**):

- Les astrocytes assurent le support, la protection des neurones, régulent le niveau de neurotransmetteurs dans les synapses et participent au maintien de la barrière hémato-encéphalique (BHE).
- Les oligodendrocytes synthétisent la myéline qui entoure les axones dans le SN, assurant ainsi le bon fonctionnement neuronal.
- Les cellules épendymaires, localisées sur les parois des cavités ventriculaires et de la moelle épinière, permettent les échanges entre le liquide cérébro-spinal et le parenchyme cérébral.
- Les microgliales sont des monocytes qui se transforment en macrophages qui forment la principale défense immunitaire active du SNC.

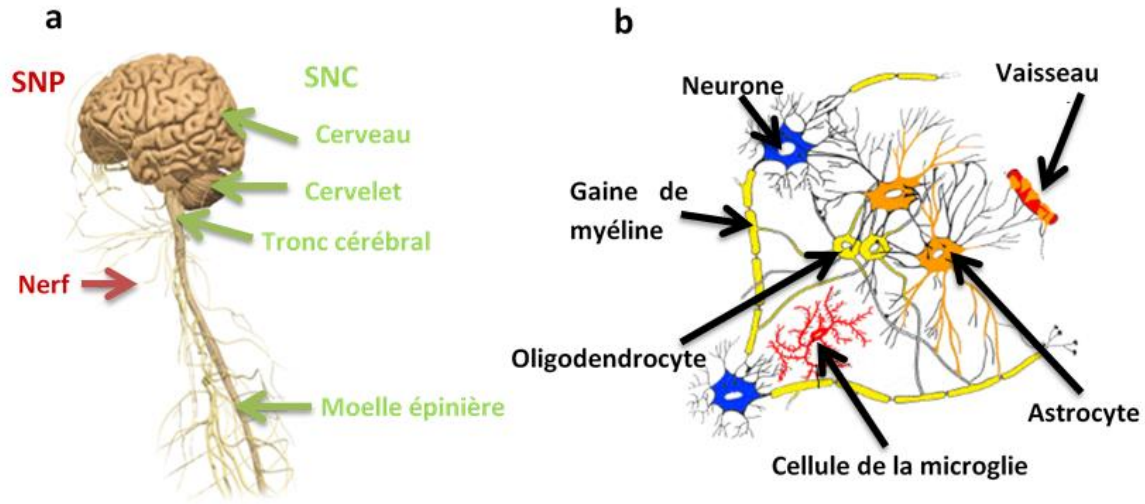


Figure I.6: a) Schéma du système nerveux chez l'homme (d'après lecorpshumain.fr). b) Les principales cellules gliales dans le SNC (d'après (Lamour 2010)).

I.1.3.2. La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière physiologique composée principalement de cellules endothéliales et par la lame basale qui sont à leur tour entourées par les péricites et les pieds des cellules astrocytaires (Serlin and others 2015). Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées et étanches (**figure I.7**). Cette

architecture assure une barrière entre le SNC et la circulation sanguine, d'où le nom 'BHE'. La BHE protége le cerveau contre les pathogènes, les toxines et les hormones pouvant nuire au parenchyme cérébral. Elle représente un filtre très sélectif (DeVries and others 1997), ne laissant passer que les nutriments essentiels à la fonction cérébrale, d'où un transport transcellulaire actif très sélectif.

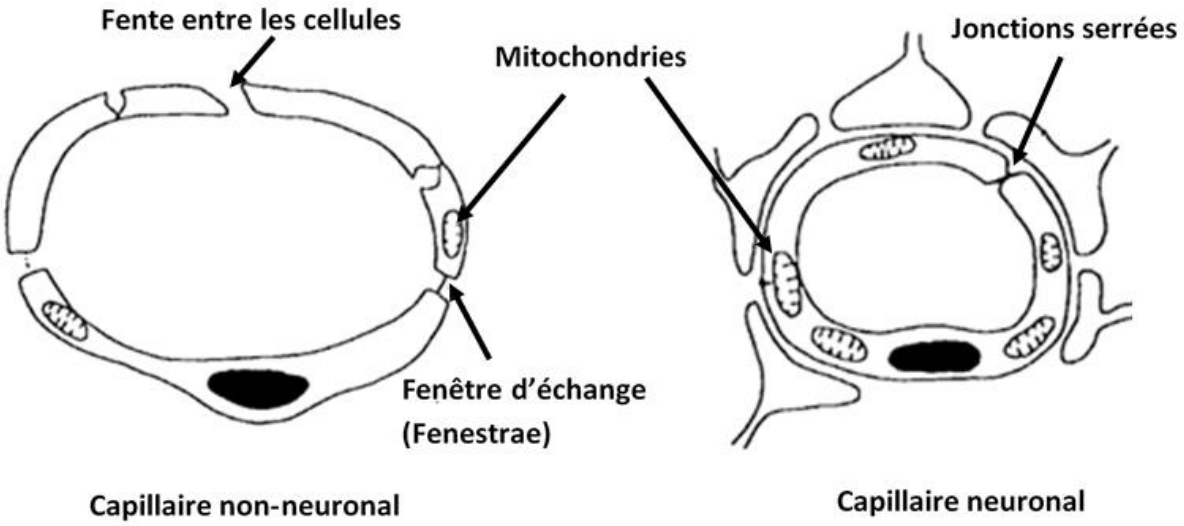


Figure I.7: Représentation schématique des caractéristiques morphologiques entre un capillaire non-neuronal (gauche) et un capillaire neuronal (droite). Un capillaire neuronal est garni d'une couche de cellules endothéliales qui manquent de fenêtre de passage et sont scellées avec des jonctions serrées. D'après (DeVries and others 1997).

L'intégrité ou l'altération de la BHE sont fortement impliquées dans les aspects pronostiques et diagnostiques des tumeurs, en particulier leur différenciation (**figure I.8**). Par contre, des altérations de la BHE peuvent limiter sévèrement les apports de l'imagerie quant à la quantification du volume sanguin cérébral (VSC), du débit sanguin cérébral (CBF) et d'autres paramètres vasculaires. Cet aspect sera abordé ultérieurement dans la partie IRM.

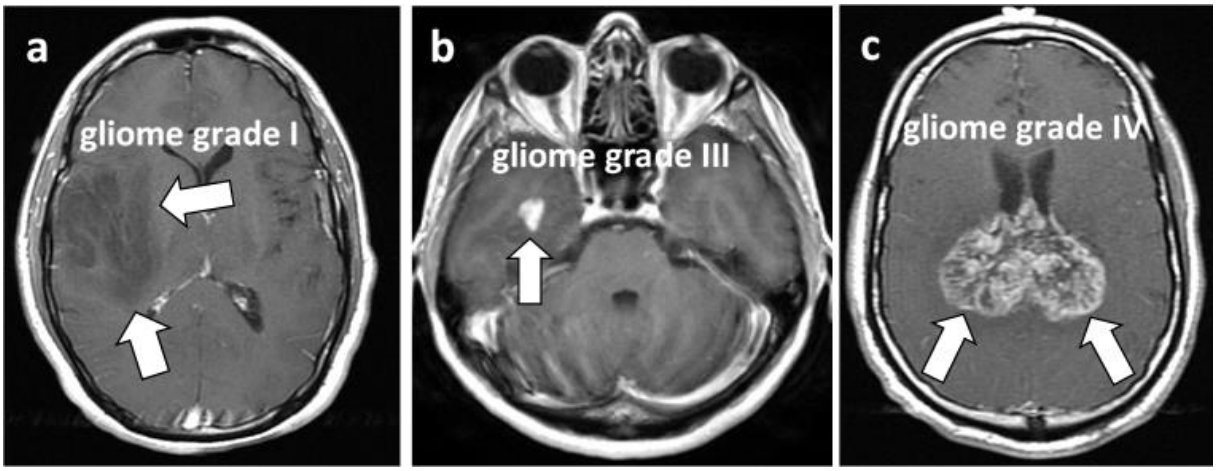


Figure I.8: Images pondérées T_1 avec injection du Gd-DOTA ($T_{1w\text{-}Gd\text{-}DOTA}$) chez des patients porteurs de tumeurs cérébrales/gliomes cérébraux. a) gliome de bas-grade sans prise de contraste, b,c) astrocytome anaplastique (grade III) et glioblastome (grade IV) respectivement, avec une prise de contraste (Julio Arevalo Perez, Department of Radiology Memorial Sloan-Kettering Cancer Center New York)

I.1.3.3. Tumeurs du système nerveux central

Il existe environ 200 types de tumeurs cérébrales selon l'OMS, classifiées en fonction des cellules dont elles sont issues. Ici on s'intéresse aux gliomes qui proviennent de cellules dérivant de la mutation des cellules gliales. Elles constituent un ensemble hétérogène de tumeurs primitives du SNC. Cette grande hétérogénéité des gliomes, aussi bien au niveau clinique, pathologique, que pronostic, en fait un véritable défi pour la recherche biomédicale.

I.1.3.3.a. Classification des gliomes OMS 2016

En 1979, l'OMS a initié une classification internationale des tumeurs cérébrales (KJ 1979) afin d'unifier le plus possible la prise en charge des tumeurs. Ceci permet de mener des études épidémiologiques au niveau international et des essais cliniques multicentriques.

Depuis 1979, les modes de classement ont évolué, la dernière classification (Brouiland and Hottinger 2017) (OMS 2016) se base sur multiples critères pour définir le diagnostic et le classement des tumeurs. Cette classification est actuellement présentée comme la norme de classification des tumeurs cérébrales en oncologie clinique dans le monde entier.

Selon cette classification, le grade des tumeurs de gliomes n'est plus défini seulement selon « des critères morphologiques » (i.e densité cellulaire, atypies nucléaires, mitoses, prolifération microvasculaire et nécrose), « mais incorpore également des paramètres moléculaires aboutissant à un « diagnostic intégré » en plusieurs strates » (Brouiland and Hottinger 2017) (**tableau I.1**):

- grade I : tumeurs bénignes à croissance lente et généralement bien circonscrites.
- grade II : tumeurs pré-malignes, à croissance lente mais avec des limites imprécises.
- grade III : tumeurs malignes à croissance modérée.
- grade IV : tumeurs hautement malignes à croissance rapide et limite tumorale mal définie.

Grades	Tumeurs diffuses astrocytaires et oligodendrogliales
II	Astrocytome diffus, *IDH*-muté Astrocytome gémistocytique, *IDH*-muté
II	*Astrocytome diffus, IDH-non muté*
II	Astrocytome diffus, NOS
III	Astrocytome anaplasique, *IDH*-muté
III	*Astrocytome anaplasique, IDH-non muté*
III	Astrocytome anaplasique, NOS
IV	Glioblastome, *IDH*-non muté Glioblastome à cellules géantes Gliosarcome *Glioblastome épithélioïde*
IV	Glioblastome, *IDH*-muté
IV	Glioblastome, NOS
IV	Gliome diffus de la ligne médiane, H3 K27M-muté
II	Oligodendrogliome, *IDH*-muté et codélétion 1p-19q
II	Oligodendrogliome, NOS
III	Oligodendrogliome anaplasique, *IDH*-muté et codélétion 1p-19q
III	*Oligodendrogliome anaplasique, NOS*
II	*Oligoastrocytome, NOS*
III	*Oligoastrocytome anaplasique, NOS*

Grades	Autres tumeurs astrocytaires
I	Astrocytome pilocytique Astrocytome pilomyxoïde
I	Astrocytome subépendymaire à cellules géantes
II	Xanthoastrocytome pléomorphe
III	Xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique
	Tumeurs épendymaires
I	Subépendymome
I	Ependymome myxopapillaire
I	Ependymome Ependymome papillaire Ependymome à cellules claires Ependymome tanacytique
II ou III	Ependymome, *RELA* fusion-positif
III	Ependymome anaplasique
	Autres gliomes
II	Gliome chordoïde du 3e ventricule
I	Gliome angiocentrique
–	Astroblastome

Tableau I.1: Classification selon l'OMS 2016 (Brouiland and Hottinger 2017)des principaux types de gliomes selon leur grade.

I.1.3.3.b. Le glioblastome multiforme

Le GBM multiforme (GBM) connu aussi sous le nom astrocytome de grade IV est l'un des cancers le plus agressif du SNC (Black 1991). Il représente entre 15 et 20% des tumeurs cérébrales et environ la moitié de tous les gliomes (Adamson and others 2009). La médiane

de survie après diagnostique est d'environ 15 mois. En outre, le taux de survie à cinq ans est de 5 % (Ostrom and others 2014).

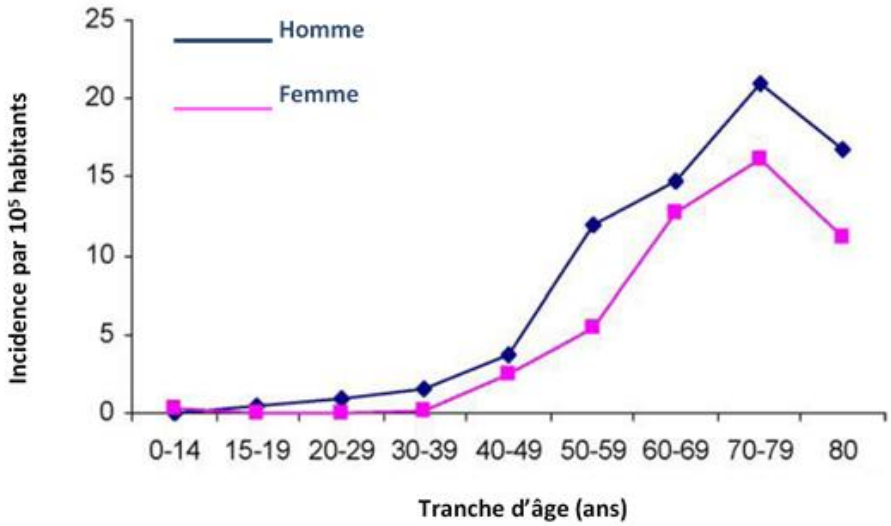


Figure I.9: Incidence des GBMs selon l'âge et le sexe (Registre de la Gironde 2000-2004)

L'incidence des GBMs dans la population augmente à un rythme annuel de l'ordre de 1 % (ANOCEF 2012). Cette augmentation peut s'expliquer par le vieillissement et l'augmentation de la population et par l'augmentation des facteurs de risques. L'amélioration de l'accès à l'imagerie de diagnostic et le développement des biopsies stéréotaxiques peuvent expliquer aussi en partie l'augmentation des cas enregistrés.

Face à l'agressivité du GBM et à son pronostic très défavorable, des efforts particuliers ont été mis en œuvre pour mieux comprendre son fonctionnement. Il s'agissait d'établir ses caractéristiques invasives et prolifératives (cellulaires et vasculaires) afin de proposer les meilleurs modes de traitement et aussi de développer et de définir les moyens de suivi les plus pertinents et compatibles face à ces modes de traitement.

Dans ce manuscrit, nous nous concentrerons uniquement sur le GBM, spécifiquement sur ses caractéristiques angiogéniques et invasives. Les sections suivantes vont aborder la prise en charge thérapeutique des GBMs en présentant ses limites et ainsi évoquer le rôle des nouveaux médicaments anti-angiogéniques, leurs modes de fonctionnement, leur impact (points forts et points faibles). Les techniques d'imagerie dédiées au suivi du GBM seront aussi abordées.

I.2. La prise en charge thérapeutique du glioblastome

La prise en charge thérapeutique des GBMs reste difficile du fait de la localisation de la tumeur située dans le cerveau, un organe fonctionnel, fragile et vital. D'une part, l'accessibilité aux tissus pathologiques se confronte à l'obstacle physique qu'est la boite crânienne, d'autre part l'obstacle physiologique représenté par la BHE qui joue le rôle d'un filtre protégeant le tissu cérébral limite le passage des drogues habituellement utilisées en oncologie. Les GBMs sont aussi connus pour être radiorésistants (Shu and others 1998). De plus, la thérapie doit être précise et ciblée afin de protéger les zones à risque à proximité (vaisseaux sanguins, nerfs, yeux, certaines parties fonctionnelles du cerveau…).

Bien qu'il existe de nombreux traitements disponibles pour les GBMs comprenant la résection chirurgicale, la chimiothérapie et les radiations, le pronostic reste mauvais. Le protocole Stupp est la référence actuelle dans la prise en charge des GBMs. Il comprend une exérèse chirurgicale la plus totale possible, suivie d'une radio-chimiothérapie concomitante, puis d'une chimiothérapie adjuvante (Stupp and others 2005).

La recherche actuelle se concentre sur des nouvelles thérapies ciblées, comme la thérapie anti-angiogénique, avec l'espoir de trouver un jour un remède. La décision de la stratégie thérapeutique est multidisciplinaire et doit être définie en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP).

I.2.1. La chirurgie

Le résidu tumoral post opératoire influant directement sur la survie, les patients doivent bénéficier d'une exérèse la plus large possible en fonction des contraintes fonctionnelles (Stummer and others 2011), de préférence après présentation en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) de neuro-oncologie s'il n'y a pas de caractère d'urgence. Afin de délimiter le mieux possible la zone tumorale et optimiser l'exérèse chirurgicale, les neurochirurgiens utilisent des cadres stéréotaxiques de précision : ils sont guidés avec précision grâce aux méthodes d'imagerie médicale, notamment l'IRM en préopératoire et même parfois peropératoire (**figure I.10**) (Senft and others 2011; Yamahara and others 2010).

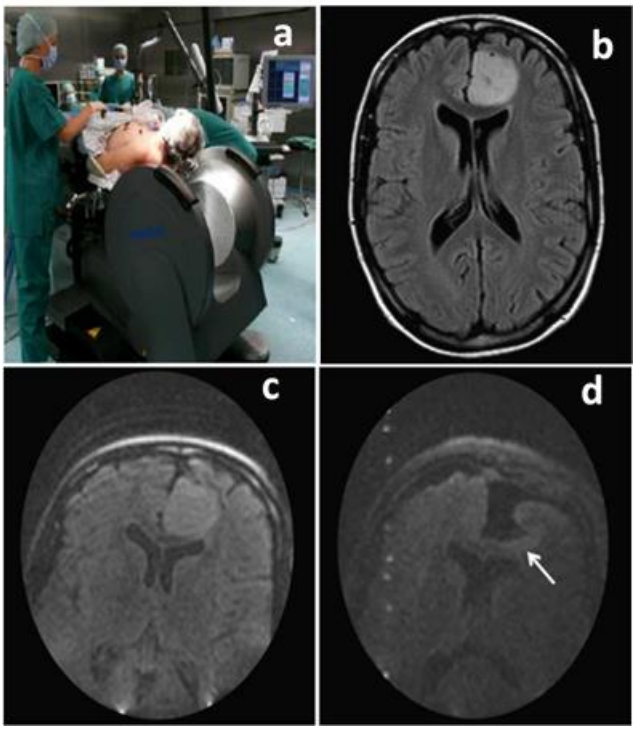


Figure I.10 : a) Chirurgie d'exérèse assistée par IRM de type FLAIR à bas champ (PoleStar N-20, 0,15 T). (b) imagerie FLAIR à haut champ (1,5T) en préopératoire d'un patient avec un astrocytome (grade II). (c) même image que (b) réalisé à bas champ en per-opératoire. (d) même image que (c) réalisée après résection de la majeure partie de la tumeur, montrant la présence des reliquats tumoraux (Senft and others 2011).

Dans le cas du GBM, la résection est toujours incomplète à l'échelon cellulaire puisque des cellules tumorales infiltrées existent au-delà de toute anomalie visible à l'IRM actuelle (Wen and others 2010). Des nouvelles stratégies commencent à émerger pour optimiser / maximiser l'exérèse chirurgicale sans risque en se basant sur des techniques d'IRM fonctionnelle et d'IRM du tenseur de diffusion qui tentent à délimiter l'infiltration tumorale à l'échelle cellulaire (Provenzale and others 2004; Wolbers 2014). La résection tumorale sera donc plus ciblée et plus précise, tout en préservant les régions cérébrales fonctionnelles ou encore les structures vasculaires importantes bordant la tumeur (**figure I.11**).

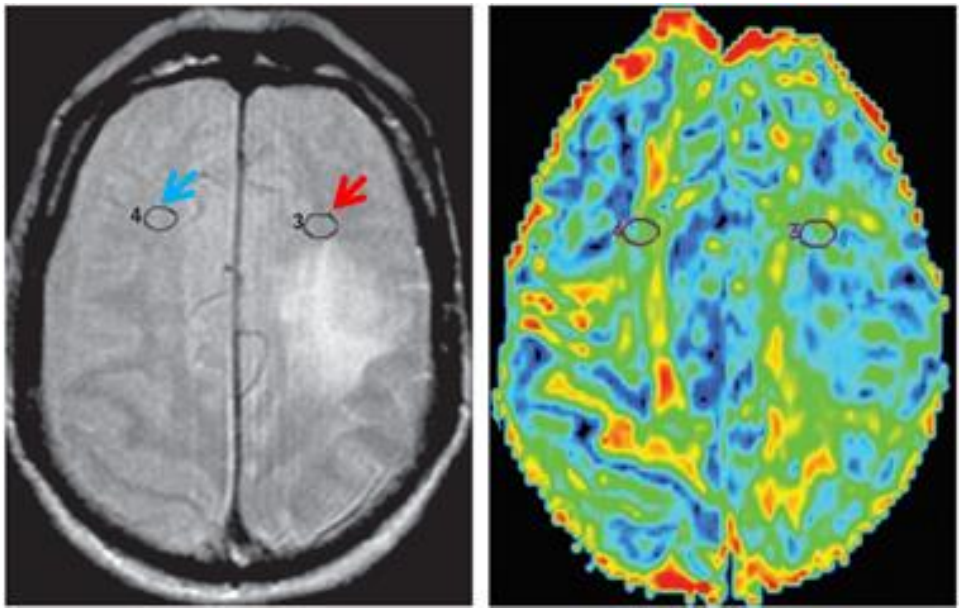


Figure I.11: Scan IRM d'un GBM après résection chirurgical. Image $T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ (à gauche) et cartographie de la fraction d'anisotropie (FA) (à droite). La FA est calculée dans le péritumoral dans une région sans rehaussement de signal $T_{1w\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ (flèche rouge) et dans la région controlatérale correspondante (flèche bleue). Une diminution de FA de 10% est constatée par rapport à la région controlatérale. Cela montre le potentiel de la FA pour détecter des cellules tumorales invisibles par rapport à des méthodes d'imagerie conventionnelles (Provenzale and others 2004).

I.2.2. La thérapie par rayonnement ionisant

Les rayonnements ionisants induisent des cassures double brin de l'ADN des cellules cancéreuses, aboutissant ainsi à leur destruction. Plus précisément, les rayonnements ionisants créent des radicaux libres hautement réactifs qui eux induisent la cassure double brin de l'ADN et perturbent ainsi le processus cellulaire. En radiothérapie, l'objectif est d'induire le plus de dégâts possibles sur l'ADN des cellules tumorales tout en épargnant le tissu cérébral sain environnant. Cette utilisation repose en particulier sur la loi classique empirique de Bergonié-Tribondeau (Bergonié 1906). Théoriquement, un tissu à cellules quiescentes est donc plutôt peu sensible, car rarement en mitoses, alors qu'un tissu à forte activité mitotique (les tissus embryonnaires, les cellules souches, les cellules cancéreuses…) est fortement radiosensible.

La radiothérapie est réalisée en général à la suite de la chirurgie, pour compléter cette dernière qui se limite à une exérèse macroscopique. La radiothérapie permet un ciblage précis

des berges de la tumeur (au maximum 3 cm) et de la région péritumorale supposées infiltrées par des cellules tumorales.

La radiothérapie des tumeurs cérébrales est pratiquée depuis les années 70, montre un effet significatif sur la survie des patients irradiés. De plus, l'étude de Sheline (**tableau I.2**) souligne l'importance de la radiothérapie contre les GBMs en mettant en évidence une survie à 1 an de 8% dans le groupe ayant eu chirurgie seule contre 24% dans le groupe ayant eu une radiothérapie associée à la chirurgie (Sheline 1976).

Gliome Grade	Thérapie	% de survie moyenne			
		1 an	2 ans	3 ans	5 ans
IV	Chirurgie seule	8	3	0	0
IV	Chirurgie + Radiothérapie	24	9	6	0

Tableau I.2: Effet de la radiothérapie sur la survie des patients dans le cas des GBMs (Sheline 1976).

La planification des plans de traitement en radiothérapie se fait sur des images scanner recalées sur des images IRM afin que les médecins délimitent les volumes cibles à traiter. Une mauvaise délimitation des zones tumorales aboutit à une sous irradiation des tumeurs, favorisant leur récidive et diminuant leur radiosensibilité (Blankenbecler 2010).

Dans le cas du GBM des images IRM de type $T_{1w\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ (imagerie pondérée T_1 avec injection du Gd-DOTA) et FLAIR-T_{2W} sont essentielles dans la délimitation du volume cible (Noel and Guillevin 2011). Ces deux types d'imagerie mettent respectivement en évidence un rehaussement de signal IRM dans la tumeur du fait de l'extravasation de l'AC, de la présence d'œdème et/ou des cellules tumorales. D'autres techniques d'imagerie comme l'IRM de diffusion, l'IRM de perfusion, la spectroscopie ^1H peuvent être réalisées afin d'améliorer la détection et la caractérisation des régions tumorales. D'autre part, des études de suivi de radiothérapie montrent que le volume sanguin tumoral (TBVf) et la perméabilité vasculaire peuvent être des indicateurs précoces de l'efficacité thérapeutique (Cao and others 2006; Saito and others 2017; Yeung and others 2014).

I.2.3. La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement consistant en l'administration de médicaments qui agissent sur les cellules qui se développent rapidement notamment les cellules cancéreuses (Mahaley and others 1963), soit en les détruisant, soit en les empêchant de se multiplier. Un grand nombre de chimiothérapies sont actuellement utilisées en clinique ayant des modes d'actions complémentaires mais centrées sur leur pouvoir cytotoxiques. C'est pourquoi les chimiothérapies sont administrées par cycle afin de limiter l'atteinte des cellules saines et diminuer ainsi leurs effets secondaires indésirables.

Selon le type et le stade des tumeurs, la chimiothérapie peut être le premier traitement utilisé ou être complémentaire de la chirurgie et/ou de la radiothérapie. Dans le cas du GBM, le protocole de Stupp (Stupp and others 2005) est le schéma standard chez les patients de moins de 70 ans; il associe d'abord une radiothérapie de 60 Gy et un traitement concomitant de chimiothérapie par le témozolomide (**figure I.13**) oral quotidien de 75mg/m^2/jour durant 42 jours consécutifs, suivi d'un traitement adjuvant par le témozolomide.

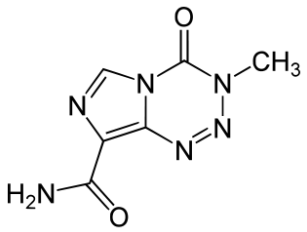


Figure I.13: Structure du témozolomide (d'après PubChem)

Le témozolomide est utilisé depuis 1999 dans le traitement des gliomes. Le témozolomide est hydrolysé à pH physiologique en 3-méthyl-(triazén-1-yl) imidazole-4-carboxamide (MTIC). Le MTIC est un agent alkylant de l'ADN. Il présente de bons résultats dans le traitement des GBMs et passe très bien la BHE grâce à sa propriété lypophile (Newlands and others 1997).

Des études rétrospectives ont montré une corrélation entre la durée d'administration du témozolomide, la survie sans progression et la survie globale (Seiz and others 2010). Grâce à ces résultats, et dans le cas de résidu tumoral constaté sur les imageries après une chimiothérapie (Brandes and others 2008), des équipes ont proposé de poursuivre le

témozolomide au-delà de 6 mois et cette stratégie a montré par une étude rétrospective une augmentation de survie médiane de 8 mois (16.5 mois à 24.6 mois) (Urgoiti and others 2012).

Bien qu'il existe de nombreux traitements disponibles pour les GBMs y compris la résection chirurgicale, la chimiothérapie et les radiations, le pronostic reste sombre. La recherche actuelle se concentre sur des nouvelles thérapies ciblées comme la thérapie anti-angiogénique qui semble être prometteuse mais avec un effet controversé d'où l'intérêt de correctement évaluer et de suivre de près son effet anti-tumoral.

I.2.4. Thérapie anti-angiogénique

Le GBM est une tumeur très hétérogène, caractérisée par différents profils génomiques et protéomiques (Carlsson and others 2010; Iacob and Dinca 2009; Parsons and others 2008). Sa caractérisation permet d'identifier différents biomarqueurs génétiques impliqués dans les processus de prolifération cellulaire, d'invasion et d'angiogenèse qui sont très prononcés dans le cas des GBMs (Bastien and others 2015; Glas and others 2010; Ruiz-Ontanon and others 2013) et expliquent leur importante malignité. Les thérapies anti-angiogéniques ont émergé à l'issue de ces constats, afin de cibler la vascularisation tumorale, de priver la tumeur de la nutrition nécessaire à sa croissance et induire ainsi la mort cellulaire.

I.2.4.1. Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est un phénomène complexe de création de nouveaux vaisseaux sanguins (néovaisseaux) (**figure I.14**) à partir de vaisseaux préexistants (Weis and Cheresh 2011). Dans le cas des cancers, ce processus est anormal, voire anarchique, et inadapté aux besoins de la tumeur en développement. A partir d'une petite tumeur de 200 µm de diamètre, l'apport de nutriments et d'oxygène ne peut plus répondre aux besoins physiologiques de la tumeur (Folkman 1995; Van der Sanden and others 1997).

L'hypoxie, la baisse du pH, le stress oxydant et d'autres modifications sont ainsi constatées au sein de la tumeur. En réponse à ce manque et à la modification de l'environnement (Folkman and Hanahan 1992), les cellules tumorales déclenchent des signalisations favorisant la

croissance des cellules endothéliales vasculaires, conduisant ainsi à la création d'un nouveau réseau vasculaire tumoral. Cet étape décrite par Folkman et al (Folkman and Hanahan 1992) est connue sous le nom du 'switch angiogénique'. Ce nouveau réseau vasculaire est très important pour la croissance tumorale.

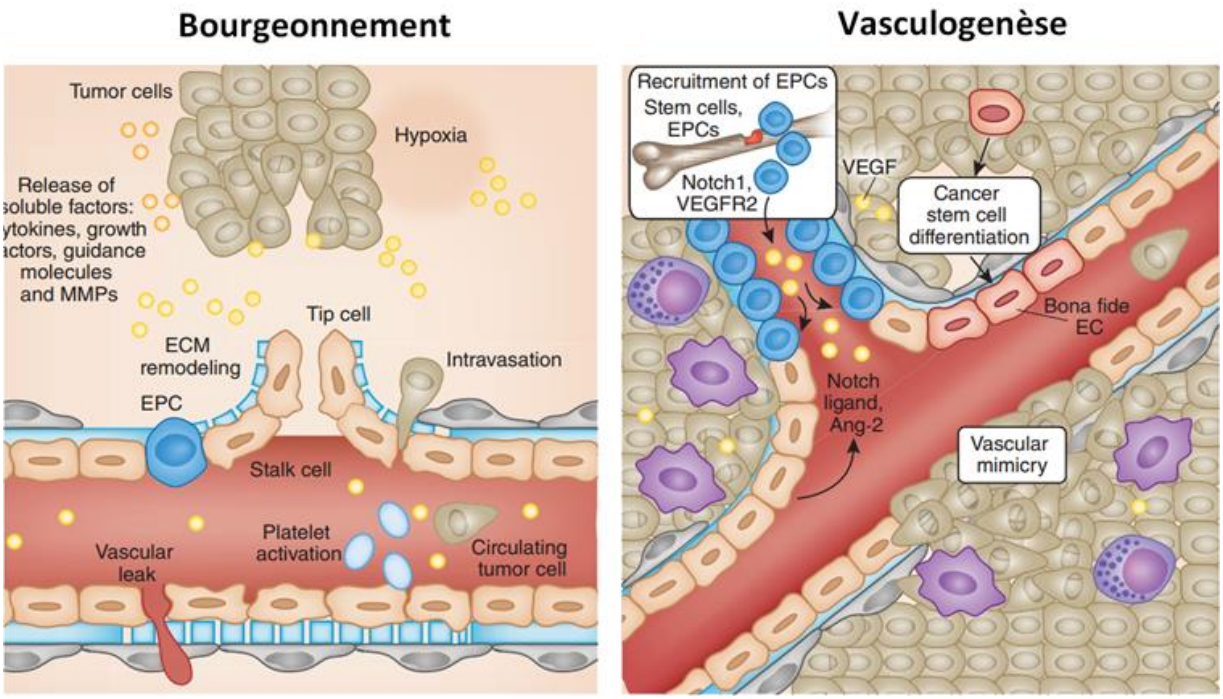


Figure I.14: Les principaux mécanismes de création/développement des nouveaux vaisseaux sanguins lors d'une angiogenèse tumorale (Weis and Cheresh 2011) : le mécanisme du bourgeonnement (à gauche) et le mécanisme de vasculogenèse (à droite). La combinaison de signaux stimulants au sein du microenvironnement tumoral induit des changements dans plusieurs types de cellules. Les cellules péri-vasculaires se détachent de leurs sites et deviennent active. Une fois la barrière vasculaire est rompue, plusieurs types cellulaires sont exposés à des stimuli angiogéniques et inflammatoires. Les thrombocytes, les cellules endothéliales de type EPC (Endothelial progenitor cells), et les cellules myéloïdes libèrent dans le microenvironnement tumoral des facteurs stimulant la production des vaisseaux sanguins. (ECM : matrice extracellulaire, MMPs : métalloprotéases matricielles)

Le *Vascular Endothelium Growth Factor* (VEGF, classés de A à F) est la famille de protéines de facteurs pro-angiogéniques jouant un rôle majeur dans l'angiogenèse des tumeurs (Carmeliet and Jain 2000; Shweiki and others 1992). Le VEGF-A, est l'acteur principal dans le processus

de l'angiogenèse tumoral. Le mode d'action du VEGF nécessite sa fixation sur des récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGF-R1 à 3) ou sans activité kinase (neuropilines NRP1 et 2). Les VEGF-R1 et -R2 sont impliqués dans les effets mitogènes, dans l'angiogenèse et dans la perméabilité vasculaire du VEGF ; les NRP amplifient les effets des VEGF-R.

Le rôle majeur de l'angiogenèse dans la croissance tumorale (Folkman and others 1971) a incité la communauté scientifique à produire des médicaments anti-angiogéniques ; de fait, le VEGF a été la première cible thérapeutique anti-angiogénique.

I.2.4.2. Traitements anti-angiogéniques et leur mode d'action

Les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de tyrosine kinase sont les deux types de molécules les plus utilisées pour cibler l'angiogenèse. Les anticorps monoclonaux ciblent le VEGF et empêchent sa fixation sur son récepteur VEGF-R. Par contre, les inhibiteurs de tyrosine kinase qui sont dirigés contre les protéines qui agissent sur les voies de signalisation(Davies and others 2000) dans le but de moduler leur intensité et de contrôler le processus de l'angiogenèse sont caractérisés par une toxicité non spécifique limitée (Cohen 2002; Zhang and others 2011).

Ce mode de traitement ne s'adresse pas directement aux cellules tumorales mais vise à diminuer puis détruire le réseau vasculaire afin de priver la tumeur de ses apports en nutriments, et donc indirectement réduire la masse tumorale ensuite (**figure I.15**).

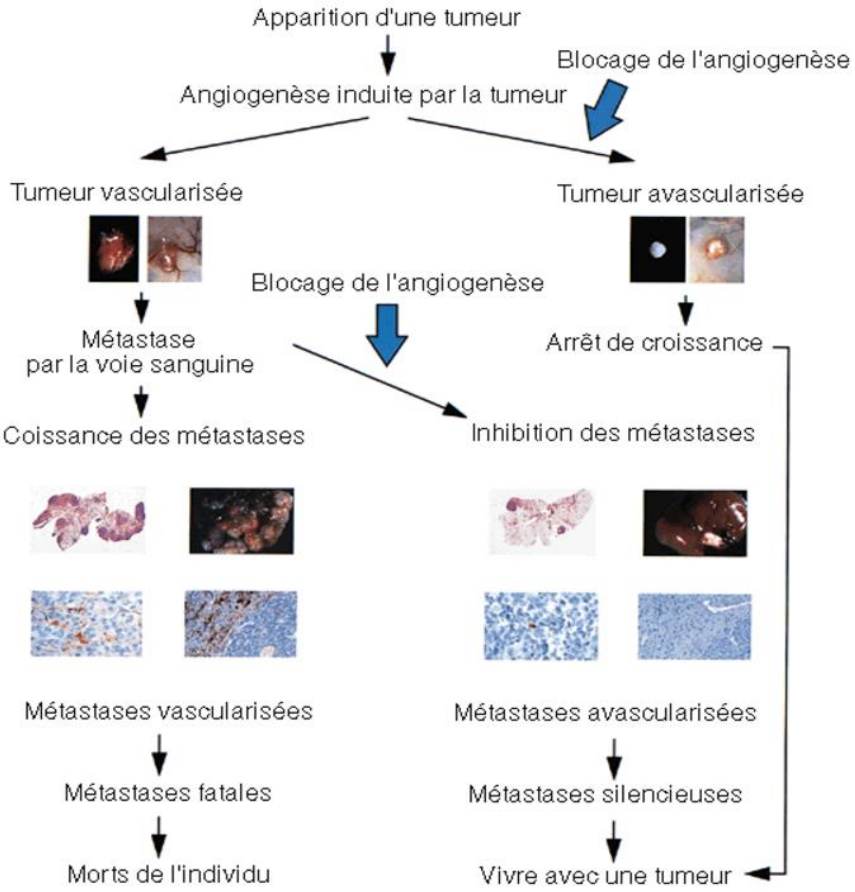


Figure I.15: Impact de la thérapie anti-angiogénique sur le devenir d'une tumeur (Hong Li and Emmanuel Blot 1998).

L'angiogenèse tumorale conduit le plus souvent à un réseau vasculaire immature, très perméable, mal perfusé, mal oxygéné, en somme peu fonctionnel et cause une forte pression interstitielle (**figure I.16 b**). Les anti-angiogéniques vont inverser le déséquilibre qui existe au sein des tumeurs entre les molécules pro et anti-angiogéniques (**figure I.16 d**). A un stade précoce de l'administration des anti-angiogéniques, la microvascularisation intratumorale va évoluer vers un état d'équilibre transitoire durant lequel la tumeur sera plus oxygénée, mieux perfusée, et les vaisseaux tumoraux moins perméables avec une diminution de la pression interstitielle (**figure I.16 c**). Ce stade est connu sous le principe de la normalisation des vaisseaux (Jain 2005). Ce stade est très important et peut jouer un rôle majeur dans l'amélioration des stratégies de thérapie concomitante, car à ce moment l'injection d'un second médicament cytotoxique peut avoir un maximum d'effet thérapeutique (Claes and

others 2008b), d'où l'utilité des méthodes d'imageries à bien détecter ce stade de l'évolution de l'état tumoral.

Dans l'idéal, si le traitement anti-angiogénique est poursuivi, la microvascularisation intratumorale sera alors détruite, induisant un arrêt de la perfusion et donc une nécrose au sein de la tumeur (**figure I.16 d**).

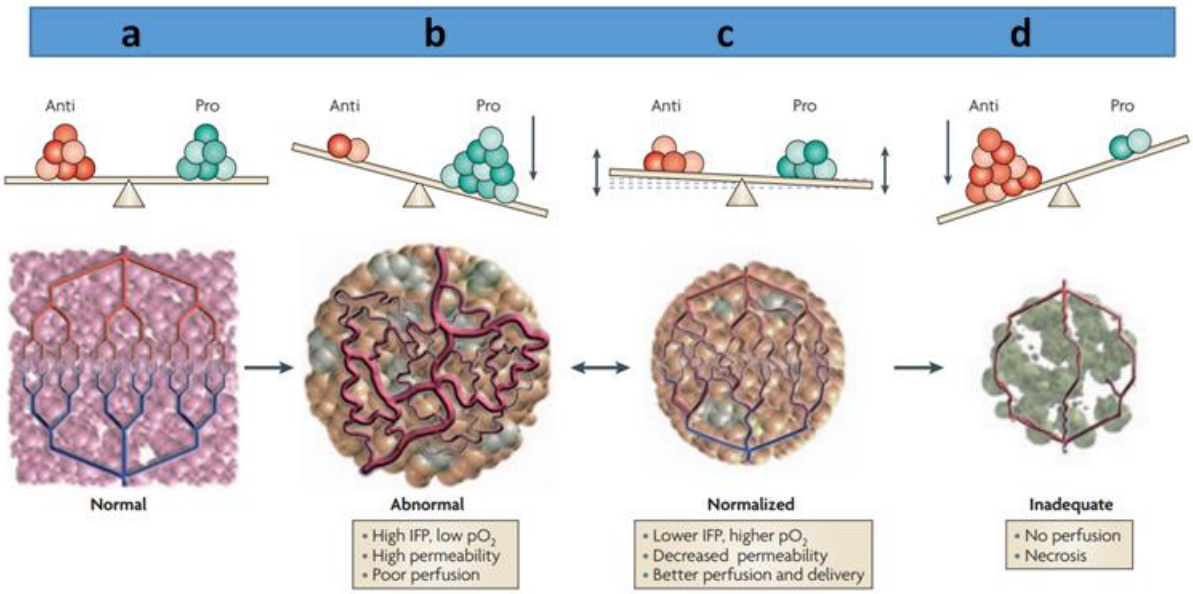


Figure I.16: schéma représentatif de la vascularisation tissulaire en fonction du niveau de facteurs pro et anti-angiogéniques. a) Normal, b) pathologique, c) pathologique à un stade précoce après traitement qu'on appelle « normalisation vasculaire » et d) pathologique à un stade tardif après traitement (Jain and others 2007).

I.2.4.3. Traitement par Bevacizumab

Le Bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF et empêchant sa fixation avec son récepteur VEGF-R. Le Bevacizumab est commercialisé par l'entreprise pharmaceutique Roche sous le nom d'Avastin, et est approuvé par la FDA (Food and Drug administration) au Etats Unis depuis 2004 (Kesselheim and others 2011). L'Avastin, comme la plupart des traitements anti-angiogéniques, a des effets cytostatiques et non cytotoxiques avec un meilleur index thérapeutique que les produits de chimiothérapie actuels. Ceci permet d'envisager une administration continue et à des doses prescrites plus élevées que celles préconisées pour les traitements cytotoxiques.

Le Bevacizumab administré en première ligne en adjonction avec la radiothérapie et le témozolimide (Protocole de Stupp avec de l'Avastin) a été étudié par l'essai clinique de phase 3 AVAGLIO (Chinot and others 2012) et a montré une augmentation significative de 4.4 mois de la durée de survie sans progression du GBM par rapport au groupe non traité par l'Avastin.

Dans le cas de récidives, le Bevacizumab est prescrit depuis 2009 aux Etats-Unis (Kesselheim and others 2011). Malgré l'augmentation du taux de survie sans progression à 6 mois (32%-64%) (Chamberlain 2009; Kreisl and others 2009; Narayana and others 2009; Vredenburgh and others 2007), l'agence européenne du médicament n'a pas donné son accord pour la mise en marché en raison de son efficacité controversée et du manque de preuve d'augmentation de la survie globale (Chinot and others 2012; Chinot and others 2014).

Le Bevacizumab a l'avantage de mieux contrôler l'œdème péritumoral, de diminuer les signes neurologiques et la consommation de stéroïdes (Kreisl and others 2009; Mancuso and others 2006). Cependant, il entraîne des complications thrombotiques ainsi que d'autres effets secondaires non négligeables (hypertension, hémorragie, toxicité rénale…) (Ranpura and others 2011; Zhu and others 2007).

En plus de ces effets secondaires indésirables, l'inconvénient majeur du Bevacizumab au niveau thérapeutique est sa capacité à promouvoir l'invasion tumorale, comme observé dans plusieurs cas cliniques (Lucio-Eterovic and others 2009; Norden and others 2008; Paez-Ribes and others 2009; Salas 2011). Ces propriétés controversés du Bevacizumab (Salas 2011), inhibition de l'angiogenèse versus favorisation de l'invasion des cellules tumorales, est limitant pour la thérapie anti-angiogénique des GBMs (Lamszus and others 2003) et peut la rendre néfaste.

La **figure I.17** montre une réponse pseudo positive caractérisée par une réduction du rehaussement du signal $T_{1w\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ après 5 mois du traitement concomitant par chimiothérapie et par Bevacizumab. Un rehaussement du signal apparaît dans une autre région voisine du foyer tumoral après 7 mois de traitement indiquant une infiltration des cellules tumorales.

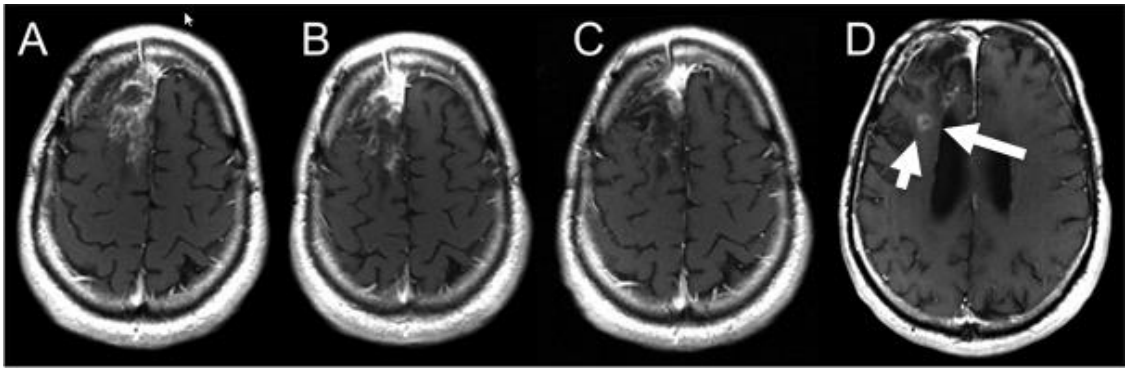


Figure I.17: a) Image $T_{1w\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ d'un GBM avant traitement par Bevacizumab et irinotecan. b) et c) Réduction progressive du rehaussement du signal $T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ après 1 et 5 mois respectivement. (d) apparition d'une nouvelle zone de rehaussement du signal $T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ après 7 mois de traitement(flèches blanches) (Norden and others 2008).

Dans le cadre du traitement par Bevacizumab, il est donc nécessaire de minimiser ses effets secondaires. Des études montrent que la diffusion lente des médicaments dans le cerveau suite à une injection locale dans le parenchyme cérébral diminue la dispersion du produit et permet une distribution locale homogène avec des concentrations plus élevées que les injections systémiques (Bobo and others 1994) (**figure I.18**). Ceci permet de diminuer les effets secondaires indésirables. D'autre part, une injection directe dans le parenchyme cérébral aide à surmonter les difficultés de passage de certains médicaments via la BHE ce qui permet d'augmenter l'efficacité de traitement (Debinski and Tatter 2009) et ainsi la survie globale des patients. Dans le cas des GBMs avec traitement par Bevacizumab, il est donc intéressant d'évaluer les effets d'une administration de ce traitement en mode CED (convection enhanced delivery).

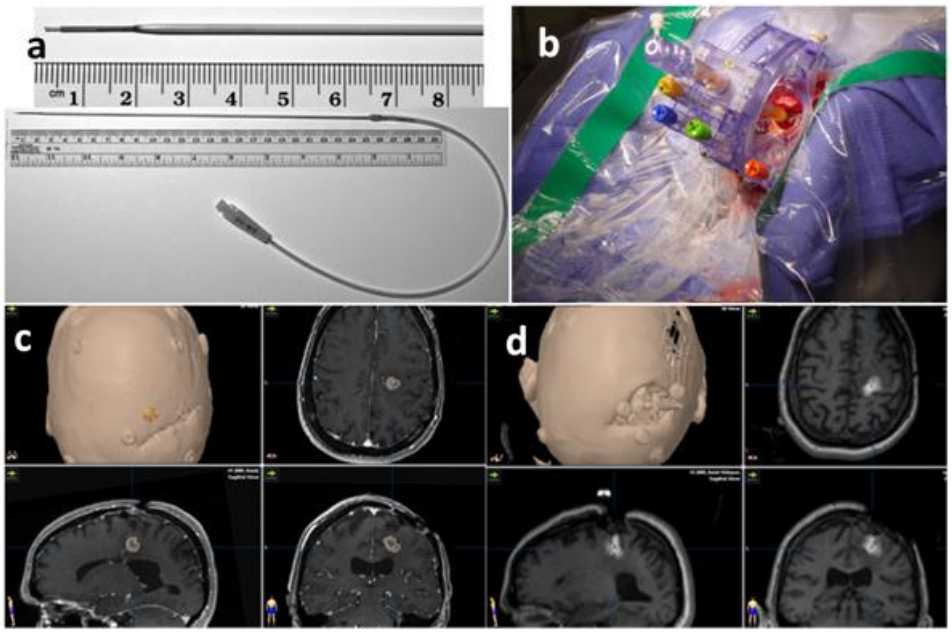


Figure I.18: IRM en temps réel pendant la délivrance de traitement en CED. a) Canule compatible avec l'IRM pour la délivrance de médicaments en CED sans reflux. b) Système de guidage stéréotaxique. c) Imagerie anatomique d'IRM (T_{1w}) avant la délivrance du traitement montrant la lésion cible (gliome). d) IRM ($T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$) peropératoire lors de la perfusion du médicament, dans lequel a été ajouté du gadolinium en tant que traceur (Vogelbaum and Aghi 2015).

I.2.4.4. Traitement par Bevacizumab par injection intratumorale ou CED

La délivrance du traitement par CED est une stratégie thérapeutique qui se base sur une délivrance lente du médicament (infusion) afin de permettre une absorption maximale du médicament dans la région d'intérêt tout en évitant le plus possible le reflux.

Dans le cas du GBM, le VEGF est secrété par les cellules gliomes et est présent dans le compartiment interstitiel de l'espace tumoral. En réponse à ce gradient de VEGF, les cellules endothéliales se différentient et lysent la membrane basale, la traverse et migrent en dehors de leur capillaire d'origine. Ces cellules endothéliales et les cellules de l'interstitium forment une tige 'Stalk cells' qui produit les récepteurs VEGFRs. La combinaison VEGF/VEGFRs active la prolifération, la migration, la survie des cellules et augmente la perméabilité vasculaire (Hicklin and Ellis 2005; Hoeben and others 2004; Levy 2014; Weis and Cheresh 2011) (**figure I.19**). Le but de l'injection des anti-angiogéniques directement dans la tumeur en mode CED, dans l'espace interstitiel, est d'inhiber le VEGF secrété par les cellules gliomes avant même

que les vaisseaux sanguins ne s'ouvrent et créent un réseau vasculaire vers les cellules gliomes (Wang and others 2015), empêchant ainsi la rupture de la BHE.

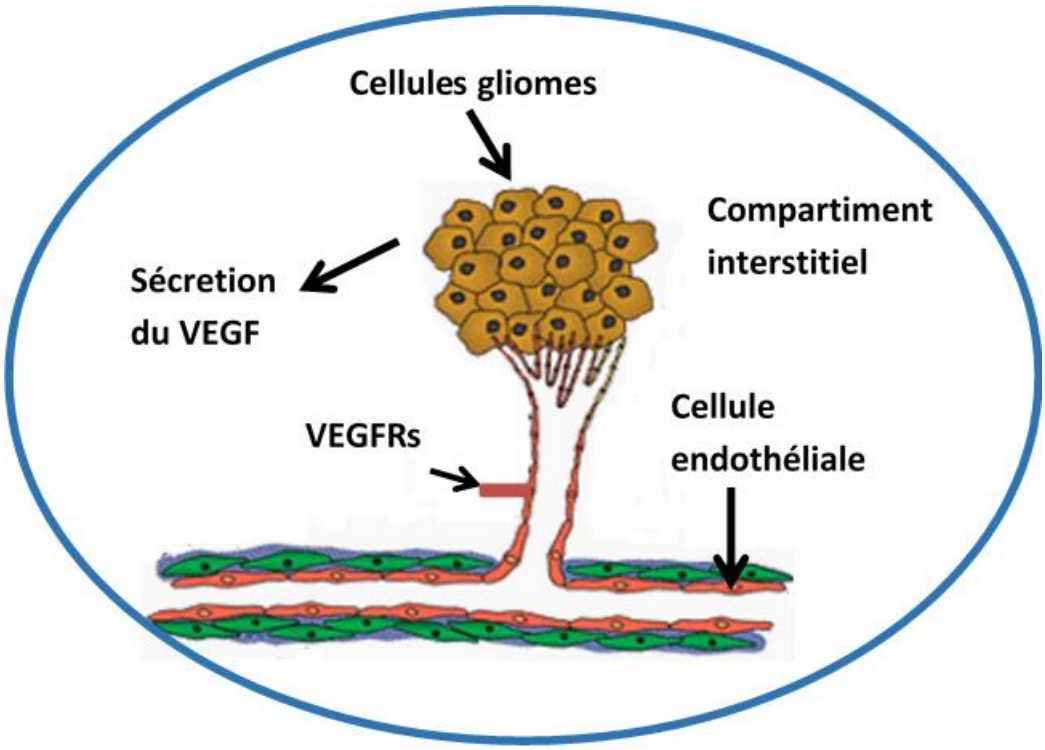


Figure I.19 : Schéma représentatif de la réponse des cellules endothéliales au VEGF secrété par les cellules gliomes. Bourgeonnement de cellules endothéliales à partir d'un capillaire existant et stimulation de l'expression du VEGFRs secrété par les cellules endothéliales. (d'après (Hicklin and Ellis 2005; Hoeben and others 2004; Levy 2014; Weis and Cheresh 2011)).

Ainsi, la délivrance permanente du Bevacizumab par CED a montré dans une étude préclinique une diminution et même une suppression des effets secondaires indésirables liés à une injection systémique (Wang and others 2015). De plus, des résultats précliniques ont montré l'effet bénéfique d'une injection de CED des anti-angiogéniques (Bevacizumab, Endostatin) et une augmentation de la survie globale par rapport à une injection systémique (Schmidt and others 2004; Wang and others 2015). L'évaluation de l'infiltration tumorale n'a pas été évoquée dans ces études. Malgré ces résultats encourageants en préclinique, aucun effet notable sur la survie globale des patients n'a été observé (Iwamoto and others 2010).

Le développement de la technique de CED est toujours en cours, avec la conception de nouveaux cathéters et des approches d'imageries innovantes qui permettront à cette technique d'être plus efficace (Vogelbaum and Aghi 2015).

Considérant d'une part les différents paramètres à définir pour un traitement (mode d'administration, dose de traitement, combinaison de plusieurs traitements), d'autre part la complexité des GBMs (l'hétérogénéité, le caractère invasif, prolifératif et angiogénique), et enfin la réponse variable des GBMs vis-à-vis des traitements, il est primordial d'évaluer du mieux possible la réponse aux thérapies à l'aide de biomarqueurs quantitatifs, précoce, spécifiques, fiables et sensibles.

I.3. Suivi thérapeutique du glioblastome par imagerie

Les méthodes invasives pour diagnostique différentiel comme les biopsies et le prélèvement du LCR, étant ponctuelles dans le temps et dans l'espace, ne reflètent pas l'hétérogénéité du GBM. Pour ces raisons, le suivi de la tumeur par ces méthodes n'est pas appliqué en routine clinique. Les méthodes non ou peu invasives se basent majoritairement sur l'imagerie médicale. Différentes méthodes d'imagerie permettent l'étude et le suivi de la tumeur, donnant des informations concernant la structure (imagerie morphologique) et/ou l'activité métabolique tumorale (imagerie fonctionnelle et métabolique).

Les techniques d'évaluation des thérapies disponibles en clinique se différencient par leur résolution spatiale, leur résolution temporelle, leur contraste, leur caractère ionisant, leur caractère invasif, leur facilité de mise en place et leur coût.

Dans un premier temps, l'efficacité du traitement des tumeurs cérébrales est évaluée en se basant sur des critères radiographiques (Macdonald and others 1990) qui tiennent compte majoritairement de la taille et du volume de la tumeur. La délimitation des tumeurs se fait donc sur des images conventionnelles d'IRM ou de tomodensitométrie (TDM, CT-Scan). Cette délimitation est réalisable grâce à la différence de contraste entre la tumeur et le reste du cerveau avoisinant, parfois suite à l'utilisation des ACs. Ces critères radiographiques ne sont actuellement pas figés, ils évoluent afin de s'adapter au type de tumeur et au traitement préconisé.

En effet, ces critères demeurent parfois non spécifiques, insensibles et tardifs, aussi bien pour évaluer le stade de la tumeur que pour évaluer la réponse au traitement ; c'est spécialement vrai dans le cas du GBM sous traitement anti-angiogénique (Wen and others 2010) qui agit sur les paramètres vasculaires, comme TBVf et la perméabilité des vaisseaux, avant même que des changements morphologiques de la tumeur soient observés (Cha and others 2000; Pope and others 2011; Reichardt and others 2005; Ren and others 2012; Sorensen and others 2009). Ainsi, des études ont été menées sur ces paramètres et ont montré que leur évaluation joue un rôle majeur pour étudier judicieusement le pronostic du patient et la progression de la tumeur ainsi que la réponse au traitement (Akella and others 2004; Cha and others 2000; Gossmann and others 2002; Law and others 2008; Schmainda and others 2015).

D'autre part, la caractérisation de la microstructure tumorale et péritumorale par imagerie conventionnelle est difficile, notamment sous traitement anti-angiogénique, car celle-ci sous-estime l'infiltration tumorale qui s'effectue hors des zones d'angiogenèse (Gupta and others 2011; Jain and others 2010). De nouvelles méthodes d'IRM comme l'imagerie FLAIR, l'imagerie du tenseur de diffusion ou l'imagerie de tomographie par émission de positon (TEP) (Dhermain and others 2010; Gerstner and others 2008; Gupta and others 2011; Hutterer and others 2015) ont fortement amélioré l'observation de la microstructure tumorale et de son environnement et ont le potentiel de détecter la présence des cellules infiltratives responsables de la récidive et d'assurer un suivi plus complet de la réponse au traitement anti-angiogénique.

L'importance de ces biomarqueurs dans la caractérisation de la tumeur, de son environnement, et surtout dans la réponse au traitement anti-angiogénique a amené le groupe de travail RANO à prévoir l'intégration de ces méthodes d'imagerie dans les critères de réponse (Chinot and others 2013; Wen and others 2010).

Ainsi, la quantification et l'évaluation de ces biomarqueurs semble indispensable pour mener des comparaisons intra et inter sujets, et des études multicentriques de la réponse aux traitements anti-angiogéniques des GBM (Gerstner and others 2008).

Parmi les différentes modalités d'imagerie (PET, SPECT, CT-Scan) capables de quantifier plusieurs biomarqueurs tumorales, l'IRM reste l'outil d'imagerie de référence en neuro-oncologie. Ceci est surtout dû au contraste élevé entre les tissus mous et à une résolution

spatiale et temporelle et un rapport signal sur bruit (RSB) élevés par rapport aux autres types d'imagerie pour un temps d'acquisition compatible avec la routine clinique.

C'est ainsi que nous proposons uniquement la revue des techniques IRM utilisées pour le suivi des GBMs sous traitement anti-angiogénique pour la quantification des paramètres vasculaires (volume sanguin et perméabilité vasculaire) et pour l'évaluation de la microstructure tumorale et péritumorale. D'une part, ce chapitre a pour but d'introduire les limites de ces méthodes d'imagerie et d'autre part d'introduire les solutions proposées dans ce travail de thèse pour répondre à ces limites notamment dans le cas du suivie de traitements par Bevacizumab.

I.3.1. IRM de la microvascularisation cérébrale

En clinique, les méthodes d'IRM les plus utilisées pour quantifier les paramètres vasculaires comme le volume sanguin et la perméabilité des vaisseaux dans le cas des tumeurs cérébrales se basent principalement sur le changement du signal IRM suite à l'utilisation d'un AC qui est souvent un complexe de gadolinium de petite taille moléculaire (<1 KDa) telque le Gd-DOTA. Parmi ces méthodes, on cite les techniques les plus utilisées en routine clinique : 1) technique dynamique de premier passage de susceptibilité magnétique, la DSC-$T_2^*{}_w$ (Dynamic Susceptibility Contrast T_2^* weighted) (Aronen and others 1995; Aronen and Perkio 2002; Bjornerud and Emblem 2010; Rosen and others 1991a) et 2) technique de rehaussement du contraste pondérée T_1 , DCE-T_{1w} (Taylor and Reddick 2000) (Dynamic Contrast Enhancement T_1 weighted). En plus de ces méthodes, on cite la technique $RSST_1$ (Rapid Steady State T_1) (Perles-Barbacaru and Lahrech 2007; Sarraf and others 2015), développée dans notre laboratoire dans le but de s'affranchir des difficultés de quantification rencontrées avec les techniques précédentes.

I.3.1.1. Technique dynamique de susceptibilité magnétique

La technique dynamique de susceptibilité magnétique se base sur le principe de changement de la susceptibilité magnétique intrinsèque du compartiment sanguin suite à une injection de l'AC. Ce changement de susceptibilité accélère la relaxation transversale dans ce compartiment. De plus, la différence de susceptibilité magnétique rehaussée entre les

compartiments vasculaire et extravasculaire suite à la présence vasculaire du produit de contraste induit une perturbation de champ magnétique en dehors des vaisseaux (**figure I.20**). Cela se traduit aussi par une baisse du temps de relaxation transversale en dehors des vaisseaux. Cette baisse de valeurs de T_2^* est considérée proportionnelle à la concentration de l'AC dans le compartiment vasculaire.

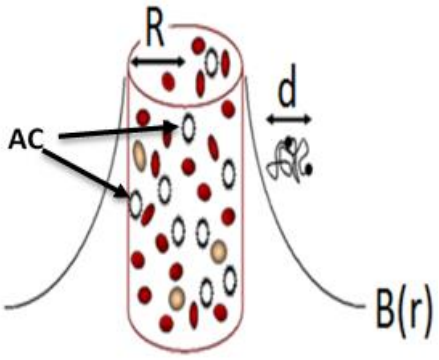


Figure I.20: Schéma représentatif de la variation du champ magnétique en fonction de la distance (Br) induit par la présence de l'AC dans un vaisseau de diamètre R. la molécule d'eau de diffusion libre est perturbée par Br. d est la distance de diffusion moyenne du proton de la molécule d'eau (d'après (Perles-Barbacaru 2007)).

I.3.1.1.a. Technique dynamique du premier passage

Au départ, la technique du premier passage de type DSC-$T_2^*{}_w$ a été développée pour quantifier le TBVf dans la région où l'AC ne s'extravase pas (traceur non diffusible et/ou tumeur avec une BHE intacte, comme le cas des gliomes de bas grade). Dans ce cas, elle présente l'avantage d'avoir un rapport signal sur bruit (RSB) élevé (Rosen and others 1991b) par rapport aux autres techniques notamment dans la région où le volume sanguin est faible. Par contre, dans le cas d'un GBM où l'AC s'extravase dans le compartiment extravasculaire, la quantification devient plus complexe.

I.3.1.1.a.1. Conversion du signal IRM en concentration d'agent de contraste

Le signal IRM est acquis en utilisant un train d'impulsions radiofréquences (RF) le plus souvent de type Echo Planer Imaging (EPI) en utilisant un seul pulse d'excitation (MK 1998) (**figure I.21**).

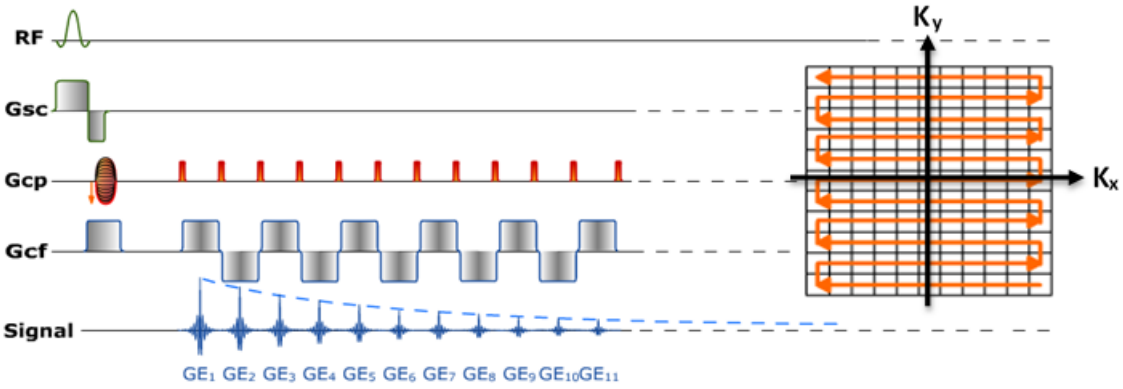


Figure I.21: Chronogramme d'une séquence écho de gradient (EG, un écho) suivie d'une séquence d'imagerie de type EPI (Bi-Blipped). A droite, schéma de remplissage du plan de Fourier (d'après (MK 1998)).

Le signal acquis peut être approximé selon l'expression suivante (Bjornerud and others 2011) :

$$S(t) = M_0 * \frac{\sin(\alpha)*(1-\exp(-TR*R_1))}{1-\cos(\alpha)*\exp(-TR*R_1)} * \exp(-TE * R_2^*) \quad \text{[Eq. I.1]}$$

$$S(t) = M_0 * E * \exp(-TE * R_2^*) \quad \text{[Eq. I.2]}$$

M_0 est proportionnel à la magnétisation longitudinale à l'équilibre, TE est le temps d'écho, R_1 et R_2^* sont les vitesses de relaxation, inversement proportionnelles aux temps de relaxation longitudinal (T_1) et transverse (T_2^*) respectivement.

Le signal est acquis quelques minutes avant, pendant et après injection de l'AC en mode bolus à quelque ml/seconde en intraveineux.

La première approche est de considérer que le facteur 'E' dans l'**équation I.2** est constant et indépendant de la présence ou non de l'AC. Les modifications du signal induites par l'AC sont dus à l'augmentation de la vitesse de relaxation transverse R_2^* qui peut être représentée par l'équation suivante :

$$\Delta R_2^*(t) = R_{2post}^*(t) - R_{2pré}^* = -\frac{1}{TE}\ln(S_{post}(t) - S_{pré}) \quad \text{[Eq. I.3]}$$

$S_{pré}$ est le signal de base avant injection de l'AC et S_{post} (t) est le signal après injection de l'AC.

La relation entre le changement de vitesse de relaxation et la concentration de l'AC est considérée linéaire :

$$\Delta R_2^*(t) = r_2 * [C(t)] \qquad \text{[Eq. I.4]}$$

Ainsi la concentration C(t) de l'AC au cours du temps dans une région d'intérêt, est représentée en fonction du signal acquis par l'**équation** suivante :

$$C(t) = -\frac{x}{TE} \ln\left(\frac{S_{post}(t)}{S_{pré}}\right) \qquad \text{[Eq. I.5]}$$

x est une constante qui est égale à l'inverse de la relaxivité transversale r_2 de l'AC dans le milieu dans le cas des microvaisseaux dans l'hypothèse de linéarité (**équation I.4**).

Afin de pouvoir obtenir le volume sanguin à partir de la courbe de concentration en fonction du temps, une fonction dite 'gamma-variate' est tout d'abord appliquée à cette courbe afin d'éliminer la contribution du signal issue de la recirculation de l'AC dans le compartiment vasculaire.

La fonction gamma-variate (Chan and others 2004; Patil and Johnson 2011) est un modèle mathématique issu de méthodes empiriques et/ou de simulations Monte Carlo pour se rapprocher le plus possible de la courbe réelle de la concentration de l'AC pendant son premier passage en fonction du temps.

Le choix des paramètres d'entrée est crucial pour la convergence correcte de la modélisation. Ce choix se fait d'une façon arbitraire et parfois basé sur des hypothèses ce qui provoque souvent des variations majeures des résultats(Chan and others 2004).

La **figure I.22 a** montre une simulation Monte-Carlo (MC) de la courbe $\Delta R'^*_2$ afin d'obtenir les paramètres d'entrée, jugées idéales pour les appliquer dans le cas du GBM (**figure I.22 b**) (Chan and others 2004).

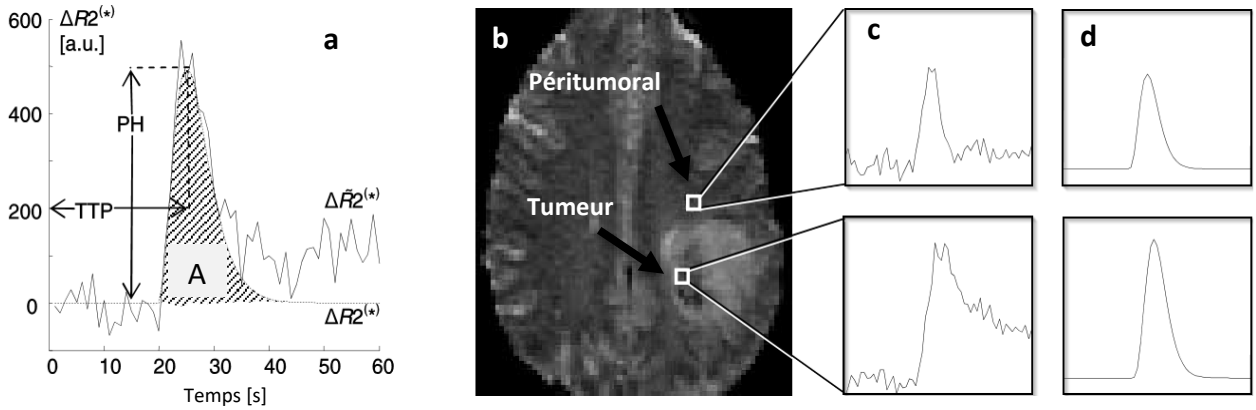


Figure I.22 : a) $\Delta R'^{*}_{2}$ simulé (MC) avec K= 0.02, RSB = 10 ; On visualise sur la courbe modélisée le temps d'arrivée au Pic (TTP), la valeur maximale du signal (PH) et l'aire sous la courbe de ΔR_2^* (A). b) Une image cérébrale T_2* d'un cas de GBM IV. Représentation du signal $\Delta R'^{*}_{2}$ (c) et du signal ΔR_2^* (d) (Chan and others 2004)

I.3.1.1.a.2. Volume sanguin cérébral relatif

Une fois la contribution du signal issu de la recirculation de l'AC dans le compartiment vasculaire éliminée, le volume sanguin cérébral relatif (rVSC) peut être calculé à partir de l'aire sous la courbe ΔR_2^* normalisée par celle obtenue pour une région de référence (**équation I.6**) comme la **figure I.23** le montre.

$$rVSC \propto \int_{t0}^{tf} \frac{\Delta R^*_{2\,(t)}}{\Delta R^*_{2\,(t)ref}}\, dt \qquad \text{[Eq. I.6]}$$

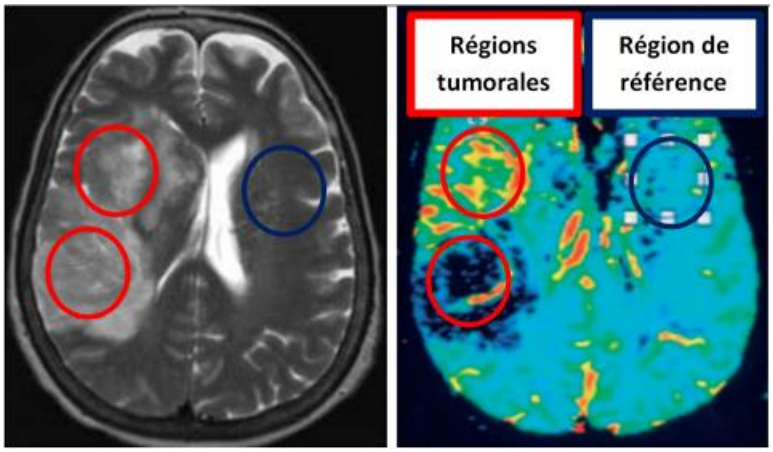


Figure I.23: IRM anatomique et cartographie de perfusion d'un GBM. a. imagerie anatomique T_{2w}. b. cartographie de perfusion montrant une cartographie du volume sanguin. L'imagerie pondérée T_2 montre une tumeur homogène alors que la cartographie de perfusion montre deux régions de volume sanguin différentes par rapport à la région de référence (Bas 2006; Le Bas and others 2006).

I.3.1.1.a.3. Volume sanguin cérébral absolu

La mesure du VSC absolu nécessite la connaissance a priori de la concentration plasmatique du produit de contraste in-situ dans chaque voxel ($C_p(t)$). Ainsi le VSC est calculé à l'aide de l'**équation** ci-dessous :

$$VSC \propto \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{C_t(t)}{C_p(t)}\, dt \qquad \text{[Eq. I.7]}$$

En pratique, la fonction d'entrée artérielle (AIF) est la concentration plasmatique [AC] dans le temps approximée à partir de la conversion du signal IRM dans une artère, qui perfuse le site d'interêt et qui se trouve à son côté (Voir paragraphe **III.1.1.3**). Le calcul du VSC absolu peut être obtenu par l'**équation** suivante.

$$C_t(t) = CBF * AIF(t) \otimes R(t) = CBF \int_0^t AIF(\tau) * R(t-\tau) d\tau \qquad \text{[Eq. I.8]}$$

R(t) est une fonction résidu qui modélise la quantité de l'AC restant dans un voxel en fonction du temps ($R(t_0) = 1$, $R(t_\infty) = 0$) et CBF est le débit sanguin. La déconvolution entre R(t) et l'AIF est primordiale pour éliminer la dispersion au cours du temps de l'AC due à la différence de site de mesure de l'AIF et du TBVf (Ostergaard and others 1996)

Le VSC absolu est déduit grâce au principe physique de la théorie de la dilution basée sur le principe du volume central (Meier and Zierler 1954) qui relie le VSC absolu, le temps de transit moyen (TTM) et le CBF selon l'équation ci-dessous :

$$VSC = V_p = CBF * TTM \qquad \text{[Eq. I.9]}$$

Dans le cas des GBM, le produit de contraste utilisé en clinique, en général le Gd-DOTA en France, s'extravase du compartiment vasculaire vers le compartiment extravasculaire. La méthode du premier passage évoquée ci-dessus n'est plus judicieuse pour évaluer la quantification du VSC absolu dans ce cas. Il est donc nécessaire de prendre en compte le signal d'extravasation en appliquant une modélisation du signal tissulaire via des modèles mathématiques qui représentent l'échange de l'AC entre les différents compartiments concernés.

I.3.1.1.b. Volume sanguin et perméabilité vasculaire en cas d'extravasation de l'agent de contraste

Actuellement en clinique et dans le cas d'un traceur diffusible, la caractérisation des paramètres de perfusion, notamment le VSC absolu et la perméabilité des vaisseaux, se base sur le principe d'échange bi-compartimental et bi-directionnel (Larsson and others 1990; Tofts 1997; Tofts and others 1999) entre les compartiments vasculaire et extravasculaire **figure I.24** (Tofts and others 1999).

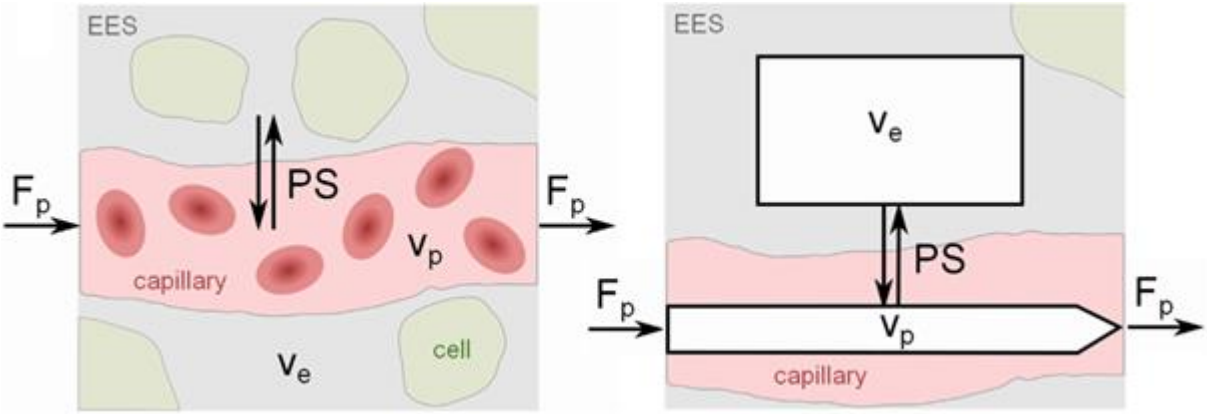


Figure I.24: schémas illustratifs de l'échange de l'AC entre le compartiment vasculaire et extravasculaire extracellulaire (EES). Cet échange est déterminé grâce au flux plasmatique (F_p, supposé inchangé par l'échange) et au produit perméabilité-surface vasculaire (PS). Le modèle générique du tissu est présenté à gauche. L'échange bicompartimental bi-directionnel proposé par Tofts (modèle modifié) est présenté à droite. v_e étant la fraction volumique du compartiment EES (Heye and others 2014).

I.3.1.1.b.1. Modèle bi-compartimental

Le signal tissulaire total représente la somme du signal issu du compartiment vasculaire et celui du compartiment extravasculaire et peut être représenté par les équations suivantes :

$$C_t(t) = v_p C_p(t) + v_e C_{ev}(t) \qquad \text{[Eq. I.10]}$$

$C_t(t)$ est la concentration totale de l'AC dans le tissu au cours du temps. $C_p(t)$ et $C_{ev}(t)$ représentent la concentration de l'AC dans le compartiment vasculaire et extravasculaire respectivement. V_p et V_e représentent le volume du compartiment vasculaire (volume

plasmatique) et extravasculaire respectivement. Le signal acquis sera ainsi modélisé par l'**équation I.11** (Johnson and others 2004; Tofts 1997; Tofts and others 1999) qui prend en compte l'échange bi-compartimental et la fraction volumique du plasma du compartiment vasculaire (V_p)

$$C_t(t) = v_p C_p(t) + K^{trans} \int_0^t C_p(\tau) e^{-K_{ep}(t-\tau)} d\tau \qquad \text{[Eq. I.11]}$$

K^{trans} et k_{ep} sont les constantes et le taux de transfert respectivement qui décrivent le flux de l'AC du compartiment vasculaire vers le compartiment extravasculaire extracellulaire, V_e est la fraction volumique du compartiment extravsculaire extracellulaire (EES). C_p (τ) est l'AIF.

Dans le cas où le tissu est bien perfusé (Permeability limited theory), K^{trans} est donnée essentiellement par la perméabilité surfacique PS, avec $K^{trans} = k_{ep} \times V_e = PS \times V_e$.

Afin de permettre une quantification absolue des paramètres vasculaires, la connaissance a priori de l'AIF est nécessaire.

I.3.1.1.c. Limites de la technique dynamique de susceptibilité magnétique

La technique de susceptibilité magnétique présente une faiblesse intrinsèque qui provient des artéfacts de susceptibilité magnétique macroscopique en IRM. En effet, des distorsions géométriques sont constatées dans des régions autour des grands vaisseaux, à l'interface tissu/air et dans des régions de champ magnétique non homogène (dont les régions tumorales font partie). De plus, ces distorsions sont beaucoup plus prononcées dans le cas d'une extravasation de l'AC dans le compartiment extravasculaire (S. Gribbestad 2005).

Dans le cas d'une extravasation de l'AC, l'effet de relaxation T_1 peut devenir significatif (Calamante and others 2007; Donahue and others 1997) par rapport à l'effet T_2^*. Par conséquent, l'**équation I.1** n'est plus valable pour la séparation des effets T_1 et T_2^*, rendant ainsi difficile la quantification de changement de l'effet T_2^*. Ceci aboutit à une sur-ou une sous-estimation du VSC selon la dominance des effets T_1 ou T_2^* (Bjornerud and others 2011; Kassner

and others 2000; Paulson and Schmainda 2008). En outre l'estimation du K^{trans} sera moins fiable en comparaison avec d'autres méthodes basées sur la relaxation T_1.

Au vu de ces limites et de l'ensemble des hypothèses et des estimations à prendre en compte pour la quantification des paramètres vasculaires, en routine clinique, le VSC n'est pas mesuré quantitativement.

I.3.1.2. Technique dynamique de rehaussement de contraste pondérée T_1

Contrairement à la technique de DSC-$T_2^*{}_w$ le signal acquis avec la technique DCE-T_{1w} augmente lors du passage de l'AC dans le compartiment vasculaire car la technique est basée sur des images pondérées T_1. De plus, l'effet de la relaxivité est localisé à proximité de l'AC et ne s'étend pas comme dans le cas des acquisitions $T_2^*{}_w$.

Dans le domaine de la neuro-imagerie la DCE-T_{1w} était considérée comme le standard de l'IRM pour mesurer la perméabilité vasculaire tandis que la DSC-$T_2^*{}_w$ était la méthode de choix pour mesurer les paramètres de perfusion. Il a été cependant montré que la DCE-T_{1w} peut combiner ces deux paramètres en utilisant une résolution temporelle suffisante pour acquérir la partie du premier passage de l'AC et ensuite une acquisition suffisamment longue avec une meilleure résolution spatiale pour capturer le signal d'extravasation (Ka-Loh and others 2012; Larsson and others 2009). Des développements sont en cours d'une part afin d'augmenter les résolutions spatio-temporelles, et d'autre part, pour réduire les biais de la quantification en améliorant le modèle pharmacocinétique pour prendre en compte l'échange d'eau entre les compartiments intra et extravasculaire et le temps de transit moyen du plasma (Jahng and others 2014; Landis and others 2000).

Malgré les progrès qui ont été faits au niveau des techniques de perfusion (DSC- $T_2^*{}_w$ et DCE T_{1w}) pour permettre la quantification des paramètres de perfusion, le problème majeur avec ces deux techniques est la détermination de l'AIF qui reste un défi surtout que celle-ci est directement liée / sensible à la plupart des sources d'artéfacts qui se présentent lors de la quantification des paramètres vasculaires. Ci-dessous, nous allons définir ce paramètre et son utilité pour la quantification des paramètres vasculaires.

I.3.1.3. Fonction d'entrée artérielle

L'AIF est la fonction qui décrit la concentration de l'AC dans l'artère principale qui entre dans le tissu en fonction du temps. Elle est nécessaire pour prendre en compte la façon dont le bolus arrive au tissu d'intérêt (**figure I.25**), et pour être en mesure de quantifier les propriétés de ce tissu. La **figure I.25** montre un exemple de deux volumes sanguins différents ayant une concentration tissulaire de produit de contraste identique. Ainsi la concentration tissulaire seule ne permet pas de distinguer deux états physiologiques différents, et la mesure de l'AIF est nécessaire.

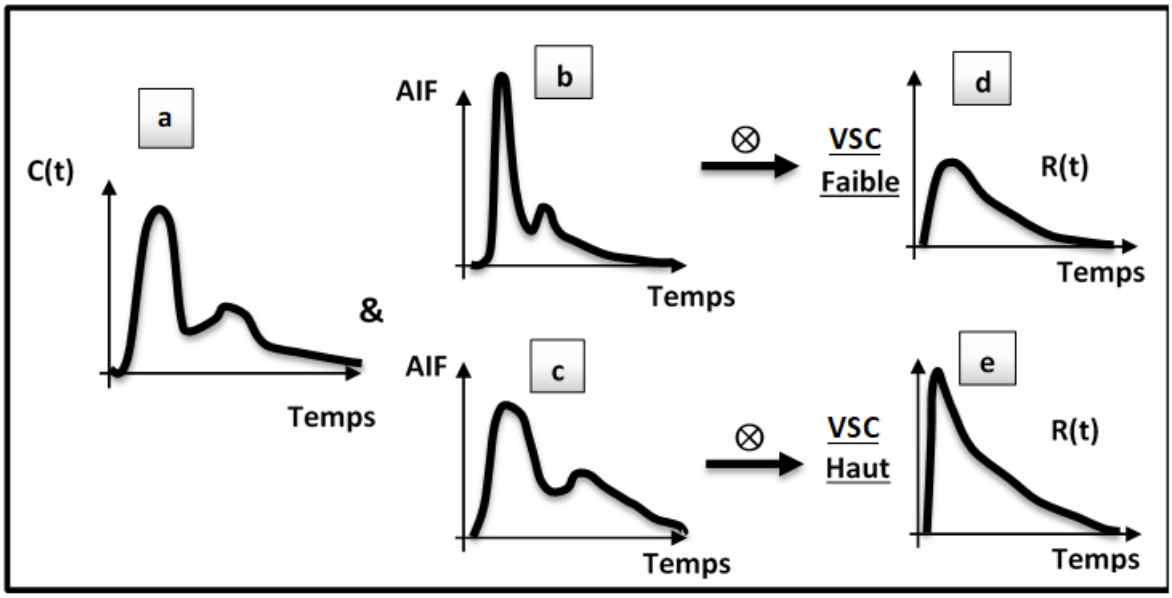


Figure I.25: Courbes illustrant la nécessité de la connaissance a priori de l'AIF afin de différencier deux VSC pour une même concentration tissulaire. a) Concentration tissulaire de l'AC. b) Un bolus rapide. d) Un faible VSC après une déconvolution de (a) et (b). c) Un bolus lent. e) Un VSC élevé après déconvolution de (a) et (c), source modifiée (Calamante 2013) .

La connaissance de l'AIF est donc primordiale pour la quantification des paramètres de perfusion. A l'heure actuelle il n'existe pas de méthode de référence pour déterminer l'AIF et beaucoup de questions se posent concernant le lieu de mesure, la méthode de mesure et quelle partie de l'AIF est utile pour la détermination du VSC (**Voir annexe X.1**).

Plusieurs difficultés et de sources d'erreurs (conversion du signal IRM en concentration d'agent de contraste, effet du volume partiel, effet de recirculation et de la troncature du signal, retard et dispersion du bolus …) perturbent la détermination de l'AIF qui est elle-même liée à la plupart des sources d'artéfacts qui se présentent lors de la quantification du VSC, rendant la quantification difficile et biaisée (Une revue plus detaillée de ces difficultés est présentée dans **l'annexe X.2**).

La méthode d'IRM $RSST_1$ (Perles-Barbacaru and Lahrech 2007) a été développée et mise en place dans notre équipe avec l'objectif d'éviter les problèmes rencontrés avec ces deux techniques lors de la quantification des paramètres vasculaires. Dans la partie qui suit nous allons décrire cette technique quantitative qui ne nécessite pas l'AIF pour la quantification des paramètres de la vascularisation et qui évite plusieurs opérations correctives et autres sources d'erreur rencontrées avec les techniques d'IRM DSC-$T_2^*{}_w$ et DCE-T_{1W}.

I.3.1.4. Rapid steady state T_1

Au départ, la méthode $RSST_1$ (Perles-Barbacaru and Lahrech 2007) a été développée principalement pour quantifier le volume sanguin d'une façon absolue sans avoir recours à l'AIF dans le cas où l'AC ne s'extravase pas dans le compartiment extravasculaire. Son application est facile, rapide et faisable avec l'injection du Gd-DOTA, l'AC le plus utilisé en clinique (Perles-Barbacaru and others 2015).

Le principe de la méthode $RSST_1$ est le suivant : une hypothèse est que l'eau est répartie d'une manière homogène dans les compartiments vasculaires et extravasculaires. La normalisation (ratio) de la quantité de l'eau intravasculaire par rapport à celle du tissu nous donne le pourcentage du VSC absolu qui occupe ce tissu. L'idée est d'acquérir la magnétisation longitudinale M_Z proportionnelle à la quantité d'eau dans chaque compartiment (**figure I.26**). L'aimantation longitudinale M_Z (**figure I.27**) est obtenue avec une séquence de type inversion récupération (**figure I.28**) paramétrée de façon à différencier l'aimantation longitudinale M_Z de l'eau vasculaire de l'aimantation longitudinale du tissu quand l'AC est présent dans le compartiment vasculaire à un certain seuil de concentration.

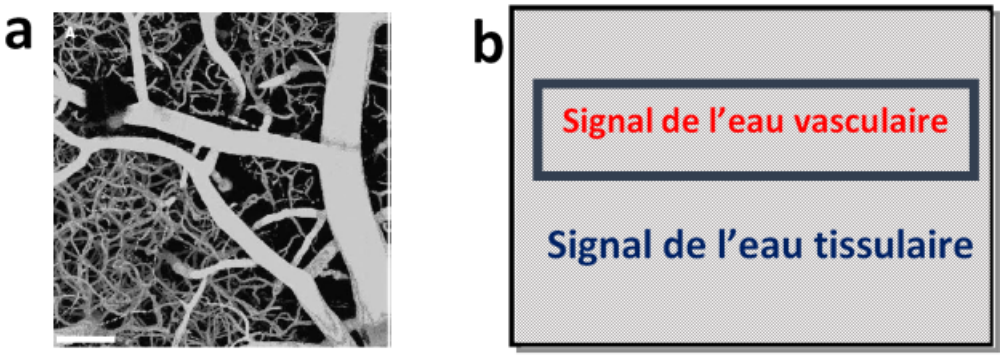


Figure I.26: a) Identification du signal vasculaire du cortex cérébral d'une souris par microscopie multiphoton (Vérant and others 2007). b) Schéma de la répartition du signal IRM, obtenu par la méthode RSST$_1$, entre le tissu et le compartiment vasculaire. La normalisation des deux signaux aboutit au volume sanguin absolu.

I.3.1.4.a. Origine du signal rapide stady state T_1

Le signal RSST$_1$ est fortement pondéré par le temps de relaxation longitudinal T_1. Dans un premier temps, le but est de différencier les temps de relaxation longitudinaux des compartiments vasculaires et extravasculaires. Ceci est effectué en injectant un AC dans le compartiment intravasculaire qui va réduire significativement le T_1 de ce compartiment. Dans un second temps, une séquence de type inversion/récupération, paramétrée de façon à acquérir le signal à l'équilibre thermodynamique d'un tissu ayant une valeur de T_1 suffisamment faible est utilisée, afin d'acquérir uniquement le signal intravasculaire.

Pour illustrer ce principe, la **figure I.27** montre un exemple de simulation de l'évolution de l'aimantation longitudinale de deux tissus ayant des valeurs de T_1 différentes après l'application d'un pulse d'inversion. Le T_1 court représente le signal intravasculaire (contenant l'AC) et le T_1 long représente le signal du tissu extravasculaire. A un temps $T_{inv} \cong 700$ ms le signal du tissu est nul tandis que le signal intravasculaire est à son maximum d'amplitude, et par conséquent à l'équilibre thermodynamique. La séparation des signaux provenant du milieu intravasculaire et du tissu est alors accomplie.

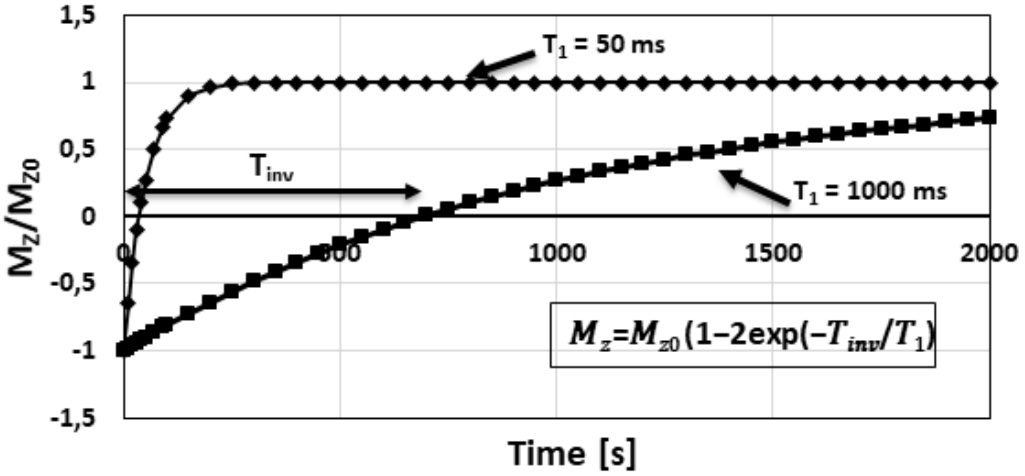


Figure I.27: Un exemple de l'évolution de l'aimantation longitudinale en fonction du temps après application de la séquence d'inversion récupération pour deux milieux ayant des T_1 différents (50 et 1000 ms). Dans le cas d'une acquisition de l'aimantation à $T_{inv} \cong 700$ ms, le signal est nul pour T_1 = 1000 ms et maximal pour T_1 = 50 ms. On a alors le signal provenant que d'un milieu, sans contamination de l'autre milieu (d'après(McRobbie 2007)).

En se basant sur ce principe, la méthode $RSST_1$ utilise des séquences d'imagerie basées sur des échos de gradients (EG) et des faibles angles de bascule dotées d'une rapidité suffisante pour acquérir tout l'espace de Fourier (espace k) et ainsi obtenir l'information souhaitée après un seul pulse d'inversion (single shot). La combinaison des paramètres (T_{inv}, TR, TE, …) de cette séquence doit être optimisée afin d'obtenir les résultats souhaités pour les T_1 du tissu et pour des concentrations vasculaires de l'AC envisageables (Perles-Barbacaru and Lahrech 2007) (voir **section I.3.1.4.a.3**).

I.3.1.4.a.1. Séquence d'imagerie IR-FLASH 2D

La séquence utilisée pour acquérir le signal $RSST_1$ est basée sur le principe de l'inversion/récupération de l'aimantation longitudinal par la technique FLASH (Fast Low angle Shot) proposé par Haase et al (Haase 1990). Cette séquence est composée d'un train de pulses RF de faible angle de bascule (α) précédé d'une impulsion RF d'inversion (180°) adiabatique non sélective. L'espace k est ainsi parcouru rapidement par un encodage de sélection de coupe et un encodage centrique de phase et de lecture (**figure I.28**).

La **figure I.28** schématise la méthode IR-FLASH 2D. TR est le temps de répétition qui sépare deux impulsions adiabatiques d'inversion, T_{inv} est le temps d'inversion qui est fixé de sorte d'obtenir le maximum du signal vasculaire tout en annulant le signal extravasculaire. Ce temps T_{inv} correspond au moment où le centre de l'espace k est acquis ($Ky \cong 0$, **figure I.28, I.29**), ainsi les lignes de l'espace k sont remplie une à une en commencant par le centre de la matrice à t = T_{inv} puis de part et d'autre de ce centre. $\alpha_{(1\ldots n)}$ sont les impulsions RF d'angle de bascule faible séparées par le temps de répétition TR_{echo} (TR_{FLASH}).

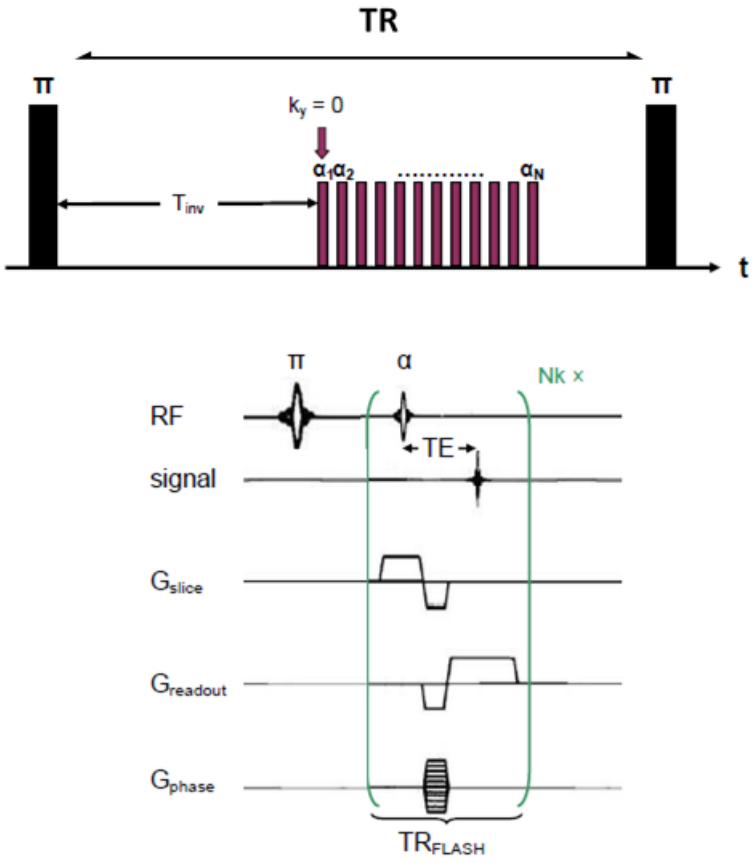


Figure I.28: Schéma simplifié d'une séquence inversion récupération de type 2D FLASH (Perles-Barbacaru 2011). Le remplissage de l'espace k commence à t = T_{inv} après l'application de la première impulsion RF α.

I.3.1.4.a.2. Signal RSST$_1$

L'aimantation longitudinale issue de la séquence IR-FLASH 2D a été modélisée par Jivan et al (Jivan and others 1997). Ici on présente l'évolution de cette aimantation pour différents temps T_1 (**figure I.29**) en utilisant un temps de répétition TR (750 ms) et un faible angle de bascule d'EG (α = 10°). 16 impulsions RF sont utilisées et associées à 16 valeurs différentes des gradients de phases permettant un encodage linéaire de type centrique du plan de fourier.

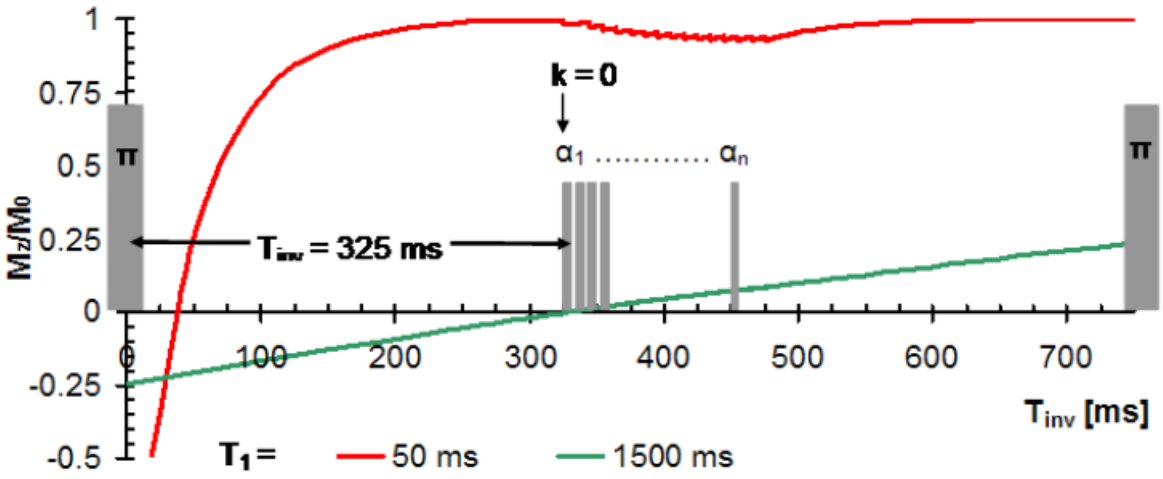


Figure I.29: Magnétisation longitudinale (Mz/M_0) après l'équilibre dynamique en fonction du temps pour un TR = 750 ms. Mz/M_0 est représentée pour différents T_1. Le centre de l'espace k est acquis à α_1, ce qui correspond à T_{inv} = 325 ms. Π est l'impulsion RF d'inversion appliquée au début de l'acquisition et après chaque TR. On observe l'installation d'un équilibre dynamique (régime stationnaire) du signal après quelques répétitions (Perles-Barbacaru and Lahrech 2013).

La **figure I.29** montre l'équilibre dynamique de l'aimantation longitudinale effectué après 6 impulsions d'inversion (TR = 750 ms). Ceci se traduit par un signal constant d'où la nomenclature 'Steady State' qui signifie « régime stationnaire ». A T_{inv} = 325 ms, l'aimantation longitudinale vasculaire (en présence de l'AC) représentée par le temps T_1= 50 ms, atteint sa valeur maximale avec $M_z/M_0 \cong 0{,}98$. Par contre l'aimantation longitudinale du tissu représentée par le temps T_1 = 1000 ms a un signal résiduel avec $M_z/M_0 \cong 0{,}03$.

I.3.1.4.a.3. M_z en fonction du TR, T_{inv} et T_1

Une fois le régime stationnaire établi après un certain nombre de répétitions, l'aimantation longitudinale peut être approximée selon Jivan et al(Jivan and others 1997) par l'**équation I.12** pour des petits angles α.

$$M_z = M_{z0}\left(1 - \frac{2\exp\left(-\frac{T_{inv}}{T_1}\right)}{1+\exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)}\right) \qquad \text{[Eq. I.12]}$$

La suppression du signal ($M_z/M_{z0} = 0$) se traduit par l'**équation I.13** en fonction de T_1 pour un T_{inv} et un TR donné

$$T_{inv} = T_1 \ln 2 - T_1 \ln\left[1 + \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)\right] \qquad \text{[Eq. I.13]}$$

Le terme exponentiel dans l'**équation I.13** peut être remplacé par $1-TR/T_1$ (selon la série Taylor première ordre) pour $T_1 >> TR$ ainsi l'**équation I.13** devient :

$$T_{inv} \cong -T_1 \ln\left[1-\frac{TR}{2T_1}\right)] \qquad \text{[Eq. I.14]}$$

Remplaçons $1-TR/2T_1$ par $\exp(-TR/2T_1)$, on obtient

$$T_{inv} \cong \frac{TR}{2} \qquad \text{[Eq. I.15]}$$

Ainsi, idéalement pour des $T_1 >> TR$, la magnétisation est annulée pour un T_{inv} qui vaut la moitié du TR.

La **figure I.30** montre l'aimantation longitudinale en fonction de la constante de temps de relaxation longitudinale T_1. Les valeurs de T_1 de l'abscisse représentent toute la plage des valeurs que le tissu cérébral et le compartiment vasculaire peuvent avoir en présence ou en absence de produit de contraste. L'aimantation longitudinale est présentée pour différents temps T_{inv} avec un temps TR fixe à 750 ms.

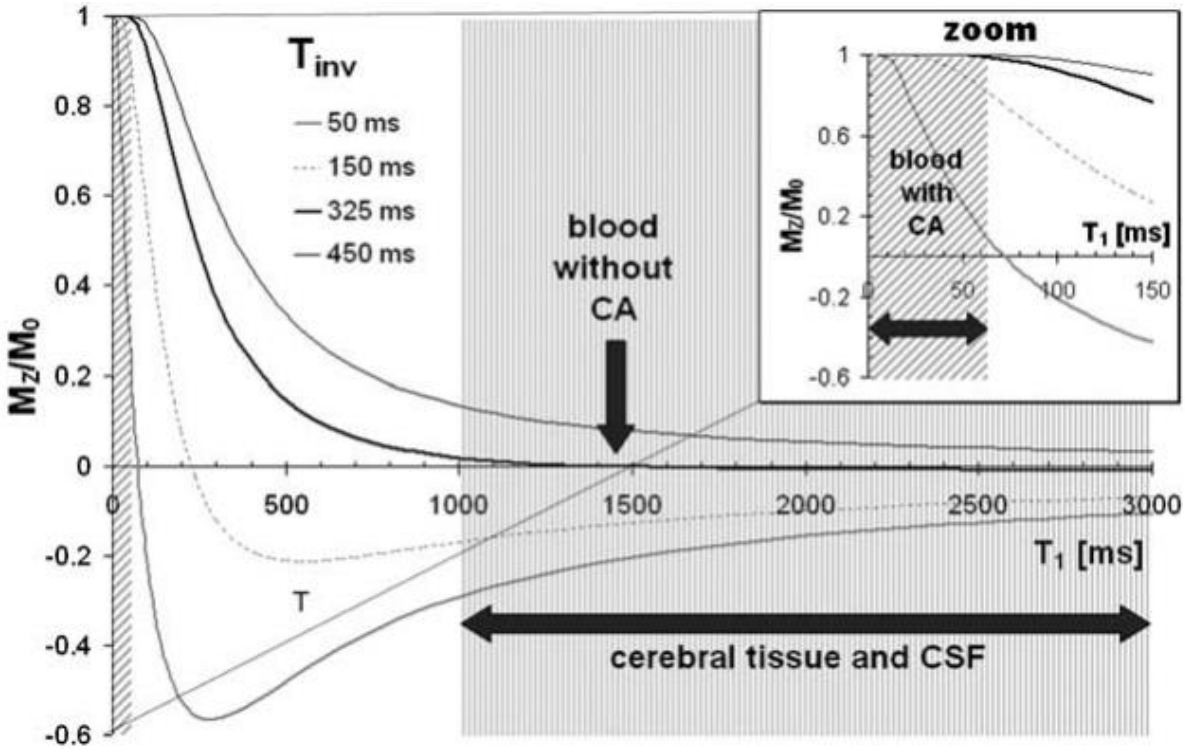


Figure I.30: Magnétisation longitudinale (M_Z/M_0) selon l'équation I.12 en fonction du temps de relaxation longitudinale pour différents temps T_{inv} à un temps TR fixe de 750 ms (Perles-Barbacaru and Lahrech 2007). Le tissu cérébral et le compartiment vasculaire (avant injection de l'AC) ont un T_1 entre 1 et 2s, ce qui correspond à une suppression optimale de leur aimantation longitudinale pour un couple TR/T_{inv} de 750ms/325ms. L'aimantation du compartiment intravasculaire en présence de l'AC atteint sa valeur maximale pour la même valeur de T_{inv}.

Pour des valeurs de $T_1 > TR$, M_z/M_0 s'annule plus rapidement avec une valeur de $T_{inv} = 325$ ms ($\cong TR/2$). Le signal du tissu cérébral dont le T_1 est supérieur à 1s peut être annulé alors avec une combinaison de TR/T_{inv} égale à 750 ms/325 ms qui a été optimisé pour le tissu cérébral de rat à 2,35T (Perles-Barbacaru and Lahrech 2007).

Par contre, dans le cas du compartiment vasculaire et en présence de l'AC, les valeurs de T_1 sont très faibles de l'ordre de 50 ms ($T_1 < T_{inv}/5$), le signal vasculaire atteint son maximum représentant ainsi l'aimantation longitudinale à l'équilibre ($M_z/M_{Z0} = 1$). Ce maximum atteint est stable et est indépendant des valeurs de T_1 en dessous du seuil $T_{inv}/5$.

Pour résumer, la séquence paramétrée avec un $T_{inv} \cong TR/2$, se comporte comme un filtre passe bas des valeurs de $T_1 < T_{inv}/5$. Pour un couple de valeurs TR = 750 ms et T_{inv} = 325 ms, le signal

intravasculaire (T_1 < 65 ms) acquis est à l'équilibre thermodynamique et par conséquent proportionnel au volume sanguin, et le signal extravasculaire (T_1 entre 1 et 2 s) est nul.

I.3.1.4.b. Détermination de la concentration de l'agent de contraste

Une valeur de T_1 en dessous du seuil fixé à $T_{inv}/5$ est nécessaire pour établir le régime stationnaire maximal dans le compartiment vasculaire. La concentration de l'AC nécessaire doit être déterminée au préalable. L'**équation I.16** nous permet d'estimer la quantité d'AC à injecter en i.v pour atteindre les valeurs souhaitables de T_1

$$R_1 = R_{10} + r_1[C] \qquad \text{[Eq. I.16]}$$

R_{10} et R_1 sont les vitesses de relaxation longitudinale avant et après injection du produit de contraste. r_1 est la relaxivité du produit de contraste.

I.3.1.4.c. Mesure du volume sanguin par la méthode $RSST_1$

Le VSC absolu est déterminé par la normalisation de la magnétisation vasculaire maximale après injection de l'AC (S_{post}) par celle du tissu à l'équilibre thermodynamique (S_0) selon l'**équation** suivante :

$$\text{VSC} = \frac{S_{post}}{S_0} \qquad \text{[Eq. I.17]}$$

S_0 est obtenu en utilisant des temps TR et T_{inv} long de l'ordre de 5 x T_1 du tissu, permettant d'obtenir l'aimantation maximale du tissu à son état d'équilibre.

Suite à l'injection de l'AC le signal vasculaire augmente jusqu'à atteindre un plateau pour un certain temps (**figure I.31**, $[C]_{Gd\text{-}DOTA}$ = 0,15 mmol/kg), durant lequel la concentration sanguine de l'AC est suffisamment élevée. Le volume sanguin sera mesuré uniquement entre les temps t_{RSS1} et t_{RSS2} du début et de la fin du plateau. La durée du plateau dépend fortement de la

concentration (**figure I.31**) et du mode d'injection de l'AC. En pratique, le pourcentage du volume sanguin sera ainsi obtenu dans un voxel à partir de l'**équation** suivante :

$$VS\ (\%) = \frac{100}{N}\left(\sum_{i=1}^{N} S_{norm(i)}\right) = \frac{\frac{100}{N}\left(\sum_{i=1}^{N}(S_{post(i)}) - \langle S_{pre}\rangle\right)}{\langle S_0\rangle} \qquad \text{[Eq. I.18]}$$

N est le nombre de signaux acquis pendant la durée du plateau. S_{post} est le signal acquis durant la période steady state. $<S_0>$ est la moyenne de l'aimantation longitudinale maximale à l'équilibre. $<S_{pre}>$ est la moyenne du signal résiduel acquis avant injection de l'AC. Nous pouvons apprécier sur la **figure I.31** que le S_{pre} est prononcé avec la séquence IR-FLASH 2D. La soustraction du signal résiduel extravasculaire (le signal intravasculaire résiduel est supposé minime dans le compartiment vasculaire) est nécessaire afin d'éviter une surestimation du VSC.

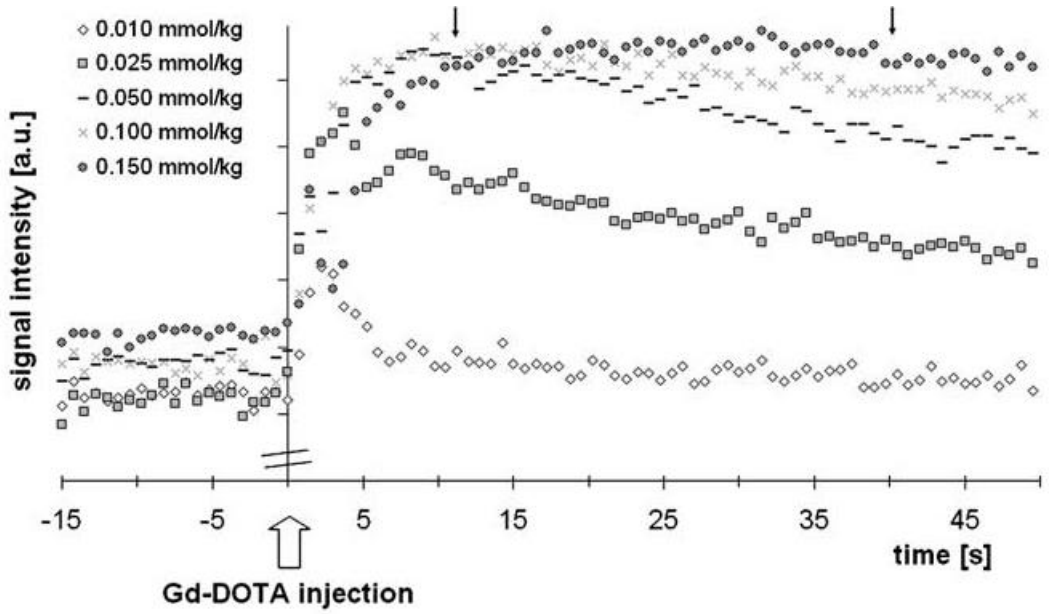


Figure I.31: Suivi de l'aimantation longitudinal Mz dans le cerveau du rat mesuré à 2,35 T(Perles-Barbacaru and Lahrech 2007). Plusieurs doses de Gd-DOTA ont été injecté en i.v. L'injection de Gd-DOTA est effectuée en i.v. Le volume sanguin est mesuré durant le plateau limité par les temps t_{RSS1} et t_{RSS2} (schématisé par les deux flèches). Nous pouvons apprécier la présence du signal résiduel avant l'injection du Gd-DOTA exprimé en unité arbitraire (a.u)

Dans notre travail de thèse nous avons utilisé une séquence d'imagerie 3D « IR-MDEFT 3D » avec un encodage de phase de type linéaire afin d'améliorer essentiellement 1) le rapport signal sur bruit, 2) la diminution du signal résiduel et ainsi amélioré la quantification du VSC. Nous avons abordé en détail dans le **chapitre 2** la différence entre la technique IR-FLASH 2D et IR-MDEFT 3D et ainsi les conséquences sur la quantification du VSC.

I.3.1.4.c.1. Volume sanguin et perméabilité vasculaire en cas d'extravasation de l'AC

Dans le cas de la plupart des tumeurs cérébrales notamment les GBMs, la BHE est rompue. Le Gd-DOTA, ne reste plus confiné dans les vaisseaux et s'extravase passant progressivement de la vascularisation vers l'interstitium. Comme c'est le cas dans le compartiment vasculaire, l'AC va modifier les valeurs de T_1 là où il diffuse. Ainsi dans le compartiment extravasculaire atteint par l'AC les T_1 vont diminuer progressivement. Le signal $RSST_1$ mesuré est alors un mélange de signaux provenant des deux compartiments vasculaires et extravasculaires et n'est plus différencier comme est montré dans la **figure I.29**.

Dans ce cas, la méthode $RSST_1$ comme elle a été décrite ne permet plus de différencier ces signaux. Une surestimation du VSC en résulte. Une modélisation du signal $RSST_1$ est nécessaire afin d'extraire le signal vasculaire et ainsi déduire la vraie valeur du TBVf. Dans la deuxième partie du **chapitre 2** nous avons développé l'origine du modèle mathématique utilisé pour modéliser le signal $RSST_1$ dans le cas de l'extravasation de l'AC.

Dans le **chapitre 3** nous avons décrit la méthodologie préconisée pour élaborer un protocole d'analyse semi-automatique pour extraire les paramètres vasculaires quantitatifs comme le TBVf, l'indice de perméabilité vasculaire et le volume d'extravasation de l'AC. Nous avons validé dans ce chapitre la quantification du TBVf dans le cas du gliome C6 chez le rat.

Dans le **chapitre 4** nous avons étudié la sensibilité et la reproductibilité de la mesure du TBVf et de la perméabilité vasculaire dans le cas du suivi tumorale (U87) suite au traitement anti-angiogénique.

I.3.2. IRM de la microstructure cérébrale

Les cellules de glioblastomes ont une capacité à infiltrer le tissu sain avoisinant à quelques centimètres du foyer tumoral (Lemée and others 2015; Ruiz-Ontanon and others 2013; Yamahara and others 2010). Lemée et al ont montré par histopathologie, par flux cytométrique et par culture cellulaire la présence des cellules tumorales infiltrant la zone péritumorale, zone considérée saine après analyse par imagerie T1W-Gd et analyse macroscopique peropératoire.

En plus de ce caractère invasif du glioblastome, l'infiltration tumorale se trouve accentuée lors des traitements anti-angiogénique (de Groot and others 2010; Narayana and others 2009; Salas 2011; Thompson and others 2011; Zuniga and others 2009). En effet, la réduction de la vascularisation (VSC, densité vasculaire ….) causée par le traitement anti-angiogénique et la prolifération des cellules tumorales induit un état hypoxique élevé (Bottaro and Liotta 2003; Keunen and others 2011; Rieger and others 2010a; Rieger and others 2010b), et de ce fait crée un environnement propice à la migration des cellules tumorales (Bottaro and Liotta 2003; Gimenez and others 2016; Norden and others 2008; Pennacchietti and others 2003). Ce changement de la microstructure tumorale et péritumorale induit par la thérapie anti-angiogénique peut être étudié d'une manière non invasive par IRM.

La **figure I.32** montre un rehaussement du signal FLAIR autour du Glioblastome quelques mois après le début du traitement par Bevacizumab, interprété comme une infiltration de cellules tumorales validée par histopathologie un mois après l'arrêt du traitement.

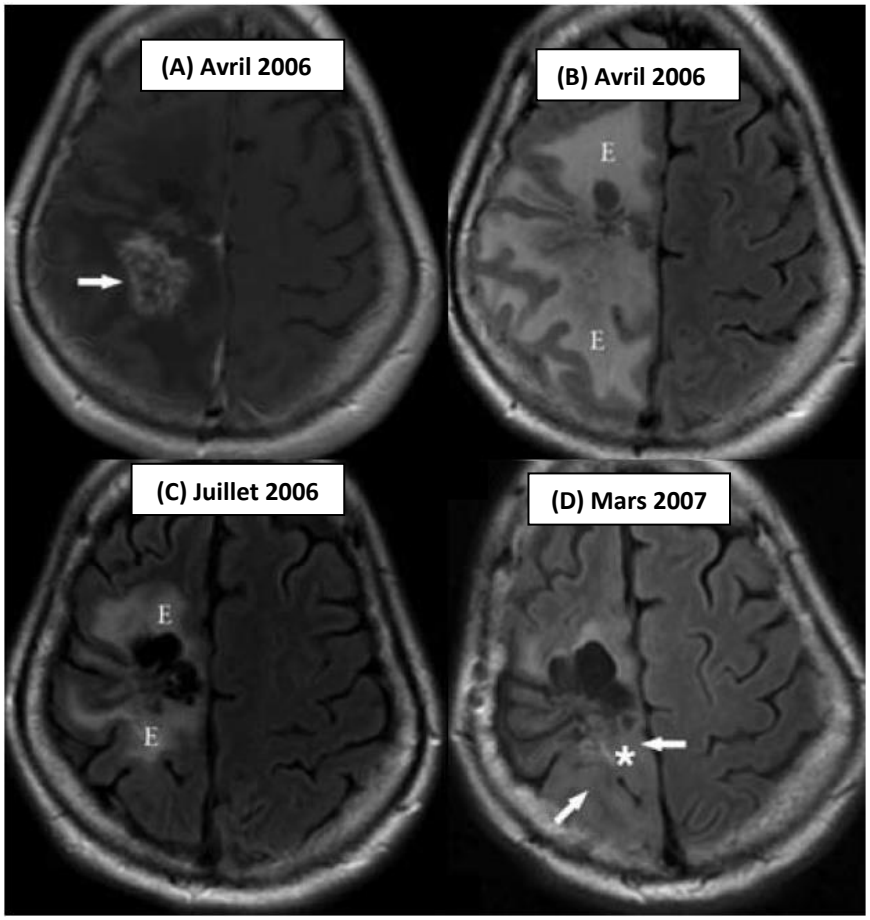


Figure I.32 : IRM de Glioblastome avant et après traitement par Avastin (de Groot and others 2010). $T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ (A) et IRM FLAIR (B, C et D). Diminution de l'œdème (E) après le traitement à court terme. Augmentation du signal FLAIR un mois après l'arrêt de l'Avastin (D, flèches blanches. Astérix représente le lieu de la biopsie) indiquant la présence de cellules tumorales.

L'IRM du tenseur de diffusion est une méthode quantitative pour caractériser la microstructure tumorale (Alexander and L 2007; Gerstner and others 2010; Kremer and S 2007; Pope and others 2011; Rieger and others 2010a). Cette technique est sensible au mouvement Brownien des molécules d'eau dans leur milieu (Bammer 2003; Le Bihan 2003). L'amplitude et la direction du mouvement Brownien peuvent renseigner sur la microstructure du milieu pouvant être modifiée par la pathologie ou par le traitement.

Afin de faciliter la compréhension des résultats nous allons introduire dans les parties suivantes 1) les bases de l'IRM de diffusion et présenter les différents paramètres quantitatifs du tenseur de diffusion, 2) le principe de l'imagerie de rehaussement du signal de type FLAIR,

imagerie utilisée pour délimiter la région tumorale et 3) les apports de ces deux techniques d'IRM dans la neuro-oncologie clinique.

I.3.2.1. IRM du tenseur de diffusion

Dans l'IRM de diffusion le signal est rendu sensible à la diffusion des molécules d'eau, en particulier celles du compartiment extracellulaire contribuant majoritairement au signal RMN. La diffusion des molécules d'eau peut être libre ou restreinte selon l'architecture du milieu qui l'entoure. Ainsi, l'étude de la diffusion de l'eau dans le tissu conduit indirectement à la caractérisation de la structure de son environnement. Dans notre cas de tumeur cérébrale, ceci permet d'étudier les microstructures des tissus tumoraux et péritumoraux avec une invasion cellulaire avant et après une thérapie anti-cancéreuse.

I.3.2.1.a. Diffusion Brownienne de la molécule d'eau

La diffusion est un phénomène naturel de mouvement stochastique, le mouvement Brownien, qui décrit le mouvement aléatoire des molécules d'eau sous l'influence de l'agitation thermique (Einstein 1956). Dans le cas d'une diffusion libre (sans obstacles), le déplacement de l'eau moléculaire au cours du temps est décrit par une densité de probabilité gaussienne selon l'**équation** suivante :

$$P(r|r_0,t) = \frac{1}{\sqrt{(4\pi D_0 t)^3}} \exp^{(-\left(\frac{(r-r_0)^2}{4D_0 t}\right))} \qquad \text{[Eq. I.19]}$$

D_0 est le coefficient de diffusion des molécules d'eau, r_0 et r sont la position initiale et finale de la molécule d'eau, t est le temps de diffusion. La diffusion dans un espace à n dimensions est ainsi traduite selon Einstein (A 1956; Einstein 1956) par :

$$D_0 = \frac{<(r-r_0)^2>}{2nt} = \frac{\sigma^2}{2nt} \qquad \text{[Eq. I.20]}$$

Avec σ le parcours quadratique moyen caractérisant le déplacement de la molécule d'eau. Ainsi, le déplacement quadratique moyen d'un ensemble de molécules d'eau augmente linéairement avec le temps de diffusion.

La **figure I.33** illustre trois cas de diffusion de la molécule d'eau qui sont caractérisés par la courbe qui relie le déplacement quadratique moyen de la molécule d'eau et le temps de diffusion. La diffusion est restreinte quand le déplacement quadratique moyen atteint une asymptote, indiquant une molécule coincée dans une géométrie fermée. La diffusion est entravée quand des obstacles se présentent devant le chemin de la molécule limitant ainsi son déplacement quadratique moyen sans l'enfermer. La diffusion est libre quand aucun obstacle ne limite son déplacement. Dans le tissu cérébral le mouvement de la molécule d'eau est modulé par les membranes cellulaires, les axones des neurones, et ne connait donc pas de diffusion libre. Ainsi, dans un milieu donné, la mesure de diffusion dépend de la compartimentation et du temps de diffusion choisi.

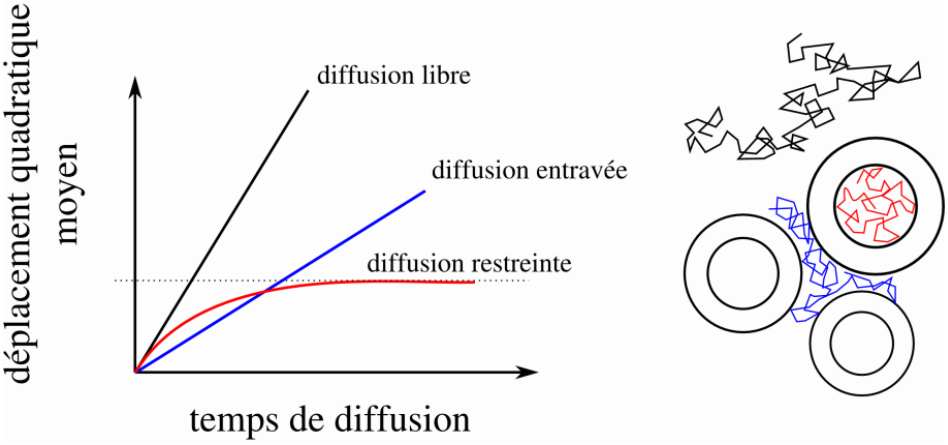


Figure I.33: modes de diffusion déterminés par le déplacement quadratique moyen des molécules d'eau en fonction du temps de diffusion. En noir, diffusion libre dans le cas de l'absence d'obstacle. En bleu, diffusion entravée par des obstacles, comme des membranes cellulaires par exemple. Pour ces deux modes le déplacement quadratique moyen est linéaire en fonction du temps de diffusion. Par contre, le mode de diffusion restreint représente un déplacement quadratique moyen constant au bout d'un certain temps de diffusion à cause d'une géométrie fermée (Mauconduit and Franck 2012).

I.3.2.1.b. Mesure des paramètres de diffusion

En RMN la mesure de la diffusion de l'eau se repose sur le principe de déphasage/rephasage de spin de l'atome d'hydrogène de la molécule d'eau. Le déphasage provoqué par des gradients de champ magnétique induit un signal RMN qui dépend du mouvement de la molécule d'eau. En 1965 Stejskal et Tanner ont mis en place une séquence RMN permettant de sensibiliser le signal RMN à la diffusion de l'eau d'une manière contrôlée.

I.3.2.1.b.1. Déphasage de spins par gradients de phases

Dans un champ magnétique statique et homogène d'amplitude B_0, l'aimantation totale des molécules d'eau est polarisée dans le sens de ce champ magnétique et les spins précessent à la fréquence de Larmor W_0 :

$$W_0 = -\gamma B_0 \qquad \text{[Eq. I.21]}$$

En présence d'un gradient de champ magnétique linéaire, la fréquence de précession des spins sera dépendante de l'amplitude de gradient où elle se trouve et ainsi évidemment de sa localisation géométrique. La fréquence de précession sera ainsi représentée en fonction du gradient de champ magnétique et de la position du spin :

$$W_{\overrightarrow{r,G}} = -\gamma B_{\vec{r}} = -\gamma\left(B_0 + \overrightarrow{G_r}.\vec{r}\right) \qquad \text{[Eq. I.22]}$$

La phase des spins sera ainsi décrite par :

$$\phi_{\overrightarrow{r,G}} = \int_0^t W_{\overrightarrow{r,G}}\,dt = \int_0^t -\gamma\left(B_0 + \overrightarrow{G_r}.\vec{r}\right)dt \qquad \text{[Eq. I.23]}$$

Dans le cas d'application d'un gradient de champ magnétique impulsionnel et constant pendant une durée très faible, les deux spins ayant deux positions spatiales différentes $\overrightarrow{r_1}$ et $\overrightarrow{r_2}$ sont déphasés l'un par rapport à l'autre par :

$$\Delta\phi = \phi_{\overrightarrow{r_1}} - \phi_{\overrightarrow{r_2}} = \gamma t\vec{G}(\overrightarrow{r_2} - \overrightarrow{r_1}) \qquad \text{[Eq. I.24]}$$

Ce principe montre la dépendance de la phase de spin par rapport à sa position. C'est sur ce principe que Stejskal et Tanner ont basé leur méthode pour sensibiliser le signal RMN à la diffusion de la molécule d'eau.

I.3.2.1.b.2. Méthode de Stejskal et Tanner

La **figure I.34** montre le principe de l'acquisition du signal RMN sensibilisée à la diffusion de l'eau. Deux gradients de champ magnétique sont appliqués au cours d'une séquence spin écho (SE). Les gradients de diffusion sont centrés autour d'une impulsion RF d'inversion et séparés par un temps Δt. Suite à l'impulsion RF 90° l'aimantation va être basculée dans le plan transverse. Une fois le premier gradient est appliqué, les spins vont acquérir une phase ϕ_1 en relation avec leur première position r_1. Un deuxième gradient est appliqué après l'impulsion de refocalisation dans le but d'annuler l'accumulation du déphasage ϕ_1 par l'accumulation d'une phase ϕ_2 correspondant à la position r_2 du spin à cet instant.

Donc, dans le cas où la molécule d'eau est restée immobile ($r_1=r_2$) la phase finale du spin est nulle à TE. Par contre, lorsqu'un spin est mobile pendant le temps Δt entre les deux gradients, la phase accumulée après le premier gradient, juste avant l'application du deuxième gradient (ϕ_x, **figure I.34b**), n'est pas identique à celle accumulée suite à l'application de ce deuxième gradient, ce qui crée une phase finale non nulle au temps TE. Ceci est dû principalement au mouvement de la molécule d'eau pendant le temps Δt et à sa position finale.

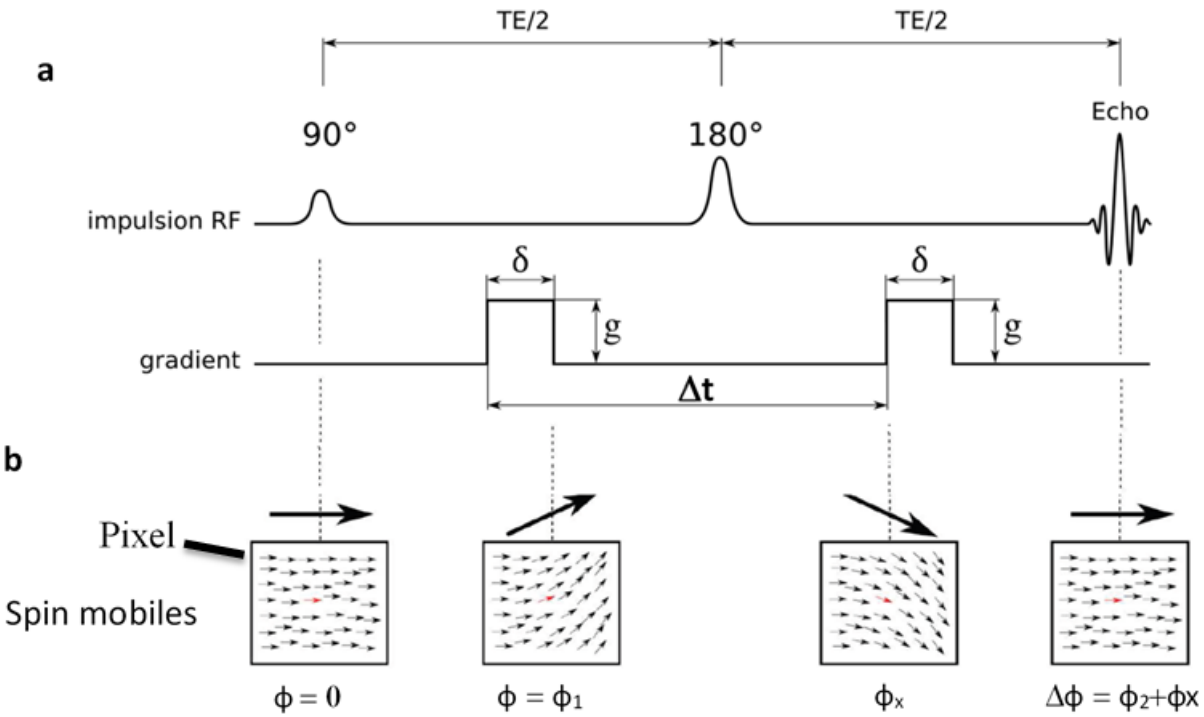


Figure 34 : a) Séquence de Stejkel et Tanner (Stejskal and E 1965): deux impulsions de gradients d'amplitude g, de durée δ et séparées d'une durée Δt, appliquées de part et d'autre de l'impulsion radiofréquence d'impulsion de la séquence SE. b) Principe de déphasage des spins et d'atténuation du signal RMN au cours de la séquence Stejskal et Tanner. Après le premier gradient les spins acquièrent une phase ϕ_1, après un Δt les spins acquièrent une phase ϕ_x (de valeur entre - ϕ_1 à 0) dépendant du mouvement des molécules d'eau et de leur position. Les valeurs extrêmes de la phase finale des spins sont entre 0 et ϕ_2 pour un déplacement nul des molécules ($\phi_2 = \phi_1$) à un déplacement de distance r_2 respectivement ($\phi_2 < \phi_1$) (d'après (Mauconduit and Franck 2012)).

I.3.2.1.b.3. Atténuation du signal et coefficient de diffusion

Pour une séquence de type SE pondérée en diffusion par les gradients de diffusion, le signal RMN d'un voxel correspond au signal T_2 diminué exponentiellement d'un facteur proportionnel au changement de phase des spins de molécule d'eau qui est lié au mouvement de ces molécules. Dans le cas d'une diffusion libre, une solution analytique est présentée par Price et al(Price 1997) pour décrire mathématiquement l'atténuation du signal pour une diffusion libre :

$$S\,(t = TE) = S_0 \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \exp(-bD_0) \qquad \text{[Eq. I.25]}$$

D_0 est le coefficient de diffusion, b est le facteur de gradient et il est exprimé en s/mm^2. Dans une séquence Stejskal et Tanner, ce facteur b est une fonction dépendant principalement des gradients de diffusion et des temps d'application reliés à ces gradients, il s'exprime par :

$$b = \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta t - \frac{\delta}{3}) \qquad \text{[Eq. I.26]}$$

Dans le cas de l'IRM de diffusion, on fait l'approximation que l'on peut décrire le phénomène de diffusion de la même manière :

$$S\,(t = TE) = S_0 \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \exp(-b * ADC) \qquad \text{[Eq. I.27]}$$

Avec l'ADC le coefficient de diffusivité apparente du milieu. Ainsi un minimum de deux mesures expérimentales à deux valeurs de b différentes est nécessaire pour déduire l'ADC dans une direction donnée de l'espace. L'ADC est obtenu par :

$$ADC = -\frac{1}{b}\left(\frac{S(b)}{S(b=0)}\right) \qquad \text{[Eq. I.28]}$$

Les valeurs de coefficient de diffusion sont dépendantes de la direction des gradients appliqués. Afin d'obtenir une information plus complète, il est intéressant d'étudier la diffusivité dans les 3 dimensions de l'espace. Pour cela, nous avons utilisé l'imagerie du tenseur de diffusion (DTI). Le principe du DTI est de reconstruire, pour chaque voxel de l'image, un tenseur qui décrit la diffusitivité des molécules d'eau dans les 3 directions de l'espace. Pour cela, des acquisitions de diffusion sont effectuées avec « n » directions de gradients de diffusion différentes, en plus d'une acquisition de référence sans gradient de diffusion. Pour résoudre l'équation du tenseur, au moins 6 acquisitions (n=6) doivent être faites.

L'**équation I.29** représente sous format matriciel le tenseur de diffusion pour n = 6. La résolution de ce système linéaire permet d'obtenir les six valeurs de diffusivité du tenseur.

$$[D] = [b^{-1}].[S] \qquad [\text{Eq. I.29}]$$

Avec

$$[b] = \begin{pmatrix} b_{xx}^1 & b_{yy}^1 & b_{zz}^1 & b_{xy}^1 & b_{xz}^1 & b_{yz}^1 \\ b_{xx}^2 & b_{yy}^2 & b_{zz}^2 & b_{xy}^2 & b_{xz}^2 & b_{yz}^2 \\ b_{xx}^3 & b_{yy}^3 & b_{zz}^3 & b_{xy}^3 & b_{xz}^3 & b_{yz}^3 \\ b_{xx}^4 & b_{yy}^4 & b_{zz}^4 & b_{xy}^4 & b_{xz}^4 & b_{yz}^4 \\ b_{xx}^5 & b_{yy}^5 & b_{zz}^5 & b_{xy}^5 & b_{xz}^5 & b_{yz}^5 \\ b_{xx}^6 & b_{yy}^6 & b_{zz}^6 & b_{xy}^6 & b_{xz}^6 & b_{yz}^6 \end{pmatrix}, [S] = \begin{pmatrix} \ln(\frac{S_1}{S_0}) \\ \ln(\frac{S_1}{S_0}) \\ \ln(\frac{S_1}{S_0}) \\ \ln(\frac{S_1}{S_0}) \\ \ln(\frac{S_1}{S_0}) \\ \ln(\frac{S_1}{S_0}) \end{pmatrix}, [D] = \begin{pmatrix} D_{xx} \\ D_{yy} \\ D_{zz} \\ D_{xy} \\ D_{xz} \\ D_{yz} \end{pmatrix}$$

I.3.2.1.b.4. Paramètres du tenseur de diffusion

Plusieurs paramètres peuvent être déduits grâce aux valeurs du tenseur obtenu par la méthode DTI. Ces valeurs peuvent être représentées avec ou sans leur vecteur d'orientation. Ici on va introduire les paramètres les plus utilisés pour étudier la microarchitecture tumorale en routine clinique.

Afin de simplifier la représentation des valeurs et pour donner plus de clarté aux valeurs de diffusion, une diagonalisation du tenseur de diffusion est appliquée, et seulement trois directions principales de diffusion ($\overrightarrow{e_1}$, $\overrightarrow{e_2}$, $\overrightarrow{e_3}$) sont retenues pour lesquelles les coefficients de diffusion sont donnés par les trois valeurs propres $\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3$.

Ces trois valeurs constituent les bases des paramètres de diffusion utilisés en routine clinique. Nous pouvons alors identifier 4 paramètres :

- λ_1 représente la diffusivité maximale notée souvent $D_{//}$ (diffusivité longitudinale).
- $D_{\perp}$ représente la diffusivité transversale :

$$D_{\perp} = \frac{\lambda_2+\lambda_3}{2} \qquad \text{[Eq. I.30]}$$

- <ADC> est la diffusivité moyenne connue sous le nom de Mean Diffusivity (MD) :

$$MD = \frac{\lambda_1+\lambda_2+\lambda_3}{3} \qquad \text{[Eq. I.31]}$$

- FA est l'indice d'anisotropie traduisant l'anisotropie du milieu:

$$FA = \sqrt{3/2}\sqrt{\left(\frac{(\lambda_1 - MD)^2+(\lambda_2 - MD)^2+(\lambda_3 - MD)^2}{2(\lambda_1^2+\lambda_2^2+\lambda_3^2)}\right)} \qquad \text{[Eq. I.32]}$$

L'échelle de FA est de 0 à 1, où 0 signifie que le milieu est isotrope avec des valeurs propres identiques. Plus la FA s'approche de 1, plus le milieu est anisotrope, c'est-à-dire que la diffusion a une direction privilégiée.

Selon le phénomène que l'on souhaite étudier, ces valeurs peuvent être affectées à chaque pixel de l'image, formant une cartographie des propriétés de diffusion. Ces informations scalaires correspondent aux propriétés intrinsèques du tissu contenu dans chaque pixel de l'image.

I.3.2.2. IRM FLAIR

L'imagerie FLAIR (Hajnal 1992), pour " Fluid Attenuated Inversion Recovery ", est une imagerie qui a été développée afin de sonder les lésions du parenchyme cérébrale, particulièrement celles qui sont localisées à l'interface parenchyme cérébral/liquide céphalo-rachidien (LCR)(Stuckey and others 2007). Le signal provenant du tissu est pondéré T_2 et le signal du LCR est supprimé. Les lésions peuvent avoir un hyper ou hypo signal par rapport au tissu sain avoisinant dépendant de leur temps de relaxation T_1 et T_2 (Stuckey and others 2007).

La **figure I.35** ci-dessous montre le principe de l'imagerie FLAIR basé une séquence d'imagerie rapide SE-RARE (Spin Echo-Rapid acquisition with relaxation enhancement) précédée par une

impulsion d'inversion (IR) de 180°. La séquence RARE permet une acquisition plus rapide du plan de Fourier en utilisant une seule impulsion d'excitation RF (dans notre cas RF d'excitation = 90°) suivi de la lecture de plusieurs lignes de l'espace de Fourier.

Après avoir inversé l'aimantation longitudinale (M_Z) suite à l'impulsion RF de 180°, M_Z va croître pour revenir à sa valeur initiale à l'équilibre thermodynamique, en passant par la valeur nulle à TI = ln (2) * T_1 (ajusté par rapport aux T_1 du LCR à un champ magnétique donné). A ce moment le signal est acquis. Le LCR a un signal nul et le tissu dont le T_1 est différent de celui du LCR a un signal non nul.

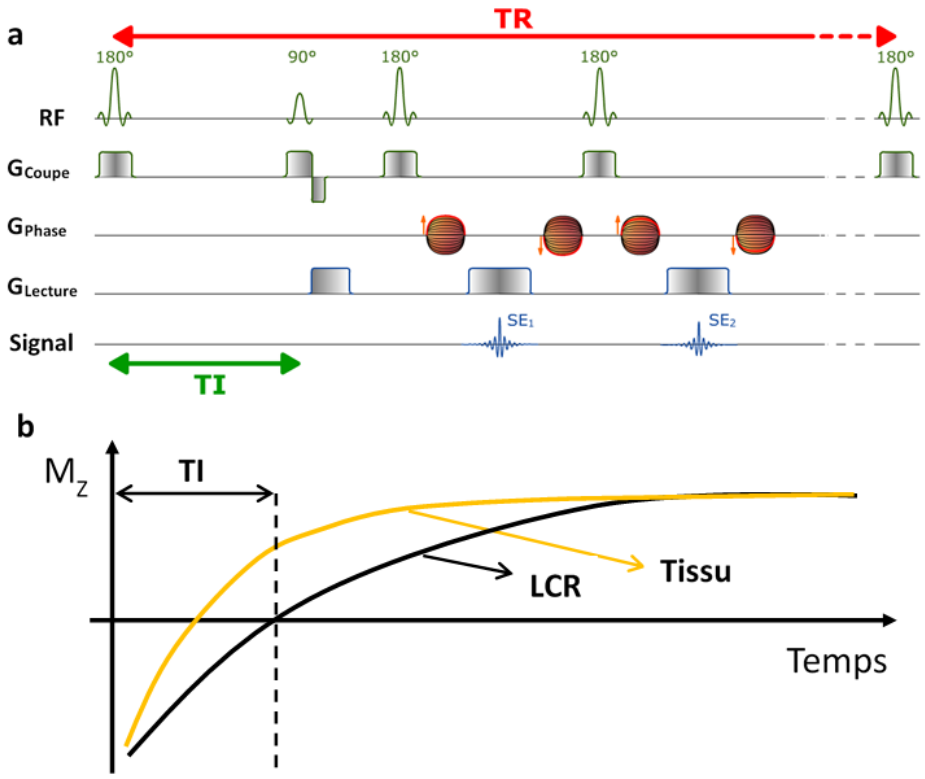


Figure I.35: a) Schéma générique d'une séquence FLAIR de type SE (IR RARE). b) Suivi de l'aimantation longitudinale M_z du tissu et du LCR suite à l'application d'une impulsion RF 180°. (d'après (Bailey 2006)).

Cette imagerie a prouvé son utilité et est devenu un critère d'évaluation de la réponse tumorale vis-à-vis des traitements (Chinot and others 2013; Wen and others 2010) préconisés

notamment dans le cas des tumeurs de GBM (Nieder 2015) sous traitement anti-angiogénique (Paldino and others 2012) (**Figure I.36**).

Malgré la sensibilité élevée de cette technique pour détecter les lésions parenchymateuses, l'hyperintensité du signal FLAIR trouvée chez des patients souffrant d'une tumeur de glioblastome n'est pas encore un biomarqueur valide et spécifique pour la présence de cellules tumorales mais peut également indiquer un oedème vasogénique.

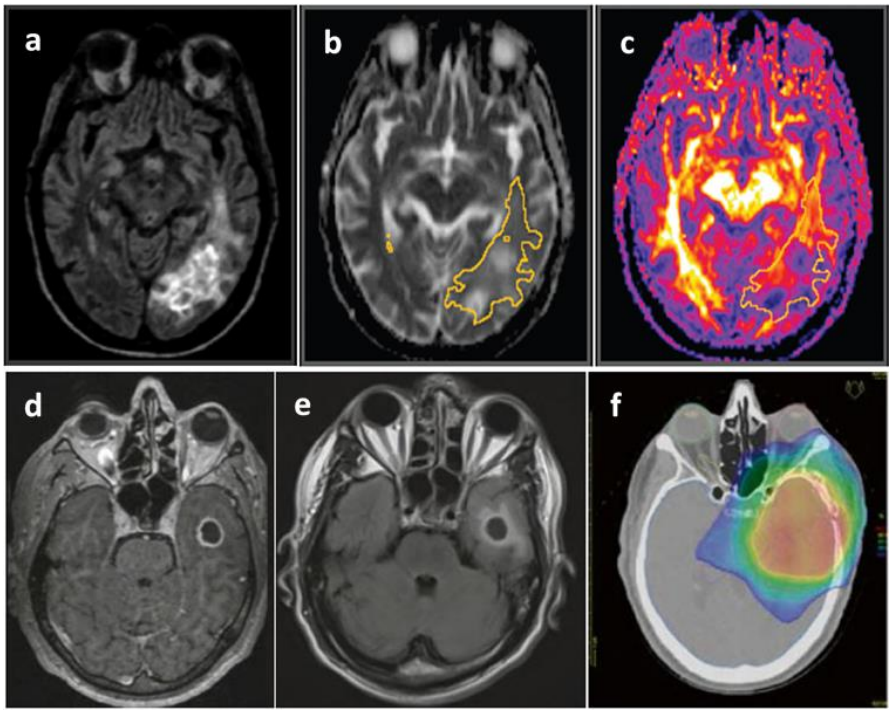


Figure I.36: Première ligne, GBM du lobe pariéto-occipitale gauche. a) L'imagerie FLAIR pour délinéer les limites de la tumeur. b) Cartographie de la diffusivité moyenne MD. c) Cartographie de l'anisotropie FA. Cette étude montre que le changement de la MD de la tumeur après traitement par le Bevacizumab est associée à une diminution de la survie (Paldino and others 2012). Deuxième ligne: GBM du lobe temporale gauche. d) Imagerie $T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$. e) Imagerie FLAIR. f) Imagerie CT-SCAN ayant une distribution de dose par radiothérapie couvrant les limites de la tumeur délinéées grâce à l'imagerie FLAIR (Nieder 2015).

I.3.2.3. Apports de l'imagerie FLAIR et des paramètres DTI dans la neuro-oncologie clinique

Provenzale et al ont mis en évidence une différence de valeurs de FA et de MD entre les régions tumorales, péritumorales et controlatéral chez des patients souffrant de tumeurs gliales confirmées par histologie (Provenzale and others 2004). La MD est plus élevée dans les régions péritumorales et maximales dans la tumeur par rapport à la région controlatérale. La

FA est plus faible dans les régions péritumorales et minimales dans la tumeur par rapport à la région controlatérale. Sinha et al ont montré aussi que ces valeurs se distinguent entre les trois régions ce qui permettrait de déterminer la limite de l'invasion du glioblastome d'une manière non invasive mais ceci doit être valider par des études complémentaires (Sinha and others 2002).

Les valeurs de la FA du glioblastome sont inférieures à celles trouvé dans la matière blanche (Beppu and others 2003; Sinha and others 2002). La baisse de la FA est expliquée par la destruction et/ou un changement de direction des fibres de la matière blanche par les cellules tumorales induisant une diminution de la diffusion de l'eau tout au long des fibres (Beppu and others 2003). Stadlbauer et al ont mis en évidence une corrélation négative (r= -0,67) entre la densité cellulaire et les valeurs du FA trouvé au centre des tumeurs gliales (Stadlbauer and others 2006). Contrairement à Stadlbauer et al, Beppu et al ont montré une corrélation positive (r=0,73, P< 0,05) entre la densité des cellules tumorales quantifiée par une biopsie et les valeurs de la FA dans la région tumorale (Beppu and others 2005). Ceci peut être justifié par l'augmentation de la densité cellulaire et/ou vasculaire selon une direction particulière notamment autour la circonférence tumorale qui peuvent induire une augmentation de la diffusivité de l'eau (Beppu and others 2003).

Au vu de ces résultats, l'imagerie DTI a été utilisée pour étudier l'effet du traitement anti-angiogénique sur l'environnement tumoral et péritumoral. Jain et al (Jain and others 2010) ont trouvé par étude rétrospective que les valeurs de l'ADC de la région hyper intense sur les images FLAIR diminuent significativement après le Bevacizumab dans le groupe des patients avec progression tumorale selon les critères de Macdonald (Macdonald and others 1990). Cette diminution est expliquée par l'augmentation de la densité cellulaire tumorale après traitement. Les valeurs de l'ADC n'ont pas évolué significativement après le traitement dans le groupe des patients sans progression tumoral à 1 an après traitement.

Gerstner et al ont trouvé que le volume d'infiltration tumorale, délimitée sur l'imagerie hyperintense FLAIR et ayant des faible valeurs d'ADC (valeur seuil défini au préalable), augmente après traitement anti-angiogénique (Gerstner and others 2010). Ceci suggère que les valeurs d'ADC faibles peuvent être utiles pour déterminer la réponse à la thérapie anti-

angiogénique et à étudier l'infiltration tumorale et que ceci doit être validé dans les futures études. Dans cette étude, les valeurs de FA n'ont pas évolué significativement.

Malgré ces résultats encourageants, l'interprétation des valeurs de diffusion n'est pas évidente : la modification de la diffusivité de l'eau n'est pas spécifique à la densité cellulaire ou à l'infiltration tumorale car elle peut résulter de plusieurs changements de la microstructure tissulaire causés par la présence des cellules tumorale et/ou par la thérapie anti-angiogénqiue. La **figure I.37** montre un exemple schématisé de la relation entre les différents états biologiques d'une cellule tumorale et la diffusivité moyenne MD.

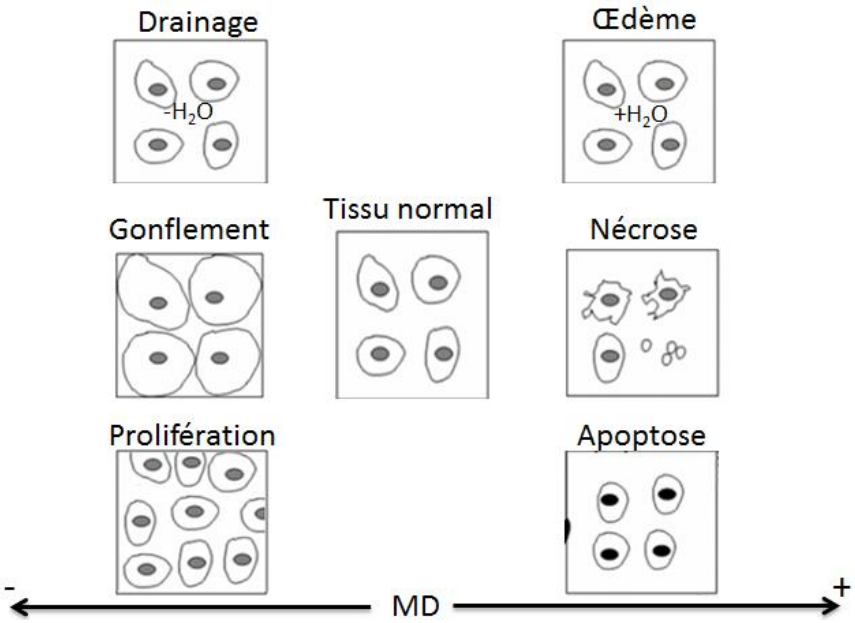


Figure I.37: Différents états des cellules tumorales présentés en fonction de la MD. La diffusivité de l'eau augmente dans le cas d'un œdème, d'une nécrose ou d'une apoptose cellulaire, tandis qu'une forte densité cellulaire, un gonflement des cellules ou un drainage de l'eau aboutit à une diminution de la MD. La diffusivité moyenne n'est pas un biomarqueur spécifique caractérisant l'état de la tumeur (d'après (Koh and Collins 2007; Moffat and others 2005)).

En plus de cette faible spécificité, l'interprétation des résultats des études n'est pas évidente 1) d'une part, à cause des différents techniques d'imagerie (T_{1W}, T_{2W}, FLAIR …) utilisées pour la détermination de la région tumorale et péritumorale, 2) et d'autre part, à cause des différentes critères avec lesquels est définie la région péritumorale dans les études et 3) mais

également, parce que les résultats dépendent de la localisation de la tumeur dans la substance grise (milieu isotrope) et/ou dans la substance blanche (milieu anisotrope).

En tenant compte de ces limites de sensibilité et de spécificité, la technique DTI pourrait être une technique prometteuse pour la détection de la migration des cellules tumorales suite aux traitements anti-angiogéniques. Une corrélation entre les paramètres DTI et la présence des cellules tumorales a été tentée dans très peu d'études précliniques (Gimenez and others 2016; Valable and others 2008) et d'études cliniques ((Beppu and others 2005; Lemée and others 2015). A ce jour, cette corrélation n'a pas encore été établie sous traitement anti-angiogénique et notamment pas dans la région péritumorale.

I.3.3. Etude préclinique de la microvascularisation et de la microachitecture tumorale et péritumorale sous traitement anti-angiogéniques

L'expérimentation animale partie intégrante du développement préclinique, permet de se rapprocher au mieux des conditions cliniques. Elle permet de tester et d'évaluer des nouvelles méthodes de diagnostic et de suivi thérapeutique et elle permet également d'évaluer l'efficacité du traitement ainsi que ses effets secondaires potentiels qui peuvent arriver au cours du traitement. Dans le cadre de ce travail de thèse, l'expérimentation animale nous permet de mettre en place une nouvelle méthode in vivo afin de quantifier la microvascularisation tumorale et nous permet dans un deuxième temps d'étudier de plus près l'effet de l'Avastin sur la microarchitecture tumorale et péritumorale en IRM. Ceci dans le but d'optimiser au mieux l'efficacité du traitement et de comprendre l'échec thérapeutique potentiel qui survient en clinique suite au traitement par Avastin.

Plusieurs équipes de recherche humaine (Ferrara and others 2004; Gerber and others 2000; Yu and others 2008a) ont étudié la spécificité de ce médicament et ont montré que l'Avastin a très peu ou pas d'interaction avec le VEGF d'origine murine. Afin d'évaluer son efficacité en préclinique, il est donc nécessaire d'utiliser des cellules tumorales d'origine humaine (Yu and others 2008a) pour lesquelles l'Avastin est spécifique.

De nombreuses tumeurs gliales d'origine humaine ont été utilisé dans les études pour évaluer les traitements anti-angiogéniques (Bagri and others 2010; Gerber 2005; Towner 2011). Plusieurs de ces tumeurs comme l'U87 ont un profil hautement angiogénique (Candolfi and

others 2007a; Strojnik and others 2006) et invasive (Candolfi and others 2007a; Sun and others 2004b; Zhao and others 2009). Ces tumeurs interagissent et répondent différement aux traitements anti-angiogéniques (Claes and others 2008a; Gossmann and others 2002; Keunen and others 2011; Lemasson and others 2011; Muldoon and others 2011; Pechman and others 2011; Pechman and others 2012; Sun and others 2004a; Varallyay and others 2009; Yang and others 2005; YUAN 1996) qui lui-même provoque l'hypoxie et incite à l'invasion tumorale (de Groot and others 2010; Jahnke and others 2009; Keunen and others 2011; Lucio-Eterovic and others 2009; Winkler and others 2004; Zhang and others 2012). Cette interaction tumeurs gliales/anti-angiogéniques est particulièrement présente en clinique et de ce fait, les études précliniques mimant ces effets pourront permettre la compréhension plus approfondie de ces phénomènes.

Les tableaux suivants présentent quelques études précliniques pour la caractérisation de la microvascularisation et la microarchitecture tumorale avec ou sans traitements anti-angiogénique notamment dans le cas des tumeurs gliales d'origine humaine comme l'U87. Diverses techniques d'imagerie, dont des techniques d'IRM ont été utilisées. Les tableaux résument les résultats principaux et les limites des techniques.

1er auteur (année)	Animal	Tumeur (nombre de cellules)	traitement	Paramètres mesurés (B_0)
F Yuan (1996)	Souris nude-SCID	U87 (Absence)	mAb A4,6,1	**Indice de perméabilité vasculaire.**

Limites de l'étude :

1- Technique invasive de mesure du signal (fenêtre crânienne, microscopie de fluorescence).
2- Etude relative de perméabilité vasculaire.

Conclusion de l'étude : Diminution précoce et significative de l'indice de perméabilité vasculaire dans le groupe traité (i.v).

A Gossmann (2002)	Rat Athymic nude	U87 ($4*10^5$ cellules)	A4,6,1	**Volume tumoral, VS, K^{trans} (2 T).**

Limites de l'étude :

1- Nécessité de la détermination de l'AIF.
2- Analyse par ROIs.
3- Absence d'étude de suivi longitudinal.
4- Absence d'étude histologique pour les trois paramètres.

Conclusions de l'étude :

1- Diminution significative du volume tumoral post traitement par rapport au groupe contrôle
2- Diminution significative du VS et du K^{trans} post traitement par rapport au groupe contrôle.
3- Absence d'œdème autour de la tumeur.
4- Absence de nécrose dans la tumeur (ex vivo).

Y Sun (2004)	Souris nude Swiss	U87 (10^5 cellules)	Absence	**ICBF, densité vasculaire (8,5T).**

Limites de l'étude :

1- Méthode d'IRM relative de mesure du flux sanguin (ICBF).
2- Densité vasculaire est mesurée ex vivo.
5- Absence d'étude de reproductibilité dans la tumeur.

Conclusions de l'étude (**voir aussi étude cellulaire**):

1- ICBF et la densité vasculaire augmentent en s'éloignant de la tumeur.
2- Méthode reproductible dans le tissu sain.

I Tropres (2004)	Rats Wistar	C6 (10^5 cellules)	Absence	**VS, VSI (2,35 T).**

Limites de l'étude :

1- Agent de contraste non utilisable en clinique (AMI-227).
2- Méthode d'IRM non applicable pour la mesure de la perméabilité des vaisseaux sanguins.
3- Nécessite une mesure invasive supplémentaire pour déterminer $\Delta\chi$.

Conclusion de l'étude :

1- Les valeurs du VS dans le cortex tumoral et dans la région péritumorale sont très hétérogènes et dépendent fortement de la taille tumorale (petite ou taille moyenne tumorale : VS ≥ 4%, grand taille tumorale : VS ≅ 2%).
2- Les valeurs de VS dans le cortex controlatéral sont de l'ordre de 4,3 %.
3- Les valeurs de VSI obtenus par IRM ont été corrélées à celles obtenues ex vivo.

F Winkler (2004)	Souris nude-SCID	U87 (0,2 - 0,3 mm)	DC101 - Radiothérapie	**Densité vasculaire.**

Limites de l'étude :

1- Technique invasive de mesure du signal (fenêtre crânienne, microscopie de fluorescence).
2- Etude relative de la densité vasculaire.

Conclusion de l'étude : Diminution significative de la densité vasculaire dans le groupe traité par rapport au groupe contrôle.

S valable (2008)	Rats Wistar	C6 (10^5 cellules)	Absence	**VS, VSI (2,35 T).**

Limites de l'étude :

Cf I Tropres (2004)

Conclusions de l'étude (**voir aussi étude cellulaire)** :

1- Le VS est de l'ordre de 3 % dans le striatum et le néocortex sain.
2- Le VS reste stable au centre de la tumeur et à la périphérie tumorale (ordre de grandeur du tissu sain) sauf à un stade avancé de la tumeur (J25) la périphérie tumorale a montré un VS élevé (4 %).
3- Le VSI augmente précocement et significativement au centre et à la périphérie tumorale.
4- Les valeurs de VSI et du VS sont trois fois plus élevées en IRM que celles obtenus ex vivo (Présence d'une corrélation significative).

A claes (2008)	Souris nude Balb/c	U87 (10^5 cellules)	Vandetanib	**Extravasation de l'AC, Densité vasculaire (7 T).**

Limite de l'étude : Etude qualitative des paramètres étudiés par IRM in vivo et ex vivo.

Conclusions de l'étude :

1- Absence de signal d'extravasation ($T_{1W\text{-}Gd\text{-}DTPA}$) dans le groupe traité à forte dose.
2- Diminution de la densité vasculaire (i.e signal $T_{2W^*\text{-}SINERM}$) après traitement.
3- Les résultats sont en cohérence avec l'étude histologique (MVD).

K Jahnke (2008)	Rat Athymic nude	UW28 (1,2 - 1,5*10^6 cellules)	Bevacizumab - Carboplatine	**Volume tumoral, TTP (3 T).**

Limites de l'étude :

1- Volume tumoral de base non reproductible.
2- Absence d'étude quantitative de perméabilité vasculaire.

Conclusions de l'étude :

1- Augmentation significative du volume tumoral dans tous les groupes (augmentation minimale dans le groupe contrôle et le groupe ayant reçue les deux traitements) en cohérence avec les données ex vivo.
2- Les valeurs de TTP augmentent dans les groupes de traitements.

B Lemasson (2009)	Rats Wistar et Nude RH-rnu/rnu	C6 ou U87 (10^5 cellules)	BCNU	**VS, VSI (2,35 T)**

Limite de l'étude :

1- cf I Tropres (2004)

Conclusions de l'étude (**voir aussi étude cellulaire**):

1- Volume tumoral de base dans le striatum : 75 mm^3.

2- Le VS dans le striatum tumoral du C6 (J17) est de 2,4 % et il est de 2,7 % dans le controlatéral.
3- A ce stade de la croissance tumorale le VS est assez homogène dans la tumeur.
4- Le VSI du C6 est significativement plus élevé que celui trouvé dans le controlatéral.
5- Le VS dans le striatum tumoral de l'U87 (J17) est de 5,3 % et il est de 2,3 % dans le controlatéral.
6- Le VSI de l'U87 est plus élevé que celui trouvé dans le controlatéral ainsi que la surface vasculaire mesurée ex vivo.

Les données histologiques de la densité vasculaire, du VSI et de la surface vasculaire sont aussi disponibles dans cette étude.

M Beaumont (2009)	Rat Wistar	C6 (10^5 cellules)	Absence	**VS, VSI, K^{trans} (2,35 T)**

Limites de l'étude :

1- Deux techniques d'imagerie IRM (MGESE et DCE-T_{1W}) et deux injections d'AC (USPIO et Gd-DOTA) pour mesurer ces paramètres.
2- Agent de contraste non utilisable en clinique (USPIO).
3- La nécessite de mesure invasif supplémentaire pour déterminer le $\Delta\chi$.
4- Données non personnalisées pour déduire l'AIF.

Conclusions de l'étude :

1- Le VS dans le striatum sain est de 2,4%.
2- Le VS dans le striatum tumoral du C6 mesuré par les deux techniques d'IRM étaient différent (~ 0,9 % vs 2,8 %).
3- Le VS mesuré ex vivo dans le striatum tumoral et controlatéral est de l'ordre de 1,5%.
4- K^{trans} dans le striatum tumoral du C6 est de l'ordre de 2,5 * 10^{-2} min^{-1}.

C Varallyay (2009)	Rat Athymic nude	U87 (1,2 - 1,5*10^6 cellules)	Bevacizumab - Dexamethasone	**VS, TTP (12 T)**

Limites de l'étude :

1- Mesures relatives du VS et de la perméabilité vasculaire.
2- Deux techniques d'imagerie IRM (DSC-T_2* et DCE-T_{1W}) et deux injections d'AC (Ferumoxytol et Gadodiamide) pour mesurer ces deux paramètres.
3- Absence d'étude ex vivo pour ces deux paramètres.

Conclusions de l'étude :

1- Augmentation du VS dans le groupe contrôle.
2- Diminution précoce puis stabilisation du VS dans les groupes de traitement par Bevacizumab (absence de diminution dans le groupe contrôle).
3- TTP reste stable dans le groupe contrôle.
4- Augmentation précoce du TTP dans les groupes de traitement (Maximal dans le groupe de Bevacizumab).

B Lemasson (2011)	Rat Athymic nude	U87 (10^5 cellules)	Sorafenib - BCNU	**Volume tumoral, VS, VSI, extravasation de l'AC. (2,35 T)**

Limites de l'étude :

1- Cf I Tropres (2004)
2- Méthode relative d'évaluation de la perméabilité des vaisseaux sanguins.

Conclusion de l'étude (**voir aussi étude cellulaire)**:

1- Le volume tumoral augmente significativement dans le groupe contrôle (de J14 à J28 de 4,5 mm^3 à 117 mm^3).
2- Augmentation significative du signal d'extravasation de l'AC ($T_{1W\text{-}P846}$) de la tumeur dans le groupe contrôle par rapport au controlatéral.
3- Augmentation significative des valeurs du VS et du VSI dans la tumeur dans le groupe contrôle par rapport au controlatéral (reste stable durant le suivi : VS : 4,4 % vs 3,3 %).
4- Augmentation significative du diamètre vasculaire (ex vivo) dans la tumeur dans le groupe contrôle par rapport au controlatéral.

O keunen (2011)	Rat Athymic nude	GBM (0,3 - 0,4 mm)	Bevacizumab	**VS, CBF, K^{trans}, CE (7 T)**

Limite de l'étude :

1- Fiabilité du modèle de l'AIF.
2- Plusieurs approximations et constantes sont utilisées.

Conclusions de l'étude (**voir aussi étude cellulaire)**:

1- Progression tumorale lente poste traitement accompagnée d'une baisse de CE.
2- Diminution significative du VS, du CBF et du K^{trans} dans la tumeur après traitement par rapport au groupe contrôle (technique DCE-$T_{1W\text{-}Gadodiamide}$).
3- Corrélation entre le VS tumoral et la densité vasculaire obtenus ex vivo.

L Muldoon (2011)	Rat Athymic nude	LX-1SCLC ($1,5*10^6$ cellules)	Bevacizumab	**Volume tumoral, VS, Indice de perméabilité vasculaire (12 T)**

Limites de l'étude :

1- Mesures relatives du VS et de la perméabilité vasculaire.
2- Deux techniques d'imagerie IRM (DSC-T_2* et DCE-T_{1W}) et deux injections d'AC (Ferumoxytol et Gadodiamide) pour mesurer ces deux paramètres.

Conclusions de l'étude :

1- Diminution significative du VS régional et de l'indice de perméabilité vasculaire après traitement.
2- Progression du volume tumoral dans le groupe traité.
3- Le volume tumoral déterminé in vivo (T_{2W}, $T_{1W\text{-}Gadodiamide}$) est similaire à celui obtenu ex vivo.

K Pechman (2011)	Rat Athymic nude	U87 ($2*10^5$ cellules)	Bevacizumab	**Volume tumoral, VS (9,4 T)**

Limites de l'étude :

1- Mesure relative du VS.
2- Mesure normalisée par rapport à la région controlatérale en présence de traitement anti-angiogénique.
3- Fiabilité de la méthode de correction de l'extravasation de l'AC.
4- Absence d'étude histologique.

Conclusions de l'étude :

1- Diminution tardive de la progression tumorale ($T_{1w\text{-}Gadodiamide}$) dans le groupe traité.
2- Diminution précoce du VS post traitement.
3- Diminution significative du VS uniquement dans le groupe ayant reçu la dose maximale (10 mg/kg) par rapport au groupe contrôle.

<table>
<tr><td colspan="5">4- Augmentation du VS dans le groupe contrôle puis diminution du VS tardivement.</td></tr>
<tr><td colspan="5"></td></tr>
<tr><td>K Pechman (2012)</td><td>Rat Athymic nude</td><td>U87 (2*10^5 cellules)</td><td>Bevacizumab - Irinotécan</td><td>Volume tumoral, VS (9,4 T)</td></tr>
<tr><td colspan="5">Limites de l'étude :
1- Cf K Pechman (2011)

Conclusions de l'étude :
1- Diminution précoce de la progression tumorale dans le groupe traité par Bevacizumab.
2- Augmentation continue du VS dans le groupe contrôle.
3- Diminution significative précoce du VS dans le groupe recevant les deux traitements et tardive dans le groupe recevant uniquement le Bevacizumab par rapport au groupe contrôle.</td></tr>
<tr><td colspan="5"></td></tr>
<tr><td>W Wang (2015)</td><td>Souris Athymic nude</td><td>U87 (2*10^5 cellules)</td><td>Bevacizumab - Irinotecan</td><td>MVD, survie</td></tr>
<tr><td colspan="5">Limites de l'étude : Absence d'étude non invasive comme l'IRM.

Conclusions de l'étude :
1- Augmentation significative de la survie dans le groupe traité par CED par rapport au groupe traité en i.v (45% P< 0,05).
2- Diminution significative de la densité vasculaire dans le groupe CED par rapport au groupe i.v (Absence de données).</td></tr>
</table>

Tableau I.3 : Etudes précliniques pour la caractérisation de la microvascularisation tumorale. ICBF: index cerebral blood flow; VSI: vessel size index; TTP: time to peak; CE: contrast enhancement; MVD: mean vessel density. (Claes and others 2008a; Gossmann and others 2002; Jahnke and others 2009; Keunen and others 2011; Lemasson and others 2011; Lemasson and others 2009; Muldoon and others 2011; Pechman and others 2011; Pechman and others 2012; Sun and others 2004a; Tropres and others 2004; Valable and others 2008; Varallyay and others 2009; Wang and others 2015; Winkler and others 2004; YUAN 1996).

Les points important à retenir sont que, le taux de survie, le taux d'inhibition de l'angiogenèse et la fenêtre de normalisation des vaisseaux dépend du type de l'anti-angiogénique, de la dose, de la fréquence, du mode d'injection et de la combinaison des traitements. L'inhibition de l'angiogenèse n'est pas complète et d'autres facteurs pro-angiogéniques peuvent être mis en jeux et réactiver l'angiogenèse tumorale sous traitement ou après un arrêt du traitement anti-angiogénique.

Le traitement par Bevacizumab des tumeurs d'origine humaine, notamment l'U87 qui mime le profile angiogénique des tumeurs gliales humaines, a montré une inhibition de

l'angiogenèse présentée par une baisse significative du volume sanguin, de la densité vasculaire, du diamètre vasculaire, de la prolifération vasculaire, du flux sanguin et de la perméabilité vasculaire.

La survie est amélioré suite au traitement anti-angiogénique et notamment en combinaison avec d'autres types de traitement comme la chimiothérapie par exemple (Jahnke and others 2009). Cette amélioration de la survie a été corrélée à une baisse de VSC et de la perméabilité vasculaire même en présence d'une progression tumorale.

L'effet du Bevacizumab sur la vascularisation est détecté précocement grâce aux biomarqueurs fonctionnels comme le VSC et la perméabilité vasculaire (Muldoon and others 2011; Pechman and others 2011; Pechman and others 2012). Ces biomarqueurs sont plus sensibles, spécifiques et plus fiables que les techniques basées sur la baisse du rehaussement de contraste (CE-T_{1W}, ie $T_{1W\text{-}Gd}$) qui peuvent confondre différents phénomènes comme la baisse du flux sanguin, baisse de VSC, baisse la perméabilité vasculaire (Claes and others 2008a; Pechman and others 2011; Sun and others 2004a; Varallyay and others 2009). De plus, la vitesse de progression tumorale est majoritairement ralentie par le traitement anti-angiogénique (Lemasson and others 2011; Muldoon and others 2011; Pechman and others 2012). La progression du volume tumorale est souvent évaluée par l'imagerie $T_{1W\text{-}Gd}$ et ne corrèle pas toujours au volume tumoral quantifié par histologie (Jahnke and others 2009; Muldoon and others 2011) ni aux biomarqueurs fonctionnels (Pechman and others 2011; Pechman and others 2012).

La majorité des études précliniques en IRM, non invasives et applicables en clinique évaluent l'angiogenèse tumorale en se basant sur des techniques dynamiques (DSC-T_2^* et DCE-T_{1W}) qui mesurent le VSC et la perméabilité des vaisseaux. Ces mesures sont parfois relatives et/ou normalisées par des régions controlatérales présumées intactes et invariable lors du traitement et de la progression tumorale. Ceci peut conduire à des biais de mesures notamment dans le cas de suivi lors d'un traitement prolongé et des difficultés d'interprétation et de comparaison intra et inter-sujets.

Lors des mesures quantitatives de ces deux biomarqueurs, les auteurs ont cité des incertitudes de mesure liées notamment à la quantification de l'AIF (Gossmann and others 2002; Keunen and others 2011). D'autres ont pu quantifier uniquement le VSC en se basant sur des

techniques statiques utilisant un agent de contraste (non utilisable en clinique) qui reste confiné dans le compartiment vasculaire et empêchant ainsi l'évaluation de la perméabilité vasculaire (Lemasson and others 2011; Valable and others 2008).

En conclusion, des études précliniques évaluant d'une manière quantitative et non-invasive les paramètres vasculaires seront encore nécessaires pour mieux comprendre les effets thérapeutiques des agents anti-angiogéniques et pour établir également les doses optimales de ces derniers.

Afin de répondre à ce besoin, nous avons développé dans ce travail de thèse une nouvelle méthode de quantification du VSC et un coefficient apparent d'accumulation d'AC (K_{model}) ne nécessitant pas la détermination de l'AIF (**chapitre 2, 3** et **4**).

Concernant la microarchitecture tumorale, le traitement anti-angiogénique a montré un effet sur la cellularité au centre et à la périphérie tumorale ainsi que sur l'apparition des zones nécrotiques et oedemateuses dans l'environnement tumoral. Comme pour les paramètres vasculaires, les effets sur la microstructure varient avec la quantité de cellules implantées, la dose, la fréquence d'injection du traitement et dépendent moment où on évalue l'effet de l'anti-angiogénique. Ci-dessous le **tableau I.4** qui résume quelques études précliniques pour la caractérisation de la microarchitecture tumorale.

1er auteur (année)	**Animal**	**Tumeur (nombre de cellules)**	**traitement**	**Paramètres mesurés (B_0)**
Y Sun (2004)	Souris nude Swiss	U87 (10^5 cellules)	Absence	**ADC, T_{2W}, T_1 (8,5T).**
Limites de l'étude : 1- Seulement rois directions de gradient de mesure (xx, yy, zz). 2- Absence d'étude histologique. Conclusions de l'étude: 1- ADC est significativement plus élevé dans la tumeur que dans le controlatéral ($1*10^{-3}$ mm^2/s vs $0,7*10^{-3}$ mm^2/s). 2- ADC diminue quand on s'éloigne du centre tumoral. 3- Les valeurs de T_1 dans la tumeur sont différentes de ceux dans le controlatéral (2 s vs 1,6 s) 3- Le péritumotal défini à 0,5 mm de la limite tumorale (T_{2W}) a des valeurs de T_1 et de l'ADC différents de ceux du tissu sain.				

N schmidt (2004)	Souris nude swiss	U87 ($5*10^4$ cellules)	Endostatin	**Volume tumoral, apoptose cellulaire, survie.**

Limites de l'étude : Absence d'étude non invasive comme l'IRM pour sonder les cellules tumorales.

Conclusions de l'étude:

1- Diminution du volume tumoral ($T_{1W\text{-}Gd\text{-}DTPA}$) quand le traitement est administré par CED par rapport au groupe contrôle (la diminution est significative ex vivo).
2- Le taux d'apoptose est élevé uniquement dans le groupe CED (2 mg/kg/j) par rapport au groupe contrôle ($P< 0,05$).
3- Augmentation significative de la survie dans le groupe CED par rapport au groupe contrôle, la survie était plus prononcée avec la dose de 12mg/kg/j.

S valable (2008)	Rats Wistar	C6 (10^5 cellules)	Absence	**ADC (2,35 T).**

Limites de l'étude : Trois directions de gradient de mesure (xx, yy, zz).

Conclusions de l'étude:

1- ADC plus élevé dans la tumeur par rapport au tissu sain controlatéral
2- Pas de changement d'ADC à la périphérie tumorale par rapport au controlatéral
3- La densité cellulaire est élevée dans la tumeur (ex vivo)

A Lucio-Etrovic (2009)	Souris nude athymic	U87 ($5*10^5$ cellules)	Bevacizumab - inhibiteurs de MMPs	**Invasion des cellules tumorales, l'hypoxie.**

Limites de l'étude : Absence d'étude non invasive comme l'IRM.

Conclusions de l'étude:

1- In vitro, le taux d'invasion des cellules tumorales était significativement plus élevé dans le groupe ayant reçu une dose de Bevacizumab supérieure à 2.5 mm/kg (4 à 6 fois) par rapport au groupe contrôle.
2- In vitro et ex vivo, diminution significative de l'invasion des cellules tumorales dans le groupe ayant reçu le Bevacizumab combiné au inhibiteurs MMPs par rapport au groupe traité par Bevacizumab en monothérapie.
3- Ex vivo, le groupe traité par Bevacizumab présente des zones nécrotiques dans la tumeur et un profil invasif par rapport au groupe contrôle notamment quand le traitement est prolongé.
4- Ex vivo, l'hypoxie augmente dans les régions nécrotiques et péri-nécrotiques notamment pour un traitement prolongé de Bevacizumab.

B Lemasson (2009)	Rats Wistar et Nude RH-rnu/rnu	C6 ou U87 (10^5 cellules)	BCNU	**Volume tumoral, ADC (2,35 T)**

Limite de l'étude :

1- Trois directions de gradient de mesure (xx, yy, zz).
2- Faible gradient (b0 = 500 s/mm^2).

Conclusions de l'étude :

1- Volume tumoral de base dans le striatum est de 75 mm^3.
2- L'ADC tumoral du C6 (J17) est plus élevé que celui du le controlatéral (1151 µm^2/s vs 791 µm^2/s).

3- L'ADC tumoral de l'U87 (J17) est similaire à celui trouvé dans le controlatéral (706 $\mu m^2/s$ vs 734 $\mu m^2/s$).
4- Densité cellulaire de l'U87 est homogène et élevée avec certaines cellules tumorales alignées le long des vaisseaux, formant des faisceaux minces (ex vivo).
5- Les tumeurs U87 sont œdémateuses mais ne présentent pas de nécrose.

J De Groot (2010)	Souris nude	U87 (Absence)	Bevacizumab	**Prolifération cellulaire, invasion, hypoxie.**

Limites de l'étude : Etude ex vivo, absence d'étude non invasive comme l'IRM.

Conclusions de l'étude :
1- Prolifération de cellules tumorales faibles après traitement par rapport au groupe contrôle.
2- Augmentation de la prolifération de cellules de l'endothélium tardivement dans le groupe traité.
3- Tumeur bien délimitée dans le groupe contrôle.
4- Tumeur mal délimitée après traitement.
5- Présence de cellules infiltrantes péri-vasculaires.
6- Les régions FLAIR chez l'humain présentent les mêmes caractéristiques infiltratives, nécrotiques et hypoxiques chez l'U87 après traitement par Bev sauf pour le phénomène d'invasion tumorale périvasculaire qui est présent uniquement chez l'U87.

B Lemasson (2011)	Rat Athymic nude	U87 (10^5 cellules)	Sorafenib - BCNU	**Volume tumoral, ADC (2,35 T).**

Limite de l'étude : Trois directions de gradient de mesure (xx, yy, zz).

Conclusions de l'étude :
1- Le volume tumoral augmente significativement dans le groupe contrôle (de J14 à J28 de 4,5 mm^3 à 117 mm^3).
2- L'ADC tumoral est plus élevé par rapport au controlatéral et reste stable au cours du temps (851 vs 720 µm2/s).
3- La densité cellulaire de l'U87 est élevée avec certaines cellules tumorales alignées le long des vaisseaux (ex vivo).
4- Les tumeurs étaient entourées d'un anneau de tissu fortement œdémateux.

O keunen (2011)	Rat Athymic nude	GBM (0,3 - 0,4 mm)	Bevacizumab	**Infiltration tumorale, ADC (7 T)**

Limite de l'étude : Trois directions de gradient de mesure (xx, yy, zz).

Conclusions de l'étude :
1- Augmentation significative de l'infiltration tumorale dans le tissu sain post traitement.
2- Diminution non significative de l'ADC dans le péritumoral (Absence de valeurs).
3- Absence de changement de l'ADC dans la tumeur (Absence de valeurs).

Tableau I.4 : Etudes précliniques pour la caractérisation de la microarchitecture tumorale. MMP : matrix metalloproteinase (de Groot and others 2010; Keunen and others 2011; Lemasson and others 2011; Lemasson and others 2009; Lucio-Eterovic and others 2009; Schmidt and others 2004; Sun and others 2004b; Valable and others 2008).

L'infiltration des cellules tumorales suite au traitement anti-angiogénique est confirmée et est plus prononcée à forte dose de traitement anti-angiogénique et à long terme (Lucio-Eterovic and others 2009; Zhang and others 2012). Cette infiltration est accompagnée par la présence de vaisseaux normalisés et de l'hypoxie suite au traitement par Bevacizumab dans le cas des gliomes d'origine humaine notamment l'U87 (de Groot and others 2010; Keunen and others 2011; Lucio-Eterovic and others 2009).

Malgré l'infiltration tumorale constaté, la survie est améliorée suite au traitement anti-angiogénique et aussi améliorée quand le traitement est combiné à un inhibiteur d'invasion ou à des virus ciblant les cellules tumorales. La survie est aussi améliorée quand le traitement est injecté en intratumoral.

Vu l'effet controversé des anti-angiogéniques et les résultats concernant la progression tumorale et la survie, des méthodes non invasives comme l'imagerie IRM du tenseur de diffusion et l'imagerie FLAIR sont appliqués pour caractériser et suivre précocement l'effet des anti-angiogéniques sur la microstructure tumorale et péritumorale.

D'une part, les valeurs de l'ADC ne corrèlent pas toujours à la densité cellulaire évaluée par histologie (Valable and others 2008). Dans le cas contraire la corrélation est non spécifique (Lemasson and others 2011; Valable and others 2008) ou non significative (Keunen and others 2011). Ceci est probablement dû à l'hétérogénéité de l'environnement tumoral (œdème, nécrose, cellularité, vascularisation) qui rend l'ADC non spécifique et peu sensible au changement de la densité cellulaire.

D'autre part, les valeurs de l'ADC sont très peu étudiées dans la tumeur et dans la région péritumorale notamment dans un suivi sous traitement anti-angiogénique. A défaut d'une méthode standardisée, dans les études citées, la définition de la région péritumorale est arbitraire et non personnalisée : la limite de la région péritumorale est considérée à une distance fixe de la limite tumorale déterminée sur les images FLAIR et/ou $T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$. Des conditions expérimentales plus contrôlées/personnalisées et reproductibles sont nécessaires pour mettre en évidence la relation entre l'ADC et la densité cellulaire.

Dans le **chapitre 5** de ce travail de thèse, nous présentons une étude conçue pour mettre en évidence une relation reproductible et sensible entre la progression tumorale déterminé par

imagerie FLAIR et les valeurs de l'ADC et ceci sous différents modes d'injection du traitement. L'étude est rétrospective de façon à avoir des régions péritumorales définies pour chaque tumeur individuellement. Nous avons utilisé la tumeur U87 qui a montré un caractère invasif après traitement par bevacizumab similaire à celui trouvé en clinique validé par imagerie FLAIR (de Groot and others 2010).

II. Chapitre 2 :

PROBLEMATIQUES DE LA METHODE $RSST_1$: choix de la séquence d'imagerie et quantification du signal $RSST_1$ en cas d'extravasation de l'agent de contraste

II.1. Objectifs de l'étude

Dans ce travail de thèse, nous allons mesurer les paramètres de la vascularisation tumorale comme le volume sanguin tumoral (TBVf), la perméabilité vasculaire et le volume d'extravasation du produit de contraste dans le cerveau des souris et des rats. Dans ces cas, le volume des tumeurs intracérébrales varient entre 1 et 25 mm^3 et nécessitent des voxels d'environ 0,25 mm^3 pour les analyses d'hétérogénéité de la vascularisation tumorale.

Précédemment, la séquence IR-FLASH 2D (Perles-Barbacaru 2007; Perles-Barbacaru and Lahrech 2007) a été utilisée pour répondre à ces besoins. Nous souhaitons dans ce travail de thèse utiliser une séquence qui est capable 1) de réduire d'avantage le signal résiduel (i.e signal acquis avant injection de l'AC (S_{pre})), 2) d'avoir un meilleur rapport signal sur bruit (RSB) 3) et d'augmenter la résolution spatiale (RS) de l'image tout en gardant la même résolution temporelle.

Une meilleure réduction du signal résiduel permet de réduire la sous-estimation du volume sanguin cérébral (VSC). D'un part, un RSB élevé permet de mieux detecter les changements faibles, mais biologiquement intéressantes, des paramètres vasculaires notamment dans le cas des traitements anti-angiogéniques. D'autre part, un meilleur RSB permet d'augmenter si nécessaire la résolution spatiale pour mieux sonder les zones hétérogènes de la tumeur et les zones péritumorales. Afin de répondre à nos besoins nous avons privilégié l'utilisation de la séquence d'imagerie 3D « IR-MDEFT 3D » avec un remplissage linéaire de l'espace k.

Les objectifs de ce chapitre sont les suivant

1- Introduire la séquence IR-MDEFT 3D et montrer théoriquement et expérimentalement ses avantages au vu des 3 améliorations cités ci-dessus par rapport à la technique IR-FLASH 2D.
2- Introduire le modèle mathématique développé pour modéliser le signal IRM-$RSST_1$ tumoral issu de la séquence IR-MDEFT 3D dans le but de quantifier les paramètres de la vascularisation tumorale.

II.2. Matériels et méthodes

II.2.1. Imageur IRM Bruker

Les acquisitions chez le rat ont été effectuées au GIN et les acquisitions chez la souris ont été effectuées à Clinatec à cause du déménagement de notre équipe de recherche à Clinatec.

L'imageur utilisé pour nos expérimentations sur les deux sites est un Bruker Biospec USR A VIII 4.7 T/bore size 40 cm de diamètre. Il est équipé d'un fourreau de gradients de diamètre interne 12 cm et d'intensité maximale 600mT/m. Nous avons utilisé une antenne volumique de 86 mm de diamètre pour l'émission (couvrant le cœur et les carotides du rat et l'animal entier dans le cas de la souris) et pour la réception du signal ^{1}H une antenne de surface en quadrature de 19 mm de diamètre dédiée au cerveau de souris et de 33 mm dédiée au cerveau de rat.

Les datas IRM sont acquises avec le software « Paravision 5.1» sous le format « 32 BIT SIGN INTEGER ».

II.2.2. Modèles animaux

Nous avons utilisé des rats (wistar, laboratoire Charles River) et les souris nudes (athymic foxn 1^{nu}, laboratoire Harlan). Le volume du cerveau des rats est environ 5 fois plus grand que celui des souris, ce qui permet d'avoir un meilleur RSB pour les techniques d'imagerie 3D (voir **section II.2.6**). Bien que le rat soit plus avantageux lors de la quantification du volume sanguin (VS), il est aussi intéressant d'évaluer notre méthode de quantification des paramètres vasculaires dans le cerveau d'une souris. Néanmoins, le petit volume cérébral des souris nécessite une RS élevée conduisant à un faible RSB. Ces deux types de rongeurs sont des hôtes pour certains types de tumeurs gliales comme le C6 et l'U87 qu'on étudiera dans les chapitres qui suivent (**chapitre 3 sections III.2.1 et III.2.2**).

II.2.3. Agent de contraste

Le Gd-DOTA (Guerbet, Villepinte) est un chélate de gadolinium (Gd) macrocyclique paramagnétique qui provoque une diminution des temps de relaxation T_1 et T_2 du proton de l'atome d'hydrogène entraînant une augmentation de l'intensité du signal dans les séquences d'imagerie pondérées T_1.

La relaxivité r_1 du Gd-DOTA est égale à 4 $L.mmol^{-1}.s^{-1}$ à 25° C dans l'eau à 4.7T (Livramento and others 2006). Dans le plasma à 37° c cette relaxivité est égale à 3.3 $L.mmol^{-1}.s^{-1}$ (Rohrer and others 2005). La durée de demi vie du Gd-DOTA dans le sang (chez le rat) est de $T_{1/2} \leq 1,6$ h (A. Stinson 2013; Beaumont and others 2009).

II.2.4. Séquences IRM

II.2.4.1. Inversion récupération spin écho-rapide

Nous avons utilisé une impulsion d'inversion récupération suivie d'une séquence de type spin écho rapide (RARE i.e Rapid Acquisition with Refocused Echo) à plusieurs temps d'inversion (T_{inv}) pour mesurer le T_1 dans des échantillons d'eau à différentes concentrations de Gd-DOTA (cartographie $T_{1\text{-map}}$). Les paramètres utilisés pour cette séquence sont les suivants :

Pour les T_1 longs : T_{inv} = 15000, 5000, 2700, 1700, 800 et 690 ms, le facteur d'accélération (RARE factor) = 8, $TE_{effective}$ = 30 ms, la taille du champ (FOV) = 12 x 12 x 7 mm^3, RS = 0,38 x 0,38 x 0,7 mm^3, le nombre d'accumulation (NA) = 2. La durée totale de l'acquisition (Tacq) est de 10 min 21 s.

Pour les T_1 intermédiaires : T_{inv} = 2500, 1000, 500, 200, 80 et 30 ms, RARE factor = 2, $TE_{effective}$ = 10 ms, FOV = 12 x 12 x 7 mm^3, RS = 0,38 x 0,38 x 0,7 mm^3, NA = 1. Tacq = 3 min 26 s.

Pour les T_1 courts : T_{inv} = 300, 100, 50, 30, 20 et 16,5 ms, RARE factor = 1, TE = 10 ms, FOV = 12 x 12 x 7 mm^3, RS = 0,38 x 0,38 x 0,7 mm^3, NA = 4. Tacq = 3 min 18 s.

L'écart entre les valeurs théoriques de T_1 étant important (T_1 entre 30 et 3 000 ms), les paramètres de la séquence ont été optimisés d'une façon à obtenir une meilleure précision de mesure pour chaque échantillon de T_1.

II.2.4.2. Spin écho rapide $T_{1\text{-map}}$

Nous avons utilisé la séquence spin écho rapide à plusieurs TR (i.e RARE-VTR) pour mesurer le T_1 dans de cerveau de souris. Cette séquence est plus rapide (plus adéquat pour les acquisitions in vivo) que la séquence d'inversion récupération utilisée pour imager les échantillons d'eau. Les paramètres utilisés pour cette séquence sont les suivants : TR = 8000,

3000, 1700, 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 210 ms, RARE factor = 2, $TE_{effectif}$ = 10 ms, FOV = 16 x 16 x 10 mm^3, RS = 0,166 x 0,222 x 1 mm^3, NA = 2. Tacq = 19 min 48 s.

II.2.4.3. Turbo RARE écho de spin

Nous avons utilisé la séquence Turbo RARE écho de spin pour acquérir l'image anatomique cérébrale de la souris avec une pondération T_2 (T_{2W}). Les paramètres utilisés pour cette séquence sont les suivants : $TE_{effectif}$ = 40 ms, TR = 2500 ms, RARE factor = 4, FOV = 16 x 16 x 8 mm^3, RS = 0,125 x 0,125 x 1 mm^3, NA = 6. Tacq = 8 min.

II.2.4.4. IR-MDEFT 3D

La **figure II.1** schématise la séquence MDEFT 3D (3D Modified driven equilibrium fourier transform). Le signal est acquis par le biais de deux encodages de phase (G_{phase1} et G_{phase2}) et un encodage de lecture ($G_{lecture}$). TR est le temps de répétition qui sépare deux impulsions adiabatiques (non sélectives) d'inversion de forme « sécante hyperbolique π (Park and Garwood 2009) » et $\alpha_{(1\ldots n)}$ sont les impulsions radiofréquences (RF) sélectives de forme « Sinc 10H (Pauly and others 2011)» séparées par le temps de répétition TR_{echo}. Les gradients de phase sont appliqués simultanément après les impulsions RF α ensuite le gradient de lecture est appliqué pour acquérir l'écho de gradient à TE.

Pour chaque TR l'espace k est parcouru linéairement dans le plan x et y. Les lignes sont remplies une à une en commençant par la première ligne de la matrice pour aller vers la dernière en passant par le centre de la matrice à t = T_{inv} (**figure II.1 et II.2**). Ce mode de remplissage est donc de type « Linéaire » contrairement à ce qui a été préconisé pour la méthode IR-FLASH 2D (Perles-Barbacaru and Lahrech 2007) (Remplissage de type « centrique » en commençant par la ligne centrale de l'espace k).

Un nombre de répétitions égal au nombre de phases dans la direction z (G_{phase2}) est utilisé afin de remplir l'espace k dans la direction z. La transformée de fourier 3D (TF 3D) de l'espace k permet de construire une image volumique 3D (**figure II.2**).

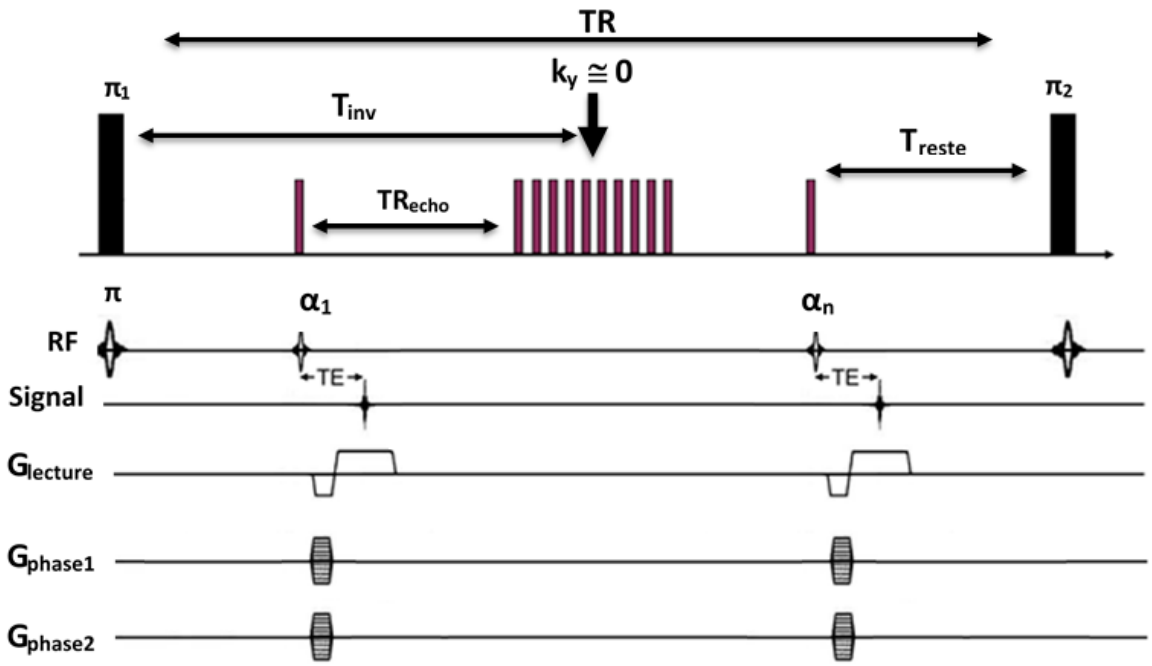


Figure II.1: Schéma simplifié d'une séquence inversion récupération de type 3D MDEFT (d'après (Fellner and others 1996; Frahm and Haenicke)). Le remplissage des lignes de l'espace k se fait d'une façon linéaire du bas vers le haut de la matrice en passant par le centre de l'espace k. Sur ce schéma le premier TR_{echo} est représenté trop long pour permettre de representer le gradient de lecture. Les ordres de grandeur de TR, TR_{echo}, TE et T_{reste} sont 750 ms, 10 ms, 2 ms et 250 ms respectivement.

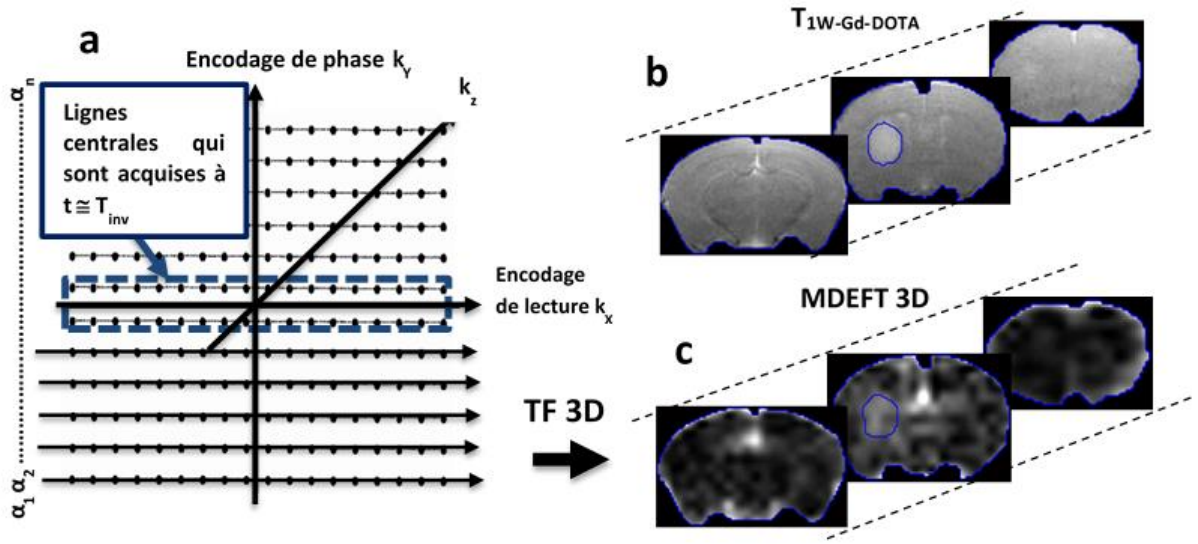


Figure II.2: a) Représentation schématique du remplissage de type « linéaire » du plan de fourier préconisé pour la séquence MDEFT 3D. b) Images anatomiques de trois coupes coronales du cerveau de souris ($T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$) ayant un glioblastome cérébral d'origine humaine (U87). c) Cartographies de l'aimantation longitudinale (M_Z) des coupes représentées en (b) obtenues avec la séquence IR-MDEFT 3D 5 minutes après injection de Gd-DOTA.

Nous pouvons constater d'après les **figures II.1 et II.2** que la séquence IR-MDEFT 3D est une séquence IR-FLASH 3D modifiée à partir du protocole d'acquisition Bruker. La séqeunce IR-MDEFT 3D se différencie de la séquence IR-FLASH 2D (**voir section I.3.1.4.a.1 du chapitre 1**) principalement par : a) le remplissage « linéaire » de l'espace k, b) l'absence de gradient de sélection de coupe, c) l'application d'un gradient de phase dans une deuxième direction pour le codage de la direction longitudinale (z). Ces caractéristiques de la séquence MDEFT 3D ont plusieurs conséquences :

1) Concernant le remplissage de l'espace k de type « Linéaire » :
   - Conséquence 1 : la première lecture d'une ligne de l'espace k a lieu à $t < T_{inv}$ contrairement à la séquence IR-FLASH 2D. Ceci aboutit à une meilleure suppression du signal résiduel ayant une constante de temps de relaxation longitudinale (T_1) longue (>1000 ms) et ainsi une meilleure quantification du VS (**section II.4.1** : **figure II.4 et tableau II.9, section II.4.3.4 : figure II.9 et section II.4.3.5** : **figure II.10, section II.4.3.6** : **figure II.11**, **II.12**).
   - Un désavantage du remplissage linéaire peut apparaître si le T_1 du sang n'est pas suffisamment court aprés injection de l'AC, car l'acquisition démarre à $t< T_{inv}$. Comme l'aimantation du sang a moins de temps pour remonter vers l'équilibre thermodynamique, le signal S_{post} serait sous-estimé (**section II.4.1**, **figure II.4**).
   - Conséquence 2 : Le temps (T_{reste}) qui sépare la dernière impulsion RF d'excitation à faible angle de bascule α et la prochaine impulsion RF d'inversion est plus long que celui disponible avec la séquence IR-FLASH 2D. Ceci permet l'augmentation du RS plus élevée, notamment si on applique la méthode de remplissage partiel de l'espace k. En effet, le remplissage centrique de l'espace k (qui a été utilsé auparavant avec la séquence IR-FLASH 2D) ne permet pas d'acquérir par exemple une matrice de 94 x 94 même avec la méthode de remplissage partiel de l'espace k contrairement au remplissage linéaire (IR-MDEFT 3D).

La séquence IR-MDEFT 3D pourrait ainsi avoir une meilleure résolution spatiale sans avoir d'impacte sur la résolution temporelle (**section II.4.4, figure II.13 et II.15**).

2) Concernant l'absence de gradient de sélection de coupe et l'application du deuxième gradient de phase :

   - Conséquence 1 : Meilleur RSB par rapport à la séquence IR-FLASH 2D (**section II.4.3.5** : **tableau II.14, section II.4.3.6** : **figure II.11 et II.12**) car l'absence d'un gradient de sélection de coupe dans la séquence 3D implique que le signal mesuré après chaque impulsion RF d'inversion est originaire de tout le volume excité par l'impulsion RF contrairement à l'imagerie 2D où le signal enregistré est donné par une seule coupe.
   - Conséquence 2 : Dans la microvascularisation, la séquence IR-MDEFT 3D supprime mieux le signal résiduel à T_1 long que la séquence IR-FLASH 2D mais l'aimantation longitudinale acquise avec cette dernière est plus élevée pour les T_1 courts. Ceci est dû à la relaxation longitudinale durant T_{inv} sans perturbation par des impulsions d'excitation à faible angle de bascule α. Le flux sanguin perpendiculaire à la coupe peut aussi conduire à une augmentation du signal par effet d'entrée dans la coupe. L'effet du flux sanguin sur la quantification du VSC dans la micro et la macro-vascularisation avec les deux séquences sera comparé en détail dans la **section II.4.3.5** (**tableau II.13**).

Les paramètres de simulation et expérimentaux des séquences IR-MDEFT 3D et IR-FLASH 2D sont mentionnés dans les **section II.2.5 et II.3** de ce chapitre.

II.2.5. Simulation théorique de l'aimantation longitudinale

Des simulations de l'aimantation longitudinale ont été effectuées en encodage centrique (IR-FLASH 2D) et en encodage linéaire (IR-MDEFT 3D). Le but de ces simulations est de 1) comparer le signal M_z/M_0 entre ces deux techniques (**sections II.4.1** : **figure II.3**, **figure II.4** et **tableau II.9**) et 2) de montrer deux stratégies qui peuvent potentiellement augmenter la RS de ces deux techniques (**section II.4.4 : figure II.13**, **figure II.14** et **figure II.15**).

Les paramètres utilisés pour ces simulations sont résumés dans le tableau suivant :

	T_1 (ms)	TR (ms)	TR_{echo} (ms)	RF α (°)	Nombre de segments
Figure II.3	25 et 1000	750	10	10	1
Figure II.4 **Tableau II.9**	25, 50 et 1000				
Figure II.13	25 et 1000				
Figure II.15	25				
Figure II.14	2 300			Absence	Absence

Tableau II.1 : Résumé des paramètres de simulation de l'aimantation longitudinale utilisés pour les séquences IR-FLASH 2D et IR-MDEFT 3D.

Pour la séquence IR-MDEFT 3D à 4,7 T, un T_{inv} de 305 ms a été choisi car nous avons trouvé expérimentalement qu'il minimise l'aimantation M_z/M_0 à T_1 long (**section II.4.3.3** : **figure II.8**). Pour la séquence IR-FLASH 2D le T_{inv} est de 325 ms comme celui utilisé précédemment (Perles-Barbacaru and Lahrech 2007) à 2,35 T, ce qui nous permet de comparer nos résultats aux précédents résultats (Perles-Barbacaru 2007; Perles-Barbacaru and Lahrech 2007).

II.2.6. Le rapport signal sur bruit (RSB) théorique

Le RSB dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être résumés principalement par deux catégories (McRobbie 2007):

- Paramètres physiques et intrumentaux :
- Champ magnétique B_0
- La densité de protons ρ_0
- Conductivité thermique de l'échantillon
- Conception de la bobine RF de réception
- Conductivité/résistance de la bobine de réception
- Bruit électronique du préamplificateur du récepteur

Soit F1 le facteur qui prend en compte les caractéristiques de la bobine de réception

- Paramètres de la séquence utilisée :

- Résolution spatiale : taille de pixel/voxel (Δ_x, Δ_y, Δ_z)
- Nombre d'accumulations (N_{acc})
- Temps de lecture ($T_{lecture}$)
- Nombre de pas de codage de phase N_k

  Type d'acquisition en 2D : N_{ky}

  Type d'acquisition en 3D : N_{ky} et N_{kz}

- Nombre de pas de codage de fréquence (N_x)
- Taille de champ (FOV)
- Temps séparant deux pas d'échantillonnage dans la direction de lecture (Δ_t)
- Plage de fréquences échantillonnée lors de la lecture (BW)

Avec

- $T_{lecture} = N_x * \Delta_t$
- $BW = 1/\Delta_t$
- $FOVx = N_x * \Delta_x$, $FOVy = N_{ky} * \Delta_y$

Soit $F_{séquence}$: les paramètres de la séquence qui restent (TE, TR, $TR_{écho}$, T_{inv} …)

La composante du signal est estimée par l'équation ci-dessous :

$$Signal = \rho_0 * B_0 * \Delta_x * \Delta_y * \Delta_z * F_{séquence} \quad \text{[Eq. II.1]}$$

La composante du bruit est estimée par l'équation suivante :

$$Bruit = \frac{F1*\sqrt{BW}}{\sqrt{N_{acc}*N_{ky}*N_{kz}*N_x}} = \frac{F1}{\sqrt{N_{acc}*N_{ky}*N_{kz}*T_{lecture}}} \quad \text{[Eq. II.2]}$$

N_{kz} est utilisé uniquement dans le cas d'imagerie 3D

Le rapport signal sur bruit est estimé par l'équation ci-dessous :

$$RSB = \frac{Signal}{Bruit} = \frac{(F_{séquence} * \rho_0 * B_0 * V_{voxel} * \sqrt{N_{ky}} * \sqrt{N_{kz}} * \sqrt{N_{acc}} * \sqrt{N_x})}{F1\sqrt{BW}} \quad \text{[Eq. II.3]}$$

II.2.7. Traitement des données IRM

Le traitement de données IRM a été effectué en utilisant des programmes informatiques développés aux laboratoires sous matlab R2012a (version 7.14.0739-R2012a-Mathworks®, Natick, MA, USA).

II.2.7.1. Quantification du VSC

La quantification du VS à partir du signal $RSST_1$ (S_{norm}) est décrite dans le **chapitre 1** (**section I.3.1.4.c**) et est obtenu à partir de **l'équation I.18**.

II.2.7.2. Mesure expérimentale du rapport signal sur bruit

Le signal S_{norm} est mesuré voxel par voxel dans la région d'intérêt (ROI, le striatum) selon **l'équation I.18** du **chapitre 1**. Ensuite la valeur moyenne de S_{norm} dans le striatum (S_{norm_ROI}) est moyennée sur la période du plateau $RSST_1$ ($<S_{norm_ROI}>$, période du plateau $RSST_1$ de $t_{RSS1} \approx 50$ à $t_{RSS2} \approx 90$ s). Nous avons estimé le bruit par l'écart-type temporel du signal moyen S_{norm_ROI} (σ_{Snorm_ROI}) mesuré dans le striatum pendant la période du plateau $RSST_1$. Le RSB est donc obtenu par l'équation ci-dessous :

$$RSB = \frac{<S_{norm_ROI}>}{\sigma_{<S_{norm_ROI}>}} \quad \text{[Eq. II.4]}$$

II.3. Protocoles expérimentaux

II.3.1. Etude in vitro

II.3.1.1. Préparation des échantillons de différents T_1

L'**équation II.5** permet d'estimer les concentrations de Gd-DOTA [C] dans de l'eau distillée qui permettent d'obtenir in vitro des valeurs de T_1 longs et des T_1 courts (environ entre 20 ms et

3 000 ms). Ces valeurs simulent le T_1 du sang et du parenchyme cérébral en absence et en présence de Gd-DOTA respectivement.

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{10}} + r_1[C] \qquad \text{[Eq. II.5]}$$

Ainsi l'**équation II.5** peut être écrite :

$$[C] = \left(\frac{T_{10} - T_1}{T_{10} * T_1 * r_1}\right) \qquad \text{[Eq. II.6]}$$

[C] est exprimé en mmol/L

T_1 et T_{10} en s sont les temps de relaxation longitudinale en présence et en absence de Gd-DOTA respectivement. r_1 est la relaxivité de Gd-DOTA.

Le **tableau II.2** ci-dessous récapitule les concentrations et les volumes de Gd-DOTA utilisés pour obtenir des valeurs de T_1 entre 25 et 1300 ms.

T_1 ms	25	60	500	1 300
[C] mmol/L	9,91	4,078	0,41	0,103
$V_{Gd\text{-}DOTA}$ µL	594,64	244,64	24,64	6,18

Tableau II.2 : Exemples de concentrations utilisées et de volume de préparation de Gd-DOTA nécessaires pour obtenir une solution de 3 ml ayant les différents valeurs de T_1 théoriques pour l'étude in vitro.

II.3.1.2. Etude expérimentale IRM

Pour toutes les mesures faites avec les séquences IR-FLASH 2D et IR-MDEFT 3D (in vitro et in vivo), le paramètre « receiver gain » qui est responsable de l'amplification du signal reçu par la bobine de réception est fixé à sa valeur maximale. La reconstruction des datas a été effectuée en mode « USER RANGE MAPPING ». Ces conditions permettent un recueil du signal brut, maximal et quantitatif.

II.3.1.2.a. Mesure du temps de relaxation longitudinal T_1

La première étape est de vérifier l'exactitude des valeurs de T_1 des échantillons préparés auparavant. Nous avons mesuré les T_1 des différents échantillons utilisant l'inversion-récupération et la séquence écho de spin.

Le volume des ROIs utilisé est de 85 mm^3 pour chaque coupe. Les T_1 ont été mesurés sur 2 coupes consécutives.

II.3.1.2.b. Mesure du signal $RSST_1$ par la séquence IR-MDEFT 3D

Le premier but des acquisitions avec la séquence IR-MDEFT 3D in vitro est de valider un signal maximal ($M_z/M_0 \cong 100\%$) dans un échantillon de T_1 de l'ordre de 25 ms (ordre de grandeur de T_1 du sang en présence de Gd-DOTA) et un signal minimal pour une valeur de $T_1 > 1s$ (ordre de grandeur des valeurs du T_1 du sang et du parenchyme cérébral en absence de Gd-DOTA).

La première étape consiste à déterminer le T_{inv} qui minimise l'aimantation longitudinale M_Z/M_0 de l'échantillon de T_1 proche du T_1 du sang et du parenchyme cérébral (par exemple T_1 = 1 290 ms). L'acquisition est effectuée pour différents T_{inv} (**tableau II.3** : **figure II.6**). La deuxième étape consiste à mesurer l'aimantation M_z/M_0 des échantillons ayant des T_1 courts et des T_1 longs en utilisant le même T_{inv} trouvé auparavant (**tableau II.3** : **figure II.6** et **tableau II.11**).

Le deuxième but est d'évaluer la séquence IR-MDEFT 3D à haute résolution spatiale (HRS) en appliquant la méthode de segmentation du plan de fourier implantée sur l'imageur. Nous avons étudié l'aimantation M_z/M_0 à HRS pour un nombre de segments (Nseg) égal à 4 pour les cinq échantillons à T_1 différentes citées ci-dessous (**tableau II.3** : **tableau II.15**) et puis pour un T_1 de 2 300 ms à différents RF α en fonction de T_{inv} (**tableau II.3** : **figure II.14**).

Le **tableau II.3** ci-dessous résume les paramètres utilisés pour ces expérimentations.

	Figure II.6		**Tableau II.11**		**Tableau II.15**		**Figure II.14**	
TR (ms)	750	20 000	750	20 000	750	20 000	750	20 000
TE (ms)	1,8							
TR_{echo} (ms)	7,6							
RF α (°)	10						5, 10, 20	
T_1 (ms)	23,8 ; 73,1 ; 437 ; 1 290 et 2 900						2 300	
T_{inv} (ms)	280, 290, 300, 310, 320 330	18 000	310	18 000	310	18 000	Entre 150 et 600	18 000
FOV (mm^3)	12 x 12 x 6							
RS (mm^3)	0,375 x 0,375 x 0,75							
NSeg	1				1 et 4			
NA	1							
NR	50	1	50	1	50	1	50	1
Tacq (min)	5	2,66	5	2,66	5 et 20	2,66 et 10,64	5 et 20	2,66 et 10,64

Tableau II.3: Paramètres expérimentaux utilisés pour la mesure de l'aimantation longitudinale M_z et celle à l'équilibre thermodynamique M_0 avec la séquence IR-MDEFT 3D in vitro à BRS et à HRS. La première ligne indique les figures et tableaux dans la partie résultat qui ont été obtenues avec ces paramètres. NR est le nombre de répétitions de l'acquisition.

L'aimantation M_z/M_0 a été mesurée dans les mêmes ROIs (sur deux coupes) que les mesures de T_1 (**II.3.1.2.a**).

II.3.2. Etude in vivo

Le soin des rongeurs avant, pendant et après les procédures expérimentales étaient conformes aux lois françaises concernant le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire. Les salles d'hébergement et d'expérimentation étaient agrées : Grenoble Institut des Neurosciences : A 38 516 10004, B 38 516 10003, Clinatec: B 38 185 10 003. Les expérimentations animales ont été autorisées avant le décret de février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques par le comité d'éthique institutionnel

pour la recherche animale, et étaient conformes aux directives du gouvernement français (décret 87-848 du 19 octobre 1987, licences 38 07 19, 2015051215314066 v2 du ministère de l'agriculture).

II.3.2.1. Préparation des animaux pour imagerie IRM

Les rongeurs ont été sous anesthésie générale induite par un mélange d'isofluorane à 5 %, d'O_2 à 30 % et d'air à 65 %. Pour la maintenance les animaux sous anesthésie, le taux d'isofluorane est réduit à 1-2 %. Les cathéters (BD Neoflon^{TM} 26 Ga) ont été implantés dans la veine caudale des rats et des souris pour permettre l'injection de l'agent de contraste dans l'IRM. Une seule souris a eu une injection de l'AC intrapéritonéale. Durant l'expérimentation IRM, les rongeurs sont placés dans un berceau équipé d'un circuit d'eau chaude. La tête des rongeurs est immobilisée avec une barre à dents et des barres d'oreilles. Le berceau est positionné dans l'IRM de façon que le cerveau soit au centre de l'aimant et des antennes. La fréquence de respiration (entre 60 à 80 respirations par minute), la pression artérielle (uniquement pour les rats, 87 ± 6 mmHg) et la température rectale (37,5 ± 1°C) ont été continuellement surveillées (MP150 Data Acquisition System équipé du logiciel BPL AcqKnowledge Lab Assistant, BIOPAC Systems, Inc., Goleta, AC). Ces valeurs physiologiques sont maintenues dans la gamme des valeurs mentionnées en ajustant la concentration d'isoflurane entre 1 et 2% et en ajustant la température du circuit de l'eau chaude.

II.3.2.2. Préparation des concentrations de l'agent de contraste

La concentration de l'agent de contraste à injecter en i.v chez la souris et le rat pour atteindre l'équilibre thermodynamique dans le sang peut être obtenue en utilisant **l'équation II.6**.

Il est recommandé que, in vivo, le volume total d'injection en i.v ne soit que de l'ordre 5ml/kg. L'injection du Gd-DOTA dans la veine caudale latérale est particulièrement délicate chez la souris car il faut tenir compte 1) du faible volume total à injecter en i.v dans le corps de la souris et 2) du diamètre interne de la veine caudale qui est très petit par rapport à celui du rat. Nous avons mis en place un outil d'injection en i.v pour la souris et le rat dans l'aimant (voir **annexe X.3**) et ainsi réalisé des injections de Gd-DOTA en i.v d'une façon reproductible et répétée. Toutes les injections de Gd-DOTA ont été réalisées manuellement sous forme de

bolus d'une durée inférieure à deux secondes (volume d'injection environ 200 µl ± 30 µl chez la souris et de 500 µl ± 30 µl chez le rat).

Suite aux résultats théoriques et expérimentaux obtenus pour le signal vasculaire avec les deux techniques et aux difficultés rencontrés lors des injections intraveineuses chez la souris nous avons utilisé pour les mesures du signal S_{norm} des doses de Gd-DOTA de 0,6 mmol/kg pour le rat et de 0,7mmol/kg pour la souris (voir **sections II.4.3.4, II.4.3.5**).

II.3.2.3. Etude expérimentale IRM

Plusieurs expériences IRM ont été élaborées pour optimiser la séquence IR-MDEFT 3D et ainsi pour comparer les résultats de quantification du VS et du RSB obtenus par cette méthode et avec ceux de la séquence IR-FLASH 2D.

Ci-dessous, le but des différentes expériences réalisées est donné ainsi que les détails des paramètres préconisés pour les deux séquences.

II.3.2.3.a. Détermination du T_{inv} qui minimise l'aimantation du tissu cérébral

Dans cette première expérience nous souhaitons déterminer le T_{inv} in vivo qui minimise l'aimantation M_Z dans le cerveau de la souris et du rat. Pour atteindre cet objectif nous avons mesuré dans un premier temps les valeurs de T_1 dans différentes régions du cerveau de souris (n = 2, striatum, sinus veineux et macro-vaisseaux, **figure II.7, tableau II.12**) pour estimer à partir des résultats in vivo le T_{inv} qui minimise l'aimantation M_Z.

Ensuite nous avons mesuré l'aimantation M_Z à différentes valeurs de T_{inv} autour de la valeur estimée. Les mesures de M_Z ont été effectuées dans le striatum de la souris (3,4 mm^3, n = 2) et du rat (14,9 mm^3, n = 2) (**figure II.8**). Les mesures quantitatives de T_1 et de l'aimantation M_z ont été effectuées sur une seule coupe.

L'imagerie anatomique pondérée T_2 est utilisée pour délimiter les ROIs. La 1^{ere} image acquise lors de l'arrivé de l'agent de contraste avec la séquence IR-MDEFT 3D est utilisée d'une façon qualitative (présence de rehaussement du signal) pour valider la visibilité des vaisseaux sanguins. Toutes les images brutes sont recalculées à une résolution spatiale de 0,125 x 0,125

x 1 mm^3. Les images brutes IR-MDEFT 3D et T_2 anatomiques sont recalées par rapport à l'imagerie RARE-VTR en utilisant code Matlab basé sur le travail de DJ. Kroon (Kroon and Dirk-Jan 2011).

Les paramètres de la séquence IR-MDEFT 3D utilisés pour cette expérience sont les suivants :

	figure II.8 a	figure II.8 b
	Aimantation M_Z chez le rat	Aimantation M_Z chez la souris
TR (ms)	750	
TE (ms)	1,2	2,2
TR_{echo} (ms)	6,5	8,84
RF α (°)	10	
T_{inv} (ms)	Entre 225 et 375	Entre 225 et 375
FOV (mm^3)	32 x 32 x 8	15 x 15 x 6
RS (mm^3)	1 x 1 x 1	0,468 x 0,468 x 0,75
NSeg	1	
NA		
NR	20	
Tacq (min)	2	

Tableau II.4: Paramètres expérimentaux utilisés pour la mesure de l'aimantation longitudinale M_Z avec la séquence IR-MDEFT 3D in vivo dans le but de trouver le T_{inv} qui minimise le signal dans le cerveau de rat et de la souris.

II.3.2.3.b. Maximisation de l'aimantation vasculaire cérébrale

Pour cette deuxième expérience nous voulons déterminer la dose de Gd-DOTA qui maximise le signal vasculaire cérébral chez le rat (n = 1) en utilisant la séquence IR-FLASH 2D.

Les concentrations optimales in vivo pour la maximisation du signal vasculaire doivent prendre en compte l'effet T_2 lors du premier passage de l'AC (induit une réduction du signal $RSST_1$) et le volume d'injection limité chez les rongeurs.

Afin de répondre à ces deux exigences nous avons mesuré le signal $RSST_1$ (i.e S_{norm}) dans le sinus veineux sagittal après administration de Gd-DOTA à plusieurs doses (0,2 mmol/kg, 0,4 mmol/kg, 0,5 mmol/kg, 0,6 mmol/kg, 0,7 mmol/kg). Les injections de Gd-DOTA ont été effectuées en i.v. Un délai de 6h a été respecté entre chaque injection permettant l'élimination de l'AC (pour éviter un signal résiduel) (**figure II.9**).

Les paramètres de la séquence IR-FLASH 2D utilisés pour cette expérience sont les suivants :

	Aimantation M_Z	Aimantation M_0
TR (ms)	750	20 000
TE (ms)	1,4	
TR_{echo} (ms)	10	
RF α (°)		
T_{inv} (ms)	305	18 000
FOV (mm^3)	32 x 32 x 15	
RS (mm^3)	1 x 1 x 1,5	
NSeg	1	
NA		
NR	400	1
Tacq (min)	5	0,33

Tableau II.5: Paramètres expérimentaux utilisés pour l'optimisation de la dose d'AC chez le rat.

II.3.2.3.c. Signal vasculaire cérébrale et RSB : IR-FLASH versus IR-MDEFT 3D

Le but de cette 3eme expérience est de comparer le signal vasculaire cérébral et le RSB obtenus avec la séquence IR-FLASH 2D et IR-MDEFT 3D chez le rat puis chez la souris.

Les paramètres de la séquence IR-MDEFT 3D utilisés pour cette expérience sont les suivants :

	Chez le rat (n=8)		Chez la souris (n=8)	
	Aimantation M_Z	Aimantation M_0	Aimantation M_Z	Aimantation M_0
TR (ms)	750	20 000	750	20 000
TE (ms)	1,2		2,2	2,2
TR_{echo} (ms)	6,5		8,84	8,84
RF α (°)	10		10	10
T_{inv} (ms)	305	18 000	305	18 000
FOV (mm^3)	32 x 32 x 16		15 x 15 x 8	
RS (mm^3)	1 x 1 x 2		0,47 x 0,47 x 1	
NSeg	1			
NA				
NR	650	1	100	1
Tacq (min)	65	0,33	10	2,66

Tableau II.6 : Paramètres expérimentaux utilisés pour la mesure de l'aimantation longitudinale M_Z/M_0 avec la séquence IR-MDEFT 3D in vivo chez le rat et la souris.

Chez le rat, nous avons choisi une RS plus élevée avec la séquence IR-FLASH 2D afin de réduire l'effet du volume partiel sur les mesures effectuées par cette séquence. Les paramètres de cette séquence sont ceux cités lors de l'expérience N° 2

Nous avons mesuré le signal $RSST_1$ (S_{norm}) dans le sinus sagittal, dans les artères cérébrales et dans le striatum sur une coupe. L'injection intraveineuse du Gd-DOTA est faite manuellement à une dose de 0,6 mmol/kg chez le rat et à 0,7 mmol/kg chez la souris (**figure II.10 et tableau II.14**)

II.3.2.3.d. RSB théorique versus expérimental

Le but de cette dernière expérience in vivo est d'étudier la différence du RSB du signal S_{norm} dans le striatum avec les deux séquences IR-FLASH 2D et IR-MDEFT 3D sur le même rongeur (souris n = 1 et rat n = 1).

Chez la souris l'injection du Gd-DOTA est réalisée par voie intrapéritonéale (i.p) à une forte dose de 7 mmol/kg. A cette dose, il a été montré que le signal vasculaire dans la microvascularisation cérébrale atteint sa valeur maximale après 20 minutes d'injection et persiste au moins 20 min dans le temps (Perles-Barbacaru and others 2013). Dans ce cas, les mesures du signal S_{norm} ont été réalisées 20 min après injection du Gd-DOTA. Les mesures ont été effectuées deux fois et d'une façon alternée entre la méthode IR-FLASH 2D et IR-MDEFT 3D sur la même coupe sans avoir bougé la souris entre les acquisitions (**figure II.11**). Chaque mesure à durée 5 min.

	IR-MDEFT 3D chez la souris		IR-FLASH 2D chez la souris	
	Aimantation M_Z	Aimantation M_0	Aimantation M_Z	Aimantation M_0
TR (ms)	750	10 000	750	20 000
TE (ms)	1,2		1,4	
TR_{echo} (ms)	6,5		10	
RF α (°)	10			
T_{inv} (ms)	305	9 000	305	18 000
FOV (mm^3)	15 x 15 x 6		15 x 15 x 0,7	
RS (mm^3)	0,47 x 0,47 x 0,75		0,47 x 0,47 x 0,7	
NSeg	1			
NA				
NR	50	1	400	1
Tacq (min)	5	0,16	5	0,33

Tableau II.7 : Paramètres expérimentaux utilisés pour la mesure de l'aimantation longitudinale M_Z/M_0 avec la séquence IR-MDEFT 3D et IR-FLASH 2D in vivo chez la souris.

Chez le rat l'injection du Gd-DOTA a été réalisée en i.v à une dose de 0,6 mmol/kg. Les deux injections ont été séparées de 6h afin de permettre une élimination du Gd-DOTA pour permettre une deuxième mesure quantitative du signal vasculaire S_{norm}. Comme pour la souris le signal S_{norm} a été quantifié dans le striatum et pour la même coupe (**figure II.12**). Un recalage d'image a été effectué pour comparer les mêmes ROIs dans le striatum des deux mesures.

	IR-MDEFT 3D chez le rat		IR-FLASH 3D chez le rat	
	Aimantation M_Z	Aimantation M_0	Aimantation M_Z	Aimantation M_0
TR (ms)	750	10 000	750	20 000
TE (ms)	1,2		1,4	
TR_{echo} (ms)	6,5		10	
RF α (°)	10			
T_{inv} (ms)	305	9 000	305	18 000
FOV (mm^3)	32 x 32 x 12		32 x 32 x 1,5	
RS (mm^3)	0,47 x 0,47 x 1,5	0,47 x 0,47 x 1,5	1 x 1 x 1,5	1 x 1 x 1,5
NSeg	1			
NA				
NR	50	1	400	1
Tacq (min)	5	1,33	5	0,33

Tableau II.8 : Paramètres expérimentaux utilisés pour la mesure de l'aimantation longitudinale M_Z/M_0 avec la séquence IR-MDEFT 3D et IR-FLASH 2D in vivo chez le rat.

.

II.4. Résultats

II.4.1. Simulation de l'aimantation longitudinale: IR-MDEFT 3D versus IR-FLASH 2D

L'aimantation longitudinale issue de la séquence d'inversion récupération de type FLASH a été modélisée par Jivan et al (Jivan and others 1997). Ici on présente l'évolution de cette aimantation pour différentes constantes de temps T_1 (T_1 court représente le signal vasculaire après injection du Gd-DOTA, T_1 long représente le signal du tissu, **figure II.3** et **II.4**) en appliquant un remplissage linéaire de l'espace k. Ainsi le centre de l'espace k correspond a T_{inv} = 305 ms et ceci après chaque impulsion radiofréquence d'inversion (π). 32 impulsions RF sont utilisées associées à 32 valeurs différentes du gradient d'encodage de phase (k_y) permettant le remplissage linéaire du plan de fourier.

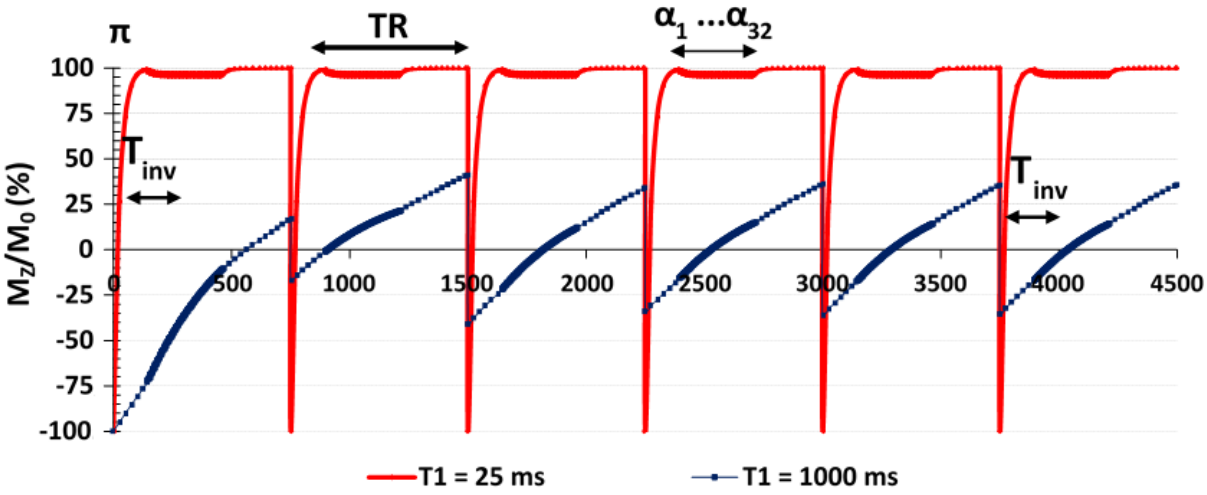


Figure II.3 : Aimantation longitudinale (Mz/M_0) en fonction du temps pour 6 temps de répétition consécutive. Mz/M_0 est représentée pour différents T_1. Le centre de l'espace k est acquis à α_{16}/α_{17}, ce qui correspond à T_{inv} = 305 ms. Π est l'impulsion RF d'inversion appliquée au début de l'acquisition et après chaque TR. On observe l'installation d'un équilibre dynamique (régime stationnaire) du signal après quelques répétitions (d'après (Jivan and others 1997)).

De point de vue théorique, l'aimantation longitudinale atteint son équilibre (steady state) rapidement après 6 impulsions d'inversion espacées de TR = 750 ms (**figure II.3**). Ceci était similaire aux résultats obtenus par la séquence IR-FLASH en appliquant un remplissage de type centrique (Perles-Barbacaru 2011), car le rapport T_1/TR est le facteur le plus important pour

l'obtention du steady state. Ici nous montrons que l'encodage spatial de type linéaire ne perturbe et ne retarde pas l'effet steady state.

La **figure II.4** compare l'aimantation longitudinale obtenue par un remplissage linéaire versus centrique de l'espace k pour différentes valeurs de T_1. Le signal total est issu de l'aimantation longitudinale simulée après chaque impulsion RF α (du 1er α jusqu'au dernier α). Afin de pouvoir comparer quantitativement le signal total obtenu par les deux méthodes de remplissage de l'espace k, nous avons quantifié en premier temps le signal après le 1er α, le 16eme α et le dernier α. Ces valeurs sont représentées dans le **tableau II.9** en fonction des temps T_1 et du type d'encodage de phase. Ces trois impulsions α permettent de représenter approximativement le signal total car ils contribuent au remplissage de la périphérie (α1 et α32, hautes fréquences spatiales : faible signal) et du centre de l'espace k (α 16, basse fréquence spatiale : intensité élevée).

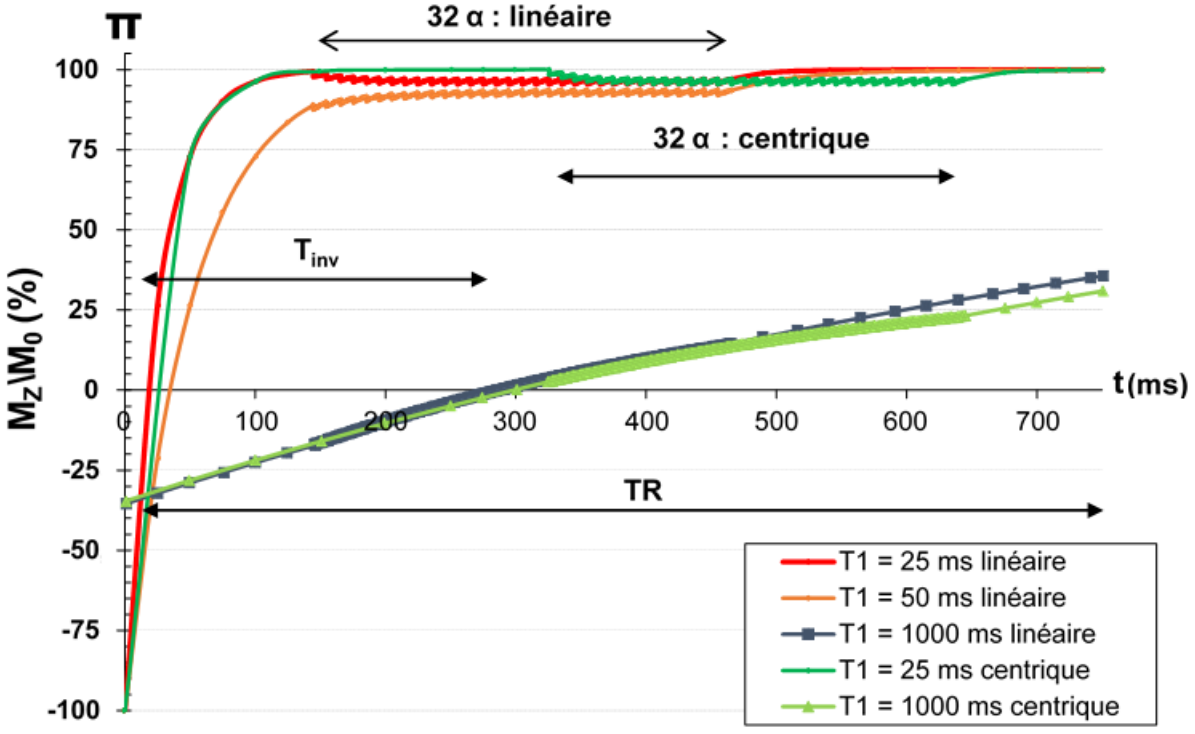


Figure II.4 : Aimantation longitudinale (Mz/M_0) en fonction du temps après l'installation de l'équilibre dynamique (répétition # 6). Mz/M_0 est simulée pour un encodage de phase de type linéaire et pour un encodage de phase de type centrique et pour plusieurs valeurs de T_1. Le centre de l'espace k est acquis à T_{inv} = 305 ms pour l'encodage linéaire ce qui correspond à α_{16} et à T_{inv} = 325 ms pour l'encodage centrique ce qui correspond à α_1. Π est l'impulsion RF d'inversion appliquée au début de l'acquisition et après chaque TR. (d'après (Jivan and others 1997)).

		Aimantation longitudinale		
Encodage	T_1 (ms)	Alpha = 1	Alpha = 16	Alpha = 32
Centrique	25	98 % *	96 %	96 %
	50	98 % *	92 %	92 %
	1000	3 % *	14 %	23 %
Linéaire	25	98 %	96 % *	96 %
	50	88 %	92 % *	92 %
	1000	17 %	1 % *	14 %

Tableau II.9: Aimantation longitudinale Mz/M0 en fonction de T_1 de l'échantillon calculée après l'application de la 1ère, la 16ème et la dernière impulsion α (d'après (Jivan and others 1997; Perles-Barbacaru 2007)). *Valeurs de l'aimantation du centre de l'espace k à T_{inv} 305 ms (linéaire) et T_{inv} = 325 ms (centrique). En rouge, les valeurs élevées du signal résiduel obtenues avec le remplissage centrique de l'espace k.

Pour un T_1 long (T_1 = 1000 ms) nous pouvons constater que la suppression du signal est meilleure avec la méthode linéaire. En effet, le signal résiduel acquis lors de l'encodage centrique est plus élevé que celui obtenu par l'encodage linéaire et ceci pour la moitié du plan de fourier. Précisément et à partir de la 16eme ligne le signal résiduel est supérieur à 14 % et atteint rapidement les 23% lors de l'encodage centrique tandis que pour l'encodage linéaire la totalité du plan de fourier a un signal résiduel inférieur à 17 %. En plus le signal résiduel du centre de l'espace k est de 3% contre 1% quand l'encodage est linéaire. L'ensemble de ces résultats montre qu'avec l'encodage linéaire les échantillons à T_1 long donnent un signal résiduel plus bas.

On constate par simulation d'après **la figure II.4** que l'encodage linéaire perturbe précocement l'aimantation longitudinale par rapport à un encodage centrique. En effet, pour le même T_1 court (exemple T_1 = 50 ms) l'aimantation longitudinale (avant le premier angle de bascule alpha) n'atteint pas la valeur maximale (M_Z/M_0 centrique ≅ 98 % vs M_Z/M_0 linéaire ≅ 90 %). Ceci engendre une sous estimation du VS.

Afin d'éviter une sous-estimation à cause de cet effet lors de l'utilisation de l'encodage linéaire, la constante de temps de relaxation longitudinal doit être de l'ordre de T_1 = 25 ms

(**figure II.4**) ce qui permettrait à l'aimantation longitudinale vasculaire (en présence de l'AC) d'atteindre sa valeur maximale (M_Z/M_0 linéaire ≅ 100 %) avant l'application de la première impulsion RF d'excitation alpha. Lors de l'expérimentation, ceci nécessite une concentration d'AC plus élevée que celle préconisée pour un remplissage de l'espace k de type centrique.

L'aimantation longitudinale à T_1 court (T_1 = 25 ms) est maximale pour les deux modes de remplissage de l'espace k mais légèrement moins élevée au centre de l'espace k en encodage de phase linéaire ($M_z/M_{0\ linéaire}$ = 96 % vs $M_z/M_{0\ centrique}$ = 98 %). En encodage linéaire, ceci est dû aux 16 impulsions RF α qui perturbent successivement l'aimantation avant l'échantillonnage du centre de l'espace k tandis que dans le cas d'un remplissage centrique le centre de l'espace k est rempli juste après la 1^{ere} impulsion RF α.

II.4.2. Comparaison théorique du RSB : imagerie 2D versus 3D

Pour les mêmes caractéristiques physiques, instrumentaux et mêmes paramètres de séquence, nous pouvons estimer à partir de l'**équation II.3** le RSB d'une séquence 3D par rapport a une séquence 2D par l'équation suivante :

$$RSB_{3D} \infty RSB_{2D} * \sqrt{N_{kz}} \qquad \text{[Eq. II.7]}$$

Nous pouvons conclure que théoriquement l'imagerie 3D est dotée d'un meilleur rapport signal sur bruit que l'imagerie 2D d'un facteur proportionnel à la racine carrée du nombre de pas de codage de phase dans la direction de coupe (direction z). En d'autres termes, le RSB est meilleur en imagerie 3D qu'en 2D car après chaque excitation RF tout le volume contribue au signal acquis lors d'une imagerie 3D (MDEFT 3D), contrairement à l'imagerie 2D où le signal acquis est originaire d'une seule coupe.

II.4.3. Mise en place de l'IR-MDEFT 3D : comparaison à l'IR-FLASH 2D

Afin de valider la mise en place de la séquence IR-MDEFT 3D avec l'encodage de phase linéaire il est nécessaire de confronter les simulations théoriques obtenus par cette méthode aux résultats expérimentaux premièrement in vitro et puis in vivo. Les résultats de cette partie

concernent la mesure de l'aimantation longitudinale dans des échantillons d'eau à différentes concentrations de Gd-DOTA et dans le cerveau des rongeurs (souris et rats) avant et après injection de Gd-DOTA. Les principaux objectifs de ce travail méthodologique étaient :

1- Minimisation du signal IR-MDEFT 3D pour des $T_1 > 1s$
2- Maximisation du signal M_z/M_0 avec la séquence IR-MDEFT 3D (≅ 100%) pour des T_1 courts de l'ordre de 25 ms
3- Quantification in vivo du signal $RSST_1$: IR-MDEFT 3D vs IR-FLASH 2D

II.4.3.1. Mesure in vitro du temps de relaxation longitudinal T_1

La **figure II.5** montre un exemple de quantification de T_1 dans un tube RMN en utilisant la séquence d'inversion pondérée en écho de spin. Les valeurs de T_1 obtenues par mesure sont représentées dans le **tableau II.10**. Les résultats de T_1 sont représentés en valeur moyenne avec leur écart-type.

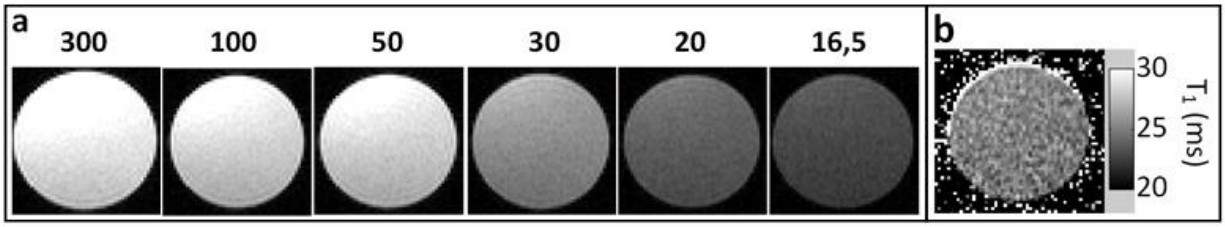


Figure II.5 : a) Images d'un échantillon de Gd-DOTA à 0,309 mmol/L dans de l'eau de T_1 théorique de 25 ms obtenues à différents T_{inv} (valeurs indiquées en ms). b) Cartographie de $T_{1\text{-map}}$ indiquant une valeur expérimentale de T_1 de 23,8 ms ± 1,2 ms

T_1 théorique (ms)	T_1 = 25	T_1 = 60	T_1 = 500	T_1 = 1 300	**T_{10}**
T_1 mesuré (ms)	T_1 = 23,8 ± 1,2	T_1 = 73,1 ± 28,6	T_1 = 456 s ± 66,1	T_1 = 1 290 ± 93,5	T_1 = 2 900 ± 260,5

Tableau II.10: Valeurs de T_1 théoriques calculées lors de la préparation des échantillons et valeurs de T_1 obtenues par mesures expérimentales en utilisant la séquence d'inversion récupération de type spin écho.

II.4.3.2. Mesure in vitro du signal RSST$_1$ par la séquence IR-MDEFT 3D

La **figure II.6 a** montre la variation de l'aimantation M_Z de l'échantillon T_1 = 1,29 s en fonction de T_{inv}. On constate que l'aimantation M_Z est minimisée pour un temps T_{inv} de 310 ms. Ceci est en accord avec la valeur théorique (320 ms) obtenue par l'**équation I.12 (chapitre 1 section I.3.1.4.a.3).**

La figure II.6 b, c et d montre un exemple représentatif de mesure de l'aimantation M_0 et M_z pour plusieurs valeurs de T_1 à T_{inv} = 310 ms.

Les valeurs mesurées de l'aimantation M_Z/M_0 sont représentées en valeurs moyennes et en écart-type dans le **tableau II.11** pour chaque échantillon de T_1 et sont comparées aux valeurs théoriques simulées à T_{inv} = 310 ms à partir de l'approximation proposé par Haase qui ne prend pas en compte l'effet des impulsions RF alpha (10°) successives sur le signal (Jivan and others 1997).

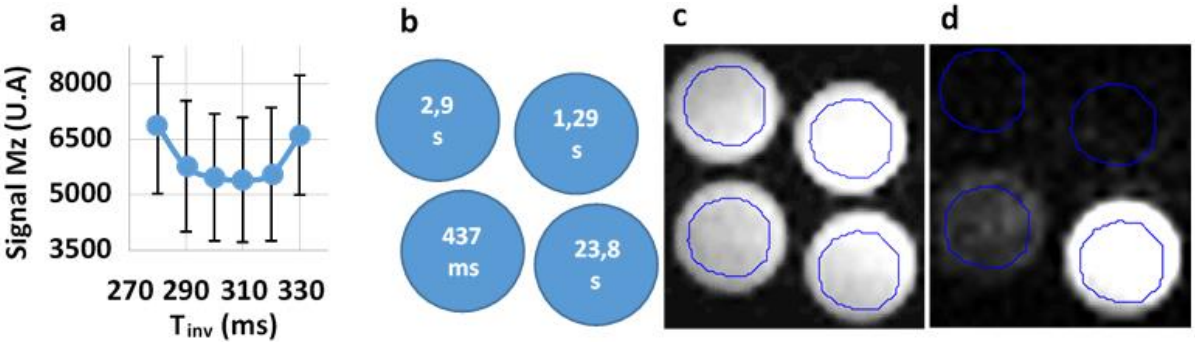


Figure II.6 : a) Mesure de l'aimantation Mz (séquence IR-MDEFT 3D, unité arbitraire U.A) de l'échantillon de T_1 = 1,29 s à différents T_{inv}. b) Exemple représentatif de la position des échantillons de différents T_1 lors de la mesure de M_z et M_0. Signal correspondant à c) M_0 et d) M_z.

T_1 mesuré (ms)	T_1 = 23,8	T_1 = 73,1	T_1 = 437	T_1 = 1 290	T_1 = 2 900
M_Z/M_0 mesuré (%)	99,6 ± 1,65	96,08 ± 2,91	21,3 ± 3,1	3,24 ± 1 ,73	3,89 ± 0,94
M_Z/M_0 théorique (%)	100	97,12	16,41	0,82	1,41

Tableau II.11 : Valeurs de l'aimantation longitudinale M_z/M_0 mesurée avec la séquence IR-MDEFT 3D pour différentes valeurs de T_1. M_z/M_0 théorique, simulé à partir du modèle simplifié pour des impulsions RF à petits α (Jivan and others 1997).

Nous confirmons ainsi expérimentalement que le signal correspondant à M_z/M_0 est maximisé pour des T_1 court et minimisé pour des T_1 long (**Tableau II.11**). Ces résultats expérimentaux sont en accord avec les simulations théoriques (Haase 1990; Jivan and others 1997).

La différence minimale de 0,4 % entre le signal théorique et le signal mesuré à T_1 court est due principalement aux perturbations du signal par les impulsions alpha (10°) successives.

Pour les valeurs de T_1 > 1s, la différence entre le signal résiduel théorique et le signal résiduel mesuré est due principalement :

a- Aux perturbations du signal par les impulsions RF α.

b- A la variation de l'aimantation M_z/M_0 au cours du balayage de l'espace k. En effet pour des valeurs de T_1 > 1 s, M_z/M_0 continue à augmenter entre l'application de la 1^{ere} impulsion RF α et de la dernière impulsion RF α. Le signal n'est pas acquis uniquement à T_{inv} comme c'est le cas de la simulation théorique mais acquis sur une plage de ± 160 ms autour de T_{inv} (**figure II.4**). Ceci est accentué pour les T_1 entre 100 et 800 ms, ainsi le signal théorique en un point (à T_{inv} = 310 ms) n'est plus représentatif du signal réel acquis.

Finalement, le signal résiduel pour les T_1 > 1 s a pour conséquence de sous estimer de 3 à 4 % le VS mesuré (i.e pour un VS mesurée à 5 %, la valeur réelle est de 5.015 % si on prend en compte le biais de quantification dû au signal résiduel dans les vaisseaux sanguins).

La faisabilité de la mesure du signal $RSST_1$ avec la méthode d'acquisition IR-MDEFT 3D est démontrée in vitro sur des échantillons ayant des T_1 représentatifs des conditions in vivo. La

prochaine étape est de valider les mesures in vivo dans les cerveaux de souris et de rats et d'étudier en un deuxième temps in vivo la différence entre la méthode MDEFT 3D et IR-FLASH.

II.4.3.3. Détermination du T_{inv} qui minimise l'aimantation du tissu cérébral

Afin d'estimer le temps T_{inv} nécessaire pour minimiser l'aimantation M_z dans le tissu et dans la vascularisation cérébrale des rongeurs, nous avons acquis des cartographies du T_1 ($T_{1\text{-map}}$) en utilisant la séquence spin écho rapide pour situer in vivo la gamme des constantes de temps de relaxation longitudinal du tissu cérébral et du sang de souris à 4.7T. La **figure II.7** montre un cas représentatif et les ROIs étudiées. Le **tableau II.12** résume les valeurs de T_1 des différentes ROIs. Les valeurs trouvées sont représentées en valeurs moyennes avec leurs écart-type.

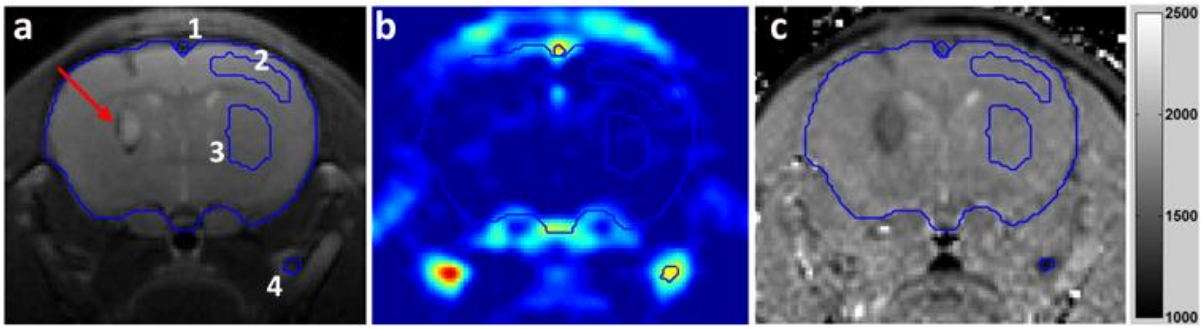


Figure II.7 : Quantification du T_1 du cerveau de souris porteuse d'une tumeur cérébrale U87. a) Image anatomique T_2 indiquant les différents ROIs étudiées et la tumeur (flèche rouge), b) Image qualitative IR-MDEFT 3D de rehaussement du signal à l'arrivé du Gd-DOTA. c) Cartographie de T_1 (échelle en ms). ROI 1 : sinus veineux sagittal, ROI 2 : cortex, ROI 3 : striatum, ROI 4 : macro-vaisseaux.

T_1 ms	Striatum	Sinus veineux sagittal	Macro-vaisseaux	Cortex
Souris 1 : T_1 ± Stdv	1949 ± 45	1661 ± 90	1252 ± 113	1960 ± 32
Souris 2 : T_1 ± Stdv	1809 ± 66	1403 ± 134	1178 ± 120	1840 ± 33
Moyen ± Stdv	1879 ± 99	1532 ± 182	1215 ± 52	1900 ± 84

Tableau II.12 : Valeurs de temps de relaxation longitudinal dans les ROIs du tissu et de la vascularisation cérébrale chez la souris.

Les mesures T_1 du cortex, du striatum et de la vascularisation cérébrale dépendent de plusieurs paramètres expérimentales (B_0, TR, RS (i.e effet du volume partiel), RSB, conditions d'anesthésie …), de la souche et de l'age des rongeurs.

Les valeurs expérimentales de T_1 sont cohérentes avec la littérature, supérieure à T_1 = 1s (Barbier and others 2002; Behroozi and others 2018; Kober and others 2005; Kuo and others 2005; Miraux and others 2008) et sont délimitées par les valeurs de T_1 utilisés dans les tubes RMN (entre 1 et 3s). Ceci nous a permis de déduire un ordre de grandeur de T_{inv} (entre 275 et 375 ms) qui devrait minimiser le signal IR-MDEFT 3D pour ces plages de T_1 (1 à 3 s). Nous avons ainsi mesuré l'aimantation M_Z dans le striatum du cerveau de souris et de rat en fonction de T_{inv} (**figure II.8**). Le graphe dans la **figure II.8** montre qu'expérimentalement l'aimantation M_Z est minimisée pour un T_{inv} de 305 ms (les résultats sont présentés en valeurs moyennes et écart-type de la ROI). Ce résultat est proche de ce qui a été trouvé auparavant par Perles-Barbacaru et al (Perles-Barbacaru and Lahrech 2007). La différence peut être due au champs magnétique B_0 qui est plus élevé dans notre étude (T_{inv} = 305 ms à 4,7 T versus T_{inv} = 325 ms à 2,35 T). La variabilité des valeurs de T_{inv} intra est inter-rongeurs est autour de 5 ms.

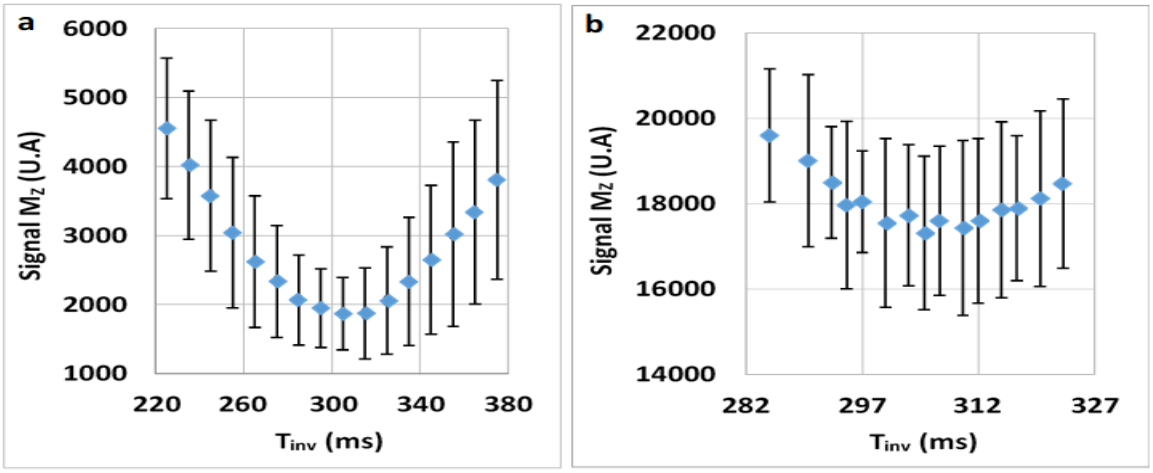


Figure II.8 : Exemple de mesure de l'aimantation M_Z en fonction du T_{inv} dans le tissu sain du striatum du rat (a) et de la souris (b).

Nous avons considéré que la valeur de T_{inv} = 305 ± 5 ms peut être utilisée aussi pour minimiser le signal vasculaire et ceci pour deux raisons : 1) le T_1 sanguin est dans la même gamme de valeurs de T_1 du tissu cérébral (Barbier and others 2002; Kober and others 2005) au dessus de 1 s, 2) Le signal résiduel mesuré dans des échantillons dans la gamme de valeurs de T_1 entre 1,29 set 2,9 s est dans la gamme de 3% et 4% (**tableau II.11**). Cet écart est minime et engendre une erreur maximale de suppression de signal de l'ordre de 1 % pour ces gammes de valeurs de T_1.

II.4.3.4. Maximisation de l'aimantation vasculaire cérébrale

La concentration de Gd-DOTA nécessaire pour diminuer les valeurs de T_1 du sang d'environ 1,5 – 2 s à 25 ms est de 11,94 ± 0,036 mmol/L selon l'**équation II.6**. Le volume total du sang d'une souris et d'un rat est approximé par 79 mL/Kg et par 64 mL/Kg respectivement (Drexel-University 2007). Par conséquent, la dose de Gd-DOTA théorique est de l'ordre de 0,95 mmol/kg pour une souris de 20 g (1,6 ml de sang) et de 0,76 mmol/kg pour un rat de 280 g environ (18 ml de sang).

Nous avons trouvé que le signal S_{norm} atteint un maximum à partir de 0,5 mmol/kg chez le rat (moins que la valeur théorique). La dose de 0,7 mmol/kg résulte en une durée de plateau de 80 s environ (**figure II.9**). Pour le bien de l'animal on a préconisé la dose de 0.7 mmol/kg (plus faible que la dose de 0.95 mmol/kg estimée théoriquement) car expérimentalement elle est

suffisante pour garantir un plateau du signal RSST1. Par contre, le signal S_{norm} n'atteint pas la valeur théorique maximale 100 %. Le signal maximal mesuré pour cet exemple et pour les doses supérieures à 0,5 mmol/kg est entre 70 et 80 %.

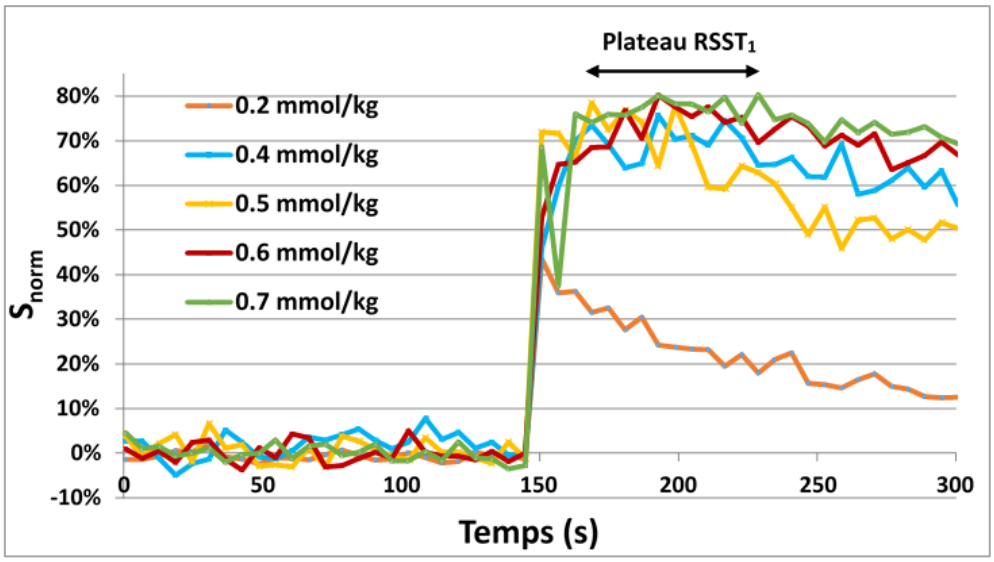


Figure II.9 : Signal S_{norm} (IR-FLASH 2D) du sinus cérébral chez le rat en fonction de temps avant et après injection du Gd-DOTA. Différentes concentrations de Gd-DOTA ont été utilisées.

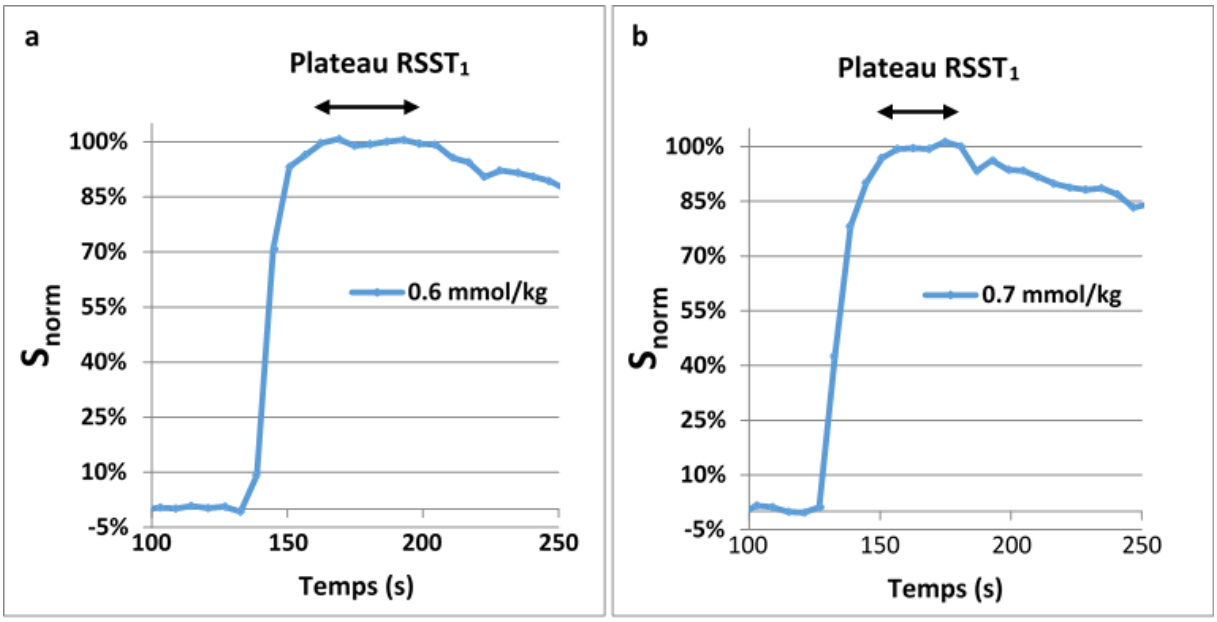
Ces résultats ont été constatés dans des travaux antérieurs (Perles-Barbacaru 2007; Perles-Barbacaru and Lahrech 2007) en utilisant la séquence IR-FLASH 2D à 2,35 T pour une dose de Gd-DOTA de 0,15 mmol/Kg. L'auteur indique que le signal S_{norm} du sang mesuré après injection de Gd-DOTA était entre 50 et 80% et n'a jamais dépassé les 80 % et que ceci peut être dû à l'effet de volume partiel (Perles-Barbacaru 2007). Afin de vérifier l'hypothèse du volume partiel, nous avons conçu une expérience comparant deux résolutions spatiales différentes.

II.4.3.5. Signal vasculaire cérébral et RSB : IR-FLASH 2D versus MDEFT 3D

Nous avons trouvé que le signal S_{norm} atteint sa valeur maximale de 100% avec la séquence IR-MDEFT 3D chez la majorité des rats (7 rats, 0,6 mmol/kg) et ceci malgré la faible résolution spatiale qui favorise l'effet de volume partiel (**figure II.10 a**). Cependant, S_{norm} vasculaire

mesuré par la technique IR-FLASH 2D n'a pas pu atteindre plus de 80 % et ceci malgré l'utilisation d'une résolution spatiale plus élevée que celle utilisée chez la technique IR-MDEFT 3D.

Nous avons aussi obtenu un signal vasculaire cérébral de 100 % chez les souris en utilisant la séquence IR-MDEFT 3D (**figure II.10 b**).



La figure II.10 : S_{norm} en fonction de temps mesuré par la séquence IR-MDEFT 3D dans les vaisseaux cérébraux a) chez le rat et b) chez la souris.

Les résultats concernant le signal S_{norm} obtenus avec la technique IR-FLASH 2D sont cohérents avec ceux obtenus par des mesures antérieures (Perles-Barbacaru 2007). Une sous estimation du signal S_{norm} vasculaire in vivo est constatée avec la technique IR-FLASH 2D et peut être due à la suppression incomplète du signal vasculaire. Car selon l'**équation I.18** du **chapitre 1**, la soustraction d'un signal résiduel (S_{pre}) non négligeable dans le compartiment vasculaire engendre une sous estimation du signal S_{norm}.

Deux sources peuvent conduire à la sous estimation du S_{norm} (i.e VS) constaté avec la séquence IR-FLASH 2D. La première est intrinsèque à la séquence et au type de l'encodage de l'espace k utilisé par cette séquence. En effet, nous avons montré par simulation (**tableau II.9**) que le signal résiduel obtenu par la séquence IR-FLASH 2D (encodage centrique) à T_1 = 1s est très

élevé (entre 14 et 23 %) et ceci pour au moins la moitié du plan de fourier tandis que pour la séquence IR-MDEFT 3D (encodage linéaire) il est de 1 % au centre du plan de fourier et atteint une valeur maximale de 17 % à la périphérie du plan de fourier. Ceci est pareil pour les T_1 encore plus longs > 1 s. → cette valeur est élevé ceci peut conduire à une sous estimation du VSC.

La deuxième source est liée à l'effet de saturation du signal qui dépend de 1) l'impulsion RF d'excitation (qui est sélective pour la coupe (2D) pour IR-FLASH 2D et non sélective pour la coupe (3D) pour IR-MDEFT 3D), 2) de la mobilité des molécules d'eau (i.e. flux sanguin à travers la coupe) et du temps de relaxation longitudinal T_1 dans la vascularisation.

Premièrement, l'effet de saturation a lieu suite à l'application répétée des impulsions d'excitation (RF α). Si la RF α est appliquée une seule fois ou si la molécule d'eau dans la coupe à étudier ne reçoit qu'un seul RF α (cas du flux sanguin rapide), l'effet de saturation n'est pas présent.

Deuxièmement, l'effet de saturation est dominant dans le cas du T_1 long car l'aimantation longitudinale relaxe lentement et n'atteint pas l'équilibre thermodynamique avant la prochaine RF α.

Le tableau **II.13** indique qualitativement l'ampleur de l'effet de saturation induit par les deux séquences sur les signaux correspondant aux aimantations M_z et M_0 (qui sont utilisées pour calculer le signal S_{norm}) en fonction du T_1 et du flux sanguin.

Effet de la saturation sur	l'aimantation M_z		l'aimantation M_0	
Absence de flux sanguin	RF α (2D)	RF α (3D)	RF α (2D)	RF α (3D)
T_1 Court < 50 ms	+	+	+	+
T_1 Long > 1 s	++	++	++	++
Présence de flux sanguin	RF α (2D)	RF α (3D)	RF α (2D)	RF α (3D)
T_1 Court < 50 ms	0	+	0	+
T_1 Long > 1 s	0	++	0	++

Tableau II.13 : Récapitulatif de l'effet de saturation du signal suite aux impulsions RF α sur l'aimantation M_Z et M_0 mesurée avec la séquence IR-FLASH 2D et IR-MDEFT 3D en fonction du T_1 et du flux sanguin. Uniquement les cas en vert interviennent dans le calcul du S_{norm}. Diminution (saturation) du signal zéro, 0, faible, +, et forte, ++.

En absence de flux sanguin, la séquence IR-FLASH 2D et la séquence IR-MDEFT 3D ont le même effet de saturation du signal. Selon l'**équation I.18** du **chapitre 1** ceci conduit à une surestimation du VS car principalement M_0 (i.e DP) subit une saturation. A noter que dans ce régime de flux sanguin $S_{pré}$ est mieux supprimé (i.e signal résiduel plus faible).

En présence du flux sanguin rapide la séquence IR-FLASH 2D et la séquence IR-MDEFT 3D n'ont pas le même effet de saturation du signal. Le VS avec la séquence IR-FLASH 2D est sous-estimé principalement à cause du signal $S_{pré}$ (i.e M_z à T_1 long) résiduel important.

Dans le cas de la séquence IR-MDEFT 3D le signal $S_{pré}$ est diminué (saturation élevée) évitant une sous-estimation de S_{norm}. Le signal M_0 (i.e DP) subit une saturation élevée. Ceci conduit alors toujours à une sur-estimation du VS, comme dans le cas de flux sanguin négligeable.

Nous pouvons conclure deux choses :

1- La séquence IR-MDEFT 3D n'est pas sensible au flux sanguin car en absence ou en présence du flux la mesure du VS est la même, tandis que la séquence IR-FLASH 2D est sensible au flux sanguin, notamment pour les artères cérébrales.
2- Dans le cas du flux sanguin élevé (macro-vaisseau > 1m/s (Verlhac and Bernaudin 2008)) la séquence IR-FLASH 2D sous-estime le VS, un effet observé expérimentalement lors de la mesure du signal S_{norm} dans les macro-vaisseaux.
3- L'effet du flux sanguin lors de la mesure du VS microvasculaire peut être considérée négligeable, parce que la vitesse du flux sanguin dans les capillaires est très faible (< 1 mm/s (Kamoun and others 2010).

Après avoir étudié l'origine de la différence du RSB entre les deux techniques, nous concluons par un résumé des valeurs moyennes du RSB obtenus par la technique IR-MDEFT 3D (à 4,7 T) chez les rats et les souris. Nous avons comparé ces valeurs à celles obtenues chez le rat avec la méthode IR-FLASH 2D à 4.7 T et à celles obtenues auparavant dans notre équipe à 2,35 T (Sarraf and others 2015). Les valeurs de RSB obtenus à 2,35 T ont été calculées en se référant uniquement au signal S_{post}, contrairement à notre méthode qui se réfère au signal S_{norm}. Ceci à pour conséquence de surestimer les valeurs de RSB à 2,35 T par rapport à notre méthode effectuée à 4,7 T.

	IR-MDEFT 3D (8 Rats)	IR-MDEFT 3D (8 Souris)	IR-FLASH 2D (8 Rats)	IR-FLASH 2D (6 Rats)
B_0	4,7 T	4,7 T	4,7 T	2,35 T **
RS	1 x 1 x 2 mm^3	0,47 x 0,47 x 1 mm^3	1 x 1 x 1,5 mm^3	1 x 1 x 2 mm^3
RSB	37 ± 6	29 ± 5	7,8 ± 2	16 ± 5

Tableau II.14 : Valeurs du RSB pour la méthode IR-FLASH 2D et MDEFT 3D dans le striatum du cerveau de souris et des rats. « ** » valeurs mesurées avec le signal S_{post}.

II.4.3.6. RSB théorique verus expérimental

Nous avons montré théoriquement que le RSB d'une acquisition 3D est plus élevé que celui d'une acquisition 2D. Sur les tracées temporelles des signaux, nous pouvons constater qualitativement que le bruit du signal S_{norm} de la séquence IR-FLASH 2D (**figure II.9**) est plus élevé que celui de la séquence IR-MDEFT 3D (**figure II.10**) avant et après injection du Gd-DOTA. Ici on souhaite présenter une mesure quantitative du RSB obtenu chez le même rongeur en utilisant les deux séquences IR-FLASH 2D et IR-MDEFT 3D.

La **figure II.11** montre que le signal S_{norm} mesuré dans le striatum chez la même souris est plus faible avec la méthode IR-FLASH 2D. Également, la mesure dans les vaisseaux sanguins avec la méthode IR-FLASH 2D donne toujours un S_{norm} sous-estimé de 30 à 40 %, (**section II.4.3.4**). Le bruit du signal obtenu par la méthode IR-FLASH 2D est double par rapport à celui obtenu par la méthode IR-MDEFT 3D ce qui conduit à un SNR trois fois plus faible avec la méthode IR-FLASH 2D (**figure II.11**). Dans le sinus veineux on obtient un signal S_{norm} de 70 % avec la méthode IR-FLASH 2D tandis que le S_{norm} atteint 100 % avec la méthode MDEFT 3D.

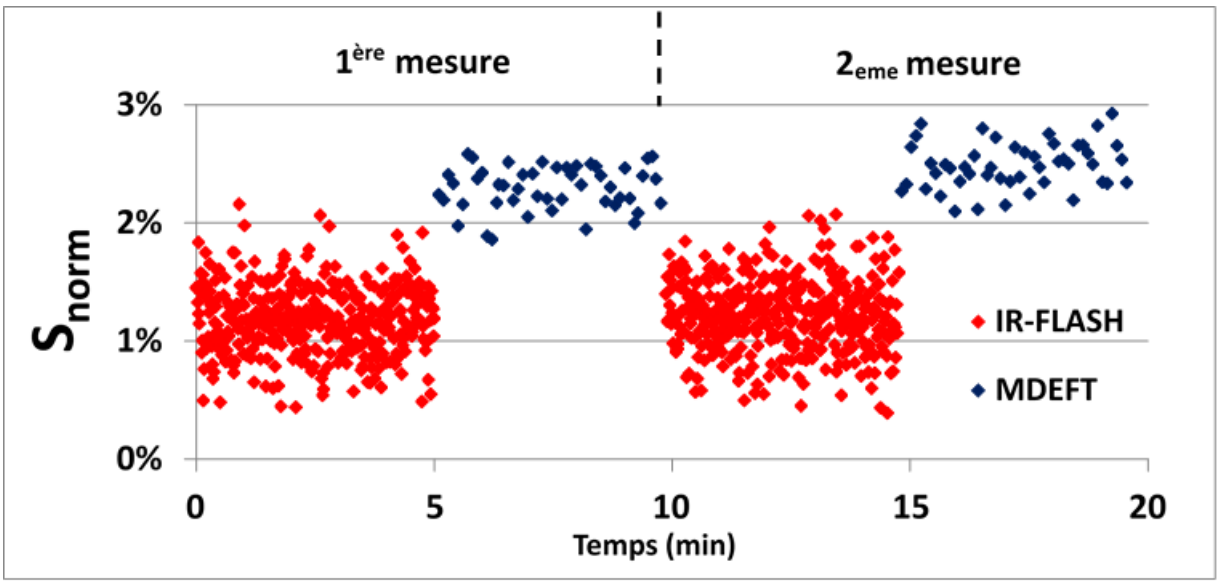


Figure II.11 : S_{norm} dans le striatum de souris en fonction du temps mesuré par la séquence IR-FLASH 2D et IR-MDEFT 3D après injection du Gd-DOTA. IR-FLASH 2D-1 : S_{norm} = 1,17 %, bruit = 0,28 % et SNR = 4,1. MDEFT 3D-1 : S_{norm} = 2,29 %, bruit = 0.19 % et SNR = 12.3. IR-FLASH 2D-2 : S_{norm} = 1,22 %, bruit = 0,3 % et SNR = 4,1. MDEFT 3D-2 : S_{norm} = 2,49 %, bruit = 0,2 % et SNR = 12,6.

Comme pour la souris, le signal S_{norm} obtenu par la méthode IR-MDEFT 3D est environ le double de celui obtenu par la méthode IR-FLASH 2D dans le striatum du même rat. Le bruit est plus élevé avec la technique IR-FLASH 2D et le SNR est meilleur avec la technique IR-MDEFT 3D (**Figure II.12**). Chez le rat aussi, dans le sinus veineux nous avons obtenu un signal S_{norm} de 100 % avec la méthode MDEFT 3D et 60 % avec la méthode IR-FLASH 2D.

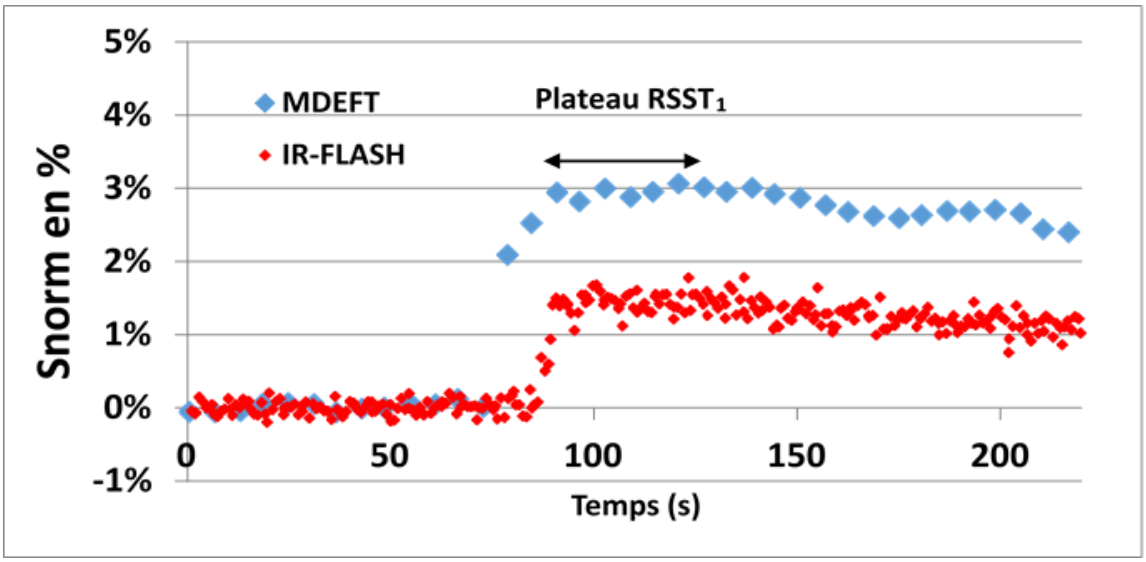


Figure II.12 : S_{norm} dans le striatum du rat en fonction du temps acquis avec la séquence IR-FLASH 2D et IR-MDEFT 3D. IR-FLASH 2D : S_{norm} = 1,44 %, bruit = 0,14 % et SNR = 10,17. IR-MDEFT 3D : S_{norm} = 2.96 %, bruit = 0,74 % et SNR = 39,92.

Afin d'identifier l'origine de l'écart du RSB constaté entre ces deux techniques, nous nous sommes basés sur l'**équation II.3**.

Il en résulte que, pour le même échantillon, le même instrument, la même résolution spatiale, le même FOV mais pour un BW différent, Nous pouvons comparer le SNR d'une séquence 3D à une séquence 2D en utilisant l'**équation** ci-dessous :

$$RSB_{3D} \infty RSB_{2D} \frac{\sqrt{BW_{2D}}\sqrt{N_{ky2}}}{\sqrt{BW_{3D}}} \qquad \text{[Eq. II.8]}$$

De plus, nous avons constaté que le signal IR-FLASH 2D dans le sang est sous-estimé d'un facteur entre 20 à 40%. Afin de prendre en compte la quantité du signal sous estimé par IR-FLASH 2D dans le calcul du RSB nous avons introduit un facteur $F_{IR\text{-}FLASH}$ qui est égal à

$$F_{IR-FLASH} = \frac{100\%}{S_{norm-sang}IR-FLASH} \qquad \text{[Eq. II.9]}$$

La relation entre le RSB de la méthode IR-MDEFT 3D et IR-FLASH 2D peut être approximée par la relation finale suivante :

$$RSB_{3D\ MDEFT} \propto (F_{IR-FLASH} * RSB_{2D\ IR-FLASH}) \frac{\sqrt{BW_{2D}}\sqrt{N_{ky2}}}{\sqrt{BW_{3D}}} \qquad \text{[Eq. II.10]}$$

Nous allons appliquer cette approximation afin de déduire le RSB de la méthode IR-MDEFT 3D à partir du SNR de la méthode IR-FLASH 2D pour l'exemple du rat

BW 2D = 50 000 Hz (paramètre utilisé pour la séquence IR-FLASH 2D)

BW 3D = 75 757 Hz (paramètre utilisé pour la séquence IR-MDEFT 3D)

N_{kz} = 8

$S_{norm\text{-}sang\text{-}rat}$ IR-FLASH 2D = 60 % (valeur expérimentale)

RSB 2D IR-FLASH 2D = 10,17 (valeur expérimentale)

RSB IR-MDEFT 3D mesuré-attendu = 39,32

$$RSB_{3D\ MDEFT-rat} \propto \left(\frac{100}{60} * 10{,}17 * \frac{\sqrt{50000}}{\sqrt{75757}} * \sqrt{8}\right) = 38{,}83$$

Pour cet exemple, l'écart entre le RSB mesuré par la méthode IR-MDEFT 3D (39,32) et calculé selon **l'équation II.10** à partir du RSB de la méthode IR-FLASH 2D (38,83) est de 2,2 %.

Le même calcul est appliqué dans le cas de la souris :

$S_{norm\text{-}sang\text{-}souris}$ IR-FLASH 2D = 70 %

RSB IR-FLASH 2D = 4,1

RSB IR-MDEFT 3D mesuré-attendu = 12,6

$$RSB_{3D\ MDEFT-souris} \infty \left(\frac{100}{70} * 4{,}1 * \frac{\sqrt{50000}}{\sqrt{75757}} * \sqrt{8}\right) = 13{,}41$$

Pour cet exemple, l'écart entre le RSB mesuré par la méthode IR-MDEFT 3D (12,6) et calculé selon l'**équation II.10** à partir du RSB de la méthode IR-FLASH 2D (13,41) est de 6,4 %.

Dans les deux cas expérimentaux, chez la souris et chez le rat, la différence du RSB entre les deux techniques est principalement due au signal S_{norm} et à la technique d'imagerie utilisée.

Le RSB de la séquence IR MDEFT 3D étant plus élevé que celui de la séquence IR-FLASH 2D, la séquence IR MDEFT 3D sera appliquée dans les expériences in vivo sur les souris, nécessitant des RS élevées et plus particulièrement lors de l'étude des tumeurs cérébrales de petit volume (≈ allant de 1 à 20 mm^3) et dont la microvascularisation est hétérogène (le cas des glioblastomes).

II.4.4. Stratégies d'amélioration de la résolution spatiale

L'acquisition du signal S_{norm} à HRS par la méthode IR-MDEFT 3D et la méthode IR-FLASH 2D est limitée par trois facteurs (**figure II.13**): 1) par la durée TR = 750 ms entre les impulsions d'inversion π et 2) par le temps minimal (T_{min}) à respecter pour que l'aimantation longitudinale atteint sa valeur maximale à équilibre thermodynamique et 3) par le temps T_{reste} qui est défini entre la dernière impulsion alpha et l'impulsion π.

Théoriquement, et pour un TR de 750 ms et un T_{inv} de l'ordre de 305 ms, la séquence IR-FLASH 2D, dotée d'un remplissage de l'espace k de type centrique (1^{ere} impulsion RF α à 305 ms), peut acquérir une matrice maximale de 44 x 44 (limité par le temps T_{reste}) tandis que la

séquence IR-MDEFT 3D dotée d'un remplissage de l'espace k de type linéaire (1ere impulsion RF α à 140 ms) peut acquérir une matrice maximale de 33 x 33 (limité par le temps T_{min} = 140 ms pour un temps T_1 de l'orde de 25 ms).

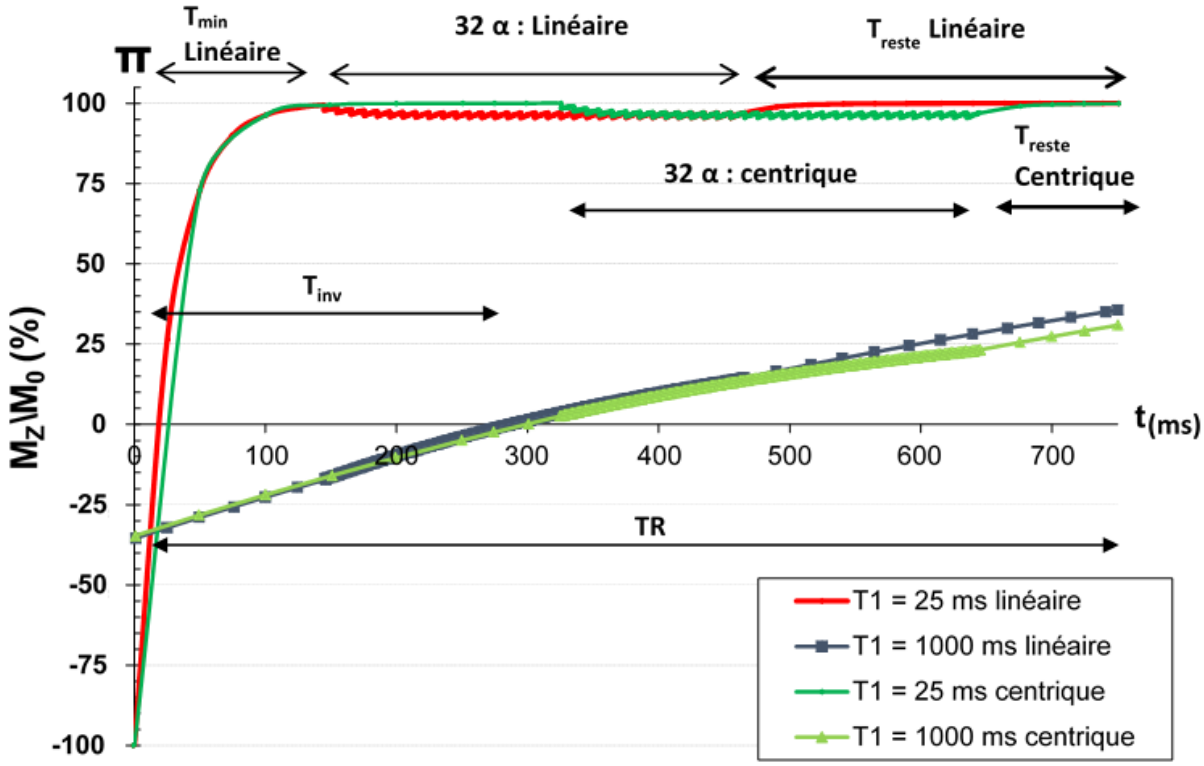


Figure II.13 : Aimantation longitudinale (Mz/M_0) en fonction du temps après équilibre dynamique (répétition # 6). Mz/M_0 est représentée pour différents T_1. Π est l'impulsion RF d'inversion appliquée au début de l'acquisition et après chaque TR (d'après (Jivan and others 1997)). Le nombre de pas d'encodage de phase réalisables avec l'encodage de phase linéaire est limité par le temps T_{min} à respecter contrairement à l'encodage de phase centrique où la limitation est donnée par le temps T_{reste} à respecter.

Nous avons voulu connaitre le moyen optimal pour augmenter la RS en utilisant ces deux méthodes. Nous avons étudié a) la technique de segmentation du plan de Fourier et b) la technique de remplissage partiel du plan de Fourier.

a) Ségmentation du plan de Fourier

Nous avons mesuré avec la méthode IR-MDEFT 3D l'aimantation longitudinale M_z/M_0 des échantillons de différents temps T_1 à HRS avec un nombre de segments 4 et nous avons comparé ces valeurs à celles obtenues à BRS sans segmentation (**tableau II.15**).

T_1 mesuré (ms)	T_1 = 23,8	T_1 = 73,1	T_1 = 437	T_1 = 1 290	T_1 = 2 900
M_z/M_0 (BRS) %	99,6 ± 1,65	96,08 ± 2,91	21,3 ± 3,1	3,24 ± 1 ,73	3,89 ± 0,94
M_z/M_0 (HRS) %	99,6 ± 8,91	97,27 ± 9	28,3 ± 16,01	10,62 ± 1 ,73	15,59 ± 9,4

Tableau II.15 : Valeurs de M_z/M_0 (moyenne ± écart-type) mesurées par la séquence MDEFT 3D (T_{inv} = 310 ms) à basse et à haute résolution spatiale dans des échantillons ayant des T_1 différents.

Nous avons obtenu une efficacité similaire (M_Z/M_0 maximal) pour des faibles T_1, par contre la technique de segmentation de l'espace k montre un signal résiduel plus prononcé pour les valeurs de T_1 élevées.

Nous avons étudié le choix de T_{inv} et le choix de l'angle d'impulsion RF α qui peuvent agir sur le signal résiduel et contribuer à une baisse ou hausse du signal. Pour cela nous avons mesuré l'aimantation M_z/M_0 en fonction de T_{inv} pour un échantillon de T_1 = 2,3 s à HRS pour différents angles RF α.

Quel que soit la valeur de T_{inv} et la valeur de la RF α (autour des valeurs optimisées) l'aimantation résiduelle M_Z/M_0 est plus élevée à HRS utilisant la segmentation du plan de Fourier qu'a BRS (**figure II.14**). En revanche, l'aimantation M_Z/M_0 à BRS est proche du signal théorique (**figure II.14** courbe bleue, (Jivan and others 1997), **équation I.12 du chapitre 1 section I.3.1.4.a.3**).

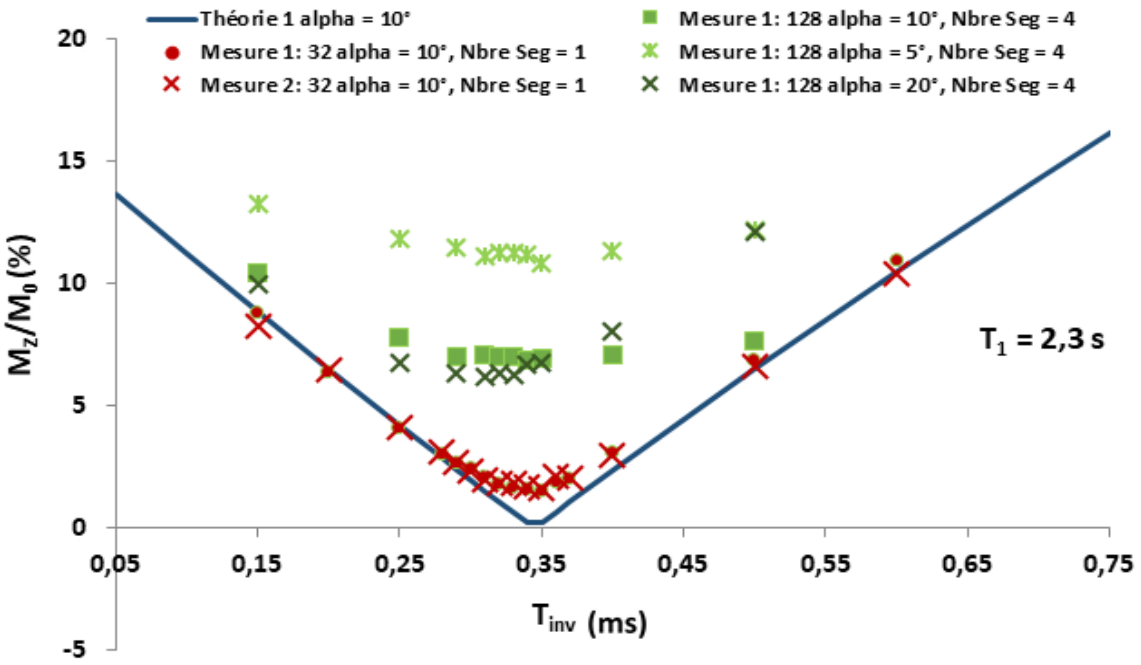


Figure II.14 : Aimantation longitudinale en fonction du T_{inv} mesurée pour un échantillon de T_1 = 2,3 s. M_z/M_0 est mesurée à BRS et à HRS pour un nombre de segments égal à 1 et à 4 respectivement et pour différents angles d'impulsion α. La courbe théorique de l'aimantation longitudinale est représentée en fonction de T_{inv} (d'après (Jivan and others 1997).

Nous pouvons conclure que la méthode de segmentation du plan de fourier a plusieurs inconvénients majeurs. Le premier inconvénient est le signal résiduel plus élevé qui peut induire une sous estimation du VS. Le deuxième inconvénient est la diminution de la résolution temporelle qui est divisée par le nombre de segments utilisé. Cette perte de résolution temporelle réduit l'échantillonnage durant le plateau $RSST_1$ et rend plus difficile la quantification du VSC notamment dans le cas de l'extravasation de l'agent de contraste (**voir chapitre III**). Le troisième inconvénient est l'acquisition des différents segments à différents temps pendant que le T_1 du compartiment extravasculaire varie en cas d'extravasation. Ceci peut induire une surestimation duVSC.

b) Remplissage partiel du plan de Fourier

Le remplissage partiel du plan de Fourier consiste à acquérir un peu plus de la moitié des lignes de l'espace k (~ 60%) dans la direction de phase k_y. L'espace k est symétrique, nous pouvons

ainsi estimer l'autre moitié des données de l'espace k grâce à sa symétrie conjuguée (McRobbie 2007).

La **figure II.13** permet d'apprécier le temps T_{reste} qui est plus élevé quand l'encodage de phase est linéaire. Ceci permet à la méthode IR-MDEFT 3D d'acquérir un nombre plus élevé de lignes dans la direction k_y et ainsi d'augmenter davantage la résolution spatiale en utilisant la méthode de remplissage partiel du plan de fourier.

Par exemple, pour obtenir une résolution de 96 x 96 x 8 (tripler la RS actuelle dans le plan X, Y) en utilisant le remplissage partiel du plan de fourier, il faut remplir environ 57 lignes de l'espace k dans la direction de phase k_y. Pour les mêmes paramètres TR, T_{inv} et TR_{echo}, la méthode IR-FLASH 2D, en utilisant le principe du remplissage partiel du plan de fourier, est incapable de remplir 57 lignes pendant le temps TR (car T_{inv} (à 325 ms) + 570 ms > 750 ms) mais maximum 42 lignes (T_{inv} (325 ms) + 420 ms = 745 ms) contrairement à la séquence IR-MDEFT 3D (**Figure II.15**).

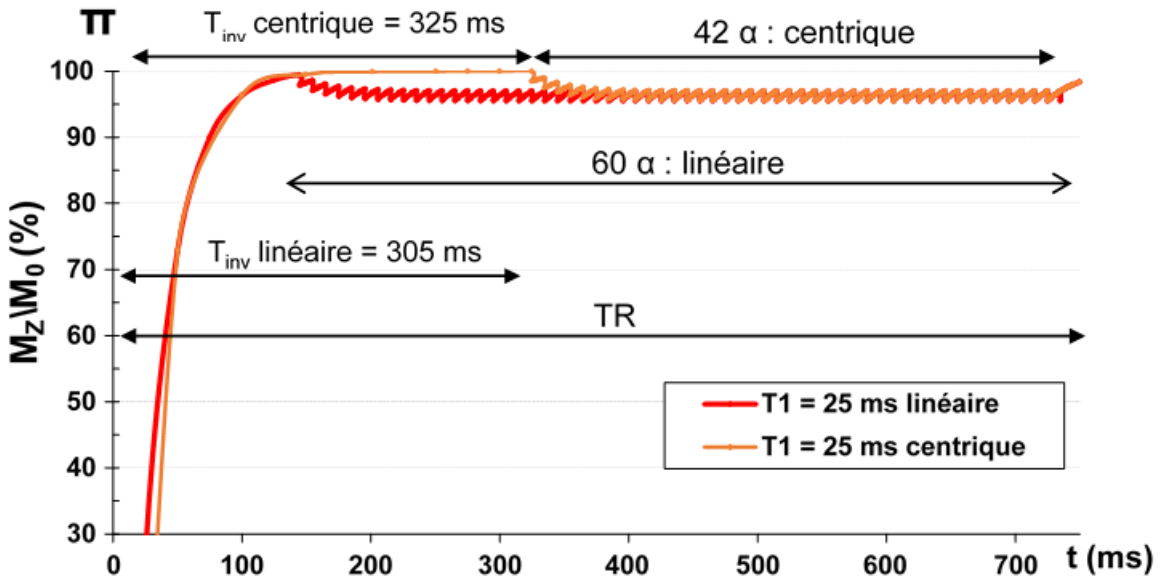


Figure II. 15 : Aimantation longitudinale (Mz/M_0) en fonction du temps après équilibre dynamique (répétition # 6). Π est l'impulsion RF d'inversion appliquée au début de l'acquisition et après chaque TR. M_z/M_0 est représentée pour T_1 = 25 ms. La courbe rouge représente l'aimantation M_z/M_0 simulée pour un remplissage linéaire et partiel de l'espace k selon la direction de phase Ky (63.8 % i.e 60 alpha). Le centre de l'espace k est acquis à T_{inv} = 305 ce qui correspond à α_{16}/α_{17} (16 impulsions RF α avant le T_{inv} et 44 impulsions RF α post T_{inv}). La courbe orange représente M_z/M_0 simulée pour un remplissage centrique maximal de 42 impulsions RF α pour une première RF α à T_{inv} = 325 ms. (d'après (Jivan and others 1997)).

D'après la **figure II.15** Nous pouvons constater que, dans la configuration d'un remplissage partiel de l'espace k, le gain en résolution spatiale n'est pas au détriment de la résolution temporelle (i.e on acquière une image complète en un même temps TR = 750 ms), ce qui est un point positif pour la quantification du VSC dans le cas où l'AC s'extravase dans le compartiment extravasculaire.

En utilisant la méthode de remplissage partiel de l'espace k, le rapport signal sur bruit sera moins élevé à HRS qu'à BRS car il y aura moins de lignes dans la direction de phase ky acquis et moins d'aimantation par voxel.

II.4.5. Théorie du modèle mathématique développé pour la quantification des paramètres vasculaires tumoraux

Lors de l'extravasation de l'AC du compartiment intravasculaire vers le compartiment extravasculaire extracellulaire, le signal $RSST_1$ représente la somme des signaux issus de ces deux compartiments atteints par l'AC. La **figure II.16** représente ce principe par une simulation de l'aimantation M_z/M_0 au cours d'une acquisition IR-MDEFT 3D pour différents T_1 (d'après (Jivan and others 1997)) dans un voxel de tissu cérébral dont la BHE est lésée. Le compartiment vasculaire est représenté par un T_1 = 30 ms. Le compartiment extravasculaire non touché par l'AC est représenté par les temps T_1 = 1000 et 2000 ms. Les valeurs de T_1 intermédiaires (150, 300 et 700 ms) représentent le compartiment extravasculaire touché par des quantités différentes d'AC.

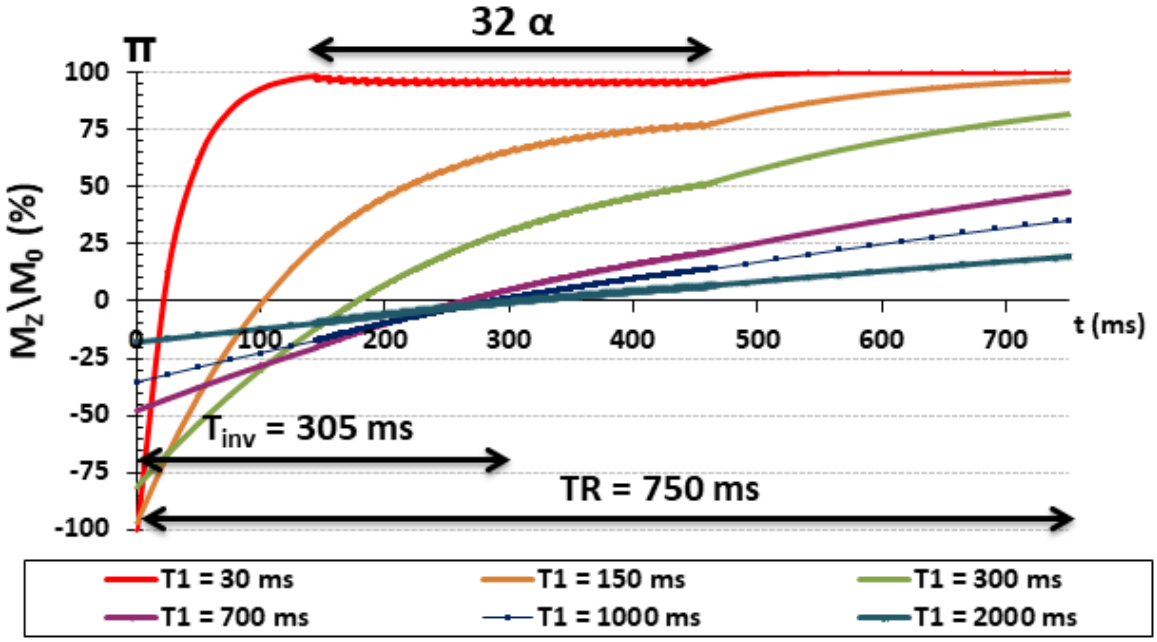


Figure II.16 : Régime stationnaire de l'aimantation longitudinale M_Z/M_0 en fonction du temps durant la séquence IR-MDEFT 3D et pour différents T_1. Π est l'impulsion RF d'inversion appliquée au début de l'acquisition, α représente les successions des impulsions RF d'écho de gradient. (d'après (Jivan and others 1997)).

Dans un voxel contenant du tissu tumoral dont la BHE est lésée, le signal $RSST_1$ est la somme des signaux provenant des compartiments ayant un T_1 inférieur à 1 000 ms. La méthode $RSST_1$ comme elle a été décrite (Perles-Barbacaru and Lahrech 2007) ne permet plus de différencier ces signaux et induit une surestimation lors de la quantification du TBVf.

Un modèle mathématique est développé dans cette section afin d'estimer la contribution du signal extravasculaire atteint par l'AC. Le modèle proposé modélise le signal $RSST_1$ lors de l'extravasation de l'AC dans le compartiment extravasculaire extracellulaire pour déduire la TBVf et un coefficient apparent d'accumulation d'AC.

Le modèle est élaboré en se basant sur la différentiation des signaux vasculaires et extravasculaire extracellulaire et en se basant sur les valeurs de T_1 de chaque compartiment. La **figure II.17 a** montre comment le signal $RSST_1$ varie avec le T_1 du compartiment (**équation I.12 du chapitre 1 section I.3.1.4.a.3**). Une accumulation progressive de l'AC dans le compartiment extravasculaire extracellulaire diminue sa constante de relaxation T_1 au cours du temps (**figure II.17 b**). Le signal mesuré par la méthode $RSST_1$ dans un voxel contenant des vaisseaux lésés étant la somme des signaux des compartiments intravasculaires et

extravasculaires atteints par l'AC, il en résulte qu'à chaque acquisition après l'injection d'AC, le signal $RSST_1$ augmente durant l'extravasation de l'AC (**figure II.17 b**).

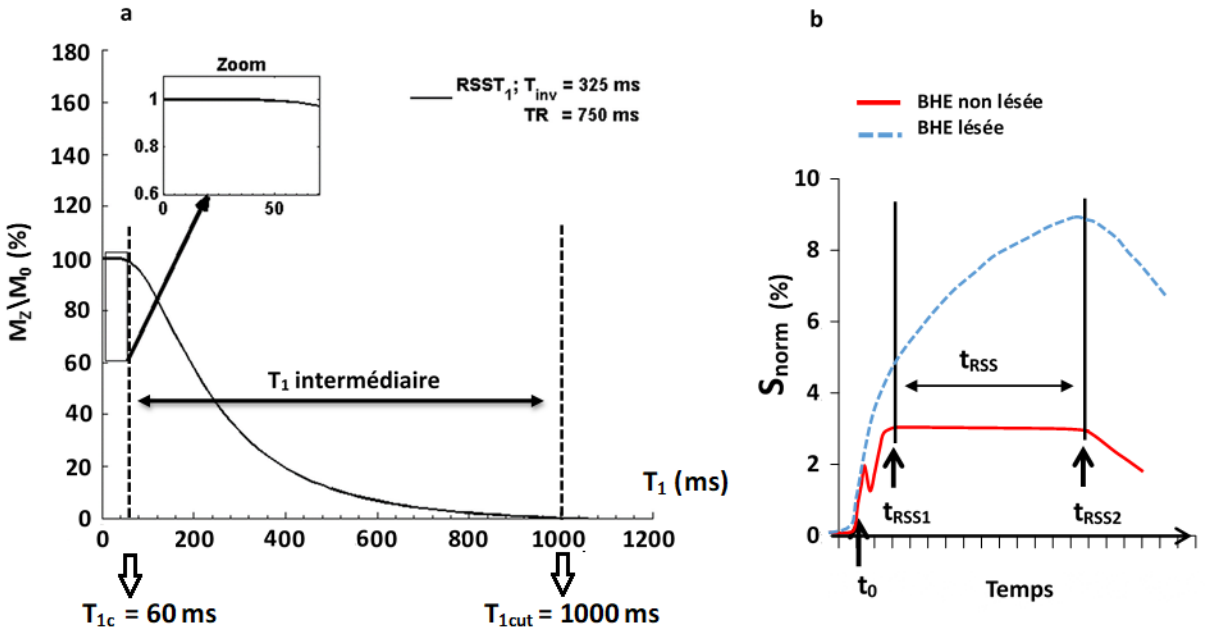


Figure II.17 : a) Signal $RSST_1$ en fonction du changement des valeurs de T_1 dû à la présence de l'AC selon l'équation I.12 (section I.3.1.4.a.3 du chapitre 1). Cette figure montre les trois comportements du signal $RSST_1$: 1) signal $RSST_1$ minimal ($T_1 \cong> 1s$), 2) signal $RSST_1$ continu et variable en fonction du T_1 (60 ms $\cong < T_1 > \cong$ 1s) et 3) signal $RSST_1$ maximal et constant ($T_1 <\cong$ 60 ms). b) Schéma de l'évolution temporelle du signal $RSST_1$ acquis dans le compartiment vasculaire et tissulaire en présence (ligne bleue) et en absence de l'extravasation de l'AC (ligne rouge). Le régime stationnaire est défini entre t_{RSS1} et t_{RSS2} (début et fin de plateau respectivement).

Figures II.17 a et b permettent de distinguer trois régimes du signal $RSST_1$:

- $T_1 < T_{1c} \cong$ 60 ms (**figure II.17 a**) : Signal $RSST_1$ constant (= régime stationnaire). Des valeurs si faibles de T_1 se retrouvent
  - (i) dans le compartiment vasculaire durant la période t_{RSS} (période entre t_{RSS1} et t_{RSS2}, cf **figure II.17 a**) après injection d'AC, et donnent lieu à un signal vasulaire à l'équilibre thermodynamique ($S_{iv} \propto M_{0iv}$) ou
  - (ii) dans le compartiment extravasculaire extracellulaire en cas d'extravasation et de très forte accumulation d'AC ($S_{ev} \propto M_{0ev}$).

- $T_{1c} \cong < T_1 < \cong T_{1cut}$: Signal $RSST_1$ dépendant de la constante de relaxation T_1. Ces valeurs de T_1 intermédiaires se retrouvent dans le compartiment extravasculaire extracellulaire pendant l'accumulation de l'AC du fait de l'extravasation (S_{ev} (t)) (**figure II.17 b**, BHE lésée).
- $T_1 > T_{1cut} \cong 1000$ ms (**figure II.17 a**) : Signal $RSST_1$ négligeable correspondant au signal résiduel du tissu (compartiment vasculaire et extravasculaire) en absence d'AC avant son injection.

Ainsi le signal total $RSST_1$ (S_{norm}) peut être écrit d'une façon analytique en fonction de ces comportements i.e en fonction du signal vasculaire (S_{iv}) et extravasculaire extracellulaire (S_{ev}) sous la forme suivante :

$$S_{tissu}(t) = \frac{M_{z\,(tissu)}}{M_0}(t) = S_{iv}(t) + S_{ev}(t) \qquad \text{[Eq. II.11]}$$

$$S_{tissu}(t) = \frac{M_{z\,(tissu)}}{M_0}(t) = V_p * \frac{M_{z\,(iv)}}{M_{0\,(iv)}}(t) + V_e * \frac{M_{z\,(ev)}}{M_{0\,(ev)}}(t) \qquad \text{[Eq. II.12]}$$

V_p est le volume vasculaire et V_e est le volume extravasculaire extracellulaire atteint par l'AC exprimés en fractions volumiques.

Durant la période de régime stationnaire t_{RSS}, l'aimantation longitudinale intravasculaire est maximale ($M_{z(iv)}/M_{0iv}$ = 1) et l'aimantation longitudinale extravasculaire extracellulaire atteinte par l'AC ($M_{z\,(ev)}/M_{0ev}$) suit **l'équation I.12** (**section I.3.1.4.a.3 du chapitre 1**), Ainsi le signal $RSST_1$ total est le suivant :

$$S_{tissu}(t) = V_p * (1) + V_e * \left(1 - \frac{2\exp(-T_{inv}.R_{1ev}(t))}{(1+\exp(-TR.R_{1ev}(t)))}\right) \qquad \text{[Eq. II.13]}$$

Avec $$R_{1ev} = R_{10ev} + r_1[C_{ev}(t)] \qquad \text{[Eq. II.14]}$$

R_{1ev} et R_{10ev} sont les vitesses de relaxation longitudinale du compartiment extravasculaire en présence et en absence de l'AC. r_1 est la relaxivité de l'AC dans le compartiment extravasculaire.

Remplaçons l'**équation II.14** dans l'**équation II.13** on obtient :

$$S_{tissu}(t) = V_p + V_e * (1 - \frac{2\exp(-T_{inv} * (R_{10ev} + r_1 C_{ev}(t)))}{(1+\exp(-TR * (R_{10ev} + r_1 C_{ev}(t))))}) \qquad [\text{Eq. II.15}]$$

Avec

$$\frac{M_{z\,(ev)}}{M_0\,(ev)}(t) = 1 - \frac{2\exp\left(-T_{inv} * (R_{10ev} + r_1 C_{ev}(t))\right)}{\left(1+\exp\left(-TR * (R_{10ev} + r_1 C_{ev}(t))\right)\right)} \qquad [\text{Eq. II.16}]$$

Selon la **figure I.37** (i.e **équation I.12,** i.e **II.16**), le signal extravasculaire extracellulaire touché par l'AC augmente d'une façon proche d'une fonction exponentielle, nous proposons de simplifier l'**équation II.16** par le terme exponentiel suivant :

$$\frac{M_{z\,(ev)}}{M_0\,(ev)}(t) = 1 - \exp(-K_{model} * t) \qquad [\text{Eq. II.17}]$$

Si on admet un échange bi-comparimental unidirectionnel comme celui proposé par Patlak et al (Patlak and others 1983), l'AC diffuse du compartiment vasculaire vers le compartiment extravasculaire extracellulaire dans tout les tissus du corps (les muscles, les graisses, le foie, les reins ....). La variation de la concentration extravasculaire extracellulaire C_{ev} (t) est donnée par l'**équation** suivante (voir aussi **chapitre 1 équation I.11**) :

$$C_{ev}(t) = K^{trans} \int_0^t C_p(\tau) e^{-K_{ep}(t-\tau)} d\tau \qquad [\text{Eq. II.18}]$$

Les paramètres K^{trans}, K_{ep} et $C_p(t)$ sont les mêmes paramètres décrits dans l'**équation I.11 du chapitre 1**. **La relation entre K^{trans} et K_{model} ne peut pas être envisageable que si $C_p(t)$ (i.e AIF)**

est connu. Dans notre cas le signal intravasculaire est saturé (maximisé grâce à la concentration d'AC élevée injectée en i.v) et donc l'AIF est non mesurable.

Des approximations et les hypothèses sont proposées dans la partie **annexe X.4** afin de relier le K_{model} au K^{trans} sous conditions que ces hypothèses pausées seront validées.

Remplaçons l'**équation II.17** dans l'**équation II.13**, le signal $RSST_1$ du tissu sera modélisé par :

$$S_{tissu}(t) = S_{iv} + S_L(1 - \exp(K_{model} * t) \qquad [\text{Eq. II.19}]$$

S_{iv} représente le volume sanguin (i.e V_p), S_L est le volume extravasculaire extracellulaire (i.e V_e) atteint par l'AC et K_{model} est le coefficient apparent d'accumulation de l'AC.

Lorsque la BHE est lésée le produit de contraste peut commencer à s'extravaser dès son arrivé dans le compartiment vasculaire. Dans ce cas le signal correspondant à M_Z/M_0 peut donc commencer à augmenter au delà de celui provenant du compartiment vasculaire avant que le régime stationnaire soit établi (i.e signal maximal dans le compartiment vasculaire). L'**équation II.19** ne prend pas en compte cet effet qui a pour conséquence de surestimer le TBVf. Le délai existant entre le moment d'arriver de l'AC dans la vascularisation (t_0) et le moment où la période du régime stationnaire dans le compartiment vasculaire est établie (t_{RSS1}) (**figure II.17 a, II.18**) doit être pris en compte dans le modèle mathématique. Ceci est pour prendre en compte le signal qui provient de l'AC accumulée dans le compartiment extravasculaire avant l'établissement du régime stationnaire (t entre t_0 et t_{RSS1}, **figure II.18**) et ainsi corriger la surestimation du TBVf.

Le modèle mathématique final est le suivant et est appliqué entre t_{RSS1} et t_{RSS2}:

$$S_{model} = S_{iv} + S_L[1 - \exp(-K_{model} * (t - t_0)] \qquad [\text{Eq. II.20}]$$

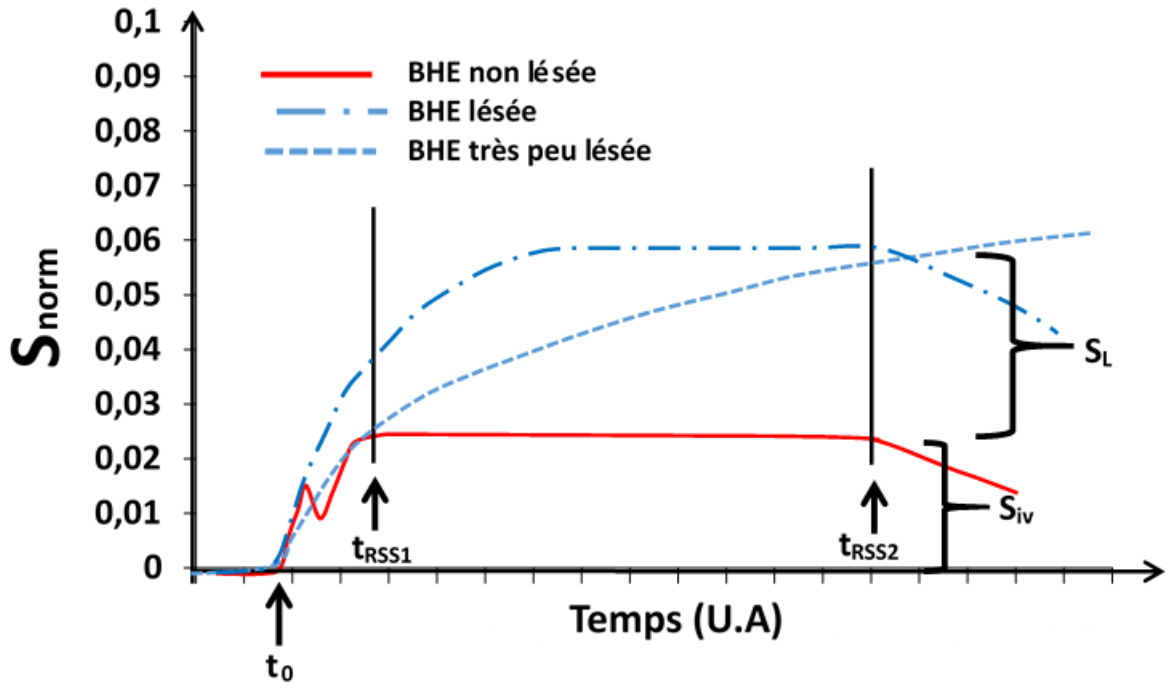


Figure II.18 : Evolution temporelle du signal $RSST_1$ en présence (lignes bleues) et en absence de l'extravasation de l'AC (ligne rouge). Deux types de BHE sont représentés : pour une BHE faiblement perméable l'aimantation du compartiment extravasculaire extracellulaire n'atteint pas son maximum durant le régime stationnaire contrairement au cas où la perméabilité de la BHE est élevée. Le signal est modélisé durant le régime stationnaire défini entre t_{RSS1} et t_{RSS2} (début et fin de plateau respectivement). Le volume vasculaire (S_{iv}) du tissu présentant une BHE lésée sera déduit à temps t_0 (temps d'arrivé de l'AC). S_{iv} permet de déduire le volume vasculaire et S_L le volume extravasculaire atteint par l'AC.

L'application expérimentale du modèle mathématique notamment le choix des paramètres d'entrée (comme le t_0, t_{RRS1} et t_{RSS2}) est décrite brièvement dans le chapitre suivant.

II.5. Discussion et conclusion

Objectif 1 : Amélioration de la méthode $RSST_1$

Les résultats expérimentaux réalisés avec la séquence IR-MDEFT 3D concernant la mesure de l'aimantation M_z/M_0 à BRS dans échantillons d'eau à différents temps T_1 sont en accord avec les simulations théoriques. Nous avons trouvé un signal maximal à $T_1 < 25$ ms et un signal résiduel de l'ordre de 3 % pour des T_1 longs. Ce signal résiduel peut introduire une sous estimation du VS de l'ordre de 3% environ.

Nous avons étudié et comparé les mesures du VSC et du RSB obtenues par les méthodes IR-FLASH 2D et IR-MDEFT 3D à BRS dans le striatum et dans la vascularisation cérébrale des souris et des rats. Deux mesures, parmi d'autres, ont été effectuées sur le même rongeur (1 souris et 1 rat) afin de diminuer les biais de mesure dû à la reproductibilité ou à la différence inter animaux. Nous avons montré que la méthode IR-MDEFT 3D est dotée d'un signal S_{norm} quantitatif moins biaisé par le signal résiduel (qui est dû aux caractéristiques intrinsèques de la séquence et aux effets du flux sanguin) que pour la séquence IR-FLASH 2D. Ceci a été validé par une mesure in vitro et par une mesure du VSC in vivo dans la macrovascularisation cérébrale des rongeurs qui a donnée des valeurs de VSC de 100% environ contrairement à la méthode IR-FLASH (entre 60 et 80%).

De plus, la séquence IR-MDEFT 3D est dotée d'un bruit plus faible et d'un RSB plus élevé que celui de la séquence IR-FLASH 2D. La méthode IR-MDEFT 3D est donc plus adaptée à la quantification du VSC notamment lors d'une application à HRS dans le sur cerveau de souris pour étudier la vascularisation hétérogène des glioblastomes.

Nous avons investigué deux moyens pour permettre à la méthode IR-MDEFT 3D d'acquérir des images plus résolues spatialement. Nous avons trouvé que la méthode de remplissage partiel du plan de Fourier est plus convenable pour nos besoins expérimentaux in vivo que la méthode de segmentation du plan de Fourier. Nous avons montré aussi que la méthode de remplissage partiel de l'espace k est plus avantageuse avec la séquence IR-MDEFT 3D.

La méthode MDEFT 3D permet aussi une résolution continue dans l'espace contrairement à la méthode IR-FLASH 2D dans la direction des coupes où il faut toujours respecter un certain gap entre les coupes pour ne pas avoir une contamination du signal des coupes adjacentes.

Pour ces raisons nous avons utilisé la séquence IR-MDEFT 3D avec un encodage de phase linéaire pour les acquisitions in vivo pour la suite des travaux de thèse. Nous n'avons pas pu effectuer une mesure expérimentale de l'aimantation M_Z/M_0 à HRS en utilisant le principe de remplissage partiel de l'espace k car le module de reconstruction d'image pour cette technique n'était pas installé sur notre imageur au moment des mesures.

En utilisant une acquisition 3D-IRM, le SNR a été considérablement augmenté et peut être amélioré en utilisant des bobines RF cryogéniques caractérisées par une sensibilité plus élevée (Finn and Edelman 1993) et / ou en utilisant une imagerie parallèle dans laquelle l'acquisition des données est accélérée. Une résolution spatiale plus élevée peut être obtenue en utilisant la segmentation de l'espace k (Larkman and others 2001; Schülen and others 1996) ou des développements technologiques récents tels que l'imagerie simultanée multi-tranches utilisant l'excitation multi-bande(Lu and others 2005; Schricker and others 2001).

Objectif 2 : Modèle mathématique

L'élaboration du modèle mathématique est basé sur un échange bi-compartimentale unidirectionnel du compartiment vasculaire vers le compartiment extravasculaire, de ce fait, 1) la validité de ce modèle est sur une courte durée après injection de l'agent de contraste car ce modèle ne prend pas en compte le retour de l'AC vers le compartiment vasculaire ni de l'élimination par le corps, 2) Le K_{model} n'est pas un paramètre physiologique directe mais il peut être relié à la perméabilité vasculaire K^{trans} déduite par le modèle Patlak (Patlak and others 1983) si les conditions et les hypothèses proposées dans l'**annexe X.4** sont valides. 3) S_L est le volume du compartiment extravasculaire extracellulaire atteint par l'AC.

L'application de ce modèle n'est valide que quand l'aimantation longitudinale intravasculaire est à l'équilibre thermodynamique appelé régime stationnaire t_{RSS} (entre t_{RSS1} et t_{RSS2}) et qui dure environ 50 à 100 s dans la vascularisation cérébrale chez la souris et le rat avec les doses de Gd-DOTA préconisées dans notre étude.

Si la durée t_{RSS} préconisée pour la modélisation est courte notamment si le signal provenant de l'aimantation extravasculaire extracellulaire n'a pas atteint son maximum (l'équilibre

thermodynamique) durant la période t_{RSS}, les valeurs de TBVf, K_{model} et S_L peuvent être moins fiable (Ceci est étudié dans le chapitre suivant).

Ce modèle mathématique prend en compte l'extravasation de l'agent de contraste, dès sa présence, avant que le régime stationnaire soit atteint, ainsi le TBVf est déduit à t_0 (temps d'arrivé de l'AC dans le compartiment vasculaire) ce qui évite la surestimation du TBVf.

L'imagerie IR-MDEFT 3D est une imagerie non instantanée, l'acquisition du signal est donc biaisée par le signal d'extravasation. Ceci est prononcé 1) pour des valeurs de T_1 intermédiaire (**figure II.16**) et 2) pour un nombre élevé de gradient de phase dans la direction de coupe. Ainsi, la quantification du TBVf est surestimée par le modèle mathématique.

L'avantage de la méthode $RSST_1$ et du modèle mathématique d'extravasation est que la méthode $RSST_1$ 1) est rapide, 2) ne nécessite pas la connaissance à priori de l'AIF et il n'y a plus besoin de convertir le signal IRM en concentration d'AC pour quantifier les paramètres vasculaires. Contrairement à DCE ou VASO-MRI (Barsky and others 1997), les paramètres d'acquisition appropriés rendent le signal $RSST_1$ indépendant du T_1 précis du sang. Avant l'injection de AC, aussi longtemps que $T_1 > T_{1cut}$, S_{pre} n'est pas affecté par les variations T_1 résultant de l'oxygénation(Perles-Barbacaru and Lahrech 2007) ou de l'hématocrite(Perles-Barbacaru and others 2012b). Après l'arrivée de l'AC, aussi longtemps que le sang $T_1 < T_{1c}$, S_{post} est directement proportionnel au volume du compartiment de distribution de l'AC. Par conséquent, le suivi de l'évolution de la vitesse de relaxation au cours du temps dans le sang, c'est-à-dire l'AIF, n'est pas nécessaire.

Après avoir abordé théoriquement les conditions d'application du modèle mathématique et ces limites, nous allons tester sa faisabilité et sa robustesse dans des mesures in vivo. La mise au point du protocole d'analyse utilisé pour modéliser le signal $RSST_1$ tumoral ainsi que les critères d'utilisation et d'acceptation des résultats issus du modèle mathématique seront abordés dans le chapitre suivant.

III. Chapitre 3 :

Modélisation du signal d'extravasation RSST1 et quantification des paramètres vasculaires tumoraux

III.1. Objectifs de l'étude

Dans le chapitre précédent, nous avons proposé un modèle mathématique pour quantifier les paramètres vasculaires tumoraux (TBVf, K_{model} et le volume d'extravasation S_L) dans le cas de l'extravasation de l'agent de contraste du compartiment vasculaire vers le compartiment extravasculaire extracellulaire. Dans ce chapitre, nous allons appliquer et étudier pour la première fois ce modèle mathématique dans le cas du modèle de gliomes de rat (C6) et aussi dans un modèle de xénogreffe humain (U87).

Les objectifs de cette étude sont les suivants :

1- **Objectif N°1** : Mise au point de l'analyse du signal IRM $RSST_1$ utilisant un protocole semi-automatique qui détermine les conditions d'application du modèle mathématique et qui applique des critères de rejet et d'acceptation des paramètres obtenus par ce modèle (TBVf (S_{iv}), K_{model} et le volume d'extravasation (S_L)) pour garantir la robustesse des résultats.

2- **Objectif N°2** : Validation du TBVf obtenu par le modèle mathématique dans le gliome C6, avec deux méthodes de référence précliniques mais non adaptées à l'utilisation clinique (méthode d'IRM de susceptibilité magnétique à l'état stationnaire (ΔR_2^*) et par immunohistologie).

L'acquisition des données expérimentales ainsi que l'analyse histologique ont été réalisées durant mon stage de Master 2. Le traitement de l'ensemble de données IRM (méthode $RSST_1$ et ΔR_2^*), la rédaction et la soumission de l'article scientifique concernant l'étude effectuée dans le gliome C6 implanté chez le rat (Sarraf and others 2015) a été fait durant la thèse.

III.2. Matériels et méthodes

III.2.1. Lignées cellulaires

La lignée C6: Ces cellules tumorales sont issues d'une tumeur gliale chez le rat (de la souche Wistar). Cette lignée a été induite par des injections de N-nitrosométhylurée (Benda and others 1968; Benda and others 1971). Ce modèle tumoral a des caractéristiques histologiques proches des glioblastomes (San-Galli and others 1989) et des astrocytomes notamment concernant son profil angiogénique (Barth 1998; Grobben and others 2002) d'où son premier intérêt dans notre étude préclinique. Ce qui a motivé en plus le choix de ce modèle tumoral dans cette étude est la possibilité de quantifier le TBVf de la tumeur C6 en utilisant la méthode d'IRM ΔR_2^*. Cette méthode d'IRM nécessite le confinement de l'agent de contraste dans la vascularisation tumorale lors de la quantification du TBVf (Tropres and others 2004). Le produit de contraste MoldayIon (BioPAL, Worcester, MA), en notre possession, répond à cette propriété dans le cas d'une tumeur C6 (Beaumont and others 2009; Julien and others 2004). Ceci permet de corréler le TBVf obtenu avec la méthode $RSST_1$ avec celui mesuré par la méthode d'IRM ΔR_2^*.

La lignée U87 : Ces cellules tumorales sont issues d'une tumeur de glioblastome humaine chez une patiente de type caucasienne de 44 ans (Fogh and others 1977). Ce modèle tumoral mime le profil angiogénique du glioblastome humain caractérisé par une densité vasculaire élevée et hétérogène, une prolifération rapide de la néovascularisation et une perméabilité vasculaire élevée (Candolfi and others 2007a; Strojnik and others 2006; Yu and others 2008b). De plus, ces cellules tumorales d'origine humaine expriment des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF humain ce qui fait de cette tumeur un bon modèle tumoral pour étudier l'angiogenèse et évaluer les traitements anti-angiogéniques utilisées en clinique comme le Bevacizumab (Pechman and others 2011; Yu and others 2008a). Les caractéristiques de l'U87 citées ci-dessus nous permettent d'étudier et d'appliquer le modèle mathématique dans des conditions proches des conditions cliniques chez les patients atteints de glioblastome. Ce modèle tumoral est utilisé pour cette étude et aussi dans l'étude présentée dans le chapitre suivant dédiée à l'évaluation du TBVf avant et après traitement anti-angiogénique par Bevacizumab.

L'U87 est plus angiogénique que le C6. Ces profils tumoraux distincts permettent d'évaluer la validité de notre modèle mathématique et de montrer son application dans différentes conditions d'angiogenèse.

III.2.2. Modèles animaux

Nous avons utilisé les rats de la souche Wistar (Laboratoire Charles River, Ecully FRANCE) comme hôte pour la lignée C6. Cette souche a été choisie car elle a montré une compatibilité avec la lignée C6 et ainsi une progression tumorale et une néovascularisation effective dans plusieurs études (Ohnishi and others 1991; San-Galli and others 1989; Valable and others 2008).

Nous avons utilisé les souris Athymic Nude foxn 1^{nu} (Laboratoire Harlan, Ganna FRANCE) comme hôtes pour la lignée U87. Ce modèle animal a été choisi car il présente un système immunitaire déficient permettant la prolifération de cette tumeur d'origine humaine. Cette lignée tumorale a montré une progression effective et une néovascularisation importante dans le tissu cérébral de ce modèle animal (de Groot and others 2010; Sun and others 2004b; Zhang and others 2012). Malgré ce fait, très peu d'études de la microvascularisation tumorale ont été effectuées par IRM chez la souris du fait de son petit volume cérébral. Plus d'études ont été effectuées dans le cerveau de rat Nude (Lemasson and others 2011; Pechman and others 2011; Pechman and others 2012). Il est intéressant d'évaluer notre méthode de quantification des paramètres vasculaires tumoraux dans des conditions de ce petit animal.

III.2.3. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires ont été obtenues auprès de la société ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia) ou du laboratoire LGC Standards (Molsheim, France). Dans nos laboratoires, les cellules ont été mise en culture dans une solution de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant du glucose (4,5 g/L), de la L-glutamine (1 mM), 10% de sérum de veau foetal, de penicillin/streptomycin (40 units/ml) et de puromycin (4 µg/ml). La solution a été maintenue à 37 °C dans une atmosphère à 95% d'humidité et contenant 5% de

CO_2. La suspension cellulaire finale a été ajustée dans une solution saline (PBS, Phosphate Buffered Saline) à une concentration de 10^5 cellules/ µl.

III.2.4. Agents de contraste

Dans cette étude nous avons utilisé le Gd-DOTA en injection i.v chez le rat et la souris pour modifier le signal $RSST_1$ provenant du compartiment vasculaire et extravasculaire extracellulaire cérébral (voir **chapitre 2 section II.2.3** pour plus d'information sur les caractéristiques du Gd-DOTA).

Le MoldayION (BioPAL, Worcester, MA) est un USPIOs (Ultra Small Iron Oxide Particle, nanoparticules contenant des cristaux d'oxides de fer supraparamagnétiques) caractérisé par une forte relaxivité transverse r_2 qui a des propriétés magnétiques similaires à AMI-227 (Perles-Barbacaru and others 2012b; Tropres and others 2004; Ungersma and others 2010). Nous avons utilisé le MoldayIon pour son effet T_2^*, sa demi vie longue dans le compartiment intravasculaire (Perles-Barbacaru and others 2012b) et son confinement intravasculaire dans le gliome C6 (Beaumont and others 2009; Julien and others 2004) pour la quantification du volume sanguin en utilisant la technique de susceptibilité magnétique.

III.2.5. Séquences IRM utilisées

Les acquisitions chez le rat et la souris ont été effectuées sur l'imageur Bruker Biospec USR A VIII à 4.7 T (voir **chapitre 2 section I.1.2**) équipé de ParaVison 5.1.

III.2.5.1. IR-MDEFT 3D

La séquence IR-MDEFT 3D (décrite plus en détail au **chapitre 2 section I.1.3.4**) est utilisée pour acquérir le signal $RSST_1$. Le **tableau III.1** ci-dessous résume les paramètres expérimentaux utilisés chez le rat et la souris pour les acquisitions décrites dans ce chapitre.

	Chez le rat		Chez la souris	
	M_Z	M_0 (i.e DP)	M_Z	M_0 (i.e DP)
TR (ms)	750	10 000	750	20 000
TE (ms)	1,2		2,2	
TR_{echo} (ms)	6,5		8,8	
RF α (°)	10			
T_{inv} (ms)	306	9 000	306	18 000
FOV (mm^3)	32 x 32 x 16		16 x 16 x 8	
RS (mm^3)	1 x 1 x 2		0,5 x 0,5 x 1	
NSeg	1			
NA	1			
NR	50 ou 650	1	50 ou 650	1
Tacq (min)	5 ou 65	1,33	5 ou 65	2,66

Tableau III.1 : Paramètres expérimentaux utilisés pour la mesure de l'aimantation longitudinale M_Z/M_0 avec la séquence IR-MDEFT 3D in vivo chez le rat et la souris. L'acquisition de la densité du proton (DP) représente l'aimantation M_0.

III.2.5.2. Multi Gradient Echo

La séquence Multi Gradient Echo (MGE) est utilisée pour mesurer le temps de relaxation transverse (T_2^*). Le volume sanguin (VS) peut être déduit par la technique de susceptibilité magnétique (Tropres and others 2004; Ungersma and others 2010) qui repose sur la mesure du T_2^* du milieu à deux états stationnaires de susceptibilité magnétique, avant et après injection d'un AC (super-)paramagnétique.

Cette technique est quantitative, ne repose pas sur la mesure de l'AIF et elle est dotée d'un RSB et d'une résolution spatiale élevés.

Les paramètres utilisés pour la séquence MGE sont: TR = 6 s, α = 90°, 30 valeurs de TE (3, 6, ..., 90 ms), NA = 2, FOV = 32 x 32 x 16 mm^3, RS = 0,25 x 0,5 x 2 mm^3. Tacq = 12 min 48 s.

III.2.5.3. Turbo RARE écho de spin

Nous avons utilisé la séquence Turbo RARE écho de spin pour acquérir les images anatomiques du cerveau de rats avec une pondération T_2 (T_{2W}) pour identifier les détails structurels et délimiter les ROIs.

Les paramètres utilisés pour cette séquence sont les suivants : $TE_{effective}$ = 33 ms, TR = 3 500 ms, RARE factor = 8, NA = 6, FOV = 32 x 32 x 24 mm^3, RS = 0,25 x 0,25 x 2 mm^3. Tacq = 5 min 36 s.

Les paramètres d'acquisition des images anatomiques T_{2W} du cerveau de souris sont les mêmes que dans le **chapitre II section II.2.4.3**.

III.2.6. Traitements des données IRM

Un programme Matlab a été développé pendant ma thèse permettant une analyse automatique voxel par voxel des paramètres vasculaires incluant le cas d'extravasation ou non de l'AC. L'analyse voxel par voxel est importante dans le cas des tumeurs avec des profils d'extravasation hétérogènes. Cette analyse a été effectuée durant le travail de thèse suite à la demande des rapporteurs qui ont examiné l'article publié Sarraf et al en 2015 (Sarraf and others 2015).

Les images ont été redimensionnées pour atteindre une RS de 0,125 x 0,125 x 2 mm^3. Ceci permet aux ROIs tumorales d'être définies manuellement sur les images anatomiques T_{2w} et puis d'être appliquées sur les différentes cartes paramétriques (cartographies du signal $RSST_1$, cartographies de VS).

III.2.6.1. Analyse du signal $RSST_1$

En absence d'extravasation du Gd-DOTA le VS a été calculé à partir du signal $RSST_1$ selon l'**équation I.18** (**chapitre 1**).

En présence d'extravasation du Gd-DOTA dans le compartiment extravasculaire le volume sanguin, la perméabilité des vaisseaux et le volume d'extravasation sont obtenus en modélisant le signal $RSST_1$ par le modèle mathématique proposé dans le **chapitre 2** (**équation II.20**) en utilisant l'algorithme de moindre carrés de type non linéaire « Levenberg-Marquardt » (Moré 2006) pour l'ajustement mathématique.

III.2.6.2. Analyse du signal de susceptibilité magnétique ΔR_2^*

Des travaux précédents (Tropres and others 2004; Ungersma and others 2010; Yablonskiy and Haacke 1994), ont montré que le volume sanguin peut être mesuré grâce au modèle suivant :

$$VS = \frac{3}{4\pi} \frac{\Delta R_2^*}{\gamma \Delta_{\chi eff} B_0} \quad \text{[Eq. III.1]}$$

Dans cette équation, γ représente le rapport gyromagnétique du proton (26,75 10^7 rad s^{-1} T^{-1}), B_0 le champ magnétique statique (4,7 T). $\Delta\chi_{eff}$ représente l'augmentation de la différence de susceptibilité magnétique entre le compartiment intra et extravasculaire induit par la présence du produit de contraste dans le compartiment vasculaire lors de l'injection de l'AC.

$\Delta\chi_{eff}$ est égal à 0,56 10^{-6} CGS à 2,35 T (donnée mesurée et utilisée dans des conditions similaires au laboratoire (Beaumont and others 2009; Payen and others 1998). $\Delta\chi_{eff}$ est inversement proportionnel au champ B_0 ($\Delta\chi_{eff} = \Delta M/B_0$, avec ΔM le changement de la magnétisation induit par l'USPIO, ΔM étant constant si $B_0 > 1$ T (Boxerman and others 1995). Pour B_0 = 4,7 T, le $\Delta\chi_{eff}$ est alors 0,28 10^{-6} CGS.

ΔR_2^* est la différence de relaxation transverse avant et après injection de l'AC ($\Delta R_2^* = R_2^*{}_{post} - R_2^*{}_{pre}$ avec $R_2^* = 1/T_2^*$).

III.2.6.3. Conditions d'exclusion des valeurs de VS

Les cartographies du volume sanguin ont été obtenues voxel par voxel par les deux méthodes IRM. Les pixels à l'intérieur des ROIs qui ont des valeurs de VS négatives avec les deux méthodes ou des valeurs de VS supérieures à 15 % (Beaumont and others 2009) avec la méthode de susceptibilité magnétique ont été exclus de l'étude. Ces valeurs peuvent correspondre à 1) un échec d'ajustement du modèle mathématique, 2) à une limitation du modèle appliqué, 3) à des pixels qui se trouvent dans des régions sans volume sanguin (proche du LCR ou hémorragie) et 4) à la limite de la théorie de linéarité entre le VS et ΔR_2^*.

Afin de pouvoir corréler voxel par voxel les valeurs de VS obtenues par les deux méthodes, les pixels exclues de l'une des cartographies sont exclus de l'autre cartographie. Le nombre de voxels exclus est donné en pourcentage des voxels des ROIs tumorales.

III.2.7. Histologie et immunohistologie

L'histologie est considérée comme une méthode de référence pour la quantification de la microvascularisation. Ici, nous avons eu recours à l'histologie et l'immunohistologie pour valider ex vivo nos mesures de VS. Les images de coloration et de fluorescence sont acquises avec un microscope de fluorescence (Nikon, Microscope Eclipse E600).

III.2.7.1. Coloration hématoxyline-Erythrosine

La coloration hématoxyline permet de colorer les noyaux des cellules en violet tandis que l'érythrosine colore le cytoplasme en rose. Cette double coloration (H&E) permet de mettre en évidence les cellules tumorales avec une densité cellulaire plus élevée que les tissus adjacents.

III.2.7.2. Marquage immunohistologique

Des anticorps monoclonaux de chèvre dirigés contre le collagène de type IV (référence 1340-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) dilués à 1/100 et des anticorps anti-IgG-chèvre d'âne conjugués avec de la fluorescéine (référence 705 095 147, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) dilués à 1/500 sont utilisés dans cette étude pour marquer le collagène IV de la lame basale qui entoure les cellules endothéliales des vaisseaux. Ces anticorps ciblent tous les vaisseaux, perfusés ou non.

III.2.7.3. Marquage Hoechst

L'Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) est un marqueur fluorescent des cellules endothéliales qui est injecté par voie intraveineuse in vivo et qui permet de marquer sélectivement les cellules endothéliales des vaisseaux perfusés.

III.2.7.4. Acquisition et traitement des données immunohistologiques

Les images composites (Hoechst, cube fluorescent : excitation λ=375/28 nm, dichroic 415 nm, émission λ=460/60 nm, Fluorescéine : excitation λ=480/30 nm, dichroic 505 nm, émission λ=535/45 nm) ont été obtenues à un grossissement de x10 (taille de pixel = 0,76 µm) en scannant les coupes de tissus deux fois (Perles-Barbacaru and others 2012a). Les images colorées à l'hématoxyline-éosine ont été acquises avec un grossissement de x2. L'analyse des images composites a été réalisée avec le logiciel Image J. La fraction de surface vasculaire a été utilisée comme substitut 2D pour le VS après sélection des vaisseaux perfusés en superposant les images binarisées Hoechst et anti-collagène IV (définissant les contours du vaisseau) et en utilisant l'opération booléenne ET (Perles-Barbacaru and others 2012a). Les étapes d'analyses sont les suivantes :

1- Séparation de l'image du collagène IV en trois couleurs (RGB)
2- Seuillage de l'image binaire pour améliorer l'intégrité des vaisseaux
3- Binarisation de l'image en couleur rouge
4- Binarisation de l'image Hoechst
5- Superposition des images binarisées
6- Application d'une opération booléenne ET
7- Calcul de la surface des vaisseaux
8- Calcul de la surface de la région d'intérêt
9- Calcul du VS en utilisant l'**équation III.2**

$$VS_{immunohistologie} = \frac{\sum surface\ des\ vaisseaux\ dans\ la\ ROI}{Surface\ ROI} \qquad \text{[Eq. III.2]}$$

L'analyse quantitative du VS a été effectuée dans la région tumorale et la région controlatérale symétrique (3 ROIs pour chaque région). L'analyse est effectuée sur 5 coupes de 10 µm (3 coupes centrales et deux coupes périphériques).

III.2.8. Analyses statistiques

La corrélation statistique entre le VS mesurée par histologie et par IRM a été déterminée avec le test de corrélation de Spearman en utilisant GraphPad Prism version 3.02 pour Windows, GraphPad Software, San Diego, Californie, USA, www.graphpad.com avec un seuil de significativité de 0,05. Les valeurs moyennes sont indiquées ± écart-type.

III.3. Protocoles expérimentaux

III.3.1. Etude in vivo

III.3.1.1. Implantation intracrânienne des cellules tumorales

L'implantation des cellules tumorales a été effectuée chez les rongeurs à l'âge de 6 à 7 semaines. Le poids des souris et des rats était 21 ± 2 g et 277 ± 5 g respectivement. Les rongeurs ont été anesthésiés avec de l'isoflurane à 2-3 % dans un mélange de 70% d'air et 30 % d'O_2. Les têtes ont été immobilisées dans un cadre stéréotaxique et un trou de 0,3 mm de diamètre a été percé dans le crâne à 2,2 mm ou à 3,5 mm à droite de la suture sagittale au niveau du bregma chez les souris et les rats respectivement (**Figure III.1**). Durant l'opération la température des rongeurs a été maintenue à 37,5 °C grâce à une plaque chauffante placée sous leur corps et le rythme respiratoire était compris entre 60 et 80 par minute. Une seringue de 10 µL (Hamilton Company, Reno, Nevada) a été utilisée pour injecter 5 x 10^5 cellules (volume total de 5 µL) dans le lobe frontal droit à une profondeur de 2,5 mm ou 5,5 mm par rapport à la surface durale chez les souris et les rats respectivement. Le temps d'injection était de 10 minutes (vitesse d'injection 0,5 µL/min), après quoi l'aiguille était retirée lentement pendant 5 minutes supplémentaires. L'ostéotomie a été fermée avec du cyanoacrylate, et après suture de la peau une infiltration locale de 2 mg de bupivacaïne a été réalisée pour réduire la douleur post-chirurgicale.

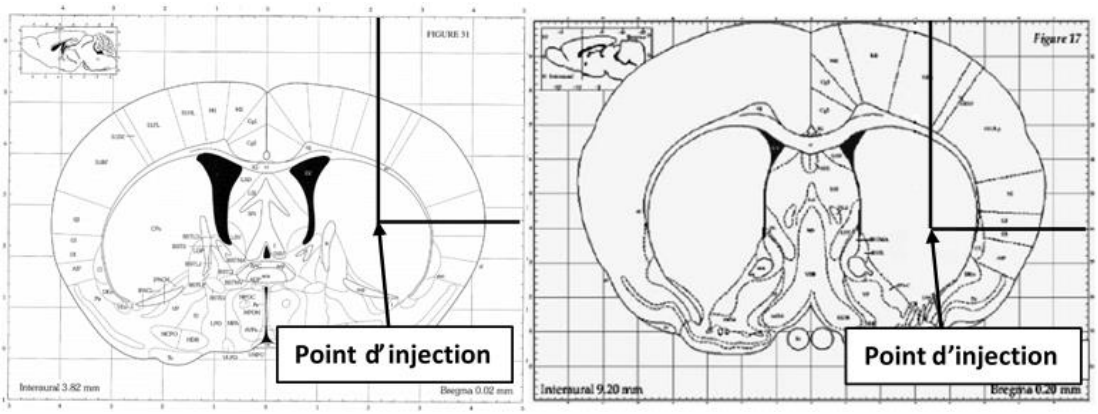


Figure III.1 : Coupes coronales du cerveau de souris (à gauche) et de rat (à droite) qui montrent la localisation du point d'implantation des cellules tumorales (d'après : (Franklin and George 2008; Paxinos and Charles 2007)).

III.3.1.2. Préparation des animaux pour imagerie IRM

La préparation des animaux pour l'imagerie IRM est décrite dans le **chapitre 2 section II.3.2.1**. L'injection de l'AC est réalisée comme est décrit dans le **chapitre 2 section II.3.2.2**. Concernant l'expérimentation dédiée à l'objectif 2 de ce chapitre, les rats ont été équipés de cathéters (cathéter BD Neoflon^{TM} 26 Ga) dans la veine et l'artère fémorale permettant à la fois, quand le rat était dans l'aimant, d'injecter l'AC et de prélever des échantillons de sang pour la mesure des gaz de sang respectivement (appareil : ABL715, Radiometer SAS, Neuilly-Plaisance, France).

III.3.1.3. Etude expérimentale IRM

Les rongeurs ont été randomisés en plusieurs groupes. Les groupes de souris N° 1, 2, 3 ont été utilisés pour l'évaluation in vivo du signal S_{norm} à différents temps de la progression tumorale et le groupe de rat N°1 pour évaluer le S_{norm} à J12. Ceci permettra de mettre au point le protocole d'analyse semi-automatique pour quantifier les paramètres de vascularisation (**objectif N°1**).

Le groupe de rat N°2 a été utilisé pour corréler les valeurs quantitatives du TBVf obtenues par la méthode $RSST_1$ et celles obtenues par la méthode d'IRM de susceptibilité magnétique et par histologie (**objectifs N°2**).

Ci-dessous le nombre de rongeurs et les dates d'imagerie pour chaque groupe :

- Les groupes de souris N°1, 2 et 3 ont été imagés à J9, J12 et J16 respectivement à partir de l'implantation tumorale (n = 3 pour chaque groupe).
- Le groupe de rats N°1 a été imagé à J12 à partir de l'implantation tumorale (n = 3).
- Le groupe de rats N°2 a été imagé à J10 et J12 à partir de l'implantation tumorale (n = 20).

La **figure III.2** montre le chronogramme expérimental des acquisitions IRM des groupes de souris N° 1, 2 et 3 et du groupe de rat N°1 (**figure III.2a**) et du groupe de rat N°2 (**figure III.2b**).

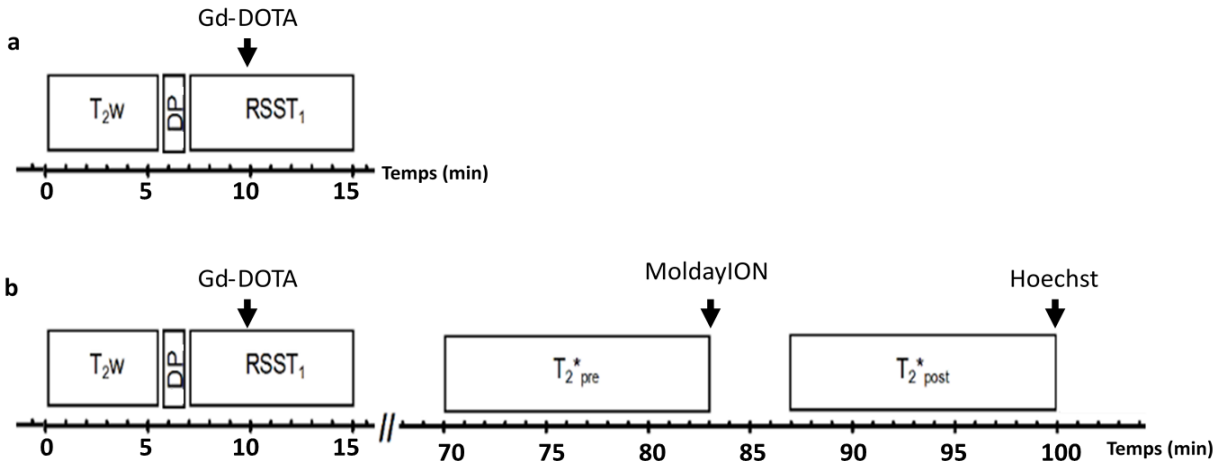


Figure III.2 : Chronogramme du protocole d'IRM pour répondre aux objectifs N°1 (a) et N°2 (b) de l'étude.

Tous les groupes ont l'imagerie anatomique T_2w suivie par l'imagerie IR-MDEFT 3D PD (i.e signal M_0) et puis par l'imagerie IR-MDEFT 3D dynamique. Le signal de cette dernière imagerie est acquis 3 min avant, pendant et au moins 5 min après l'injection du Gd-DOTA. Le Gd-DOTA a été injecté manuellement sous forme de bolus (temps d'injection inférieur à 2 s) à l'intérieur de l'aimant à une dose de 0,7 mmol/kg et 0,6 mmol en intraveineux (veine caudale) chez les souris et les rats respectivement (volume d'injection ≅ 210-240 µl).

Uniquement pour le groupe de rat N°2, ce protocole expérimental a été suivi de l'imagerie multi-écho de gradient pour la mesure de T_2^*. Le temps d'attente entre l'injection du Gd-DOTA (veine fémorale, cathéter BD Neoflon^{TM} 26 Ga) et la première imagerie T_2^* était d'une heure.

A la fin de la relaxométrie T_2^*, le MoldayION a été injecté à une dose de 0,2 mmol/kg (1,12 mL/kg, veine fémorale, cathéter BD Neoflon^{TM} 26 Ga). Les images servant à la relaxometrie T_2^* ont été acquises de nouveau 4 minutes après injection du MoldayION permettant ainsi une distribution homogène du MoldayION dans la vascularisation cérébrale du rat (Tropres and others 2004).

Chez le groupe de rats N°2 (objectif N°2), les gaz du sang artériel (P_aCO2, P_aO2) ont été mesurés à partir des prélèvements sanguins de 0,2 ml de l'artère fémorale avant l'acquisition des séquences d'IRM $RSST_1$ et de MGE et à la fin de la séquence MGE.

III.3.2. Etude ex vivo

III.3.2.1. Protocole immunohistologique

A la fin des expériences d'IRM, l'Hoechst-33342, a été injecté par voie intraveineuse (6 mg dans 0,2 ml de solution saline) une minute avant l'euthanasie des rats réalisée par décapitation sous anesthésie profonde à 5% d'isoflurane. Ensuite, les cerveaux ont été extraits, congelés instantanément dans de l'isopentane et conservés à -80 ° C pour cryosection ultérieure.

Des sections coronales de 10 µm d'épaisseur (Microm HM 560, Allemagne) ont été coupées à -18°C pour la coloration H&E et la coloration par immunofluorescence des microvaisseaux. Dix coupes sont réparties entre le début et la fin de la tumeur. Deux coupes adjacentes ont été utilisées pour la coloration H&E et pour le marquage par immunofluorescence.

Le protocole pour ce marquage (H&E) consiste à réaliser plusieurs bains et lavages des coupes de tissues. Ci-dessous les étapes suivies :

1- Hématoxyline de Harris (4 min)
2- Lavage à l'eau sous faible débit (5 min)
3- Acide-Alcool HCL 1% dans éthanol 95% (3 bains)

4- Lavage à l'eau sous faible débit (5 min)
5- Lavage à l'ammoniaque sous faible débit (2 min)
6- Lavage à l'eau sous faible débit (5 min)
7- Érythrosine (2 min)
8- Lavage à l'éthanol 100% (3 bains)
9- Lavage au toluène (2 min)

Ci-dessous les étapes suivies pour le marquage par immunofluorescent du collagène de type IV (Anti-collagène et anti-IgG) :

1- Lavage avec du PBS (0.01 M, 2 bains)
2- Trempage dans du paraformaldéhyde (4%, 10 min)
3- Trempage dans du PBS contenant du Tween (0.01%) et de l'albumine sérique bovine (BSA 3%) pendant 30 min.
4- Trempage pendant 12h à une température de 4° dans une solution de PBS-Tween (0.01%), du BSA (1%) et d'anticorps anti-collagène IV.
5- Lavage avec du PBS (5 bains)
6- Marquage avec l'anticorps secondaire anti-IgG conjugué avec de la fluorescéine (30 min)

III.4. Résultats

III.4.1. Objectif 1 : Mise au point du protocole d'analyse semi-automatique pour la modélisation du signal $RSST_1$ tumoral.

Le modèle mathématique proposé dans le **chapitre 2** (**équation II.20**) nécessite des paramètres d'entrée pour pouvoir modéliser le signal $RSST_1$ de la tumeur. Le choix judicieux de ces paramètres est nécessaire pour converger rapidement vers une solution non biaisée. La première étape est de fixer les critères de détermination de ces paramètres d'entrée. La deuxième étape est de déterminer les conditions d'application de ce modèle mathématique et les conditions d'acceptation des résultats obtenus.

III.4.1.1. Détermination des paramètres d'entrée du modèle mathématique

Nous avons séparé les paramètres d'entrée en deux groupes : les paramètres de premier ordre sont les t_0, t_{RSS1}, t_{RSS2} et les paramètres du second ordre sont S_{iv}, S_{ev} et K_{model}. Les critères pour déterminer ces paramètres sont élaborés d'une façon empirique et pragmatique en étudiant le comportement du signal $RSST_1$ issu de différentes régions cérébrales (sinus veineux, macro-vaisseaux, tissu sain controlatéral et tissu tumoral) chez la souris et le rat.

La **figure III.3** montre qu'avec la résolution temporelle des acquisitions $RSST_1$ (750 ms), l'AC arrive dans les macro-vaisseaux, le tissu controlatéral et dans la tumeur U87 en même temps à $t = t_0$. Le temps t_{RSS1} du début de plateau du signal $RSST_1$ débute aussi en même temps pour ces trois régions. Dans d'autre cas, le t_0, le t_{RSS1} et le t_{RSS2} ne sont pas les même pour ces différents régions (**figure III.4**).

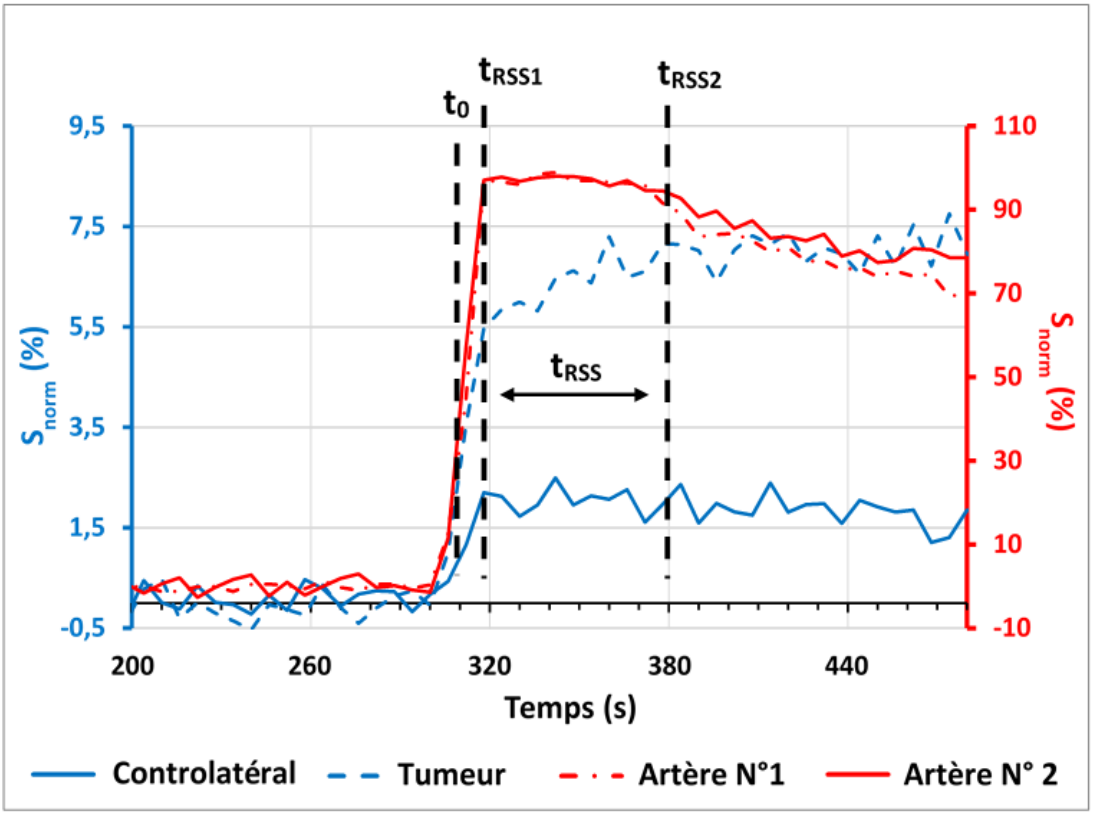


Figure III.3 : Signal S_{norm} des macro-vaisseaux (courbes rouges, axe de droite), du tissu sain et de la tumeur U87 (courbes bleues, axe de gauche) à J12 après implantation tumorale chez la souris. t_0 est le temps d'arrivé de l'AC dans la vascularisation cérébrale. t_{RSS1} et t_{RSS2} sont les temps du début et de la fin de la période steady state (t_{RSS}).

La figure III.4 montre que dans certains cas le rehaussement du signal $RSST_1$ apparait d'abord dans l'artère puis dans le tissu sain et tumoral en même temps et finalement dans les sinus veineux. De plus, la période t_{RSS} n'est plus la même entre ces différentes régions. Ceci a été constaté chez le rat et la souris. Dans ces cas les questions suivantes se posent :

1- Quelle est le meilleur choix pour déterminer t_0 et t_{RSS1} ?
2- Durant quelle période steady state on doit modéliser le signal $RSST_1$ de la tumeur ?

La réponse à ces deux questions doit garantir la modélisation du signal S_{norm} de la tumeur sous la condition steady state. Nous avons décidé de nous baser sur le signal $RSST_1$ du tissu controlatéral pour déterminer le t_0 et le t_{RSS1}. Ce choix est fait car :

En théorie, la microvascularisation tissulaire est atteinte par l'AC après son passage dans l'artère. Ceci est vrai pour le tissu sain et le tissu tumoral. Selon notre expérience, le t_0 du

signal $RSST_1$ tumoral est toujours plus proche de celui du tissu sain que de celui de l'artère (**Figure III.3** et **4**).

Le t_{RSS1} est déterminé par l'opérateur, ce temps correspond au premier signal $RSST_1$ après le premier passage du produit de contraste dans le tissu controlatéral.

Le temps t_0 est déterminé de façon automatique. t_0 correspond au temps du dernier signal S_{norm} supérieur à 2 x $\sigma_{Snorm\text{-}pré}$ avant le t_{RSS1} ($\sigma_{Snorm\text{-}pré}$ est l'écart type du signal $RSST_1$ avant injection du produit de contraste).

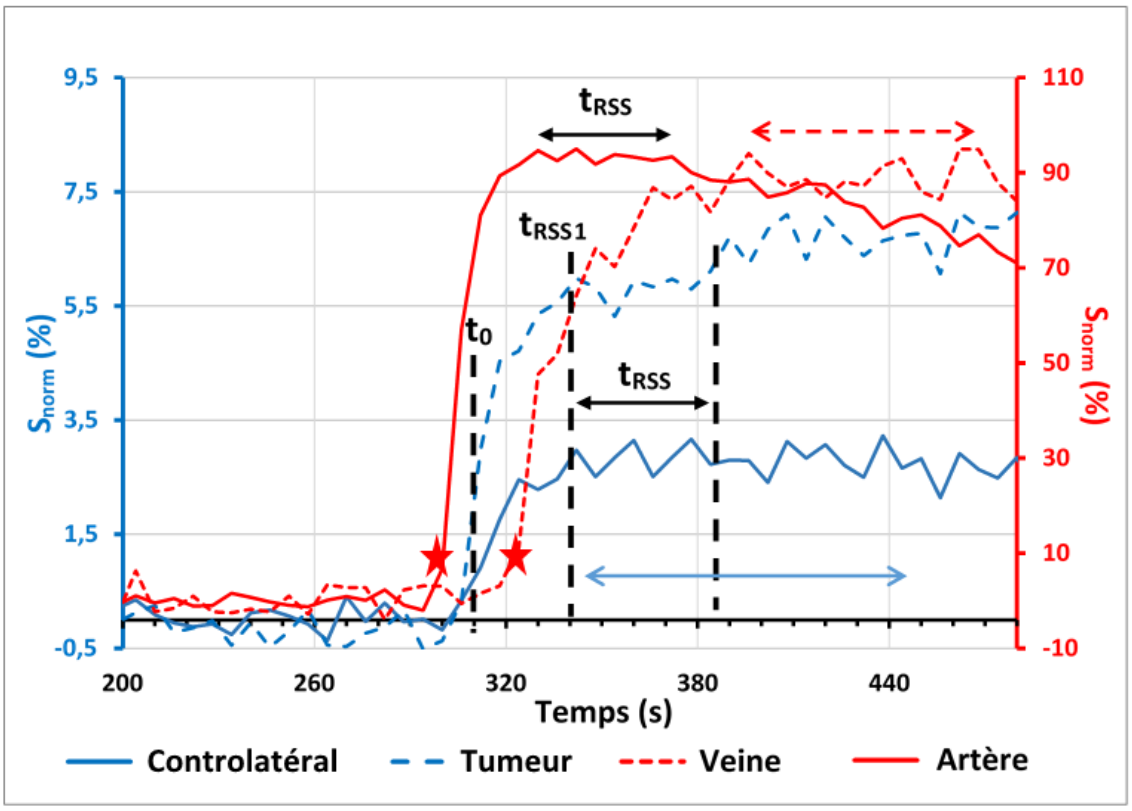


Figure III.4 : Signal S_{norm} dans le sinus veineux et dans un macro-vaisseau (courbes rouges, axe de droite), du tissu sain et de la tumeur U87 (courbes bleues, axe de gauche) à J12 après implantation tumorale chez la souris. L'arrivée du Gd-DOTA dans la veine et dans le macro-vaisseau est décalé (étoiles rouges) par rapport aux microvaisseaux (à t = t_0). La période steady state est différente et décalée entre les trois régions (flèche double sens : rouge pour la veine, bleu pour le tissu controlatéral et noir pour l'artère). La durée t_{RSS} utilisée pour la modélisation du signal tumoral est celle de l'artère, mais décalée pour coïncider avec le début du t_{RSS1} controlatéral.

On constate d'une façon qualitative d'après les **figures III.3** et **III.4** que la durée du plateau du signal $RSST_1$ des macro-vaisseaux, du sinus veineux et du tissu sain controlatéral n'est pas la même. Nous avons fait le choix de prendre toujours la durée du plateau la plus courte afin de garantir que la modélisation du signal $RSST_1$ de la tumeur se fait entièrement dans la condition steady state. Ci-dessous le logigramme suivi pour déterminer le dernier paramètre de premier ordre, le temps t_{RSS2}.

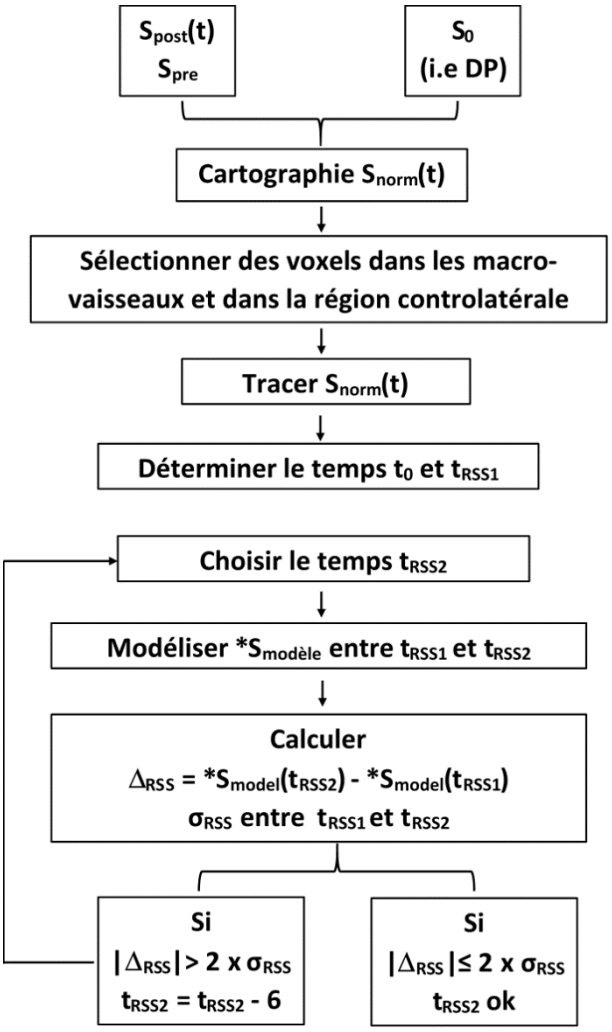


Figure III.5 : Logigramme d'analyse du signal $RSST_1$ pour déterminer le temps t_{RSS2}. $*S_{model}$ est le modèle mathématique exponentiel que nous avons choisi pour la modélisation du signal S_{norm} entre t_{RSS1} et t_{RSS2}. Le choix de ce modèle est expliqué dans la figure III.6.

Dans logigramme ci-dessus, nous avons mentionné l'utilisation d'un modèle mathématique (*S_{model}) pour modéliser le signal S_{norm} entre t_{RSS1} et t_{RSS2}. Le choix de ce modèle mathématique a été étudié. Nous avons testé deux approches mathématiques pour ce but :

- Un modèle linéaire y = -a x t + b. Les paramètres d'entré « a et b » représentent la pente de la droite et la valeur initiale de la droite à t_{RSS1} respectivement.
- Un modèle exponentiel y = b - exp (a x t). Les paramètres d'entré « a » et « b » représentent la valeur de la flexion de la courbe exponentielle vers l'axe des abscisses et la valeur initiale de la courbe à t_{RSS1} respectivement.

La **figure III.6** montre un exemple représentatif de la modélisation du signal $RSST_1$ d'un macro-vaisseau par les deux modèles durant la période steady state. Le résultat final trouvé est proche entre les deux méthodes mais le modèle exponentiel résulte en une période RSS plus courte que celle trouvée par le modèle linéaire (90 s versus 96 s) et répond mieux à notre attente.

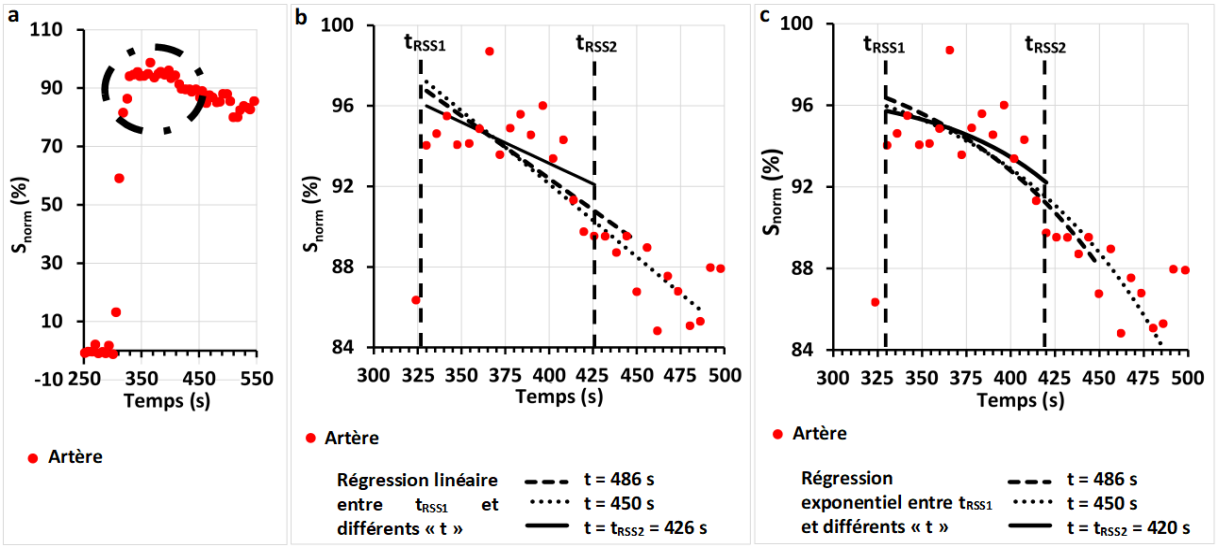


Figure III.6 : Modélisation du signal S_{norm} dans un macro-vaisseau pour déduire la fin de la période steady state correspondant à t_{RSS2}. S_{norm} de l'artère avant et après injection du produit de contraste (a). Démonstration de la modélisation de S_{norm} avec le modèle linéaire (b) et le modèle exponentiel (c) entre t_{RSS1} = 330 s et trois temps « t » différents. Δ_{RSS} est ≤ $2\sigma_{RSS}$ quand t_{RSS2} = 426 s versus 420 s pour le modèle linéaire et exponentiel respectivement (avec $\Delta_{RSS\text{-linéaire}}$ = 3,91 ; 2 x $\sigma_{RSS\text{-linéaire}}$ = 4,47 ; $\Delta_{RSS\text{-exponentiel}}$ = 3,51 ; 2 x $\sigma_{RSS\text{-exponentiel}}$ = 3,91).

Contrairement aux paramètres du premier ordre, le choix des paramètres du second ordre peut être effectué d'une façon approximative car le choix de ces paramètres n'affecte pas les résultats mais permet à l'algorithme de converger rapidement vers la solution.

Le choix de ces paramètres du second ordre est approximatif et se base sur le signal tumoral et sur les paramètres d'entrée du premier ordre. La **figure III.7** schématise la façon de déterminer les paramètres initiaux S_{iv}, S_L et K_{model} et ci-dessous les étapes à suivre :

1- S_{iv} est déterminé en faisant l'intersection de la droite « Y » (qui représente la régression linéaire du signal S_{norm} de la tumeur durant la durée RSS) et la droite parallèle à l'axe des abscisse à $t = t_0$.
2- K_{model} est la pente entre la droite X et Y
3- S_L est la différence entre le maximum du signal S_{norm} de la tumeur (droite Z) et S_{iv}.

Une première modélisation sera réalisée avec ces paramètres approximatifs en utilisant le modèle mathématique (**équation II.20 du chapitre 2**). Le résultat de S_{iv}, S_L et K_{model} obtenu après modélisation sera utilisé comme paramètres d'entrée pour modéliser le signal S_{norm} tumoral.

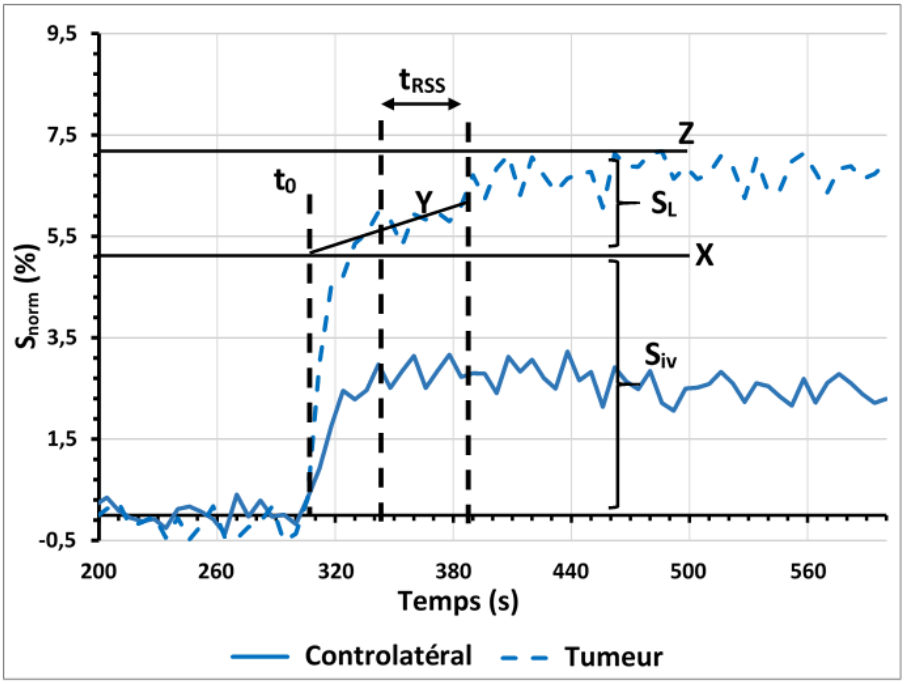


Figure III.7 : Schéma représentatif de la détermination approximative des paramètres initiaux de seconde ordre S_{iv}, S_L et K_{model}. Ces paramètres sont déterminés en se basant sur le signal tumoral et les paramètres d'entrée du premier ordre. Ici S_{iv} = 5,1 %, S_L = 2 %, K_{model} = 0,015 s^{-1}.

III.4.1.2. Conditions d'application du modèle mathématique et critères d'accéptation des résultats.

Les figures III.8, III.9, III.10 et III.11 montrent les profils du signal S_{norm} les plus représentatifs dans les différentes régions tumorales (C6 et U87) et péritumorales chez le rat et la souris à différents temps de progression tumorale. Ces figures permettent d'apprécier qualitativement le niveau du signal S_{norm} à t_{RSS1} (i.e ~ VS) et la pente du signal S_{norm} à différents stades de croissance tumorale (**figure III.9, III.10 et III.11**). La pente du signal S_{norm} est un paramètre qualitatif qui est relié directement à la vitesse de captation de l'AC.

La **figure III.8** montre que le signal S_{norm} chez la tumeur C6 est hétérogène dans la région tumorale ceci indique une hétérogénéité du VS et de la perméabilité vasculaire dans cette région. La tumeur qui présente une BHE lésée témoigne d'un VS plus élevé que celui du tissu sain controlatéral. Le comportement du signal S_{norm} de la région péritumorale est homogène, présente une extravasation faible et le VS est de l'ordre de grandeur de la région controlatérale.

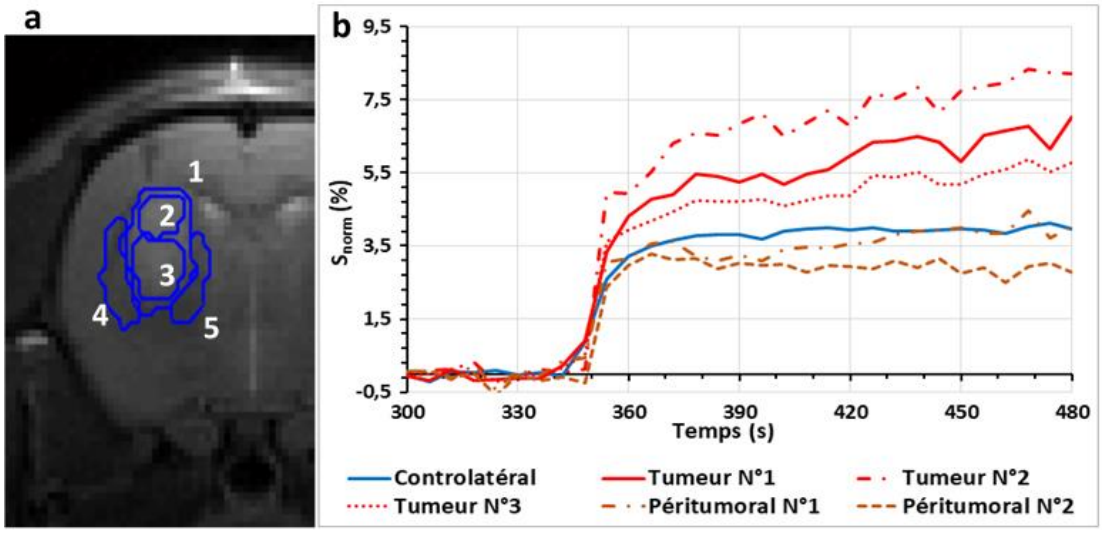


Figure III.8 : Exemple représentatif du Signal S_{norm} tumoral et péritumoral de la tumeur C6 à J12. a) Image anatomique T_2 indiquant les différentes ROIs étudiées (1, 2 et 3 représentent les régions tumorales, 4 et 5 représentent le tissu péritumoral N°1 et N°2), b) Signal S_{norm} des différentes ROIs comparés au signal issu de la région controlatérale.

La **figure III.9** montre un signal S_{norm} hétérogène dans la tumeur U87 à J9 avec un TBVf élevé et une extravasation faible de l'AC. Le comportement du signal S_{norm} dans la région péritumorale est homogène, avec absence d'extravasation de l'AC et le VS est de l'ordre de grandeur de celui de la région controlatérale.

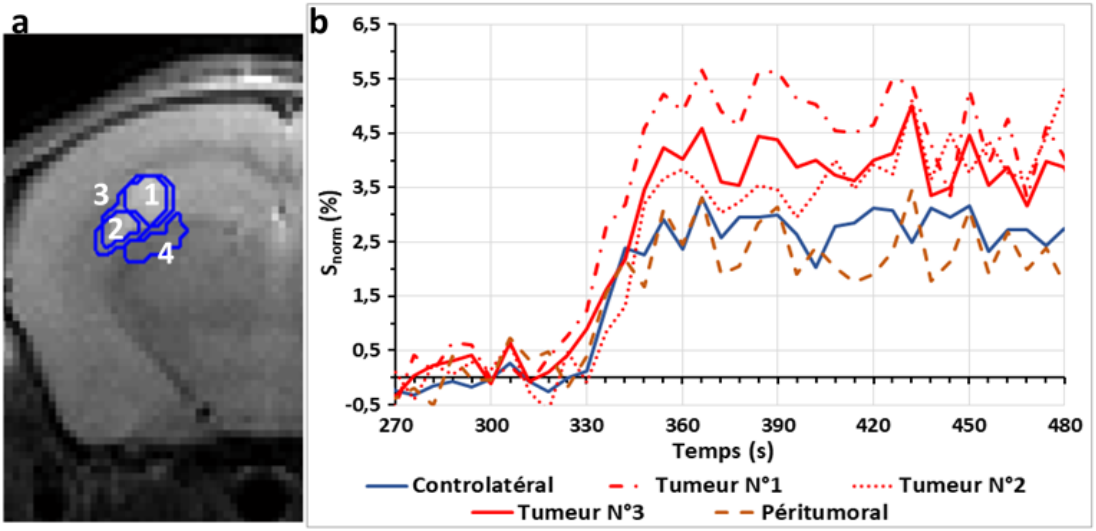


Figure III.9 : Exemple représentatif du Signal S_{norm} tumoral et péritumoral de la tumeur U87 à J9. a) Image anatomique T_2 indiquant les différentes ROIs étudiés (1, 2 et 3 représentent les régions tumorales. 4 représente le tissu péritumoral), b) Signaux S_{norm} des différentes ROIs comparés au signal issu de la région controlatérale.

A J12 (**figure III.10**), le signal S_{norm} est plus hétérogène dans la tumeur U87 avec un TBVf et une extravasation de l'AC plus élevée qu'à J9. Le signal S_{norm} de la région péritumorale est hétérogène avec une extravasation de l'AC faible et un VS élevé.

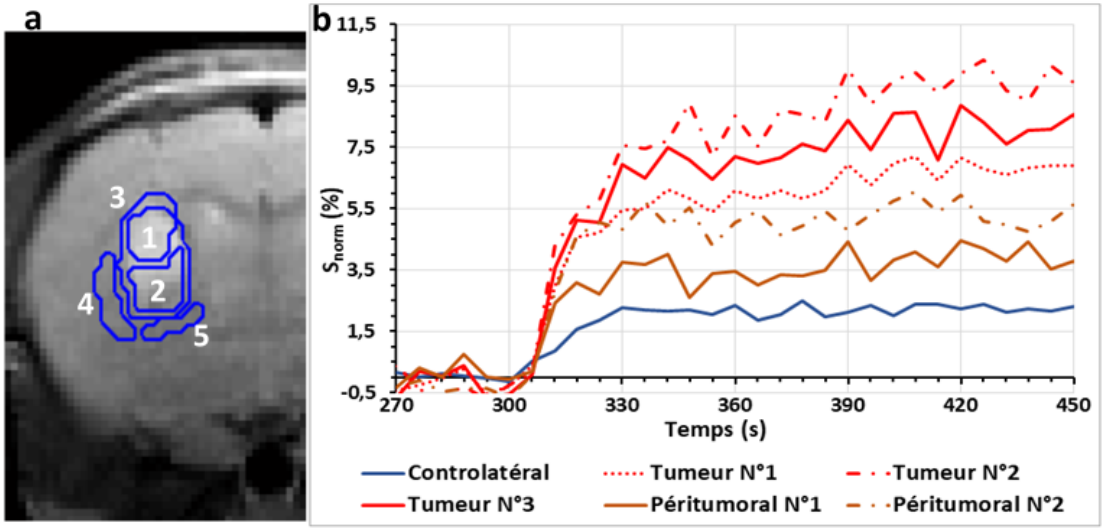


Figure III.10 : Exemple représentatif du signal S_{norm} tumoral et péritumoral de la tumeur U87 à J12. a) Image anatomique T_2 indiquant les différentes ROIs à étudier (1, 2 et 3 représentent les régions tumorales. 4 et 5 représentent le tissu péritumoral N°1 et N°2), b) Signal S_{norm} des différentes ROIs comparés au signal issu de la région controlatérale.

A J16 (**figure III.11**), le signal S_{norm} est hétérogène dans la région tumorale et péritumorale dont l'extravasation de l'AC est plus élevée que celle présente à J12. Dans la région tumorale, le VS est de même ordre de grandeur que celui observé à J12 tandis que dans la région péritumorale il est plus faible qu'à J12.

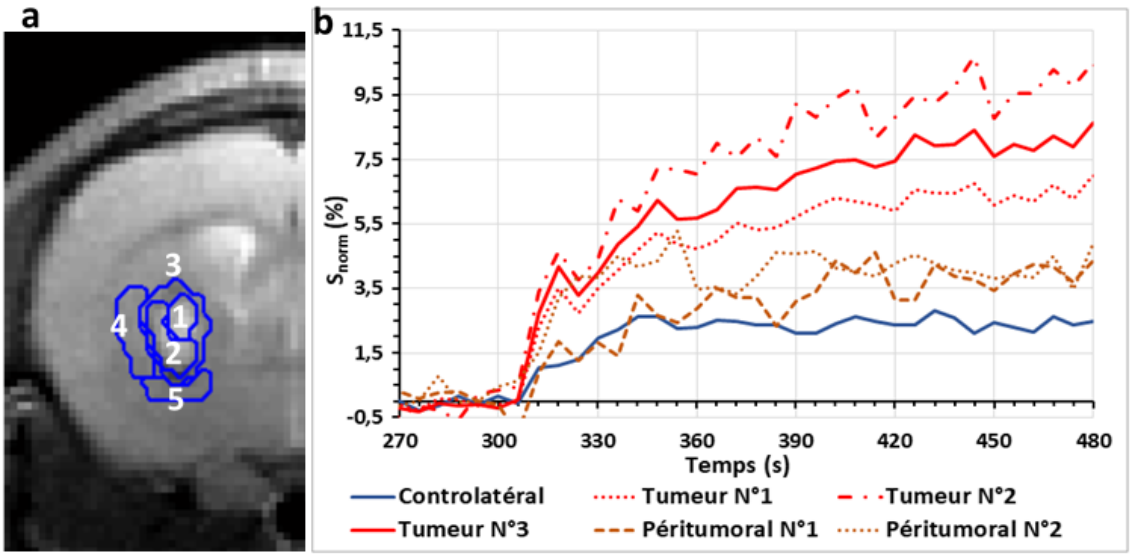


Figure III.11 : Exemple représentatif du Signal S_{norm} tumoral et péritumoral de la tumeur U87 à J16. a) Image anatomique T_2 indiquant les différentes ROIs étudiées (1, 2 et 3 représentent les régions tumorales. 4 et 5 représentent le tissu péritumoral N°1 et N°2), b) Signal S_{norm} des différentes ROIs comparés au signal issu de la région controlatérale.

Nous pouvons résumer les différents comportements du signal S_{norm} (taux du signal, i.e approximation du VS, et l'amplitude de la pente, c'est-à-dire l'état de la BHE) dans le cas de la tumeur C6 et de la tumeur U87 par :

1- Le profil temporel du signal S_{norm} est très hétérogène dans les tumeurs C6 et U87 quelque soit le stade de la progression tumorale.
2- Dans la tumeur U87, le taux du signal S_{norm} est plus élevé et ceci quel que soit le stade de la progression tumorale par rapport à la tumeur C6 à J12.
3- Dans la région péritumorale, le signal S_{norm} indique une extravasation plus élevée pour la tumeur U87 que pour la tumeur C6. L'extravasation augmente avec la progression tumorale de l'U87. Néanmoins certaines régions péritumorales de la tumeur U87 présentent une absence d'extravasation.
4- Dans la région péritumorale de la tumeur C6 le signal S_{norm} indique un VS similaire à celui de la région controlatérale, tandis que le VS dans cette région est très élevé dans la tumeur U87.

La méthode $RSST_1$ révèle différents états de perméabilite de la BHE dans les tumeurs C6 et U87. L'ampleur de la lésion de la BHE est hétérogène entre chaque tumeur et dans la tumeur elle-même et dépend de l'état de la microarchitecture tumorale (stade de la progression tumorale, période de normalisation des vaisseaux, destruction des vaisseaux …).

Face à ces différents profils du signal, il est nécessaire de déterminer une approche pour détecter la présence de l'extravasation indépendamment de l'état de la tumeur et des régions étudiées.

Nous proposons et évaluons ci-dessous deux approches mathématiques pour détecter la présence de l'extravasation (t_0, t_{RSS1} et t_{RSS2} doivent être déjà déterminés).

1- <u>Approche N°1:</u>

Si $|\Delta_{RSS}|$est > 2 x $\sigma_{RSS\text{-}tumeur}$ et si $\Delta_{RSS} > 0$, l'extravasation est considérée présente

Avec

$\Delta_{RSS} = S_{model}(t_{RSS2}) - S_{model}(t_0)$ déterminé par l'**équation II.20 du chapitre 2.**

$\sigma_{RSS\text{-}tumeur}$ est l'écart type des valeurs du signal S_{norm} entre t_{RSS1} et t_{RSS2}.

Nous avons choisi de calculer $\sigma_{RSS\text{-}tumeur}$ à partir du t_{RSS1} et non pas à t_0 car les valeurs de S_{norm} entre t_0 et t_{RSS1} ne sont pas toujours dans la condition steady state.

2- <u>Approche N°2 :</u>

L'approche N°2 suit le même raisonnement que l'approche N°1 mais prend en compte le σ_{RSS} de la région controlatérale ($\sigma_{RSS\text{-}controlatéral}$) et non de la tumeur ($\sigma_{RSS\text{-}tumeur}$). Ceci aboutit à un σ_{RSS} petit permettant à l'approche N°2 d'être plus sensible à l'extravasation.

Nous avons trouvé que dans le cas du rat avec une tumeur C6, les deux approches réussissent à identifier les régions lésées de la BHE. Dans le cas de la tumeur U87 implanté dans le cerveau de la souris, le signal S_{norm} d'extravasation étant plus bruité et par conséquent le $\sigma_{RSS\text{-}tumeur}$

étant plus grand, l'approche N°2 identifie mieux les régions lésées de la BHE et ceci dans les différentes régions tumorales et péritumorales (**figure III.12**).

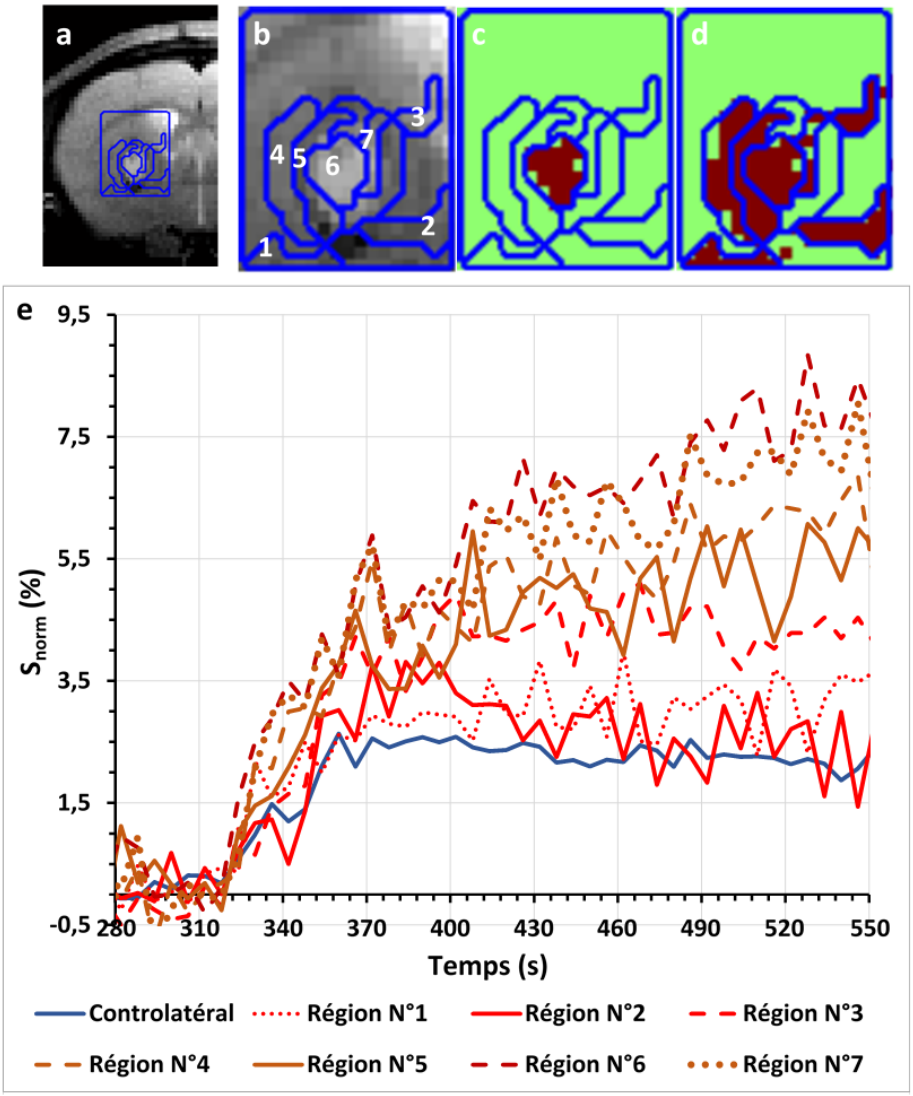


Figure III.12 : Exemple représentatif de la détection de l'extravasation dans différentes zones de la région tumorale et péritumorale de l'U87 en comparant l'approche N°1 et 2. a) Image anatomique T_{2w} indiquant la tumeur et les différentes zones tumorales et péritumorales à étudier, b) agrandissement de la région à étudier dont les zones sont numérotées de 1 à 7. Résultats issus de l'approche N°1 (c) et de l'approche N°2 (d) représentés en mode binaire indiquant la présence (en rouge) et l'absence (en vert) de l'extravasation de l'AC, e) signal S_{norm} indiquant la présence de l'extravasation de l'AC des régions étudiées.

Une fois que l'absence ou la présence de l'extravasation est déterminé voxel par voxel, les paramètres de vascularisation sont déduits par **l'équation I.18 ou II.20** respectivement. Ci-

dessous le logigramme qui résume l'analyse du signal $RSST_1$ pour l'obtention des cartographies des paramètres de vascularisation (S_{iv}, K_{model} et S_L).

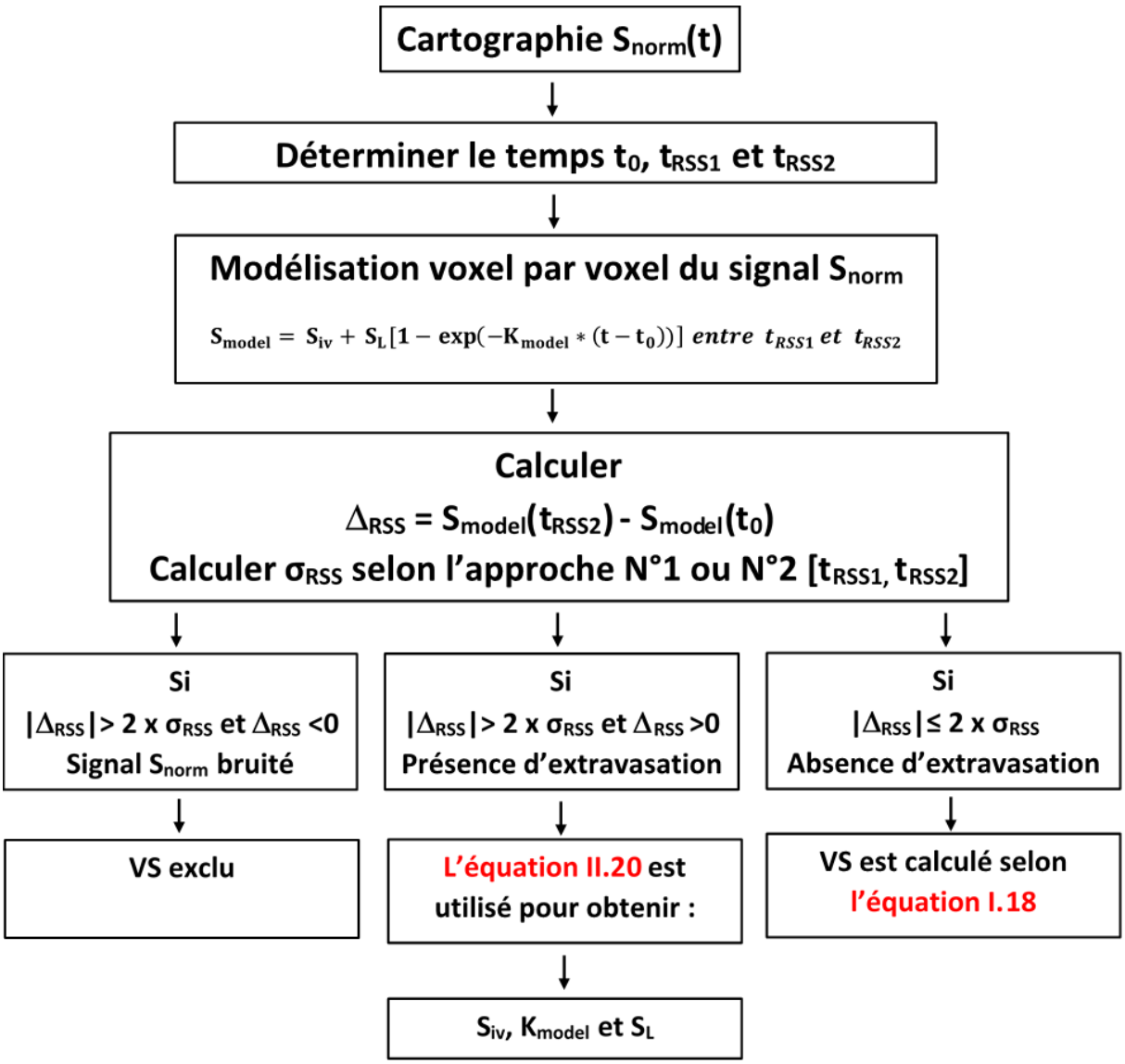


Figure III.13 : Résumé des étapes d'analyse du signal $RSST_1$ implémenté dans un programme sous Matlab pour l'obtention du VS ou les paramètres du modèle mathématique.

III.4.2. Objectifs 2 : TBVf de la tumeur C6 obtenu par le modèle mathématique versus la méthode de susceptibilité magnétique et l'histologie.

La **figure III.14** montre un exemple représentatif du signal S_{norm} dans les régions de la tumeur C6 et dans le péritumoral avant et après injection du Gd-DOTA. Nous pouvons apprécier sur les profils temporels du signal S_{norm} une variabilité du degré de l'extravasation de l'AC et du volume sanguin pour des voxels individuels dans la tumeur et sur la périphérie tumorale (**figure III.14 b**).

Dans un premier temps, nous avons modélisé le signal S_{norm} de la ROI tumorale en entier (volume de la ROI = 31,6 mm^3, **figure III.14 a, c**). Le plateau RSS et le temps t_0 sont défini en se basant sur le signal S_{norm} du sinus veineux et de la région controlatérale. Durant la durée RSS le volume sanguin dans la veine est de 99 % ± 1,67 %. Le TBVf déduit du modèle mathématique est de 4,2 % contre 2,75 % ± 0,16 % dans le tissu sain controlatéral de la tumeur.

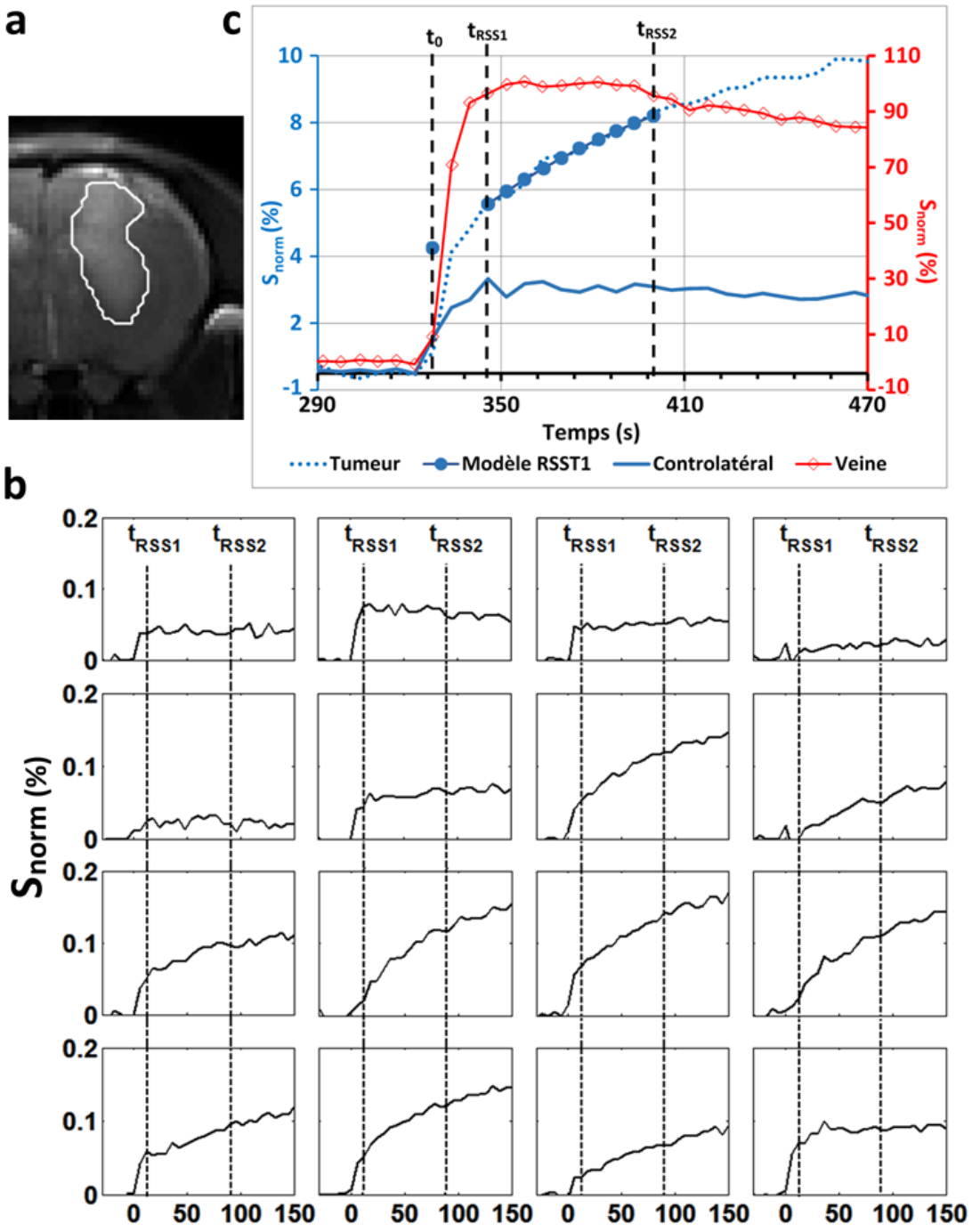


Figure III.14 : S_{norm} de la tumeur C6 à J12. a) image anatomique T_{2w} de l'hémisphère tumoral du cerveau de rat (la tumeur est contourée en blanc). b) Signal S_{norm} de quelques voxels tumoraux et péritumoraux en fonction du temps. c) Comparaison du signal S_{norm} de la ROI tumorale, du tissu sain controlatéral (courbes bleu, axe principale) et du sinus veineux (courbe rouge, axe secondaire). Le modèle mathématique est appliqué au signal S_{nom} tumoral durant la période RSS (marqueur cercle bleu). Le TBVf est ainsi extrapolé à t_0 (TBVf = 4,2 %).

Comte-tenu de l'hétérogénéité spatiale du profil S_{norm} dans la tumeur, nous avons quantifié dans un second temps le TBVf voxel par voxel dans la tumeur (**tableau III.2**). Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les valeurs de TBVf mesurées par la méthode $RSST_1$ pour les ROIs versus voxel par voxel (Coefficient de Spearman r = 0,95, P_{value} = 0,001). L'écart entre les deux méthodes d'analyse semble augmenter lorsque l'hétérogénéité des valeurs de VS est élevée (tumeur N° 6 et 7).

TBVf %	N° du rat							
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8
ROI	3,75	3,37	3,53	3,5	2,39	3,91	3,79	3,14
Voxel par Voxel	3,72 ± 1,95	3,68 ± 2,14	3,83 ± 1,99	3,52 ± 1,1	2,77 ± 1,61	4,43 ± 2,73	4,23 ± 2,26	2,82 ± 1,61

Tableau III.2: Valeurs de TBVf mesuré à partir du signal S_{norm} de la ROI tumorale (1ere ligne) et à partir du signal S_{norm} de chaque voxel individuel puis représenté en valeur moyenne et écart type (deuxième ligne).

Nous avons comparé le résultat obtenu par la méthode $RSST_1$ à celui obtenu par la méthode ΔR_2^* (**figure III.15**). Lors de la quantification du TBVf avec les deux méthodes, les mesures moyennes des gaz du sang corrigées de la température sont les suivants : P_aCO_2 = 43,2 mm Hg ± 4 mm Hg et le P_aO_2 = 120,5 mm Hg ± 6 mm Hg.

La **figure 15 b, c** montre les cartographies du TBVf de la même tumeur C6 représentée auparavant (**figure III.14**) par les deux méthodes. Les résultats montrent que les valeurs de TBVf et leures hétérogénéitées spatiales sont comparables entre les deux méthodes. La **figure III.15 d** montre une distribution (voxel par voxel) similaire des valeurs de TBVf obtenues par les deux méthodes pour toutes les tumeurs.

Pour cette étude (n=8) le volume tumoral moyen est de 22,4 mm^3 ± 5,8 mm^3. Au total, 3,5 % des voxels tumoraux sont exclus lors de la quantification du VS par la méthode $RSST_1$ (à cause d'une extravasation très élevée de l'AC constatée sur le profil S_{norm}, 2) ou d'une absence de rehaussement du signal) et 2,5 % lors de la quantification du VS par la méthode ΔR_2^*.

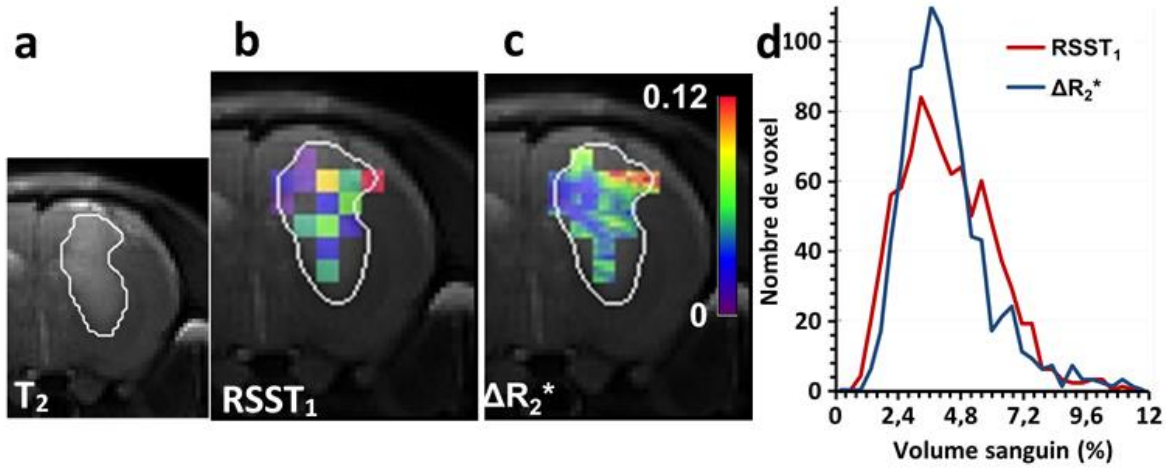


Figure III.15 : TBVf du gliome C6. a) Image anatomique T_{2w} de l'hémisphère tumorale du cerveau de rat (tumeur est contourée en blanc). b et c) Cartographie du TBVf de la ROI tumorale obtenue par la méthode $RSST_1$ (b) et par la méthode ΔR_2^* (c) superposées sur l'image anatomique T_2. d) Histogramme du TBVf de tous les rats (n = 8).

La **figure III.16** montre des images histologiques provenant du même rat que sur les **figures III.14** et **III.15**, illustrant la morphologie vasculaire dans la tumeur et le tissu cérébral controlatéral afin de quantifier le VS.

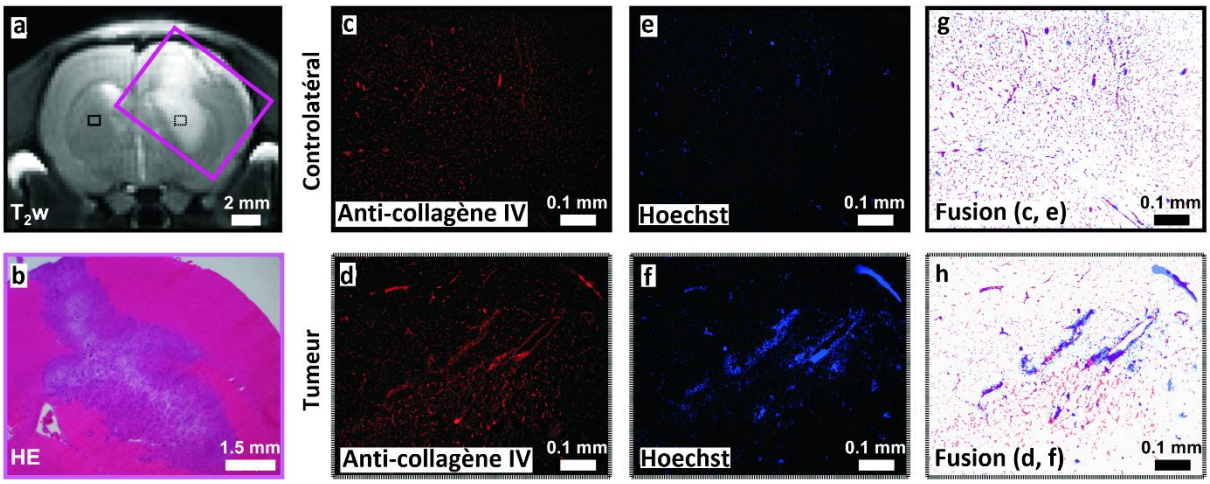


Figure III.16 : Exemple représentatif des images immunohistologiques utilisées pour détecter le volume tumoral et pour quantifier le VS. a) Image anatomique T_{2w} de l'hémisphère tumorale du cerveau de rat. Les rectangles sur cette imagerie montrent la localisation de la coloration en H&E (b), et la localisation de la coloration immunohistochimie de l'architecture vasculaire de la région saine controlatérale (c, e, g) et du gliome C6 (d, f, h). L'anticorps contre le collagène IV (c, d) marque tous les vaisseaux en rouge, l'Hoechst (e, f) marque les vaisseaux perfusés. g et h sont les images des sections vasculaires résultant d'un traitement d'image de (c, e) et (d, f) respectivement (seuillage, binarisation et fusion). g et h représentent uniquement les vaisseaux perfusés utilisés pour la quantification du VS.

La **figure III.17** résume les valeurs de VS des ROIs tumorales et du tissu sain controlatéral mesurées avec les trois méthodes $RSST_1$, ΔR_2^* et par himmunohistologie et montre la corrélation de VS entre les trois techniques.

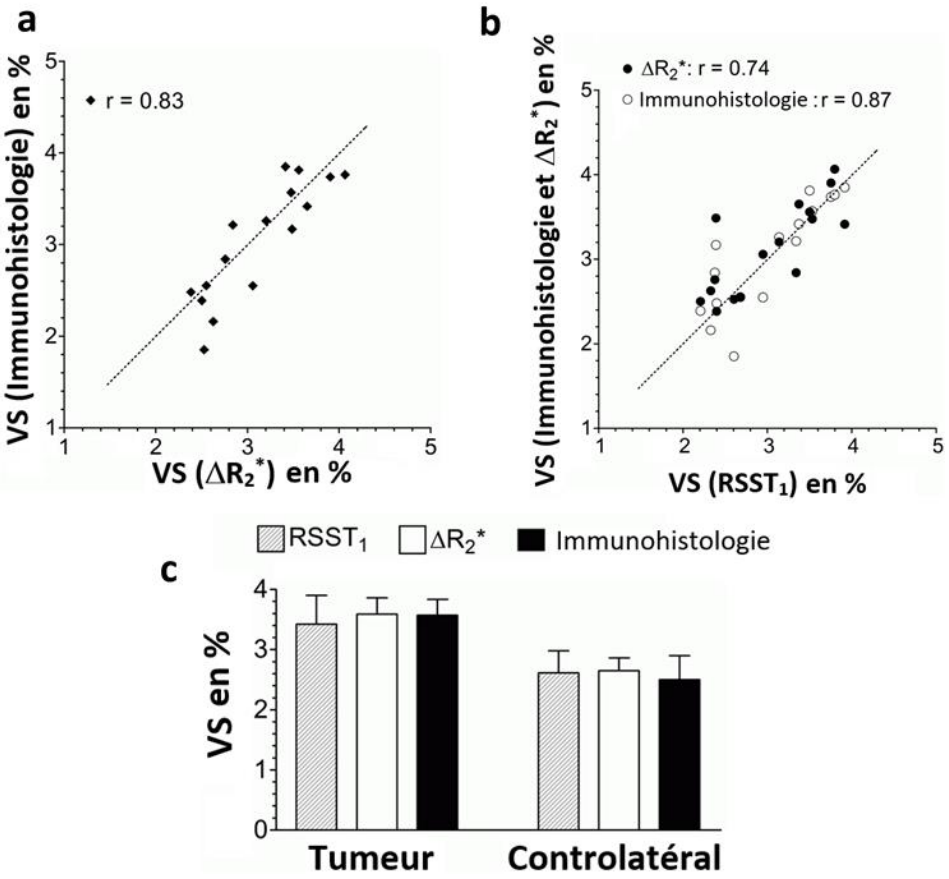


Figure III.17 : Valeurs de VS obtenues dans la tumeur et dans le tissu sain controlatéral. Corrélation des VS obtenus par les techniques ΔR_2^* et par histologie (a), $RSST_1$ et par ΔR_2^* ainsi que par $RSST_1$ et par histologie (b). Histogramme de barre qui montre des valeurs de VS (n = 8) sensiblement équivalents entre les trois techniques dans la tumeur ainsi que dans le tissu sain controlatéral (P ≥ 0,2). « r » est le coefficient de Spearman.

III.5. Discussion et conclusion

Objectif N°1 : Détermination des paramètres d'entrée du modèle mathématique et détermination des conditions d'application de ce modèle et des critères d'acceptation des résultats.

Les paramètres d'entrée du modèle mathématique sont déterminés d'une façon empirique et pragmatique en se basant sur le signal d'IRM $RSST_1$ dans les différentes zones vasculaires et du tissu cérébral (intra-tumoral, péritumoral, controlatéral). La détermination de ces paramètres en se basant sur des conditions expérimentales apporte une information personnalisée et un degré d'exactitude élevé.

Malgré ce fait, des améliorations peuvent être envisageables lors de la détermination des paramètres d'entrée.

Un premier point à améliorer est la détermination du t_{RSS1} qui est faite par l'utilisateur. Ce temps t_{RSS1} peut être déterminé plus objectivement d'une façon automatique en modélisant le signal $RSST_1$ du premier passage de l'AC et puis en évaluant les conditions qui peuvent déterminer la fin du premier passage qui peut correspondre au t_{RSS1}.

Nous pouvons aussi optimiser le choix du t_{RSS2} (plus court) si nécessaire en utilisant un critère plus strict telle qu'une variation Δ_{RSS} bien inférieure à $|2 \times \sigma_{RSS}|$. Ceci garanti la modélisation du signal $RSST_1$ tumoral dans la condition steady state. Un t_{RSS2} plus précoce ne doit pas affecter les résultats obtenus par le modèle mathématique.

La **figure III.18** montre qu'un intervalle RSS au-delà de 60 secondes est préférable pour dériver, dans nos conditions expérimentales, des paramètres vasculaires reproductibles.

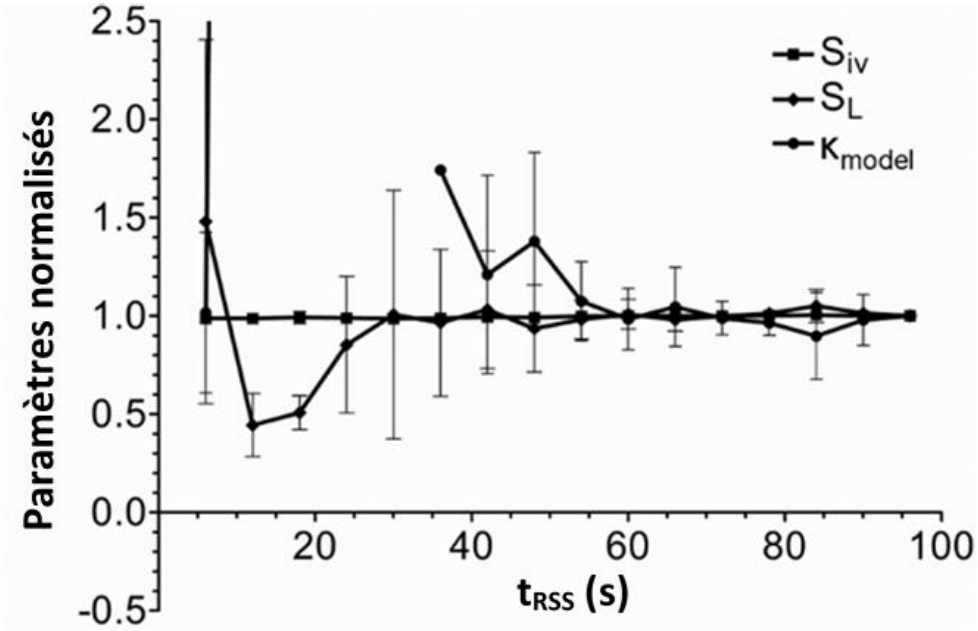


Figure III.18: Robustesse de l'estimation des paramètres du modèle en fonction de la durée RSS. Les paramètres du modèle S_{iv}, S_L et κ_{model} sont normalisés par la valeur obtenue en utilisant la durée maximale disponible du RSS. Les valeurs S_{iv}, S_L et κ_{model} sont représentées par une moyenne ± écart-type (n = 8). Tous les paramètres convergent pour une durée RSS ≥ 60 s.

Une autre approche permet de garantir la modélisation du signal $RSST_1$ sous la condition steady state sans raccourcir le temps t_{RSS2}. De nouveaux AC avec une relaxivité plus élevée et une demi-vie sanguine prolongée, comme le gadofoveset trisodium (Lin and others 1997) cliniquement approuvés peuvent être avantageux car ils prolongent l'intervalle RSS. La tumeur ou le tissu d'intérêt pourrait également avoir une perméabilité vasculaire réduite à ces AC facilitant l'analyse du signal. Le Gd-DOTA a été utilisé dans nos études pour montrer la faisabilité de la méthode avec un des AC de faible poids moléculaire les plus utilisés en clinique. Des doses élevées de Gd-DOTA ont été nécessaires dans cette étude préclinique à champ magnétique élevé afin d'obtenir un intervalle RSS vasculaire plus long que le premier passage.

Un choix discutable concerne l'application des paramètres d'entrée du premier ordre, déterminés grâce au tissu controlatéral et aux macro-vaisseaux, au signal $RSST_1$ tumoral. En effet, le signal $RSST_1$ dans la tumeur peut avoir des paramètres d'entrée différents de ceux trouvés dans le tissu controlatéral et dans les macro-vaisseaux. Ceci est inévitable et est aussi constaté par exemple avec la méthode dynamique DCE ; la quantification des paramètres de

perfusion nécessite la détermination de l'AIF souvent effectuée dans un endroit éloigné du site de la tumeur (**Annexe X.1**).

A titre d'exemple, si la durée t_{RSS} est plus longue que celle dans la tumeur 1- en absence d'extravasation ceci peut aboutir à une sous estimation du TBVf et 2- en présence d'extravasation ceci peut aboutir à une sur-estimation du TBVf.

Comme pour toutes les techniques dynamiques, si l'extravasation de l'AC est très élevée et la durée t_{RSS} est courte (le steady state ne couvre pas le temps d'extravasation) ceci aboutit à une sous estimation du TBVf. De plus, le paramètre S_L ne reflète plus le volume extravasculaire extracellulaire touché par l'agent de contraste.

Malgré l'injection du produit de contraste en bolus, l'arrivé de l'AC dans les macro-vaisseaux peut être retardée. Ce retard est représenté par le délai ($t_{délai}$, **figure III.19**) entre le moment de l'arrivé de l'agent de contraste à (t_0) et le moment du début du plateau (t_{RSST1}). Ce délai peut être différent de celui déterminé dans la partie controlatérale et dans les macrovaisseaux et peut être aussi variable dans la tumeur elle-même. Cette difficulté est aussi rencontrée avec la technique DSC (**annexe X.2**). Plus ce délai est long (bolus retardé, i.e t_{RSS} court) moins l'application du modèle mathématique est fiable et cela peut conduire à une sur- ou une sous estimation des paramètres de la vascularisation tumorale.

La **figure III.19** montre exemple de retard de bolus ($t_{délai}$ d'environ 36 s) où l'extravasation de l'AC est forte (et/ou le volume extravasculaire extracellulaire est faible). Ces conditions impliquent l'application du modèle mathématique entre t_{RSS1} et t_{RSS2} où le signal $RSST_1$ tumoral a déjà atteint son maximum. Ceci aboutit à une surestimation du TBVf et une sous-estimation du paramètre K_{model}.

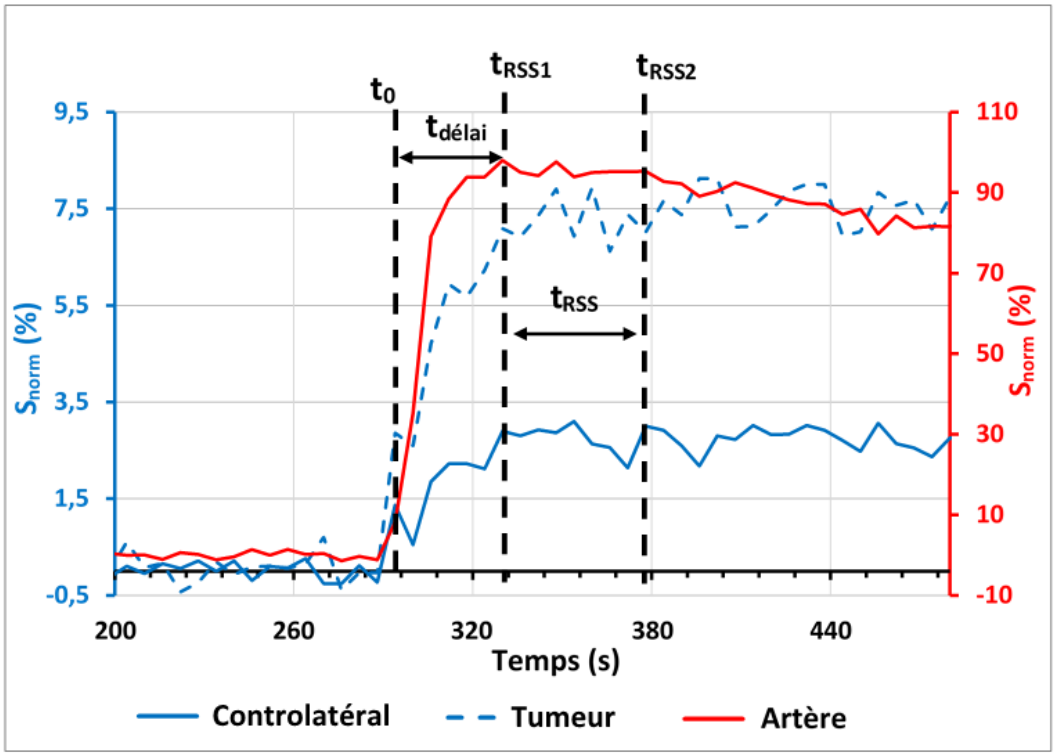


Figure III.19 : Signal S_{norm} des macro-vaisseaux (courbes rouges, axe de droite), du tissu controlatéral et de la tumeur U87 (courbes bleues, axe de gauche) à J12 après implantation tumorale chez la souris. Le temps $t_{délai}$ est indiquant un retard du bolus.

Enfin les paramètres d'entrée de premier ordre (t_0, t_{RSS1}, t_{RSS2}) doivent être déterminés d'une façon judicieuse et avec prudence car ils affectent les valeurs de vascularisation tandis que les paramètres d'entrée de second ordre (S_{iv} S_L K_{model}) ne font qu'améliorer la vitesse de convergence de l'algorithme de calcul.

Il a été nécessaire de déterminer d'une façon objective la présence ou l'absence d'extravasation de l'AC afin d'appliquer ou non le modèle mathématique au signal $RSST_1$.

Nous avions proposé une première approche qui consistait à étudier pour chaque voxel la présence ou l'absence d'extravasation de l'AC en se basant sur le bruit du voxel lui-même (approche N°1 : $\sigma_{RSS\text{-}tumeur}$). Nous avons constaté que cette approche personnalisée fonctionne dans le cas d'une tumeur C6 dans le cerveau du rat mais pas dans le cas de la tumeur U87 dans le cerveau de souris. Ceci peut être dû :

1) Au bruit faible dans le cerveau de rats et élevé dans le cerveau de souris (le volume du voxel est plus grand chez le rat, voir aussi RSB dans le **chapitre 2**). Le bruit élevé dans le cerveau de souris ne permet pas de détecter l'extravasation de l'AC.

2) Au taux d'extravasation qui est pris en compte dans le calcul du $\sigma_{RSS\text{-}tumeur}$ dans le voxel tumoral. En effet, plus l'extravasation est rapide, ce qui est le cas dans la tumeur U87, plus le $\sigma_{RSS\text{-}tumeur}$ calculé est élevé. Ceci rend dans ce cas l'approche N°1 insensible à la détection de l'extravasation dans le cas de l'U87 dans le cerveau de souris.

Nous avons ensuite proposé une deuxième approche moins personnalisée, car elle se base sur le bruit dans une ROI dans le tissu controlatéral (approche N°2 : $\sigma_{RSS\text{-}controlatéral}$), mais plus sensible à l'extravasation de l'AC. Cette approche permet 1) de ne pas prendre en compte l'ampleur de l'extravasation dans le calcul du bruit 2) d'avoir un bruit faible car le volume d'une ROI est plus grand que celui d'un voxel.

A noter que la détection de l'extravasation de l'AC dépend aussi du Δ_{RSS} qui est différent pour chaque type de tumeur et hétérogène en inter et intratumoral.

Nous avons étudié cas par cas et sur plusieurs ROIs ces conditions afin de valider nos deux approches.

<u>Objectif N°2 : Validation du TBVf de la tumeur C6 obtenu par la méthode $RSST_1$ avec la méthode de susceptibilité magnétique et par histologie.</u>

Le but de cette étude était de valider le BVf dérivé de la modélisation de l'augmentation du signal $RSST_1$ lors de l'extravasation de l'AC. Bien que les modèles de gliome de rat C6 utilisés dans cette étude pourrait ne pas imiter avec précision toutes les caractéristiques des gliomes cliniquement rencontrés, il a été choisi pour sa perméabilité vasculaire bien caractérisée aux ACs. En particulier, le modèle C6 est connu pour avoir un système vasculaire perméable au Gd-DOTA tandis que l'USPIO reste intravasculaire, ce qui permet une quantification du BVf en utilisant la technique d'IRM ΔR_2^* à l'état stationnaire. Nous avons ensuite corrélé les valeurs de TBVf obtenues par IRM à celles obtenues par études histologique.

La méthode $RSST_1$ a un SNR intrinsèquement faible puisqu'elle n'acquiert que les signaux des compartiments contenant l'AC, en particulier chez les rongeurs, étant donné le plus petit VS

et la petite taille de voxel (voir **chapitre 2**). Pour surmonter cette limitation, la faisabilité de la méthode a été démontrée à une résolution spatiale relativement faible. Nous aurions pu travailler avec un champ magnétique plus fort (> 4,7 T) pour augmenter le SNR, mais nous ne disposions pas du matériel adéquat.

Pour cette étude il n'y avait pas besoin d'un recalage d'image entre les imageries car les rats n'avaient pas bougé dans l'aimant entre les acquisitions. Seul un rééchantillonnage a été effectué afin de pouvoir translater les ROIs d'une imagerie à l'autre. Nous avons exclu de l'étude 7 rats qui ont eu un écart de valeurs de $PaCO_2$ et PaO_2 de plus de 10 % entre le début et la fin des acquisition IRM. En effet, ces paramètres sont connus pour affecter la mesure du TBVf (Payen and others 1998; Perles-Barbacaru and Lahrech 2007; Tropres and others 2004). Nous avons également exclu 3 rats en raison d'une absence de signal $RSST_1$ (échec d'injection de l'AC) et enfin, 2 rats sont mort suite à l'injection de l'USPIO. Le nombre total éligible de l'étude est n = 8.

Nous avons comparé dans un premier temps le résultat de TBVf obtenus par la méthode $RSST_1$ voxel par voxel avec le TBVf par ROI. Nous n'avons pas trouvé une différence significative. Nous avons considéré plus judicieux de corréler les données de TBVf obtenus par ROIs avec les deux méthodes de référence car le recalage d'image n'a pas été effectué entre les trois méthodes de mesure notamment celle des mesures histologiques. Nous n'avons pas trouvé de différence de TBVf entre les trois méthodes comparées.

Le VS moyen de la région controlatérale saine est en accord avec les valeurs obtenues dans les études précédentes (Lemasson and others 2009; Perles-Barbacaru and others 2008; Valable and others 2008). Dans la région tumorale les valeurs trouvées dans la littérature (Lemasson and others 2009; Tropres and others 2004; Valable and others 2008) sont plus faibles (TBVf de C6 ≅ 2,5 %) que celles trouvées dans cette étude ; ceci lié au stade avancé de la tumeur dans ces études. Nous avons mesuré le VS à J10-J12 (volume tumoral de 22,4 mm^3 ± 5,8 mm^3) tandis que les autres études (Lemasson and others 2009; Tropres and others 2004) ont mesuré le VS à un stade plus avancé (J > 17) dont le volume tumoral est de l'ordre de 75 mm^3. A ce stade tumoral, il a été constaté la présence d'une nécrose tumorale (validée par étude histologique) contrairement à ce qui est décrit dans l'étude de Valable et al (Valable

and others 2008) dans la tumeur C6 à J11. La présence de la nécrose pourra expliquer les valeurs basses du VS intratumoral.

Bien que la méthode d'IRM ΔR_2^* et la méthode histologique sont des méthodes de références et sont validées dans la littérature pour la quantification du TBVf, elles ont des inconvénients par rapport à la méthode d'IRM $RSST_1$. A titre d'exemple, la mesure du TBVf par la méthode ΔR_2^* dépend de l'architecture vasculaire car elle est sensible aux différences de susceptibilité aux frontières vasculaires contrairement à la méthode d'IRM $RSST_1$ puisque le signal extravasculaire est supprimé avec cette méthode.

De plus, dans notre étude nous nous sommes basés sur une approximation du $\Delta\chi_{eff}$ pour quantifier le TBVf. La détermination du $\Delta\chi_{eff}$ expérimentalement nécessite une acquisition supplémentaire sur des échantillons de sang (méthode invasive), ou dans un gros vaisseau sanguin par IRM (mais limité par l'effet du volume partiel).

Enfin, aucun AC similaire approuvé en clinique, qui reste confiné dans le compartiment vasculaire et qui possède une longue demi-vie vasculaire n'était disponible pour notre étude.

Concernant l'étude histologique du TBVf, il existe deux points faibles : 1) La fenêtre de seuillage est déterminée d'une façon manuelle par l'opérateur. 2) Le nombre faible de ROIs étudiées qui ne couvrent pas toute la tumeur. Les coupes acquises et les ROIs utilisées ne peuvent pas fidèlement représenter l'hétérogénéité tumorale.

Nous n'avons pas évalué les valeurs de S_L car la durée du plateau RSS ne permet pas au signal d'atteindre son amplitude maximale lors de l'extravasation. Dans le cas d'une faible extravasation ou d'un intervalle RSS trop court, la valeur obtenue pour le S_L est moins fiable et ne représente pas exactement le volume extravasculaire extracellulaire.

En conclusion, nous avons proposé et évalué une méthodologie d'analyse semi-automatique du signal $RSST_1$ dans la tumeur. Une équivalence quantitative et une corrélation linéaire ont été démontrées entre le VS dérivé du signal $RSST_1$ et celui obtenu par la méthode d'IRM stationnaire ΔR_2^* et par histologie tant dans la tumeur que dans le tissu cérébral controlatéral.

Ce travail démontre également que le TBVf peut être quantifiée avec un AC de faible poids moléculaire, cliniquement approuvé, simplifiant la transposition de la méthode en clinique. La

faisabilité de la quantification directe du VS avec Gd-DOTA dans les contraintes cliniques a déjà été démontrée (Perles-Barbacaru and others 2015).

La sensibilité de la méthode $RSST_1$ aux modifications du VS cérébral a déjà été démontrée en conditions d'hypercapnie (Perles-Barbacaru and Lahrech 2007) et avec vasodilatateur acétazolamide (Perles-Barbacaru and others 2013). Une étude pilote présentée par Sarraf et al (Sarraf and others 2015) a également montré le potentiel du modèle mathématique à quantifier le VS sous différents degrés de perméabilité vasculaire en utilisant deux ACs de différents poids moléculaire: le Gd-DOTA et le P750 (Fonchy and others 2001).

Suite aux résultats encourageants obtenus dans les chapitres 2 et 3 nous allons étudier dans le chapitre suivant la sensibilité et la reproductibilité de la méthode $RSST_1$ dans la tumeur U87 implantée dans le cerveau de la souris sous traitement anti-angiogénique (pour suivre la réponse tumorale). Nous allons corréler les résultats du TBVf obtenus par la méthode $RSST_1$ à ceux obtenus par une méthode de microscopie 3D ex vivo. Cette méthode permet de se rapprocher mieux des conditions de l'IRM et permet de s'affranchir de quelques points faibles de l'imagerie histologique 2D.

IV. Chapitre 4 :

$RSST_1$ pour le suivi quantitatif des paramètres vasculaires : reproductibilité de la méthode et sensibilité aux effets du Bevacizumab. Comparaison avec une analyse par microscopie à deux photons.

IV.1. Objectifs de l'étude

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté la quantification du TBVf de la tumeur gliale C6 en utilisant la méthode $RSST_1$. Nous avons eu recours à des méthodes d'imagerie 2D (l'IRM-ΔR_2^* et l'immunohistochimie) pour valider les mesures obtenues par la méthode $RSST_1$ en utilisant la séquence d'imagerie 3D (IR-MDEFT 3D). Dans cette étude nous allons quantifier les paramètres vasculaires tumoraux (TBVf, coefficient d'accumulation d'AC i.e K_{model}) par la méthode $RSST_1$ pour la première fois dans un modèle de gliomes d'origine humaine l'U87 implanté dans le cerveau de souris.

En particulier, nous allons étudier la reproductibilité et la sensibilité de cette méthode en présence du Bevacizumab. L'effet du Bevacizumab sur la vascularisation a été déjà étudié dans un modèle de gliome U87 implanté dans le cerveau de rats ((Pechman and others 2011; Pechman and others 2012). Enfin, les mesures quantitatives du TBVf sont corrélées avec une méthode d'imagerie 3D ex vivo basée sur la technique de fluorescence par microscopie à deux photons.

Les objectifs de cette étude sont les suivants :

3- **Objectifs N°1** : 1) Etudier la reproductibilité des mesures du signal $RSST_1$, des valeurs de TBVf dans le tissu tumoral et controlatéral et des valeurs de K_{model}. Cette étude sera réalisée en présence et en absence de Bevacizumab. 2) Corréler les valeurs de TBVf obtenus par la méthode d'IRM $RSST_1$ en présence et en absence de Bevacizumab, avec celles obtenues par microscopie à deux photons sur les mêmes souris ex vivo.

4- **Objectifs N°2** : Evaluer la sensibilité de la méthode d'IRM $RSST_1$ pour détecter les changements de TBVf et K_{model} au cours de la progression tumorale et après traitement par Bevacizumab.

IV.2. Matériels et méthodes

IV.2.1. Modèles animaux

Nous avons choisi pour cette étude la tumeur gliale U87 car elle mime le profile angiogénique du glioblastome humain (voir détail de cette lignée **chapitre 3 section III.2.1**). Les souris Athymic Nude foxn 1^{nu} (Laboratoire Harlan, Ganna FRANCE) sont choisies pour cette étude car elles sont un hôte adapté pour la lignée U87, permettant la prolifération angiogénique (pour plus de détails voir **chapitre 2 section II.2.2** et **chapitre 3 section III.2.2**). La culture cellulaire de l'U87 est décrite dans le **chapitre 3 section III.2.3**.

Les souris sont fréquemment utilisées dans les études ex vivo pour évaluer l'angiogenèse tumorale et les traitements anti-angiogéniques (Claes and others 2008a; Sun and others 2004a; Winkler and others 2004).

Néanmoins, des études de paramètres de la vascularisation tumorale in vivo chez la souris ne sont pas fréquentes. Malgré leur petit volume cérébral, le RSB obtenu par la méthode $RSST_1$ dans le cerveau de souris est encourageant (voir **chapitre 2 section II.4.3.5**) et ouvre la possibilité d'effectuer une étude non-invasive de suivi des paramètres vasculaires au cours de l'angiogenèse tumorale et au cours du traitement suivi d'une validation par une méthode ex-vivo.

IV.2.2. Traitement anti-angiogénique dirigé contre l'U87

Nous avons utilisé le Bevacizumab pour ses propriétés contre le VEGF humain (voir **chapitre 1 sections I.2.4** et **I.3.3** pour plus de détail sur le Bevacizumab) et plus particulièrement pour inhiber la vascularisation de l'U87. La diminution du volume sanguin et de la perméabilité vasculaire de l'U87 au cours de ce traitement ont été démontrées dans plusieurs études précédentes (Gossmann and others 2002; Pechman and others 2011; Pechman and others 2012; Varallyay and others 2009).

IV.2.3. Séquences IRM utilisées

Les acquisitions d'IRM chez la souris sont effectuées sur l'imageur Bruker Biospec USR A VIII à 4.7 T (**voir chapitre 2 section II.2.1**).

IV.2.3.1. FLASH

Nous avons utilisé la séquence FLASH afin d'acquérir des coupes anatomiques orthogonales (coronal, sagittal and axial) dans l'espace pour nous aider à localiser la position de la tumeur pour les études de suivi tumoral in vivo et pour l'étude ex vivo. Les paramètres utilisés pour cette imagerie sont les suivantes : $TE_{effective}$ = 3 ms, TR = 100 ms, RS = 0,23x 0,23 x 1 mm^3, FOV = 30 x 30 x 1 mm^3, NA = 1. Tacq = 12 s.

IV.2.3.2. IR-MDEFT 3D

La séquence IR-MDEFT 3D (voir **chapitre 2 section II.2.4.4**) est utilisée pour acquérir le signal d'IRM $RSST_1$. Le **tableau IV.1** ci-dessous résume les paramètres expérimentaux utilisés chez la souris pour acquérir le signal d'IRM $RSST_1$ dans cette étude.

	Chez la souris	
	Aimantation M_Z	Aimantation M_0 (i.e DP)
TR (ms)	750	20 000
TE (ms)	2,2	
TR_{echo} (ms)	8,8	
RF α (°)	10	
T_{inv} (ms)	305	18 000
FOV (mm^3)	16 x 16 x 8	
RS (mm^3)	0,5 x 0,5 x 1	
NSeg	1	
NA	1	
NR	100	1
Tacq (min)	10	2,66

Tableau IV.1 : Paramètres expérimentaux utilisés pour la mesure de l'aimantation longitudinale M_Z/M_0 avec la séquence IR-MDEFT 3D in vivo chez la souris. L'acquisition de la densité du proton (DP) représente l'aimantation M_0.

IV.2.3.3. Turbo RARE écho de spin

Nous avons utilisé la séquence Turbo RARE écho de spin pour acquérir les images anatomiques du cerveau de souris avec une pondération T_2 (T_{2W}) et une pondération T_1 avec ou sans injection de Gd-DOTA ($T_{1w\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ et T_{1w} respectivement) pour identifier les détails structuraux et tumoraux.

Les paramètres utilisés pour la pondération en T_1 sont les suivants : $TE_{effectif}$ = 20 ms, TR = 1000 ms, RARE factor = 4, FOV = 16 x 16 x 8 mm^3, RS = 0,125 x 0,125 x 1 mm^3, NA = 6. Tacq = 3 min 12 s.

Les paramètres d'acquisitions des images T_{2w} sont ceux présentés dans le **chapitre 2 section II.2.4.3.**

IV.2.3.4. Spin écho rapide $T_{1\text{-}map}$

Nous avons utilisé la séquence spin écho rapide (i.e RARE-VTR) à plusieurs TR pour mesurer le T_1 dans de cerveau de souris avant et après injection de Gd-DOTA. Les paramètres d'acquisition sont ceux présentés dans le **chapitre 2 section II.2.4.2**)

IV.2.3.5. Inversion récupération spin écho rapide

Nous avons utilisé la séquence spin écho rapide précédée par une impulsion RF d'inversion afin d'acquérir une image anatomique de type FLAIR. Cette imagerie est utilisée pour délimiter la région tumorale tout en évitant la contamination par un signal issu du liquide céphalorachidien en raison de la proximité de la tumeur et des ventricules, et parfois accentué par une hydrocéphalie causée par l'implantation des cellules tumorales. Les paramètres utilisés pour cette imagerie sont les suivants: $TE_{effective}$ = 60 ms, TR = 9000, T_{inv} = 1700 ms, RARE factor = 4, NA = 4, FOV = 16 x 16 x 8 mm^3, RS = 0,125 x 0,125 x 1 mm^3. Tacq = 12 min 36.

IV.2.4. Traitements des données IRM

Nous avons eu recours au recalage automatique entre les différentes images IRM afin de permettre l'analyse des mêmes ROIs lors 1) de l'étude de reproductibilité des mesures des paramètres de la vascularisation et 2) lors du suivi de ces paramètres durant la progression

tumorale en présence et en absence de Bevacizumab. Pour effectuer un recalage automatique, toutes les images ont été redimensionnées pour atteindre une RS de 0,125 x 0,125 x 1 mm^3.

Le recalage d'image a été effectué par un code Matlab basé sur le travail de DJ. Kroon (Kroon and Dirk-Jan 2011) entre les images anatomiques à contaste élevé (T_{1W}, T_{2W}, FLAIR et RARE-VTR). La matrice de transformation rigide a été extraite et appliquée sur l'imagerie IR-MDEFT 3D à contraste faible.

Dans cette étude les ROIs tumorales ont été définies manuellement en se basant sur les images dynamiques IR-MDEFT 3D après injection du Gd-DOTA sur lesquelles le signal d'IRM $RSST_1$ est fortement rehaussé (principalement à J12 et J16 avant l'injection du Bevacizumab), puis appliquées aux autres types d'images et cartes paramétriques (cartographies du signal $RSST_1$, du VS, K_{model}) ayant été recalées.

Pour les mesures de reproductibilité, des ROIs symétriques ont également été dessinées dans l'hémisphère cérébral controlatéral.

Pour l'obtention des paramètres de la vascularisation, l'analyse du signal d'IRM $RSST_1$ a été effectuée selon la méthode décrite dans le **chapitre 3 section III.4.1**.

IV.2.5. Microscopie à deux photons

La microscopie à deux photons (Dufour and others 2006; Vérant and others 2007) permet une acquisition en 3D du tissu en profondeur contrairement à la technique mono-photon utilisée dans le chapitre précédent.

Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un microscope TriM Scope II (LaVision BioTec, Bielefeld, Allemagne) équipé d'un objectif à immersion à eau (16x, NA 0.8, Nikon, France) et d'une platine motorisée. L'ensemble des acquisitions a été réalisé à l'aide du logiciel « Imspector Pro ».

IV.2.5.1. Marquage Ant2-PHEA

L'Ant2-PHEA est un marqueur de la vascularisation dérivé de l'anthracène développé par Mettra et al ((Mettra and others 2016), des collaborateurs de l'équipe du Dr Chantal Andraud, Ens Lyon). L'Ant2-PHEA circule dans le réseau vasculaire et marque les cellules endothéliales par accumulation dans les lipides qui composent leurs membranes.

IV.2.5.2. Acquisitions et traitements des données par microscopie à deux photons

L'acquisition des images par la technique à deux photons se base sur l'excitation de la molécule fluorescente du marqueur Ant2-PHEA par un laser infrarouge (Insight DeepSea, Spectra-Physics, Evry, France) avec une longueure d'onde de 900 nm. Les émissions de fluorescence du marqueur Ant2-PHEA sont ensuite colléctées par un tube photomultiplicateur en utilisant le filtre d'émission 542/50 (Semrock, USA).

Pour chaque hémisphère tumoral, nous avons généré environ 80 images 3D. Chaque image à une dimension de 680 x 680 x 300 µm. Chaque image est réalisée en faisant un scan horizontal puis vertical de RS = 1,33 x 1,33 x 3 µm. La durée d'acquisition de chaque coupe est de 4h. Pour chaque hémisphère tumoral un nombre total de 3 coupes est utilisé pour reconstituer une seule image de haute résolution en 3D.

Ci-dessous les étapes les étapes de traitement de données (effectué avec le logiciel Fiji (Schindelin and others 2012)) pour la mesure du volume sanguin tumoral :

1- Acquisition des images avec un overlap (chevauchement) de 15 % entre chaque champ acquis. L'overlap de 15 % permet le recalage des images acquises et ainsi la reconstruction de l'image globale de l'hémisphère tumoral.
2- Recalage rigide et reconstruction de l'image totale à partir des images mosaïques précédemment acquises à l'aide du plugin de Fiji « Grid/Collection stitching » (Preibisch and others 2009) corrigeant les éventuelles erreurs de la platine motorisée. Des matrices de recalages sont ainsi créées.
3- Segmentation des vaisseaux sanguins par classification supervisée en utilisant le logiciel Ilastik (Sommer 2011) (https://www.ilastik.org/about.html). Une première

phase d'apprentissage est nécessaire afin d'entraîner l'algorithme de classification (basé sur une méthode d'arbre de décision « random forest »(Breiman 2001)). Deux classes ont été définies, correspondant respectivement aux vaisseaux sanguins et au fond.

Dans le cadre de ce travail, seuls les paramètres d'intensité calculés par le logiciel ont été utilisés afin de construire l'algorithme de classification. Le logiciel recherche ensuite quelle classification par arbre de décision converge le mieux vers le modèle défini lors de la phase d'apprentissage.

4- Application de cette classification multiparamétrique à l'ensemble des images acquises. A l'issue de cette étape, on obtient des images binaires. La valeur 1 est attribuée à un voxel (1,33 x 1,33 x 3 µm) si l'algorithme de classification converge sinon la valeur du voxel est 0.
5- Reconstruction de l'image binaire de l'hémisphère complet en utilisant les matrices de recalage calculées lors de l'étape 2.
6- Calcul du volume sanguin pour chaque coordonnée X, Y dans la direction Z et ceci pour chaque coupe (i = 1, 2, 3) imagée en utilisant l'**équation** ci-dessous :
7-

$$VS_{coupe\ i}\ (\%) = \frac{\sum_Z du\ nombre\ de\ voxel\ dont\ la\ valeur=1}{\sum_Z du\ nombre\ de\ voxel\ total} \quad \text{[Eq. IV.1]}$$

8- Recalage des 3 coupes consécutives en utilisant un algorithme de recalage rigide fourni par Fiji (plugin « Register Virtual Stack Slices » de Fiji (Arganda-Carreras and others 2006).
9- Calcul du volume total sur les trois coupes (épaisseur totale ≅ 0,9 mm) en faisant une moyenne selon l'**équation** suivante :

$$VS\ (\%) = \frac{VS_{coupe\ 1} + VS_{coupe\ 2} + VS_{coupe\ 3}}{3} \quad \text{[Eq. IV.2]}$$

10- Echantillonage de la cartographie du VS à la même résolution spatiale que celle de l'IRM (X, Y = 0,125 µm x 0,125 µm), permettant une comparaison de VS entre ces deux techniques.

Le temps de calcul des cartographies du VS pour chaque tumeur est de 6 h environ. L'analyse quantitative du VS a été effectuée dans la région tumorale, les valeurs de TBVf sont présentées en valeurs moyenne ± écart-type. Le placement des ROIs sur les cartographies du VS obtenues par microscopie à deux photons a été guidé par l'imagerie vasculaire obtenue en ex vivo (**figure IV.7 c**).

IV.2.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 7).

Pour étudier la reproductibilité des mesures de VS, des tests ANOVA (analyse de la variance) à mesures répétées ont été utilisés après avoir confirmé l'homogénéité des variances des données.

Pour comparer les mesures de TBVf obtenues par la méthode $RSST_1$ avec celles obtenues par la microscopie à deux photons, nous avons utilisé le test de Wilcoxon (apparié bilatéral) comme test non paramétrique. La corrélation a été évaluée par le coefficient de Spearman.

Le test de Wilcoxon a également été utilisé pour étudier la significativité de la variation du TBVf au cours de la progression tumorale avant et après le traitement, tandis que le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour le même but, dans le cas où les échantillons étaient non-appariés.

IV.3. Protocoles expérimentaux

IV.3.1. Etude in vivo

L'implantation intracranîenne de l'U87 chez la souris est décrite dans le **chapitre 3 section III.3.1.1.** La préparation des souris pour imagerie IRM a été effectuée comme décrit dans le **chapitre 2 sections II.3.2.1 et II.3.2.2**.

IV.3.1.1. Etude expérimentale IRM

Les rongeurs ont été randomisés à l'aveugle en plusieurs groupes et sous-groupes indépendamment de leur volume tumoral. A J12, le groupe de souris traitées (n = 6) a reçu une injection i.v unique de Bevacizumab de 10 mg/kg (i.e dose clinique dans 200 µL de sérum physiologique (0,9 % NaCl). Le groupe contrôle (n = 9) a reçu un traitement placebo de même volume de sérum physiologique le même jour.

- **<u>Etude expérimentale pour répondre à l'objectif N°1 de cette étude :</u>**

Nous avons choisi d'effectuer les mesures de reproductibilité à différents stades de la progression tumorale ainsi que chez le groupe traité et non traité par Bevacizumab pour vérifier si ces conditions affectent la reproductibilité et les résultats obtenus par la méthode d'IRM $RSST_1$.

Les mesures ont été répétées trois fois pour chaque souris pendant une durée maximale de 24 h et minimale de 15 h. Cette durée a été définie après avoir effectué une étude théorique et expérimentale (pilote) concernant le temps d'élimination du Gd-DOTA permettant la répétition de la mesure d'IRM $RSST_1$.

Pour répondre à l'objectif N°1, les souris ont été choisies à l'aveugle de la façon suivante :

- Sous-groupe a1 (n = 3) : les souris sont imagées à J12 après implantation tumorale.
- Sous-groupe a2 (n = 3) : les souris sont imagées à J16 après implantation tumorale (Absence de traitement à J12).
- Sous-groupe a3 (n = 3) : les souris sont imagées à J16 après implantation tumorale (souris traitées par Bevacizumab à J12).

NB : Il ne s'agit pas des mêmes souris entre J12 et J16, la comparaison des paramètres de vascularisation à J12 et J16 pour les souris individuelles n'est pas envisageable.

Pour chacun de ces sous-groupes, nous avons sacrifié deux souris à la fin de la troisième IRM pour effectuer une mesure de VS ex vivo par microscopie à deux photons.

➢ **<u>Etude expérimentale pour répondre à l'objectif N°2 de cette étude :</u>**

Nous avons effectué le suivi du TBVf et de K_{model} avant et après injection du Bevacizumab ou du placebo de la façon suivante :

- Sous-groupe b1 (n = 6) : sans traitement à J12, les souris sont imagées à J12 et à J16 après implantation tumorale. Une de ces souris a également été imagée à J9.
- Sous-groupe b2 (n = 6) : avec traitement à J12, les souris sont imagées à J12 et à J16 après implantation tumorale. Deux de ces souris ont également été imagées à J9.

Trois souris choisies de façon aléatoire ont été imagées à J9 afin de confirmer la présence de la tumeur et d'une vascularisation tumorale.

Tous les groupes expérimentaux concernant l'objectifs N°1 et N°2 ont subi le même protocole IRM schématisé dans la **figure IV.1**.

Le signal de l'imagerie IR-MDEFT 3D dynamique est acquis en continu 5 min avant, pendant et 5 min après l'injection du Gd-DOTA (veine caudale, cathéter BD Neoflon^{TM} 26 Ga). Le Gd-DOTA a été injecté manuellement sous forme de bolus (temps d'injection inférieur à 2 s) à l'intérieur de l'aimant à une dose de 0,7 mmol/kg en i.v. (volume d'injection ≅ 210-240 µl).

Les cartographies $T_{1\text{-map}}$ (n = 2, uniquement pour l'objectif N°1) ont été acquises huit minutes et cinq heures après l'injection de Gd-DOTA afin de s'assurer qu'aucun signal $RSST_1$ résiduel significatif n'est présent dans la région tumorale, si la BHE est endommagée, ce qui pourrait affecter les mesures ultérieures du volume sanguin.

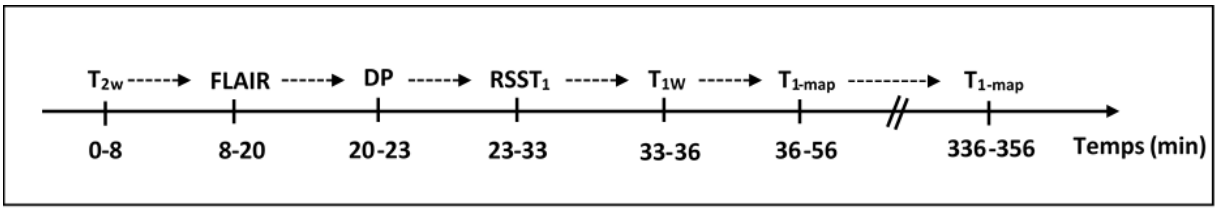


Figure IV.1 : Chronogramme du protocole d'IRM.

IV.3.2. Etude ex vivo

L'Ant2-PHEA est injecté en i.v dans une des veines caudales de la souris à raison de 5mg/ml après la fin de la dernière IRM, 30 minutes avant le sacrifice de la souris. Ceci permet à l'Ant2-PHEA de circuler dans la vascularisation et de marquer uniquement les vaisseaux sanguins perfusés. Les souris sont sacrifiées, sous anesthésie, par dislocation cervicale. Les cerveaux des souris sont ensuite rapidement extraits et fixés dans une solution de para formaldéhyde à 4% à 4°C pendant 24 heures.

A l'issue de la fixation, les échantillons sont lavés dans une solution saline (0.9% NaCl). Des coupes coronales d'une épaisseur de 300 µm sont ensuite réalisées au vibratome (Leica VT1200S). Les coupes sont montées sur lames de verre en utilisant des chambres d'imagerie en silicone (Coverwell imaging chamber, Grace Bio-Labs, Oregon). La chambre d'imagerie est remplie d'une solution saline et recouverte d'une lamelle afin de préserver le tissu et d'éviter sa déshydratation durant la microscopie.

IV.4. Résultats

IV.4.1. Etude pilote de détermination du temps d'élimination de Gd-DOTA permettant la répétition de la mesure d'IRM $RSST_1$

Les valeurs de T_1 du sang et du tissu cérébral doivent être supérieures à 1s avant chaque mesure du signal $RSST_1$ pour minimiser le signal résiduel. Afin de re-mesurer le signal d'IRM $RSST_1$ et ainsi effectuer des mesures de reproductibilité du TBVf et du K_{model} sans biais dus au signal résiduel (**voir chapitre 2 et 3**) il a fallu déterminer le temps d'attente minimal à respecter entre deux injections de Gd-DOTA.

Après injection de 0,7 mmol/Kg de Gd-DOTA, on s'attend à une concentration sanguine de $[Gd\text{-}DOTA]_{sang} \cong 0{,}5$ mM. Selon l'estimation théorique, il faut attendre environ huit heures pour que la constante de temps T_1 du sang soit de l'ordre de 1s (cette estimation a été faite avec T_{10} = 1,75 s et une demi-vie du Gd-DOTA dans le sang $T_{1/2\text{-}Gd\text{-}DOTA\text{-}sang} \leq 1{,}6$ h (A. Stinson 2013)). À t = 8h il en résulterait une $[Gd\text{-}DOTA]_{sang} \cong 0{,}15$ mM et un T_1 du sang de l'ordre de 1 s .

Ce calcul dépend fortement de $T_{1/2\text{-Gd-DOTA-sang}}$ du sang et du tissu si la BHE est lésée, mais ces paramètres ne peuvent pas être extrapolés facilement de la littérature. Des temps d'élimination inférieurs de l'ordre de ou même inférieurs à 1h ont également été décrits (A. Stinson 2013; Lemasson 2010)), ce qui permettrait un temps d'attente plus faible.

La mesure expérimentale de l'évolution des valeurs de T_1 après injection du Gd-DOTA a montré que 5h après l'administration de Gd-DOTA, les valeurs de T_1 mesurées dans le tissu tumoral non traité par Bevacizumab (avec une perméabilité vasculaire élevée, i.e présence de l'AC dans le tissu) sont de l'ordre de 1,5 s ± 0,3 s comparable au T_1 dans le tissu cérébral controlatéral (1,7 s ± 0,2 s) sans lésion de la BHE et donc sans accumulation de Gd-DOTA.

Dans le sinus veineux les valeurs de T_1 sont de l'ordre de 0,4 s ± 0,2 s et de 1,4 s ± 0,1 s à 8 min et 5 h après injection du Gd-DOTA respectivement.

La **figure IV.2** montre un exemple représentatif de la cartographie de $T_{1\text{-map}}$ 8 minutes et 5 heures après injection du Gd-DOTA dans le cas d'une tumeur U87 à J16 sans traitement par Bevacizumab.

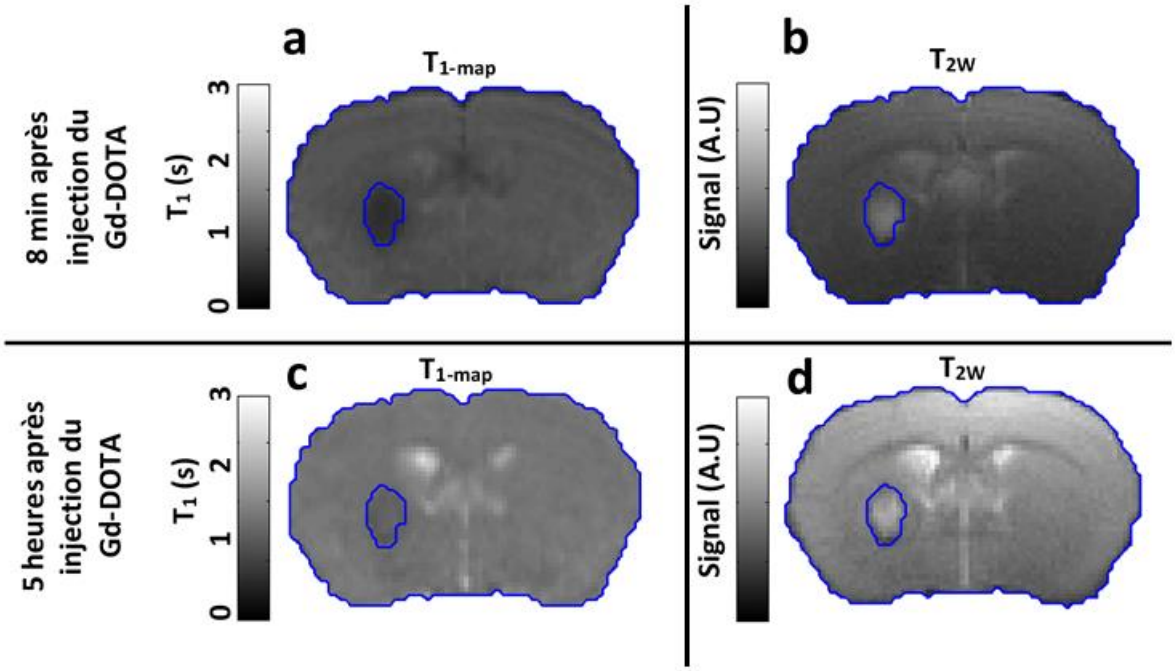


Figure IV.2: cartographie de $T_{1\text{-map}}$ (a, c) et image anatomique T_{2w} (b, d), 8 min (a) et 5h (c) après injection du Gd-DOTA. 5h après injection du Gd-DOTA les valeurs de T_1 dans la tumeur et dans le tissu controlatéral sont supérieures à 1s.

Les temps d'attente théorique et expérimental étant compris entre 5h et 8h, nous avons effectué nos mesures de reproductibilité en respectant un temps d'attente de minimum 5h pour éviter à avoir à prendre en compte le signal $RSST_1$ résiduel après chaque injection de Gd-DOTA.

IV.4.2. Objectif 1 : Etude de reproductibilité de la méthode $RSST_1$

IV.4.2.1. Mesure de reproductibilité du signal $RSST_1$ et des paramètres vasculaires

Afin d'évaluer la reproductibilité des mesures du VS et du K_{model} nous avons effectué dans un premier temps une évaluation qualitative du signal $RSST_1$ dans le tissu controlatéral et dans la tumeur. Dans un deuxième temps, nous avons mesuré quantitativement les paramètres vasculaires.

La **figure IV.3** montre un exemple représentatif des trois répétitions des mesures du signal $RSST_1$ dans la tumeur et le tissu controlatéral, à J12 en absence de traitement (**figure IV.3 a**) et à J16 dans le cas d'une tumeur traitée par Bevacizumab (**figure IV.3 b**). Nous pouvons apprécier sur ces figures la similitude des mesures répétées du signal $RSST_1$ dans ces conditions. Les résultats sont similaires pour les autres souris.

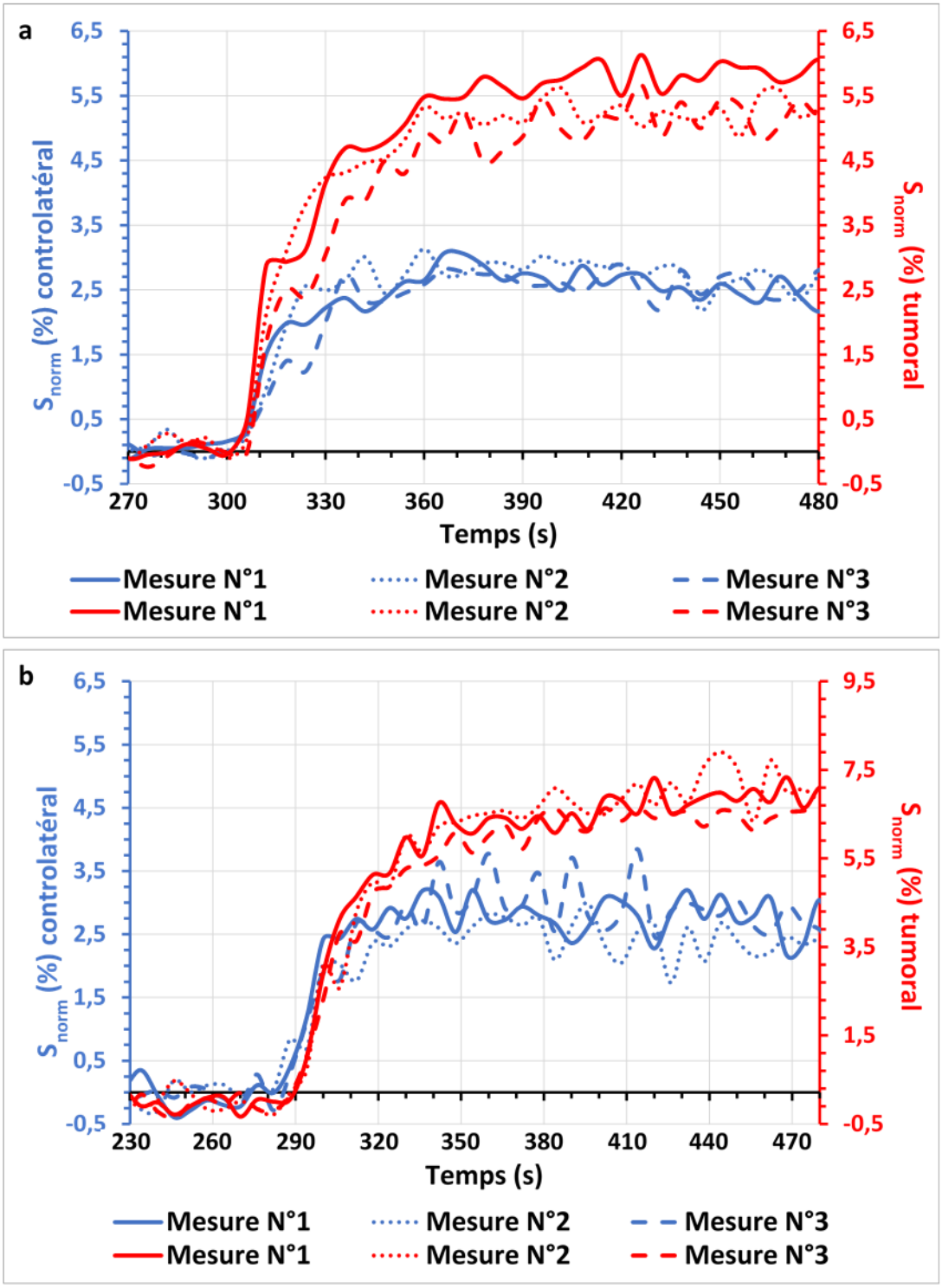


Figure IV.3 : Exemple représentatif des trois mesures répétées du Signal S_{norm} dans la tumeur (courbes rouges, axe de droite) et dans le tissu controlatéral (courbes bleues, axe de gauche) à J12 en absence de Bevacizumab (a) et à J16 en présence de Bevacizumab (b).

La cinétique similaire des signaux $RSST_1$ dans le tissu controlatéral en absence de l'extravasation de l'AC suffit pour évaluer la reproductibilité des mesures du VS. Lorsque la BHE est lésée, il est nécessaire d'étudier quantitativement la reproductibilité du TBVf et K_{model} afin de valider la fiabilité du modèle mathématique et de la méthodologie d'analyse qui dépendent de plusieurs hypothèses et de paramètres d'entrée (**voir chapitre 3**)

Une analyse de la variance à deux facteurs pour la mesure du VS n'a pas révélé de différence, ni entre les répétitions (P=0,71 pour les ROIs controlatérales, P=0,36 pour les ROIs tumorales), ni entre les sous-groupes a1 à a3 (P=0,38 pour les ROIs controlatérales, P=0,14 pour les ROIs tumorales), nous permettant d'augmenter la puissance de l'analyse de la variance en regroupant les trois sous-groupes pour effectuer une ANOVA à un facteur (les répétitions pour chacune des neuf souris). La **figure IV.4** montre que, comme attendu, cette analyse statistique a confirmé l'absence de différence significative entre les répétitions (**figure IV.4 a, b**) et un appariement significatif (**figure IV.4 c, d**).

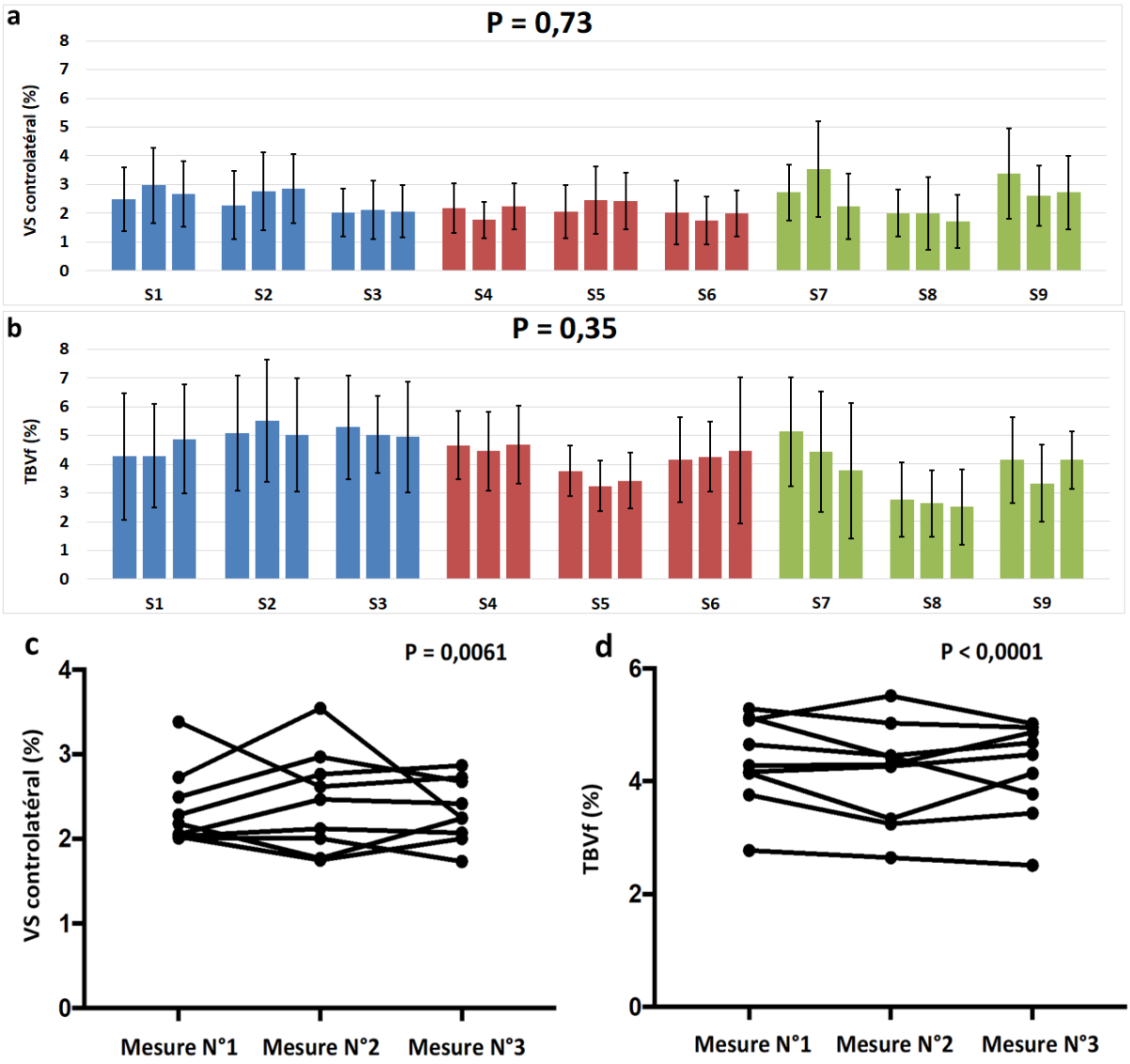


Figure IV.4: Etude de reproductibilité de la mesure du VS par la méthode RSST$_1$. VS mesuré lors des trois acquisitions dans la région controlatérale (a) et tumorale (b) chez 9 souris appartenant aux sous-groupes a1-a3. Pour chaque mesure, la moyenne ± écart type des valeurs de VS dans la ROI est affichée. Les valeurs de P indiquent que les différences des mesures répétées ne sont pas significatives tandis que l'appariement est important (c, d).

La **figure IV.5** résume les valeurs moyennes du VS ± l'écart type des trois mesures répétées.

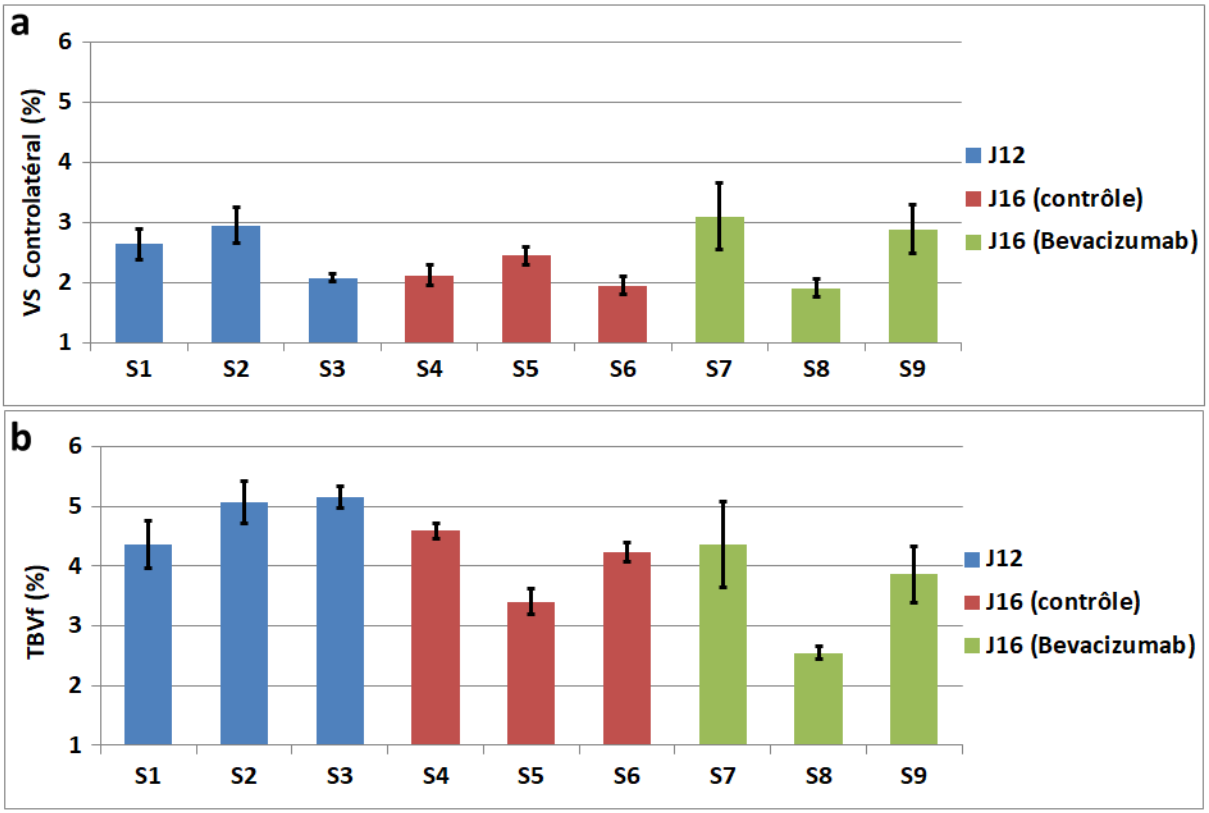


Figure IV.5: Histogramme des valeurs moyennes du VS dans la région controlatérale (a) et tumorale (b) pour chacune des 9 souris. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois mesures répétées.

Pour chaque groupe (J12, J16 traités et J16 non traités), l'écart type moyen était inférieur à 15 % et 12 % dans les régions controlatérales et tumorales respectivement.

Dans les conditions de mesure préconisées pour cette étude et pour les conditions étudiées (U87, avec et sans traitement) le seuil de 15 % est considéré comme la variation maximale due à la mesure par la méthode d'IRM $RSST_1$. Toute variation au-delà de 15 % du VS peut être considérée comme une variation intrinsèque du TBVf pendant la progression tumorale ou à cause du traitement par Bevacizumab durant le suivi tumoral.

Après contrôle visuel, le résultat du recalage d'image étant satisfaisant, nous avons analysé les mesures répétées de VS voxel par voxel. Toutefois, dans ce cas, les mesures dans les ROIs tumorales n'étaient reproductibles que pour cinq souris sur neuf, et dans le cas des ROIs

controlatérales, pour deux souris sur neuf, indiquant que l'hypothèse d'un recalage d'image parfait n'était pas valable à cette résolution spatiale.

Concernant les mesures répétées de K_{model} nous avons trouvé que l'écart type moyen pour toutes les groupes étaient de plus de 50 % (figure IV.6) de la valeur moyenne. La variation est plus élevée pour l'estimation de K_{model}, que pour le VS. Ceci peut être dû à une dynamique très rapide de ce paramètre dans la tumeur entre les trois mesures, ou l'écart des mesures peut être issu de la modélisation du signal $RSST_1$. Il est difficile de conclure sur la reproductibilité dans le tissu pathologique.

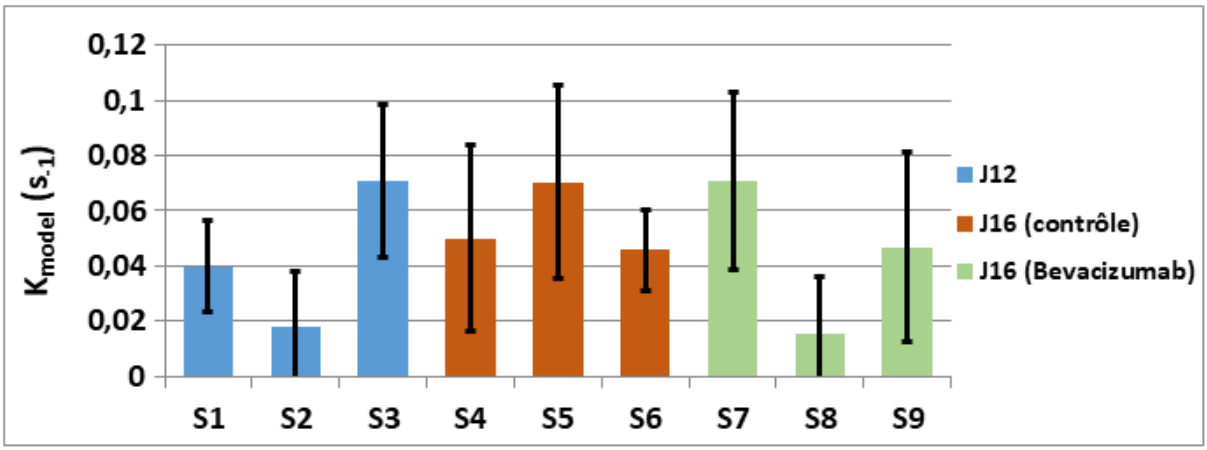


Figure IV.6: Histogramme des valeurs moyennes de la perméabilité vasculaire tumorale pour chacune des 9 souris. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois mesures répétées.

IV.4.2.2. Comparaison TBVf : IRM $RSST_1$ 3D vs imagerie microscopique à deux photons 3D

Nous avons comparé les valeurs du TBVf obtenues par la méthode d'IRM $RSST_1$ avec celles obtenues par l'imagerie bi-photon ex vivo (n = 6) afin de valider les mesures répétées de TBVf obtenues par la modélisation du signal $RSST_1$ par une méthode d'imagerie 3D indépendante.

La **figure IV.7** montre la reconstruction des cartographies de VS effectuée à partir des images bi-photon pour 3 coupes ex vivo de 300 µm comme décrit dans **la section IV.2.5.2** pour un cas représentatif.

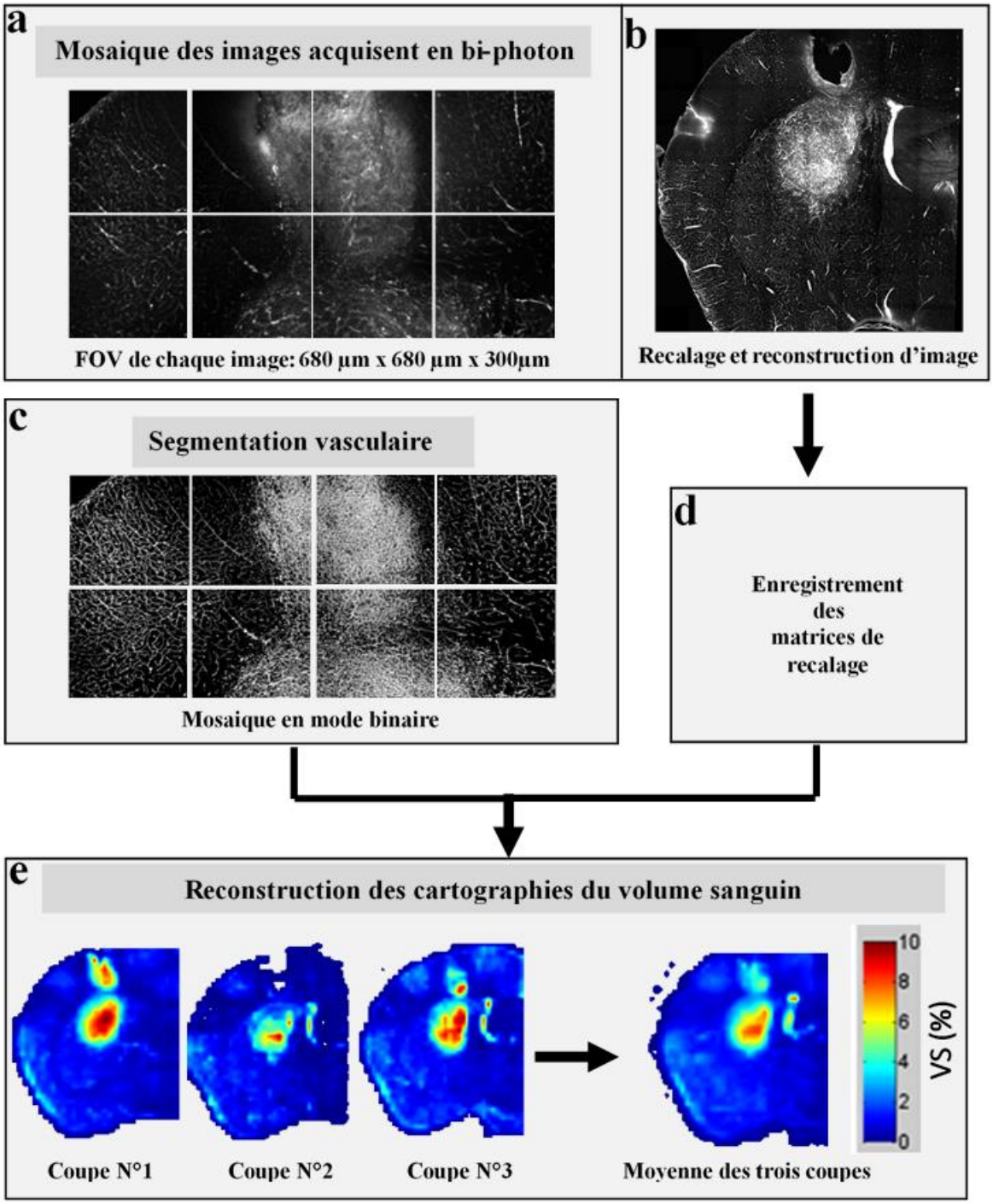


Figure IV.7 : Étapes pour la génération de cartes du VS utilisant la microscopie à deux photons. (a) Quelques champs (FOV) imagés ont été représentés sous la forme de mosaïque. (b) Recalage et reconstruction d'image à partir des champs mosaïques. (c) Segmentation des vaisseaux sanguin des champs en se basant sur l'algorithme de classification supervisée en utilisant le logiciel Ilastik, les résultats sont représentés sous forme binaire. (d) Enregistrement des matrices de recalage générées à partir de l'étape (b). (e) Cartographies de VS résultantes d'un traitement d'image (c et d) pour trois coupes consécutives d'épaisseur 300 µm chacune et leur moyenne (RS = 0,125 x 0,125 x 0,9 mm^3).

La figure IV.8 montre des cartes représentatives de la vascularisation cérébrale chez deux souris à J16 après implantation tumorale sans (**figure IV.8 a)** et avec (**figure IV.8 b)** traitement par Bevacizumab. Les cartographies de VS des trois mesures successives effectuées par la méthode IRM $RSST_1$ sont comparées à la microscopie à deux photons. Chez la souris non traitée nous avons mesuré par la méthode d'IRM $RSST_1$ un TBVf moyenné sur les trois répétitions de 4,59 % ± 0,13 % comparé à 4,75% par microscopie à deux photons. La souris traitée a eu un TBVf moyenné de 4,3 % ± 0,3 par IRM $RSST_1$ comparé à 4,7 % par microscopie à deux photons (sachant que son TBVf à J12 mesuré par l'IRM $RSST_1$ avant le traitement était de 7 %).

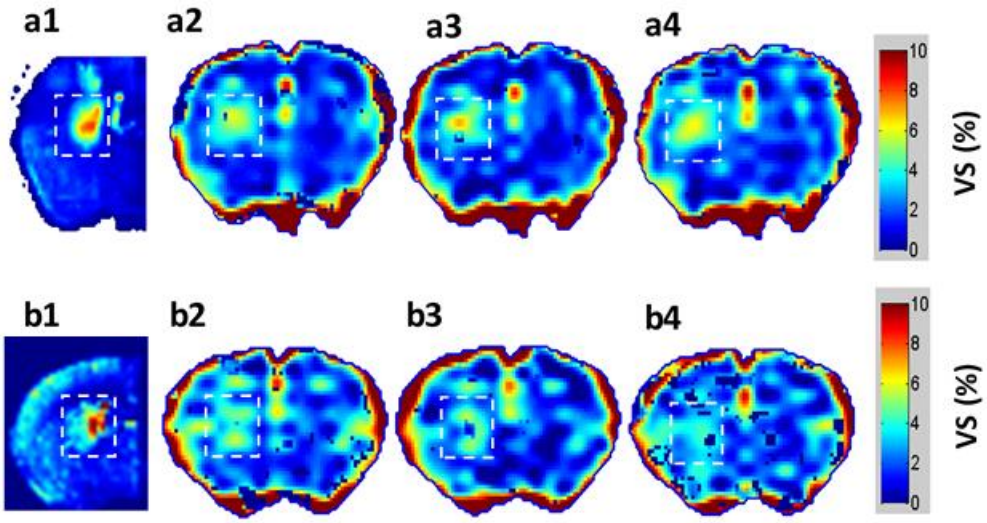


Figure IV.8: Cartographie du VS de deux cerveaux de souris porteuses d'une tumeur U87 à J16 sans traitement (a) et avec traitement par Bevacizumab (b). Les mesures du VS obtenues ex vivo par microscopie à deux photons (a1, b1) sont comparées aux trois mesures répétées effectuées in vivo par la méthode d'IRM $RSST_1$ (a2, a3, a4 et b2, b3, b4).

Les valeurs moyennes de TBVf entre la méthode d'IRM $RSST_1$ et la technique bi-photon pour tous les groupes (n = 2 à J12, n = 2 à J16 avec traitement et n = 2 à J16 sans traitement) sont comparables (**figure IV.9**) ($P_{Wilcoxon}$=0,48). Le coefficient de corrélation entre les valeurs de TBVf des deux méthodes est de $r_{Spearman}$ = 0,83, et proche de la significativité (P = 0,06) malgré

un faible nombre de mesures (i.e nombre de souris). Ces résultats statistiques montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs de TBVf avec les deux méthodes.

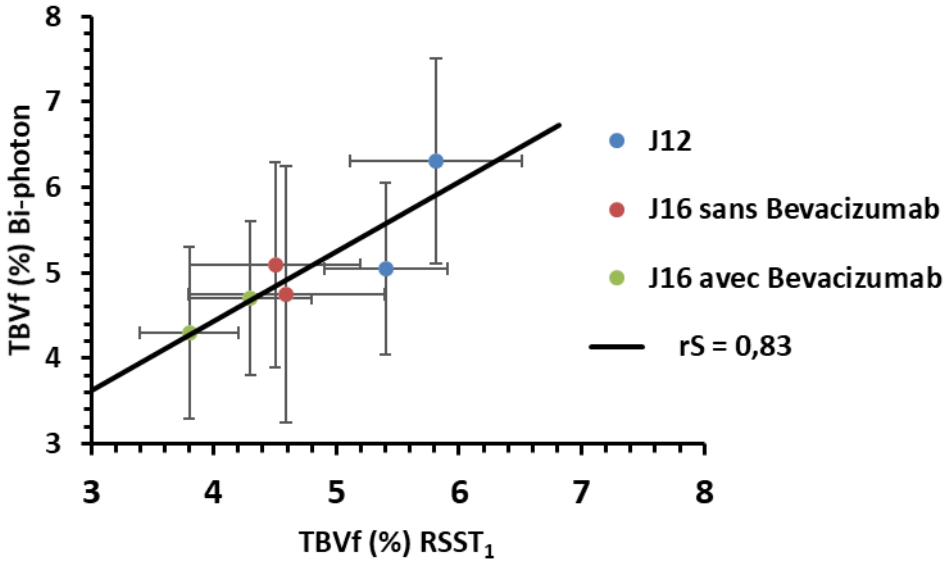


Figure IV.9 : Corrélation des valeurs de TBVf mesurées avec la méthode $RSST_1$ et la microscopie à deux photons (n = 2 par sous-groupe). Les valeurs de TBVf sont représentées en valeurs moyennes et en écart type spatial (prise en compte de l'hétérogénéité tumorale).

IV.4.3. Objectifs 2 : Etude de suivi tumoral

Les mesures répétées effectuées par la méthode d'IRM $RSST_1$, dans l'objectif N°1 de l'étude de reproductibilité présentée ci-dessus, ont été effectuées sur des souris indépendantes dont le nombre dans chaque groupe est faible (n = 3) et qui présentent une large distribution des tailles tumorales (à J12 3,8 mm^3 ± 1 mm^3 et à J16 3,7 mm^3 ± 0,6 mm^3) empêchant ainsi une comparaison entre le groupe de souris traitées et non traitées par Bevacizumab.

Ci-dessous nous présentons les résultats du suivi tumoral, effectué par la méthode d'IRM $RSST_1$, chez les mêmes souris ayant reçu le Bevacizumab (n=6) et chez les souris ayant reçu un traitement placebo (n = 6) à J12 après implantation tumorale.

IV.4.3.1. Suivi qualitatif du signal $RSST_1$

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le profil du signal S_{norm} indique qualitativement le degré de la perméabilité vasculaire (pente du signal S_{norm}) et le TBVf (amplitude du signal S_{norm} à t_{RSS1}).

Avant de quantifier le TBVf et K_{model} nous avons étudié qualitativement les profils du signal $RSST_1$ durant le suivi tumoral avec et sans traitement. Ceci était nécessaire pour savoir si le profil du signal $RSST_1$ est suffisamment sensible pour évaluer le TBVf et K_{model} à chaque stade tumoral en présence et en absence de traitement par le Bevacizumab.

Les **figures IV.10, IV.11 et IV.12** illustrent les principaux changements des profils constatés durant la progression tumorale chez certaines souris.

Dans les régions avec une BHE intacte et donc sans extravasation de l'AC, le signal $RSST_1$ a atteint une valeur constante. Le TBVf (i.e l'amplitude du S_{norm}) dans les régions tumorales à J9 est augmenté par rapport au tissu controlatéral (figure **IV.10 a**). Ce profil constant avec une amplitude diminuée peut être aussi détecté dans la tumeur à J16 après traitement par le Bevacizumab (**figure IV.10 b**). Dans ce cas, nous pouvons déduire qualitativement que le Bevacizumab a normalisé la vascularisation (suppression de la perméabilité vasculaire et réduction du TBVf à une valeur proche du tissu controlatéral, **figure IV.10 b**, courbe rouge discontinue).

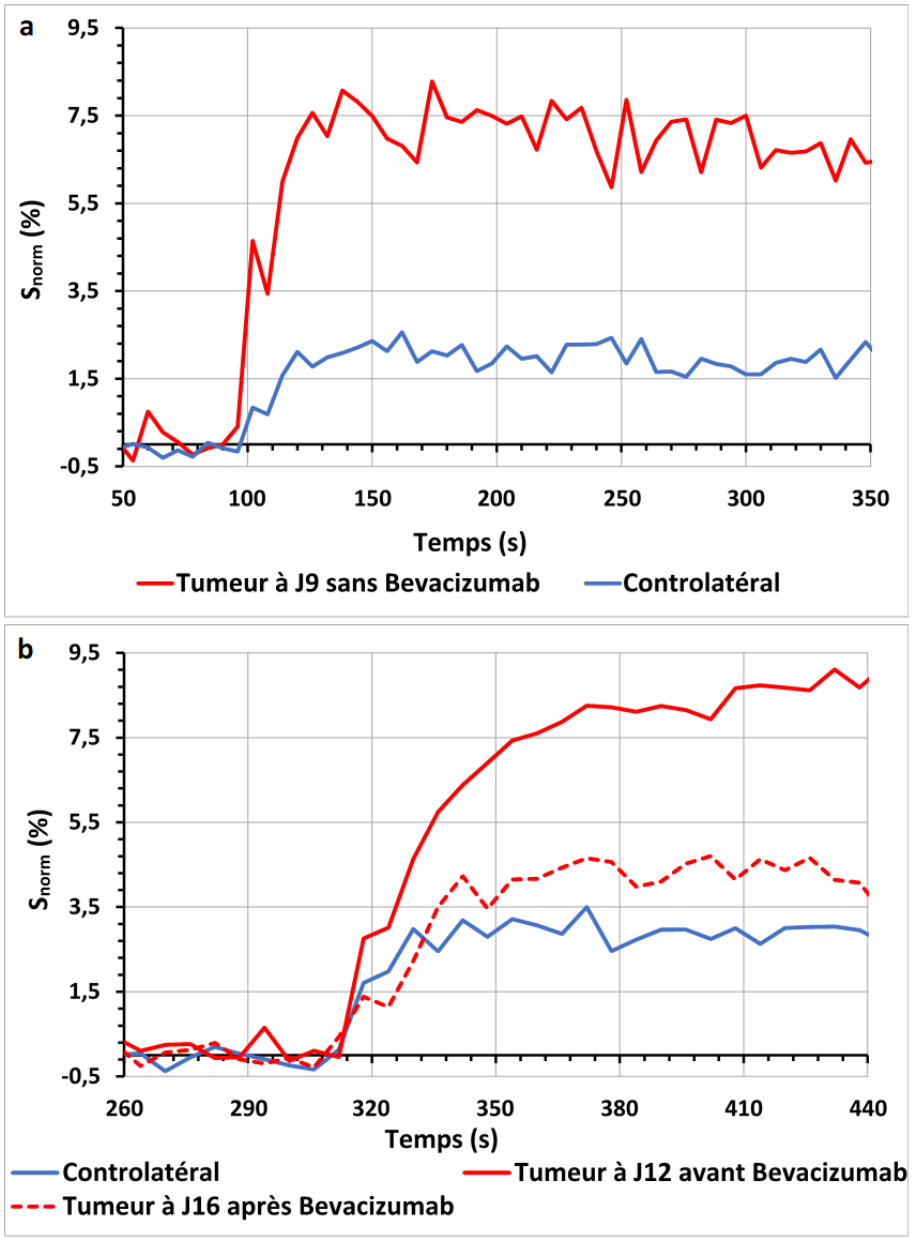


Figure IV.10 : **Exemple représentatif du Signal S_{norm} tumoral de l'U87 et du tissu controlatéral. a) Le signal $RSST_1$ tumoral à J9 est constant mais plus élevé que celui du tissu sain témoignant d'une vascularisation tumorale élevée mais sans rupture de la BHE. b) Signal S_{norm} dans la ROI tumorale avant (J12) et après Bevacizumab (J16) montrant un effet de normalisation de la vascularisation tumorale après traitement.**

En revanche, dans les régions avec BHE lésée sans traitement, le signal $RSST_1$ a changé continuellement avec des pentes et des amplitudes différentes en fonction du degré de la perméabilité vasculaire (**figure IV.11**).

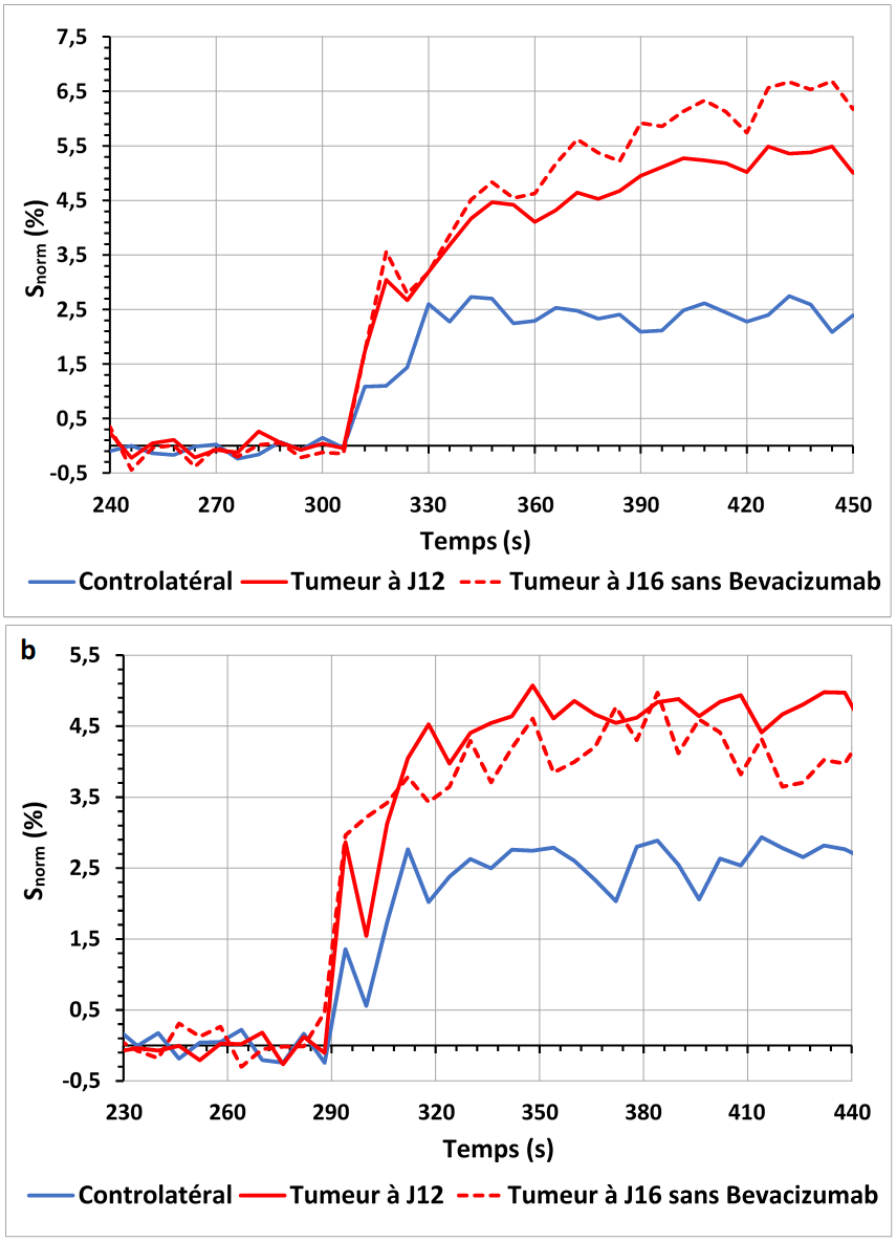


Figure IV.11: **Exemple représentatif du signal S_{norm} de la ROI tumorale U87 entre J12 et J16 en absence de traitement par Bevacizumab. Nous pouvons déduire qualitativement différents changements de valeurs de perméabiliaté vasculaire et de TBVf entre J12 et J16. Une perméabilité plus prononcée avec uneTBVf plus élevée (a) et un TVBf moins élevée (b).**

Le dernier cas constaté lors du suivi tumoral est caractérisé par une augmentation de l'amplitude et de la pente du signal $RSST_1$ (i.e une augmentation du TBVf et de la perméabilité vasculaire tumorale respectivement) avant le traitement puis une diminution de ces deux paramètres après le traitement par Bevacizumab (**figure IV.12**).

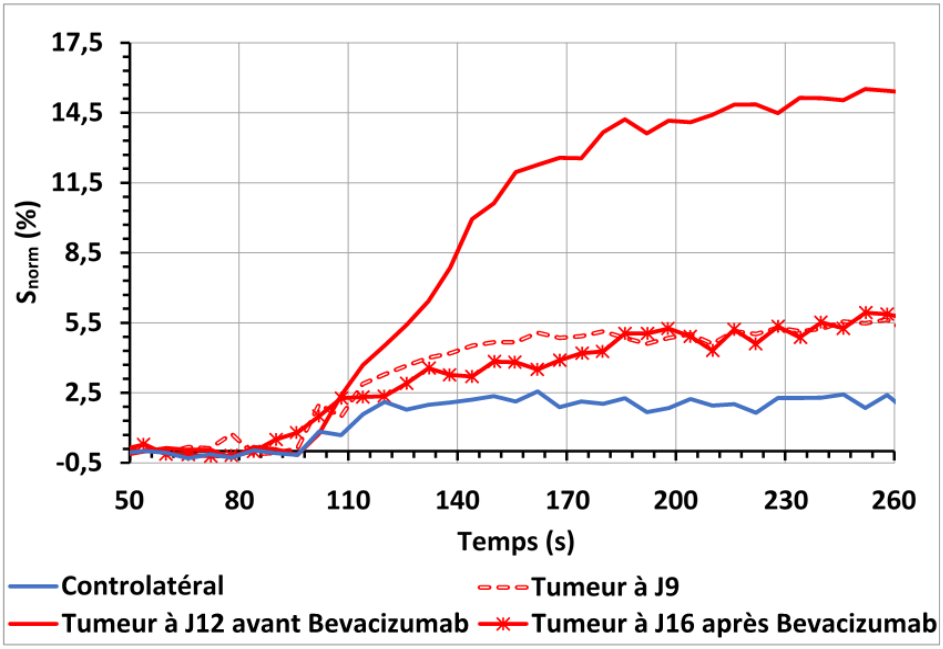


Figure IV.12: **Exemple représentatif du signal S_{norm} de la ROI tumorale U87 à J9, J12 avant le traitement et à J16 après le traitement par Bevacizumab.**

Les différents cas présentés ci-dessus montrent que le profil du signal $RSST_1$ (pente et amplitude) a été sensibles au changement de l'état de la vascularisation (i.e VS et perméabilité vasculaire tumorale) durant la croissance tumorale et également après traitement par Bevacizumab.

IV.4.3.2. Suivi quantitatif du TBVf et de K_{model}

Des modifications du TBVf ont été détectées pendant la croissance tumorale et après l'administration du Bevacizumab (**figure IV.13 et IV.14)**. La **figure IV.13** montre des cartes de VS à trois moments différents de la progression tumorale et après administration du traitement pour trois coupes contiguës de cerveau. Pour cette souris, le TBVf a augmenté

entre J9 et J12. Comme attendu, la diminution de TBVf a été constatée à J16, soit 4 jours après l'administration de Bevacizumab.

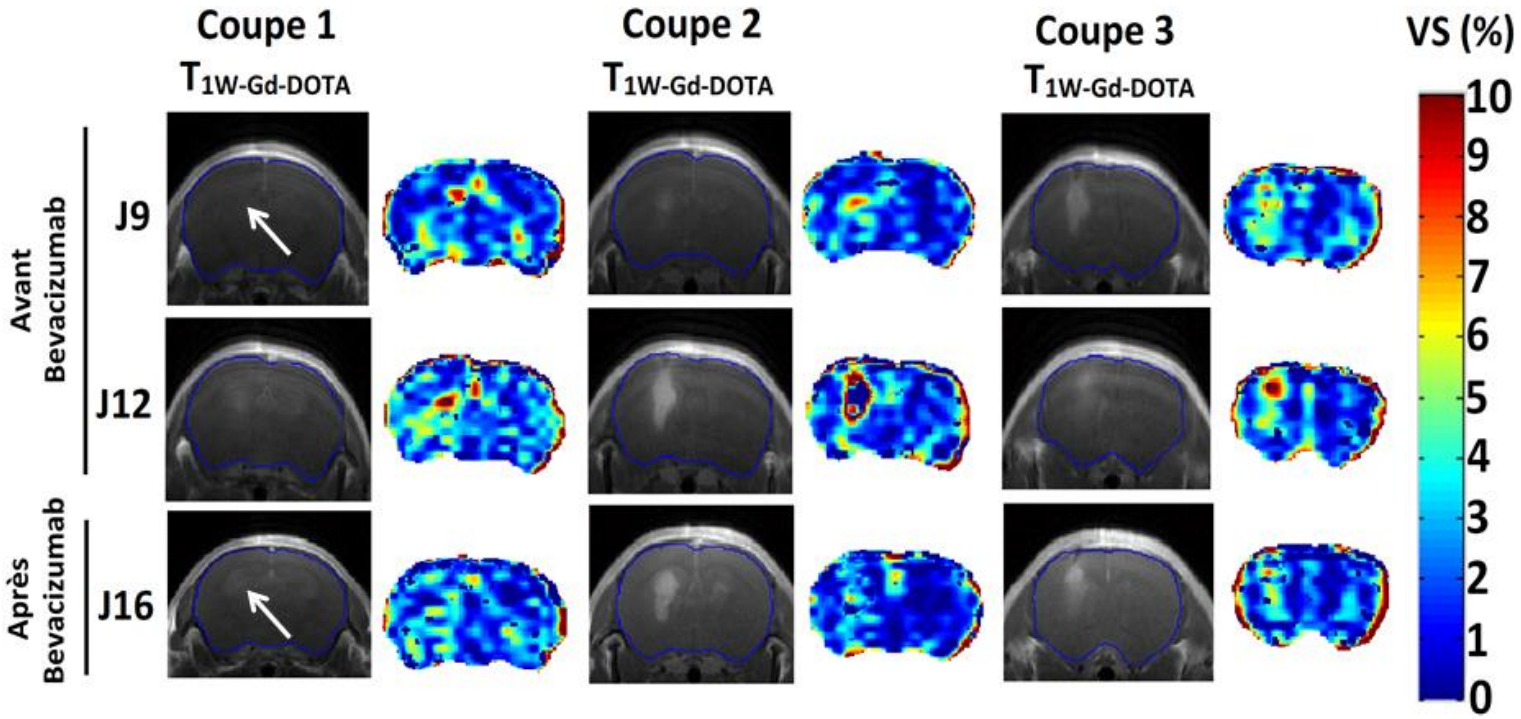


Figure IV.13: Suivi de la croissance tumorale de l'U87 avant (J9 1ère ligne, J12 2ème ligne) et après traitement par Bevacizumab (J16 3ème ligne). Le TBVf diminue après le traitement de Bevacizumab. Les flèches blanches sur les images $T_{1W\text{-}GD\text{-}DOTA}$ à J9 et J16 ne montrent pas un rehaussement du signal suffisant pour signaler une activité angiogénique contrairement aux cartographies quantitatives de VS affichées en couleur.

Nous avons constaté que dans certains cas (n = 5) à un stade précoce de la croissance tumorale (**figure IV.13**, coupe 1, flèche blanche J9) et après traitement (**figure IV.13**, coupe 1, flèche blanche J16), le TBVf est élevé par rapport au tissu controlatéral, tandis que l'imagerie $T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ ne montre aucun changement. Dans ces régions tumorales, le signal $RSST_1$ révèle l'absence d'extravasation de l'AC correspondant au cas montré dans la **figure IV.10**.

Ce même effet a été constaté dans la circonférence et/ou le tissu péritumoral des ROIs tumorales délimitées par l'imagerie $T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$. Dans ces régions, la BHE n'est pas perméable et ne permet pas un rehaussement suffisant sur les images $T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$.

La **figure IV.14** montre l'effet local de la normalisation des vaisseaux sanguins dû au traitement par Bevacizumab. Nous avons effectué la soustraction des cartographies de VS ($VS_{J16\text{-avec-Bevacizumab}} - VS_{J12\text{-sans-Bevacizumab}}$) pour la coupe 2 et 3 de la **figure IV.13**. Le TBVf de la circonférence de la tumeur (coupe 2) diminue après traitement par Bevacizumab indiquant une activité angiogénique élevée dans cette région avant traitement.

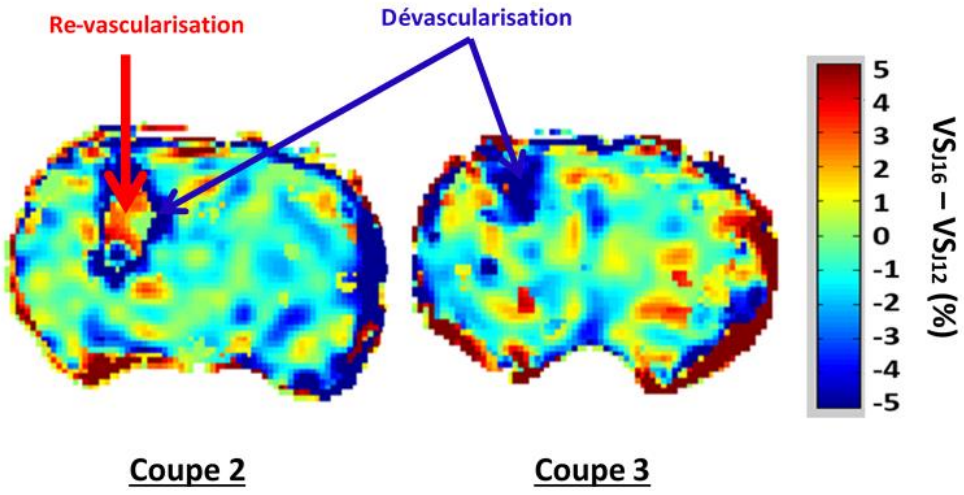


Figure IV.14: **Cartes fonctionnelles de la VS illustrant les changements entre J12 et J16 après le traitement par Bevacizumab (VS_{J16} - VS_{J12}). Nous constatons un effet de normalisation: i) les régions tumorales à très faible VS récupèrent leur vascularisation après traitement (flèche rouge, revascularisation), ii) les régions tumorales à très haute vascularisation verront une diminution du VS après traitement (flèches bleues, dévascularisation).**

Dans le groupe des souris qui ont eu reçu le placebo, le VS n'a pas changé significativement entre le J12 et le J16. Seule une légère diminution a été constatée, similaire à ce qui a été trouvé par Pechman et al à T8 (Pechman and others 2011) (**figure IV.15 et IV.22**).

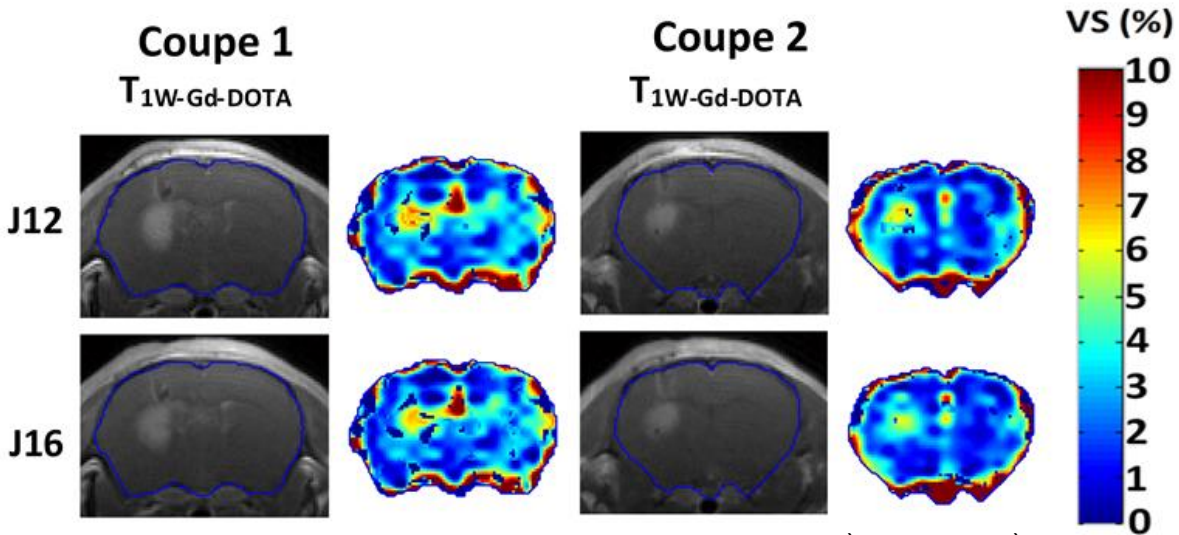


Figure IV.15: Suivi du VS pendant la croissance tumorale de l'U87 (J12 1ère ligne, J16 2ème ligne) sans traitement par Bevacizumab. Le TBVf est similaire pour les deux dates d'imagerie.

La **figure IV.16** présente le suivi individuel du TBVf pour chaque tumeur pour le groupe placebo et le groupe traité par Bevacizumab au cours de la progression tumorale. Une diminution significative du TBVf est obtenue pour le groupe traité (P_{value} = 0,001).

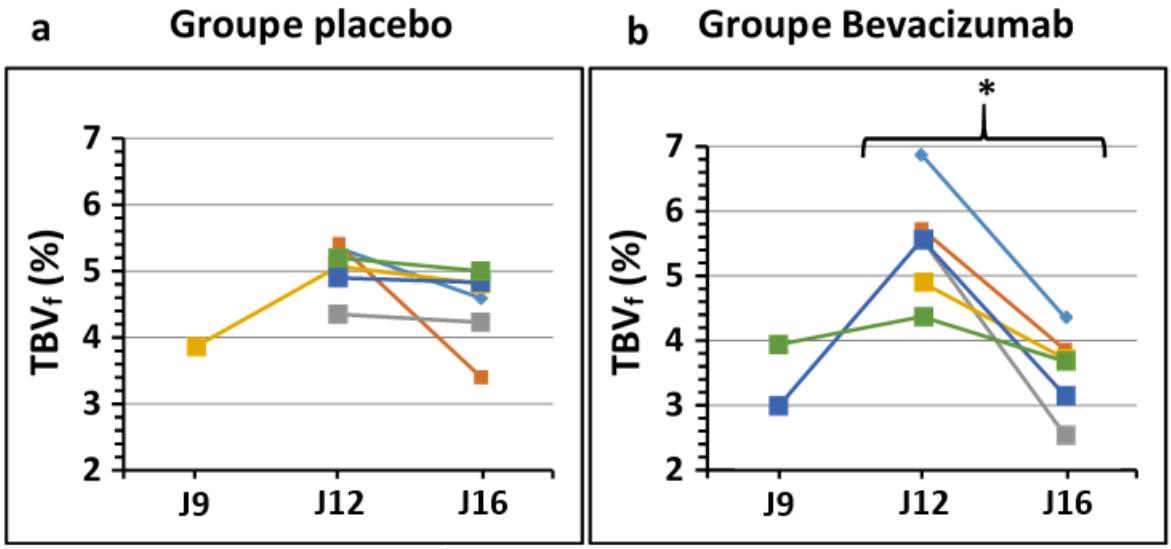


Figure IV.16: Suivi individuel du TBVf au cours de la progression tumorale, a. sans traitement, b. avec traitement. Le TBVf diminue considérablement après l'injection du Bevacizumab. Aucun changement significatif du TBVf n'a été obtenu entre J12 et J16 pour le groupe non traité.

La mesure moyenne du TBVf à chaque stade tumoral et pour chaque groupe est présentée dans la **figure IV.17**. Entre J9 et J12, le TBVf a augmenté de façon significative (J9: 3,6 ± 0,43%, J12: 5,27 ± 0,67%, P <0,001).

Le TBVf a diminué significativement dans le groupe traité quatre jours après l'injection de Bevacizumab (J12: 5,5 ± 0,84 %, J16: 3,55 ± 0,62%, P = 0,03,).

Aucun changement statistiquement significatif n'a été observé dans le groupe non traité entre J12 et J16 (J12: 5,05 ± 0,39%, J16: 4,48 ± 0,59%, P = 0,06)).

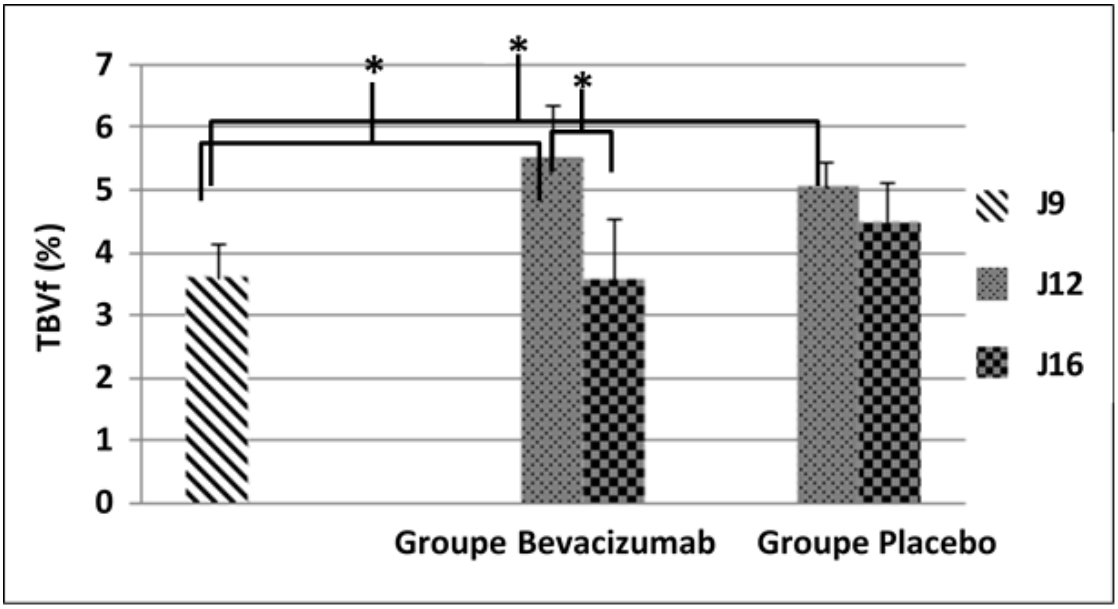


Figure IV.17: Histogramme du TBVf pour les groupes de souris traitées et non traitées à différents stades de progression tumorale. Les changements significatifs de TBVf sont marqués par des astérisques « * ».

Concernant le suivi de K_{model} (**figure IV.18**), nous avons trouvé que ce paramètre avait tendance à augmenter entre J9 et J12 (0,025 ± 0,01 s^{-1} et 0,05 ± 0,03 s^{-1}), mais le changement n'était pas statistiquement significatif. De même, pour le groupe non traité, K_{model} a encore augmenté entre J12 et J16 (de 0,032 ± 0,023 à 0,042 ± 0,05 s^{-1}). En revanche, pour le groupe traité, K_{model} a diminué (J12: 0,066 s^{-1} ± 0,035 s^{-1} et J16: 0,055 s^{-1} ± 0,035 s^{-1}).

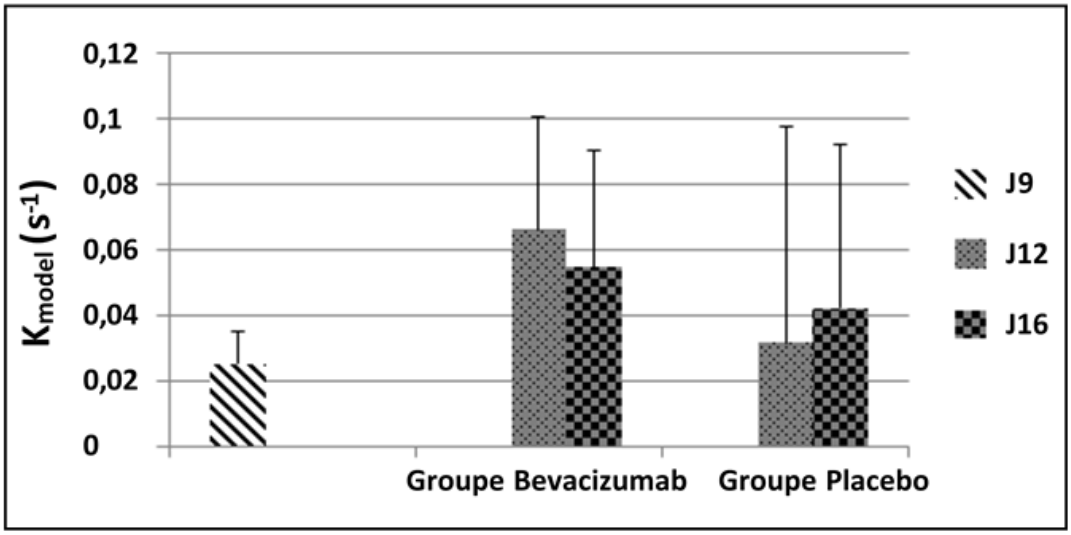


Figure IV.18: Histogramme des valeurs de K_{model} de la tumeur U87 pour les groupes de souris traitées et non traitées à différents stades de progression tumorale. Aucune différence statistiquement significative n'a été obtenue entre les groupes.

Même si le changement de K_{model} n'a pas atteint la significativité, nous avons constaté un « effet marquant » concernant le nombre de voxels indiquant la présence d'une BHE lésée. La **figure IV.19** montre un exemple représentatif de cet effet entre le J12 et le J16 pour les deux groupes (traité et non traité par Bevacizumab).

Pour cet exemple d'une souris traitée par Bevacizumab, K_{model} et le nombre de voxels présentant un K_{model} ont diminué de 55 % et de 85 %, respectivement. Chez la souris qui a reçu le placebo K_{model} a augmenté de 95 % mais le nombre de voxels présentant un K_{model} n'a pas changé.

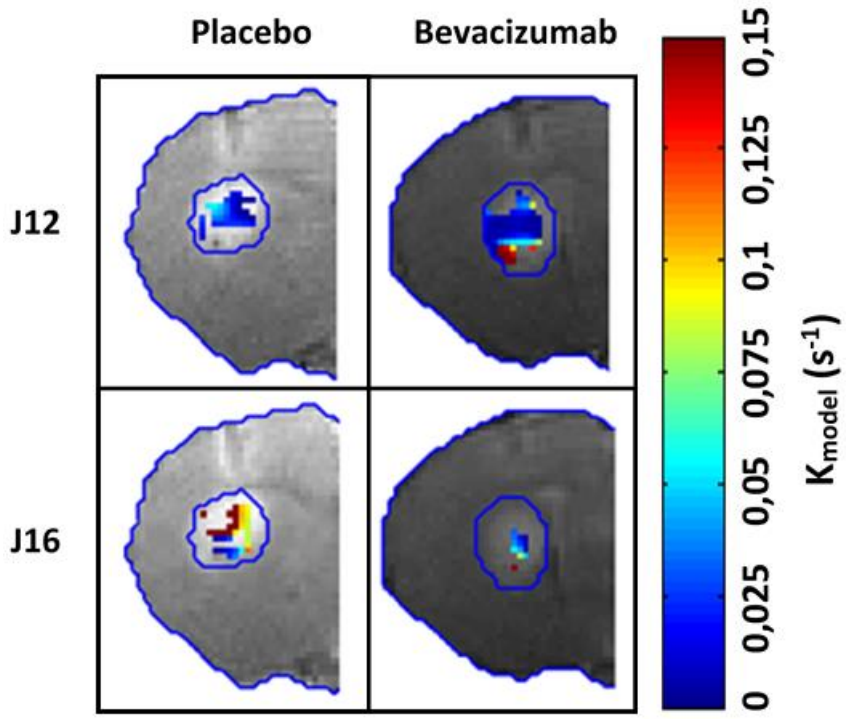


Figure IV.19: Exemple représentatif de suivi de la cartographie de K_{model} tumoral entre J12 et J16 dans le cas du traitement par Bevacizumab et de placebo. Seuls les voxels présentant un $k_{model} > 0$ sont affichés.

Le nombre total des voxels indiquant un $K_{model} > 0$ chez les deux groupes avant et après injection du Bevacizumab ou du placebo a été quantifié. En effet, ce nombre de voxels a diminué de 66% entre J12 et J16 après injection de Bevacizumab. Cependant, dans le groupe placebo ce nombre a augmenté de 12% (**figure IV.20**).

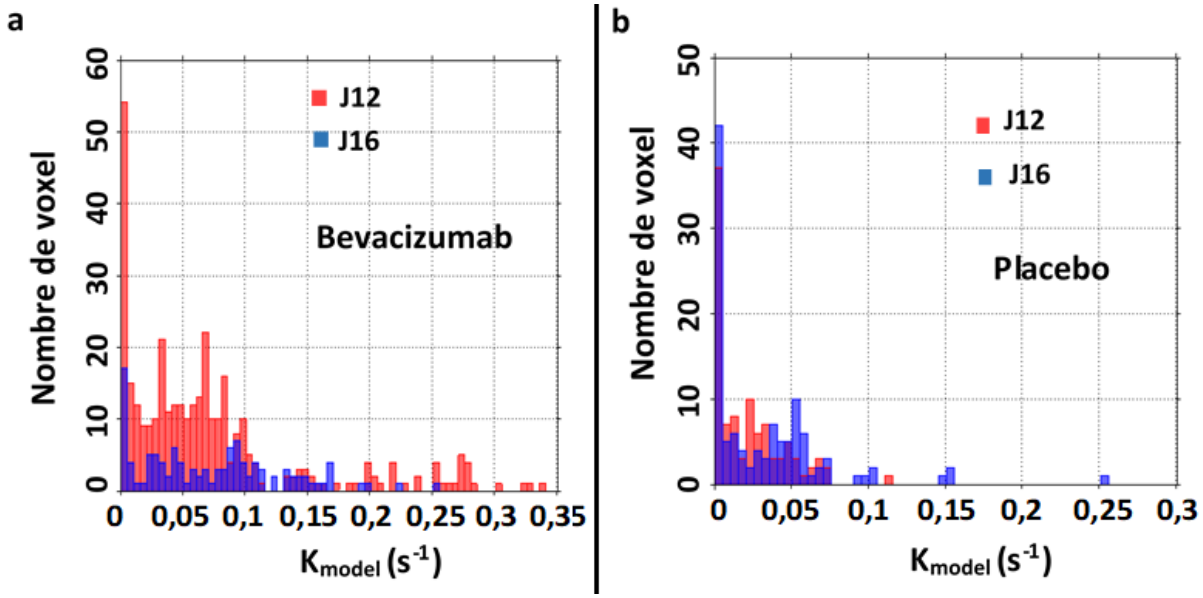


Figure IV.20: Histogramme représentant le changement du nombre de voxels et les valeurs de K_{model} dans le groupe traité par Bevacizumab (a) et dans le groupe placebo (b) à J12 et J16.

IV.5. Discussion et conclusion

Reproductibilité des mesures de VS

Nous avons effectué une estimation théorique et des mesures expérimentales des valeurs de T_1 du sang et du tissu tumoral en présence de l'AC. La vérification expérimentale est utile car l'estimation théorique est basée sur des hypothèses qui peuvent être biaisées par 1) le temps d'élimination de l'AC du sang, 2) le volume sanguin corporel total, 3) le T_{10}, et 4) le r_1. Contrairement à l'estimation théorique, les mesures expérimentales permettent de connaitre le T_1 du tissu tumoral présentant une extravasation de l'AC. Les deux méthodes sont complémentaires et nous ont permis d'identifier le temps d'attente minimum à respecter entre deux injections de Gd-DOTA ($T_{minimum}$ = 5h) permettant des mesures répétées des paramètres de la vascularisation avec la méthode d'IRM $RSST_1$ sans biais dus au signal résiduel.

Nous avons étudié la reproductibilité des valeurs de VS et de K_{model} en combinant l'évaluation qualitative du signal dynamique $RSST_1$ et l'évaluation quantitative par la modélisation du signal $RSST_1$ par notre modèle mathématique.

Nos mesures de reproductibilité sont affectées par 1) la précision du positionnement des rongeurs dans l'aimant, 2) la précision du volume et de la vitesse d'injection de l'AC 3) la modification de la vascularisation tumorale durant l'intervalle de temps entre chaque mesure (19 ± 2 heures entre la première et la dernière mesure) et 3) la qualité du recalage d'image.

La dynamique du signal $RSST_1$ a été reproductible. La variation moyenne de VS dans chaque groupe de souris à J12 (n = 3), à J16 avec traitement de Bevacizumab (n=3) et sans traitement (n = 3), dans le tissu controlatrélal et tumoral est inférieure à 15 %.

Comparé à des mesures de reproductibilité de l'index de flux sanguin cérébral (ICBF) par la méthode CASL (Continuous Arterial Spin Labeling) (Sun and others 2004a) dans le tissu sain controlatéral (variation de 5,5%) nos mesures de VS avec la méthode d'IRM $RSST_1$ dans les mêmes conditions (tissu sain, en absence de Bevacizumab) montrent une reproductibilité légèrement moins bonne (variation de 8,1 %) mais comparable .

L'analyse voxel par voxel a montré que le recalage d'image n'a pas été suffisamment bon pour toutes les acquisitions répétées, probablement à cause d'une légère angulation hors plan

(dans la direction z) du cerveau de la souris d'une répétition à l'autre. Néanmoins, la mesure des valeurs moyennes de VS sur les ROIs tumorales et controlatérales a été reproductible pour toutes les souris.

Suite à ces résultats, nous pouvons conclure que dans les études longitudinales la méthode d'IRM $RSST_1$ est capable de détecter de manière fiable les modifications du TBVf dues à la progression tumorale ou aux effets thérapeutiques si elles dépassent la limite de sensibilité de 15%.

Reproductibilité des mesures de K_{model}

La reproductibilité des mesures de K_{model} était moins bonne que pour le VS ; Malgré le signal dynamique $RSST_1$ qualitativement similaire pour les trois mesures répétées, l'écart type obtenu pour les valeurs de K_{model} pour ces trois mesures était élevé pour toutes les souris (n=9).

Si cela n'est pas le résultat d'un changement biologique des valeurs de perméabilité pendant l'intervalle de temps séparant deux mesures, ceci signifie que l'estimation du paramètre K_{model} est moins robuste. Ceci pourrait être dû 1) à l'injection manuelle de l'AC qui peut ne pas être suffisamment reproductible, 2) à la durée variable du plateau $RSST_1$ qui ne permet pas toujours de modéliser le signal $RSST_1$ d'extravasation jusqu'à l'arrivée à son maximum.

Pour améliorer la reproductibilité des valeurs de K_{model} dans les futures expérimentations, on pourra 1) utiliser une pompe d'infusion de l'AC 2) raccourcir le temps d'attente entre les mesures si l'agent de contraste s'élimine suffisamment vite, et 3) utiliser une dose plus élevée de Gd-DOTA qui pourra prolonger le plateau $RSST_1$ (mais ceci risque d'induire un effet T_2* qui pourra diminuer le signal $RSST_1$).

Validation du TBVf obtenu par la méthode d'IRM $RSST_1$ avec la microscopie à deux photons

Finalement, nous avons comparé les valeurs du TBVf obtenues par la méthode d'IRM $RSST_1$ à celles obtenues par la microscopie à 2 photons ex vivo. Nous avons évalué la corrélation des deux méthodes à différents stades tumoraux avec et sans traitement.

Les mesures effectuées par bi-photon incluent les erreurs de mesure dues 1) à la diffusion de la nouvelle sonde fluorescente lipophile dans le sang et dans le tissu et la fixation de cet agent

sur la membrane vasculaire des cellules endothéliales qui peut varier selon l'état de la BHE et le temps d'attente avant le sacrifice de l'animal (environ 30 min), 2) au mouvement des tranches de lame pendant l'acquisition qui est relativement long (4h pour l'hémisphère tumoral). La comparaison entre la méthode d'IRM $RSST_1$ et bi-photon inclue l'erreur 1) de similitude des trois tranches étudiées (position et épaisseur) en bi-photon et la tranche d'IRM, 2) de l'exactitude du recalage d'image manuel effectué entre ces deux modalités d'où l'adaptation des ROIs en se basant aussi sur la vascularisation de l'imagerie bi-photon et 3) le changement potentiel de la vascularisation en ex vivo par rapport à l'in vivo.

Malgré ces difficultés, les tests statistiques effectués sur les ROIs tumorales n'ont pas révélé une différence significative entre la méthode d'IRM $RSST_1$ et l'imagerie bi-photon.

La quantification de TBVf par la méthode d'IRM $RSST_1$ a aussi été validée par une analyse histologique 2D et stéréologique dans des modèles tumoraux de rat (C6, RG2) (Perles-Barbacaru and others 2012a; Sarraf and others 2015). L'avantage ici est que 1) la technique de bi-photon se base sur une imagerie 3D similaire à celle utilisée en IRM, 2) la sensibilité et la RS obtenues par la technique d'imagerie du bi-photon sont plus élevées que celles obtenues par l'imagerie optique 2D, 3) la technique bi-photon est dotée d'un faible bruit car la fluorescence hors foyer optique est diminuée par rapport à la technique 2D (Dufour and others 2006) et 4) l'analyse des images bi-photon se base sur une technique automatique qui ne dépend pas de l'utilisateur concernant l'étape de seuillage comme celle préconisée avec l'analyse histologique 2D du chapitre précédent.

Finalement, l'étude de reproductibilité de la méthode d'IRM $RSST_1$ a été réalisée 1) pour la première fois sur les mêmes individus 2) chez la souris et ceci pour un modèle tumoral hautement angiogénique (U87), reproduisant plus fidèlement les caractéristiques du glioblastome humain, 3) sous traitement anti-angiogénique. Les valeurs de TBVf obtenues par la méthode $RSST_1$ ont été validées en ex vivo en se basant sur une méthode d'imagerie 3D comme celle utilisée en IRM.

Ces résultats nous permettent de considérer la méthode d'IRM $RSST_1$ suffisamment fiable pour la quantification in vivo du TBVf.

Suivi longitudinal du TBVf

Nous avons évalué la capacité de la méthode d'IRM $RSST_1$ à détecter des changements du TBVf et de K_{model} en effectuant un suivi longitudinal chez la même souris avant et après injection de Bevacizumab ou de placebo. Nous avons fait un suivi personnalisé pour chaque souris, car le nombre de souris de chaque groupe est considéré faible (n = 6) et les valeurs de base du volume tumoral ou du TBVf à J12 était hétérogène. Les souris ont été randomisées dans les deux groupes à J12 sans connaissance au préalable des valeurs de VS et de K_{model}.

Dans une première approche, le profil du signal $RSST_1$ (pente et amplitude) a montré sa capacité à donner des renseignements qualitatifs sur l'état du TBVf et de K_{model} et ainsi sur les changements de ces paramètres au cours de la progression tumorale et en présence de traitement de Bevacizumab. Le profil du signal $RSST_1$ s'est avéré plus sensible que l'imagerie $T_{1W\text{-}GD\text{-}DOTA}$ pour détecter les régions tumorales et péritumorales à TBVf élevé.

La deuxième approche est la mesure quantitative de la vascularisation par la méthode $RSST_1$ qui a été sensible aux changements du TBVf.

Le TBVf était de 48 % plus élevé que le VS du tissu controlatéral à J9 (stade précoce de la progression tumorale) et a augmenté de 46 % au cours de la progression tumorale entre J9 et J12, tandis qu'il a diminué significativement (de 65 %) après le traitement anti-angiogénique entre J12 et J16.

Lemasson et al (Lemasson and others 2011; Lemasson and others 2009) ont évalué le TBVf de l'U87 dans deux études différentes dans le striatum du rat et ont trouvé que celui-ci est de 4,4 % ± 0,3 % et 5,3 ± 0,1 % dans la tumeur versus 3,3 % ± 0,5 % et 2,3 % ± 0,2 % dans le tissu controlatéral ce qui est en accord avec nos mesures.

Des études similaires (Pechman and others 2011; Pechman and others 2012), basées sur des mesures relatives de TBVf chez le rat, ont évalué la progression tumorale de l'U87 (2×10^5 cellules au jour de l'implantation) et sa réponse au Bevacizumab. Ces études ont montré une augmentation de TBVf d'environ 37 % entre J10 et J14 (entre T0 et T4, **figure IV.21**) et une diminution de TBVf d'environ 22% à J14 quand le Bevacizumab est administré à J10 (Pechman and others 2012).

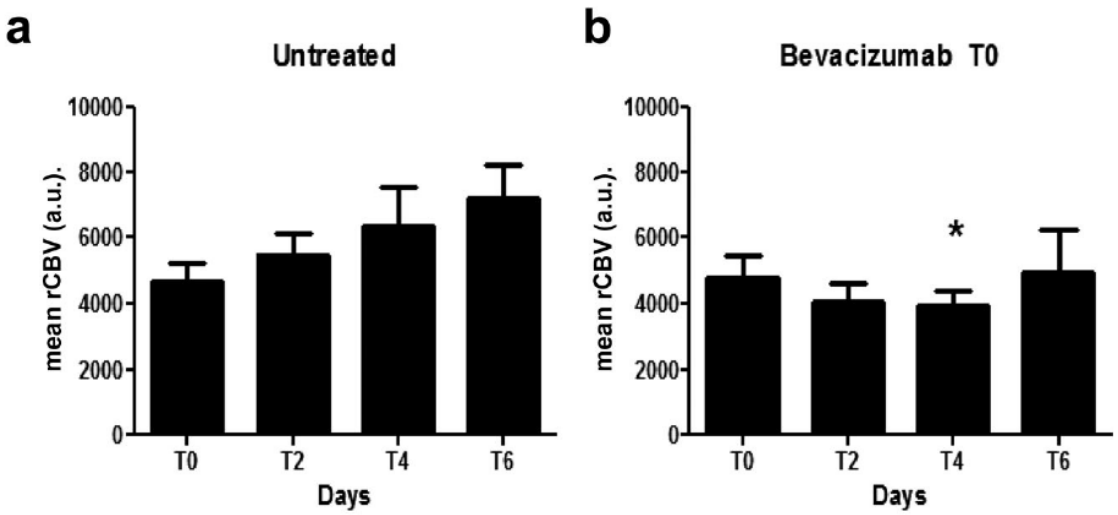


Figure IV.21: Suivi des valeurs moyennes de TBVf relatif dans le groupe traité et non traité par Bevacizumab. Le jour de traitement correspond à T0 (i.e 10 jours après implantation tumorale) (Pechman and others 2012)

Dans cette étude on constate que le TBVf relatif a augmenté de nouveau 6 jours après l'administration du traitement par Bevacizumab. Nous n'avons malheureusement pas inclus ce délai post traitement dans notre étude. Néanmoins toutes les modifications de TVBf étudiées par Pechman au cours de la croissance tumorale et du traitement sont suffisamment grandes pour être détectables avec la sensibilité trouvée pour notre approche IRM-RSST$_1$ sur le modèle murin.

Une autre étude réalisée par les mêmes auteurs (Pechman and others 2011) a montré une diminution d'environ 22 % de TBVf relatif 5 jours après administration du traitement (T5, **figure IV.22**) correspondant à J21 après implantation tumorale. Cependant, pour le groupe non traité par Bevacizumab le TBVf relatif a augmenté de 15 % environ avec un écart type relativement élevé.

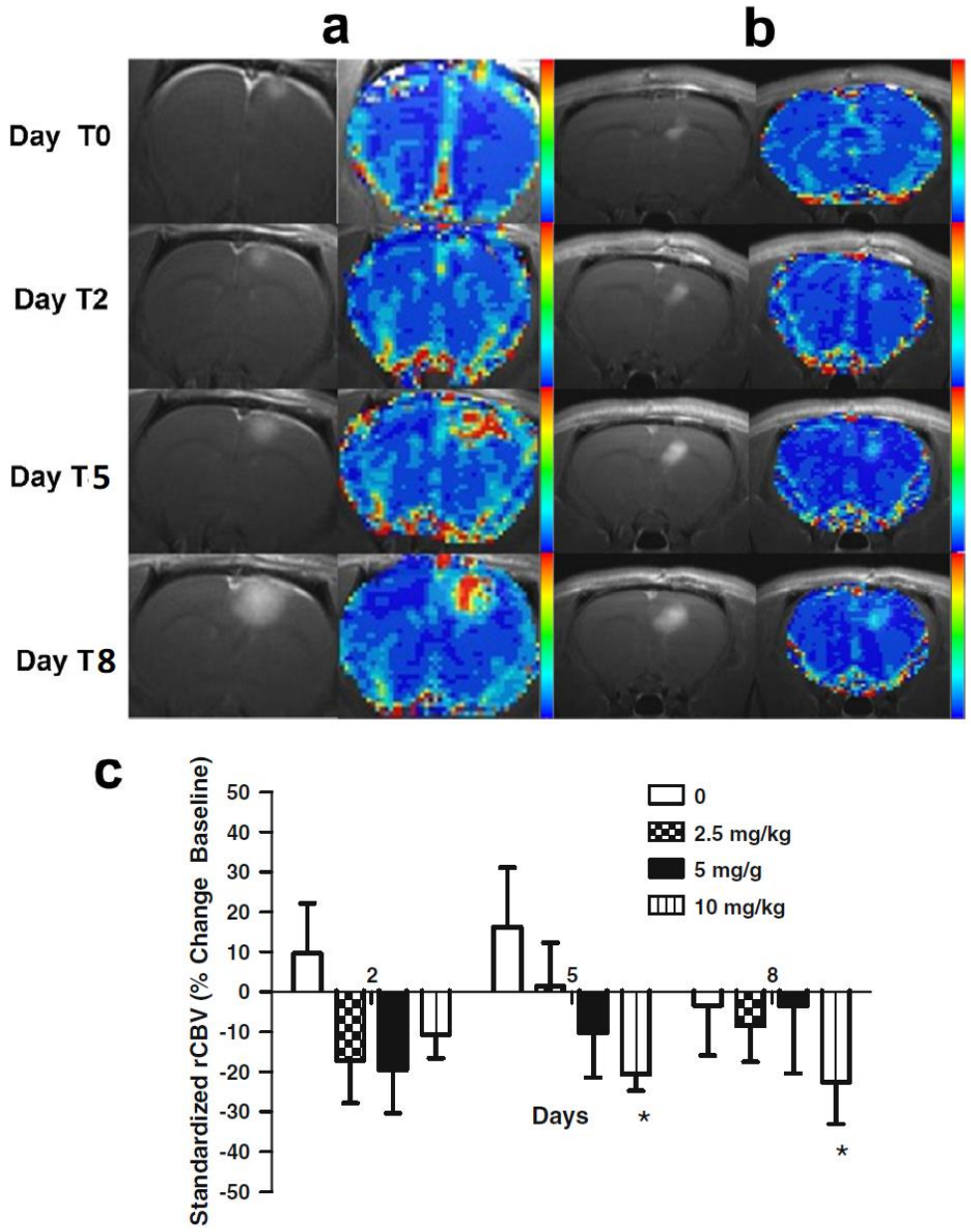


Figure IV.22: Images représentatives $T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$ et cartographie cérébrale de VS relatif pour un rat sans traitement (a) et pour un rat traité par Bevacizumab à 10 mg/kg à T0 = J16 après implantation tumorale (b). (C) Effet de différentes doses de Bevacizumab sur le VS relatif à T2, T5 et T8 par rapport à T0 (Pechman and others 2011).

Pour ces deux études la variation de TBVf est similaire à celle de notre étude, les différences restent dues au nombre de cellules tumorales implantées et aux dates d'imagerie choisies.

La tendance de variation de TBVf dans notre étude sont aussi conformes à d'autres résultats de la littérature pour les tumeurs gliales d'origine humaine implantées dans le cerveau des

rats avec et sans traitement de Bevacizumab (Gossmann and others 2002; Keunen and others 2011; Lemasson and others 2011; Lemasson and others 2009; Pechman and others 2011; Pechman and others 2012; Varallyay and others 2009).

Les résultats présentés dans ce chapitre confirment la sensibilité et l'efficacité de la méthode d'IRM $RSST_1$ pour le suivi quantitatif in vivo du TBVf absolu dans un modèle tumoral humain hautement angiogénique en présence d'une perméabilité vasculaire élevée avec extravasation de l'AC dans le compartiment extravasculaire extracellulaire.

Suivi longitudinal de K_{model}

Les changements de K_{model} ont également été quantifiés. Les valeurs moyennes de K_{model} avaient tendance à diminuer lorsque le Bevacizumab était administré et a augmenté dans le groupe recevant le placebo, en accord avec la littérature, sur les tumeurs gliales d'origine humaine (Gossmann and others 2002; Keunen and others 2011). Cependant, aucune différence statistiquement significative entre les groupes n'a été révélée, ce qui peut s'expliquer soit par une moins bonne reproductibilité de mesure avec le modèle mathématique, soit par la grande hétérogénéité inter- et intra-tumorales de la perméabilité vasculaire, en particulier au stade tumoral avancé et chez les souris non traitées. Ceci nécessite peut-être un nombre de souris plus élevé dans chaque groupe ($n > 6$).

Cette hétérogénéité spatiale de la perméabilité endothéliale est conforme à ce qui est rapporté pour les modèles U87 et pour d'autres modèles de tumeur humaine (Gossmann and others 2002; Preda and others 2004) ainsi que dans le glioblastome humain en général (Kickingereder and others 2014).

Malgré une modification non significative de K_{model} moyenne dans notre expérience, nous avons montré que le nombre de voxels indiquant la présence d'une BHE lésée a diminué après traitement par Bevacizumab et a augmenté significativement en absence de traitement.

Très peu d'études ont quantifié la perméabilité vasculaire de l'U87 dans nos conditions expérimentales; Gahramanov S et al ont rapporté des valeurs de K^{trans} chez la tumeur U87 allant de 0,003 à plus de 0,03 s^{-1} à J12 après l'implantation de la tumeur (Gahramanov and others 2011). Après conversion en unité de K_{model} (i.e: 0,01 à 0,12 s^{-1}, **voir annexe X.4**) ces valeurs sont similaires à celles trouvées dans notre étude.

Ces résultats suggèrent 1) que la méthode d'IRM $RSST_1$ est fiable pour quantifier le K_{model} et 2) la combinaison des valeurs moyennes de K_{model} et du nombre de voxels dont la vascularisation tumorale est perméable, rend la méthode d'IRM $RSST_1$ sensible à la détection des changements de la perméabilité vasculaire tumorale et donc à l'évaluation du degré d'endommagement de la BHE au cours de la progression tumorale et sous traitement.

En conclusion, cette étude montre que la méthode d'IRM $RSST_1$ est sensible pour détecter la vascularisation tumorale et péritumorale notamment à un stade précoce de la progression tumorale de l'U87. Cette méthode est capable de quantifier les effets précoces des traitements anti-angiogéniques sur la vascularisation tumorale. L'effet de normalisation a été mis en évidence notamment sur la circonférence et/ou la région péritumorale.

Très peu d'études ont été réalisées chez la souris pour mesurer quantitativement le volume sanguin et un indice de perméabilité vasculaire par une technique IRM non invasive sous traitement anti-angiogénique. La méthode $RSST_1$ peut réaliser cet objectif avec une reproductibilité suffisante pour la quantification du TBVf permettant des études précliniques multicentriques.

V. Chapitre 5 :

Imagerie du tenseur de diffusion pour la caractérisation tumorale et péritumorale sous traitement par Bevacizumab par voie intraveineuse versus intratumorale (CED)

V.1. Objectifs de l'étude

L'inconvénient majeur du Bevacizumab dans le traitement des récidives du GBM est sa capacité à promouvoir l'infiltration tumorale (Lamszus and others 2003; Lucio-Eterovic and others 2009; Norden and others 2008; Paez-Ribes and others 2009; Salas 2011). Ce traitement controversé (Salas 2011), inhibiteur de la vascularisation tumorale et promoteur de l'infiltration des cellules tumorales, est un défi des thérapies anti-angiogénique, limitant leur efficacité (Lamszus and others 2003). Certaines études ont montré que l'administration du traitement directement au centre de la tumeur (CED) peut avoir un effet bénéfique limitant les effets indésirables et augmentant la survie globale des sujets (Schmidt and others 2004; Wang and others 2015).

D'autre part, la plupart des cellules infiltrantes se trouvent principalement à 3 cm de la tumeur primaire, zone dite péritumorale, et elles sont considérées responsables de la récidive de la tumeur (Nagashima and others 1999; Petrecca and others 2013; Sherriff and others 2013; Yamahara and others 2010). Mais le cerveau est complètement envahi par les cellules de gliomes dormantes en plus faible densité. En clinique, la délinéation de la région péritumorale est définie 1) à une distance fixe (selon le clinicien) de la bordure tumorale qui est délinée elle-même en se basant sur 2) les techniques d'imageries anatomiques conventionnelles (méthode qui se base sur le rehaussement du signal après injection du produit de contraste). En suivant cette méthodologie, dans la plupart des cas, la détection précoce de cellules infiltrantes n'est pas possible (Yamahara and others 2010). Ceci peut être optimisé et personnalisé dans les études précliniques en utilisant 1) des méthodes d'imagerie comme la FLAIR et la DTI qui ont montré récemment en clinique leur efficacité pour détecter directement une anomalie tissulaire (BM 2009; Ellingson and others 2010; Ellingson and others 2011; Wen and others 2010) 2) en effectuant une délinéation personnalisée de la région péritumorale.

Malgré l'importance de la zone péritumorale, très peu d'études précliniques ont examiné cette zone in vivo au cours de la progression tumorale pendant une thérapie anti-angiogénique.

L'objectif de ce travail est d'étudier in vivo et en préclinique la capacité de la technique DTI combinée aux imageries FLAIR et T_{1W} à détecter 1) des différences entre les régions tumorales (TR), péritumorales (PTR) et controlatérales (CR) à une date précise de la progression

tumorale, et 2) des variations des paramètres de DTI sous traitement par Bevacizumab dans la zone péritumorale en effectuant des ROIs personnalisées de cette région dans le cas de la tumeur U87 (voir **section V.2.3** : **figure V.1**) . L'U87 a été choisie car nous avons constaté dans le chapitre précédent que l'U87 présente une activité angiogénique dans la région péritumorale. Le traitement est injecté par voie intraveineuse (i.v) et en intratumoral (CED).

V.2. Matériels et méthodes

Nous avons choisi le même modèle animal tumoral (souris-U87) pour les mêmes raisons décrites **au chapitre 4 section IV.2.1**. La culture cellulaire de l'U87 est décrite dans le **chapitre 3 section III.2.3**.

V.2.1. Modes d'injection du Bevacizumab

L'injection du Bevacizumab a été réalisée par voie intraveineuse à 10 mg/kg dans un volume de 200 µL de sérum physiologique (0,9 % NaCl) et en intratumoral (CED) à raison de 20 mg/ml. L'injection en CED a été réalisée à l'aide d'un cathéter avec une aiguille de Hamilton reliée à des pompes automatiques. Le délai d'administration de Bevacizumab était d'environ 25 minutes (0,5 µl/min), pour un volume maximal d'injection de 12,5 µl. L'aiguille était rétractée lentement pendant 5 minutes supplémentaires. La peau était fermée avec du cyanoacrylate.

V.2.2. Séquences IRM utilisées

Les acquisitions d'IRM chez la souris sont effectuées sur l'imageur Bruker Biospec USR A VIII à 4.7 T (**voir chapitre 2 section II.2.1**).

V.2.2.1. FLASH

Nous avons utilisé la séquence FLASH pour localiser la tumeur et pouvoir effectuer la mise en place de la souris dans l'imageur IRM à différentes dates d'imagerie d'une façon reproductible (voir **chapitre 4 section IV.2.3.1** pour les détails des paramètres utilisés).

V.2.2.2. Acquisition du tenseur de diffusion

Nous avons utilisé une séquence de type EPI (echo planar imaging) de type écho de spin avec des gradients de diffusion (voir **chapitre 1 section I.3.2.1**). Les paramètres d'acquisition sont les suivants :TR = 2,5 s, TE = 27 ms, NA = 6, Nseg = 4, FOV = 16 x 16 x 8 mm^3, RS = 0,125 x 0,125 x 1 mm^3, gradients de diffusion (b = 0 et 1000 s/mm^2), temps d'application du gradient = 3,5 ms, temps séparant deux gradients consécutifs = 10 ms. Directions de gradient de diffusion = 6 (xx, yy, zz, xy, xz, yz). Tacq = 7 min.

V.2.2.3. Turbo RARE écho de spin

Nous avons utilisé la séquence Turbo RARE écho de spin pour acquérir les images anatomiques du cerveau de souris avec une pondération T_2 (T_{2W}) et une pondération T_1 avec injection de Gd-DOTA ($T_{1w\text{-}CE}$) pour identifier les détails structuraux et tumoraux.

Les paramètres utilisés pour la pondération en T_1 sont les mêmes que ceux présentés dans le **chapitre 4 section IV.2.3.3**. Les paramètres d'acquisitions des images T_{2w} sont présentés dans le **chapitre 2 section II.2.4.3.**

V.2.2.4. Inversion récupération spin écho rapide

Nous avons utilisé la séquence spin écho rapide précédée par une impulsion RF d'inversion afin d'acquérir une image anatomique de type FLAIR. Cette imagerie est utilisée pour délimiter la région tumorale et permet comme décrit auparavant dans le **chapitre 4 section IV.2.3.5** d'éviter la contamination avec du signal issu du liquide céphalorachidien (LCR). Les paramètres utilisés pour cette imagerie sont décrits dans le **chapitre 4 section IV.2.3.5**.

V.2.3. Traitements des données IRM

Les cartes paramétriques du DTI (diffusivité moyenne (MD), diffusivité maximale ($D_{//}$), diffusivité transverse ($D_{\perp}$) et la fraction d'anisotropie (FA)) ont été calculées par un code Matlab, basé sur l'algorithme de Levenberg-Marquardt, développé par Franc Mauconduit (ancien doctorant de notre équipe) en se basant sur les équations développées dans le **chapitre 1 section I.3.2.1.b.4**.

Pour permettre le suivi des mêmes régions au cours de la progression tumorale, un recalage d'images a été réalisé (code Matlab fait maison basé sur les travaux de DJ.Kroon (Kroon and Dirk-Jan 2011)). Les images anatomiques à fort contraste ont été utilisées pour le recalage. La matrice de transformation a ensuite été extraite et appliquée aux images DTI.

Les ROIs tumorales ont été définies manuellement en se basant sur les images $T_{1W\text{-}CE}$ et FLAIR dans la région de striatum. Des ROIs symétriques ont également été dessinées dans l'hémisphère cérébral controlatéral. Les ROIs péritumorales à une date spécifique d'imagerie ont été délimitées par rapport à la progression tumorale identifiée à la session d'imagerie suivante (Figure V.1). La délimitation à l'aide de cette stratégie a été réalisée dans les trois dimensions, c'est-à-dire que les régions tumorales apparaissant sur les images T_{1W} sur des coupes adjacentes à J28 ont été considérées comme des régions péritumorales à J14 et à J21 (Figure V.1).

Le volume tumoral est calculé selon l'**équation** suivante:

$$Volume\ tumoral = \sum_{i=1}^{n} L * W * D * S_i \qquad \text{[Eq. V.1]}$$

n est le nombre de coupes contenant la tumeur (allant de 1 à i), L, W and D sont les dimensions du voxel et S est le nombre des voxels tumoraux dans la coupe 'i'.

Le changement du volume tumoral, de la MD et de $D_{//}$ sont calculés selon l'**équation** suivante:

$$\Delta X\ \% = 100 \frac{X_{après} - X_{avant}}{X_{avant}} \qquad \text{[Eq. V.2]}$$

X fait référence au volume tumoral, ou à la MD ou à $D_{//}$.

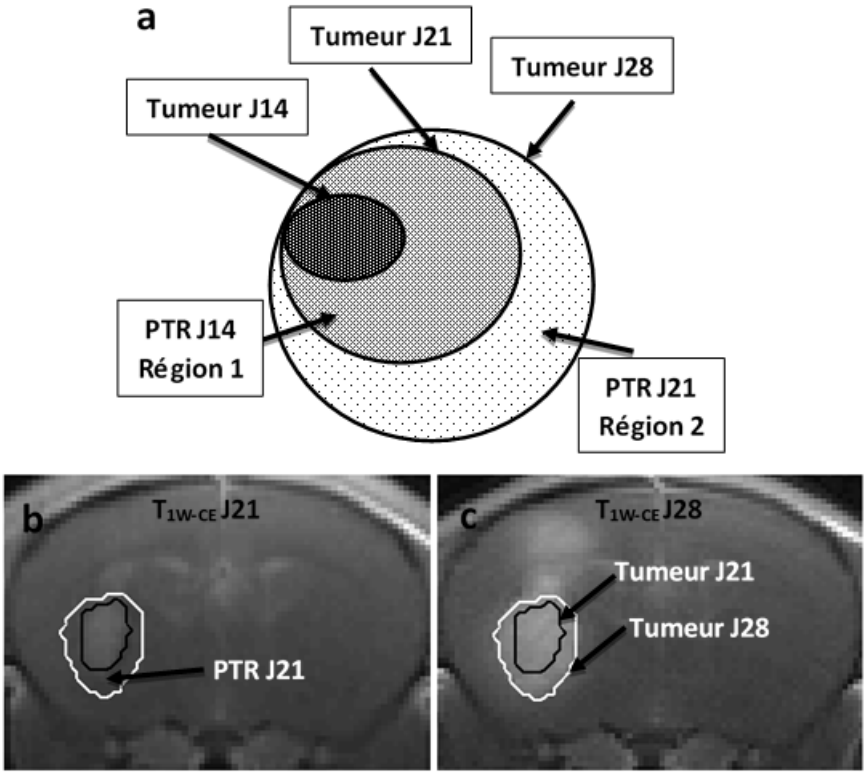


Figure V.1: (a) Représentation schématique de la façon dont les zones péritumorales ont été délinées durant la progression tumorale. (b and c) Images axiales pondérées T_1 post injection de AC ($T_{1w\text{-}CE}$). La PTR à J21 (b) est la région entre les limites externes de la tumeur à J21 (b) et à J28 (c).

V.2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel MedCalc (version 16.8.4).

V.3. Protocoles expérimentaux

V.3.1. Etude in vivo

L'implantation intracrânienne des cellules tumorales U87 chez la souris et leur préparation pour l'imagerie IRM a été effectuée comme décrit dans le **chapitre 3 section III.3.1.1** et dans le **chapitre 2 section II.3.2.1 et II.3.2.2** respectivement.

V.3.1.1. Etude expérimentale IRM

Les rongeurs ont été randomisés en plusieurs groupes indépendamment de leur volume tumoral. A J14, deux groupes de souris ont eu le traitement par Bevacizumab. Le premier groupe (n = 6) a eu le traitement par voie i.v et le deuxième groupe (n = 6) par injection intratumorale. Le groupe contrôle (n = 6) a reçu un traitement placebo (sérum physiologique) par CED. Les trois groupes ont subi une IRM de base (J14) avant le traitement et l'administration du placebo.

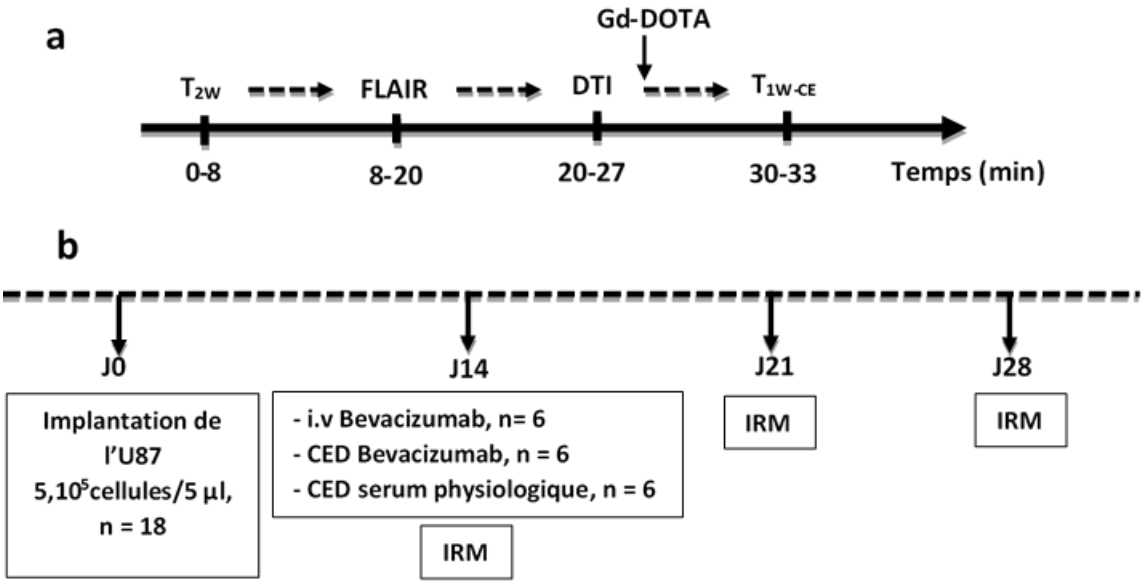


Figure V.2: Protocole IRM (a) et expérimental (b) pour le suivi longitudinal des paramètres de DTI

Le Gd-DOTA a été injecté manuellement sous forme de bolus (veine caudale, cathéter BD Neoflon™ 26 Ga, temps d'injection inférieur à 2 s) à l'intérieur de l'aimant à une dose de 0,7 mmol/kg en i.v. (volume d'injection ≅ 210-240 µl).

Le diagramme dans la **figure V.2 a** montre le protocole d'IRM réalisé à J14, J21 et J28 post implantation tumorale (V.2b). L'IRM T_{1W} a été effectuée trois minutes environ après l'injection du Gd-DOTA.

V.4. Résultats

Pour tous les groupes, nous avons trouvé une différence entre le volume tumoral délinéé sur les images anatomiques $T_{1W\text{-}CE}$ versus FLAIR inférieure à 5% mais qui n'est pas statistiquement significative ($P_{Wilcoxon}$> 0,4). Ces différences sont constatées à J14. A ce stade précoce de la progression tumorale, l'IRM $T_{1w\text{-}CE}$ était plus pertinente pour détecter une anomalie du signal que les images FLAIR (**figure V.3 et V.4,** J14 flèches blanches). Dans ces régions, le rehaussement du contraste sur les images T_{1W} était accompagné d'un changement des paramètres de DTI par rapport aux valeurs normales.

Néanmoins, dans les cas où la tumeur était située près du liquide céphalorachidien (LCR), les images FLAIR étaient particulièrement utiles pour délimiter la tumeur tout en évitant le LCR (**figure V.3 et V.4)**.

En se basant sur ces résultats et pour la suite de l'étude, la délinéation de la tumeur a été effectuée en utilisant à la fois les images $T_{1w\text{-}CE}$ et FLAIR afin de maximiser la sensibilité à la détection de la tumeur sans inclure les régions du LCR.

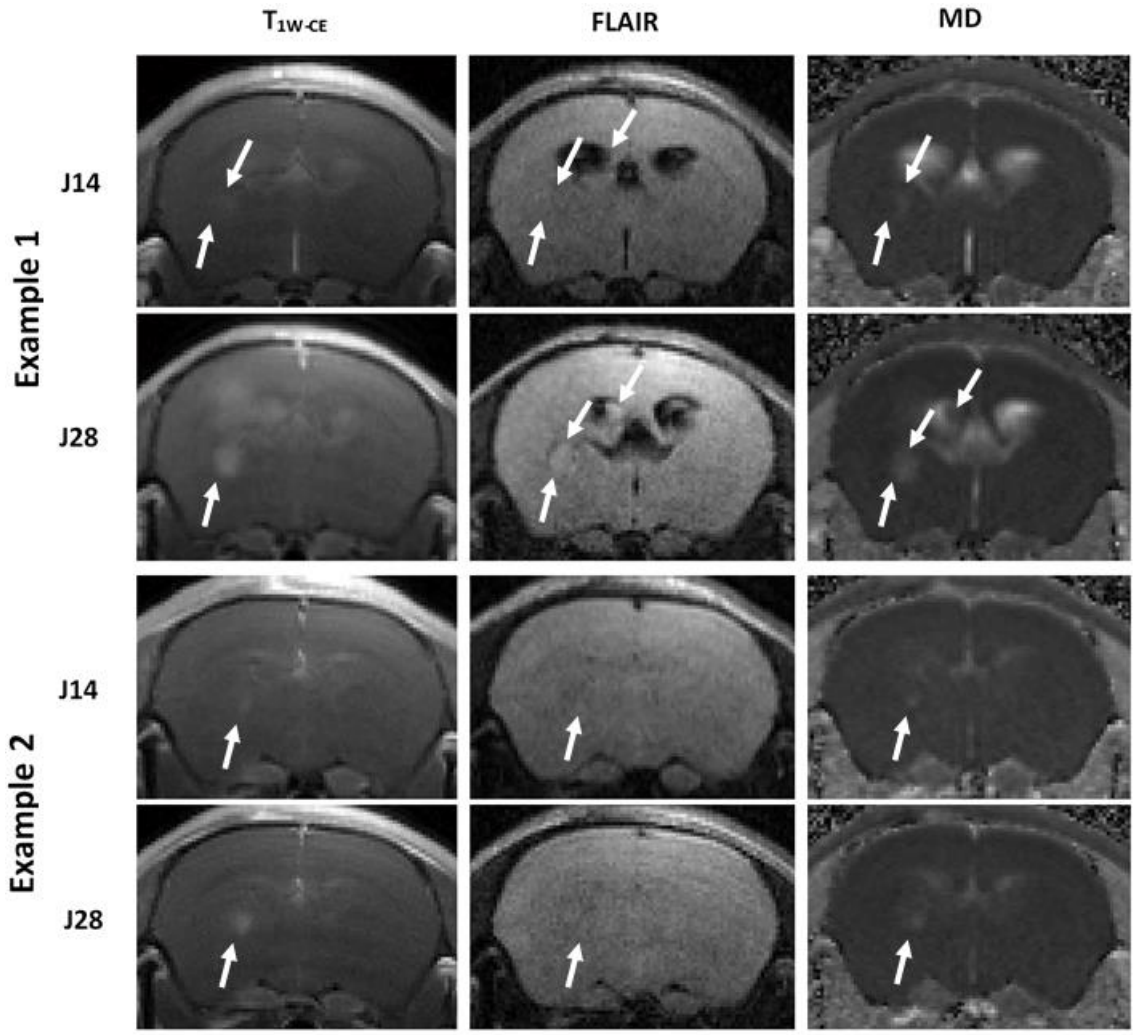


Figure V.3: Deux exemples typiques montrant la sensibilité de l'imagerie $T_{1W\text{-}CE}$ à détecter à J14 le rehaussement du signal tumoral après injection du Gd-DOTA tandis que l'imagerie FLAIR ne détecte aucune anomalie à cette date mais uniquement à un stade tardif de la progression tumorale (J28). Les régions tumorales sont marquées par des flèches blanches.

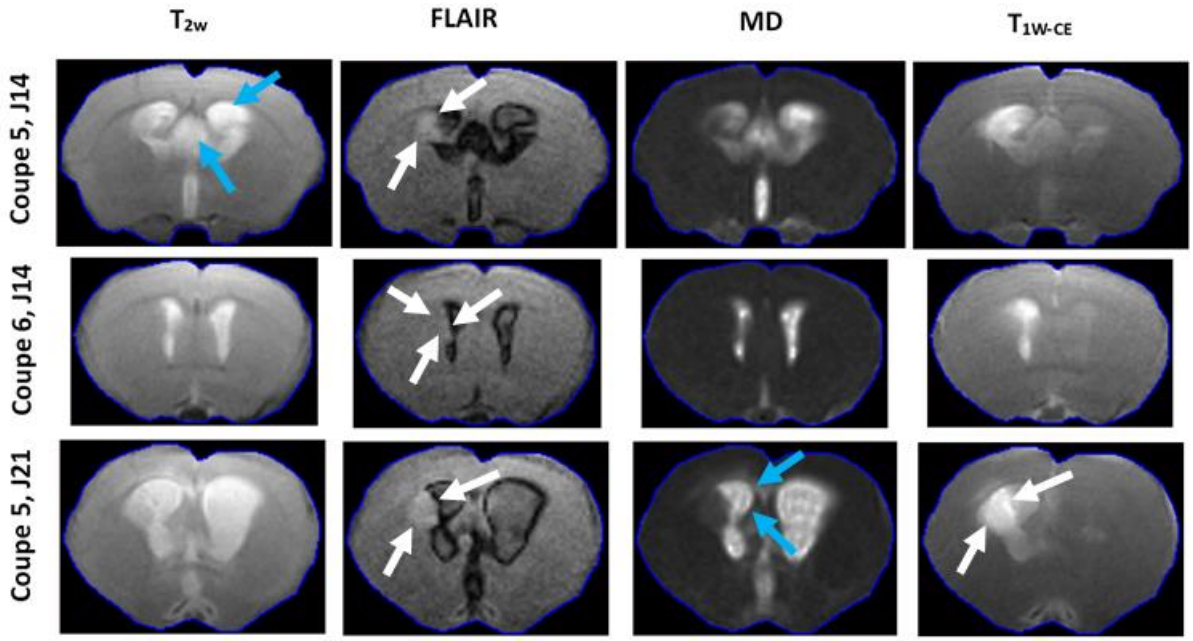


Figure V.4: Exemple typique de l'avantage des images FLAIR pour la délinéation de la tumeur proche du LCR. Les flèches blanches indiquent une tumeur avec un signal anormal sur les images FLAIR, tandis que les flèches bleues indiquent un rehaussement du signal sur les autres techniques d'IRM reflétant le LCR.

Par rapport au CR (6 x 10^{-4} ± 0,3 x 10^{-4} mm^2/s), les valeurs de MD à J14 dans le TR et le PTR étaient significativement plus élevées (8,8 x 10^{-4} ± 0, 3 x 10-4 mm^2/s, 7,1 x 10^{-4} ± 0,5 x 10^{-4} mm^2/s, $P_{Friedman} < 0,001$). Le même comportement a été observé pour les paramètres $D_{//}$ et $D^{\perp}$ ($P_{Friedman} < 0,001$).

Les valeurs de FA étaient les plus élevées dans le PTR (0,27 ± 0,04) et significativement plus basses ($P_{Friedman} < 0,001$) dans le TR (0,2 ± 0,02) par rapport au CR (0,23 ± 0,04) (**Figures V.5 et V.6**). Ces valeurs sont utilisées comme valeurs de base pour évaluer la réponse de la région péritumorale au Bevacizumab.

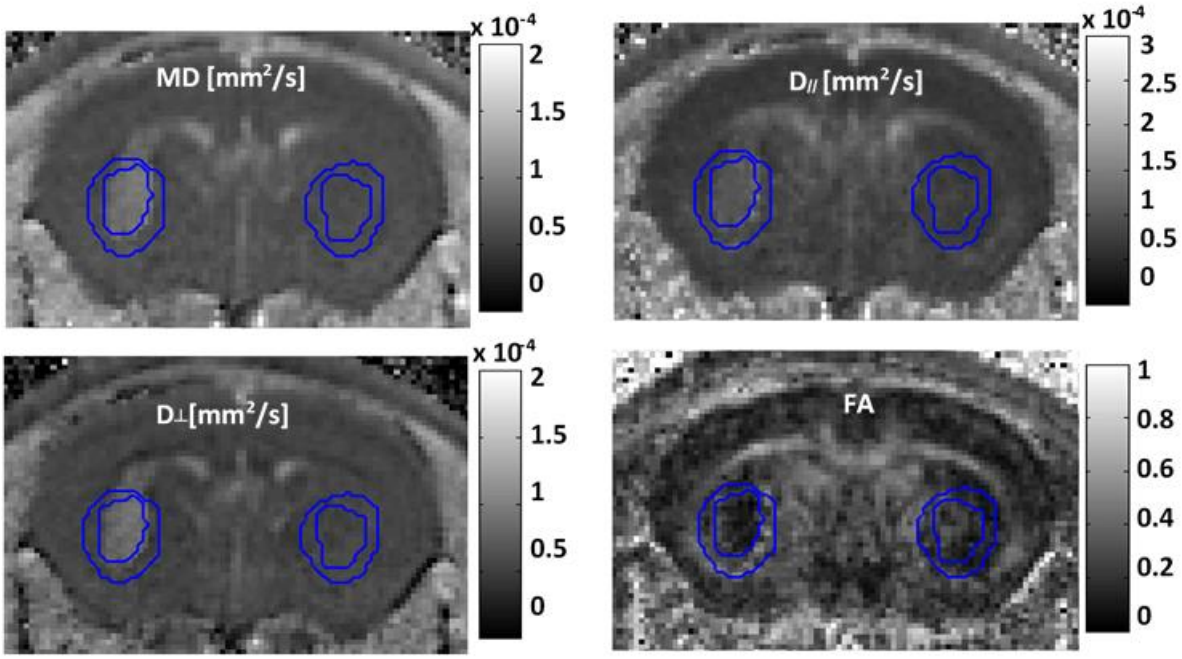


Figure V.5: Exemple de cartographies des paramètres DTI en présence de la tumeur U87 à J14. Nous pouvons apprécier ces paramètres dans la région tumorale, péritumorale et le controlatérale. Des valeurs élevées de MD, $D_{//}$ et $D_{\perp}$ sont observées dans la tumeur alors que les valeurs de FA sont faibles par rapport à la région controlatérale. Dans la région péritumorale, tous les paramètres de DTI étaient supérieurs à ceux de la région controlatérale.

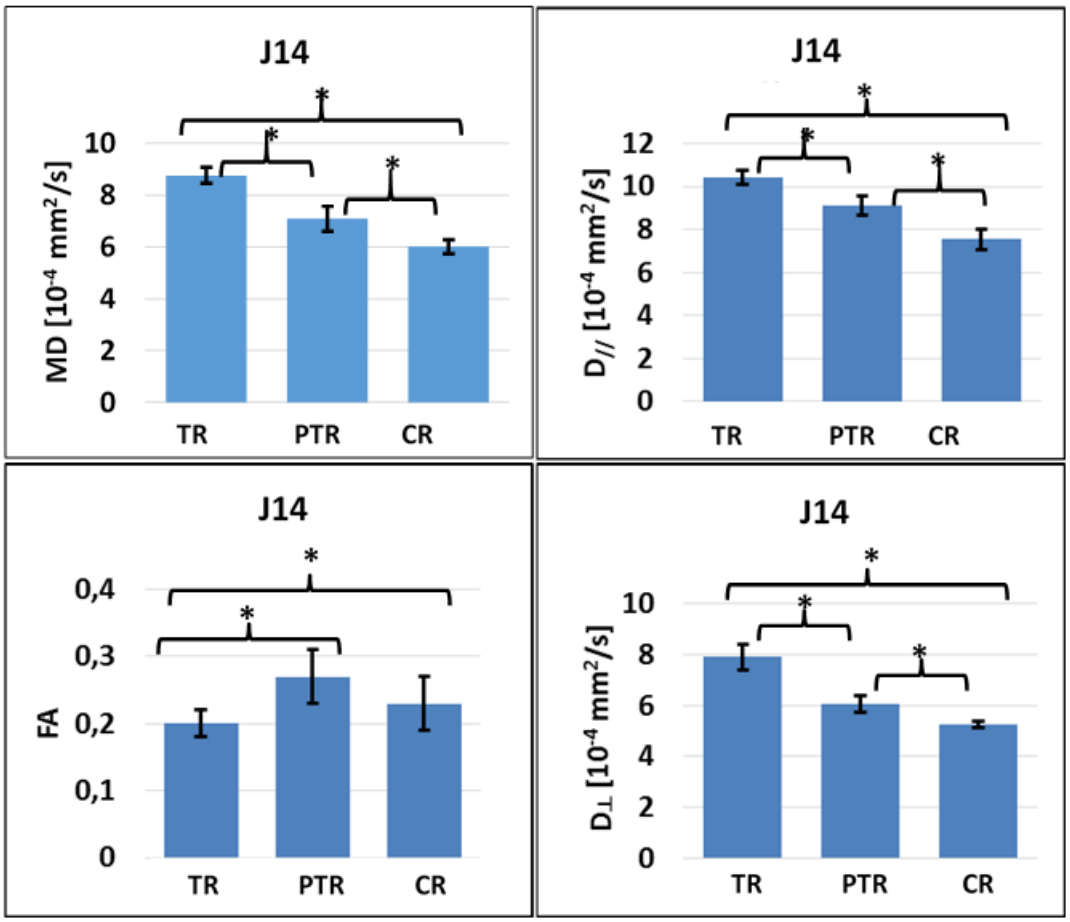


Figure V.6: Valeurs des paramètres DTI (MD, $D_{//}$, $D_{\perp}$, FA) à J14 dans les régions tumorales, péritumorales et controlatérales (n = 18).

Dans le CR, les paramètres DTI n'ont pas changé significativement entre J14 et J28 ($P_{Wilcoxon}$ > 0,40, n = 18). La **figure V.7** montre les valeurs obtenues dans le groupe traité avec Bevacizumab par voie veineuse (n = 6).

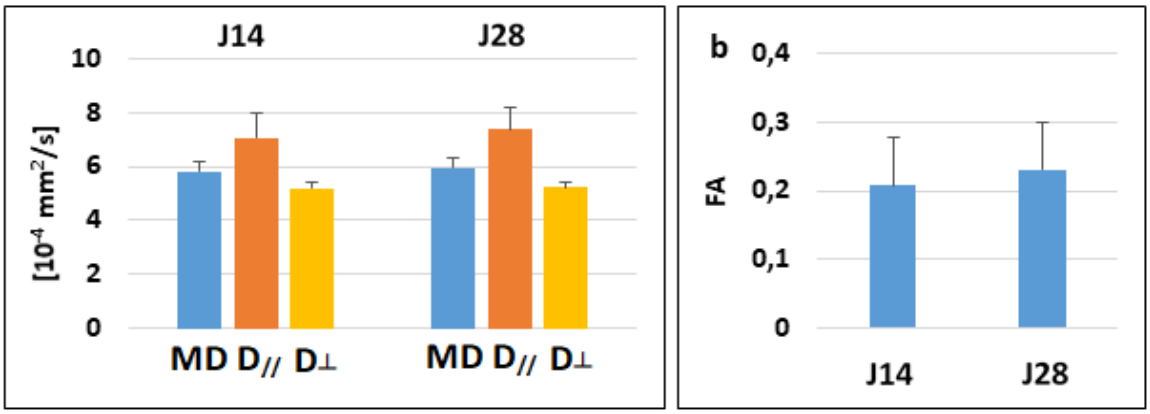


Figure V.7: Paramètres DTI dans la CR à J14 et J28 pour le groupe traité par voie intraveineuse. Aucun changement significatif de ces paramètres n'a été observé entre J14 et J28.

Entre J14 et J21, tous les paramètres DTI du PTR à J14 (**figure 1**, région 1) ont diminué dans le groupe traité par CED et dans le groupe non traité. Ces valeurs tendent à se rapprocher de celles du CR. Au contraire, lorsque le Bevacizumab était injecté en i.v, les paramètres DTI dans le PTR avaient tendance à augmenter (à l'exception de la FA) et de se rapprocher des valeurs du DTI constatées dans la tumeur (FA inclus) (**figure V.8**).

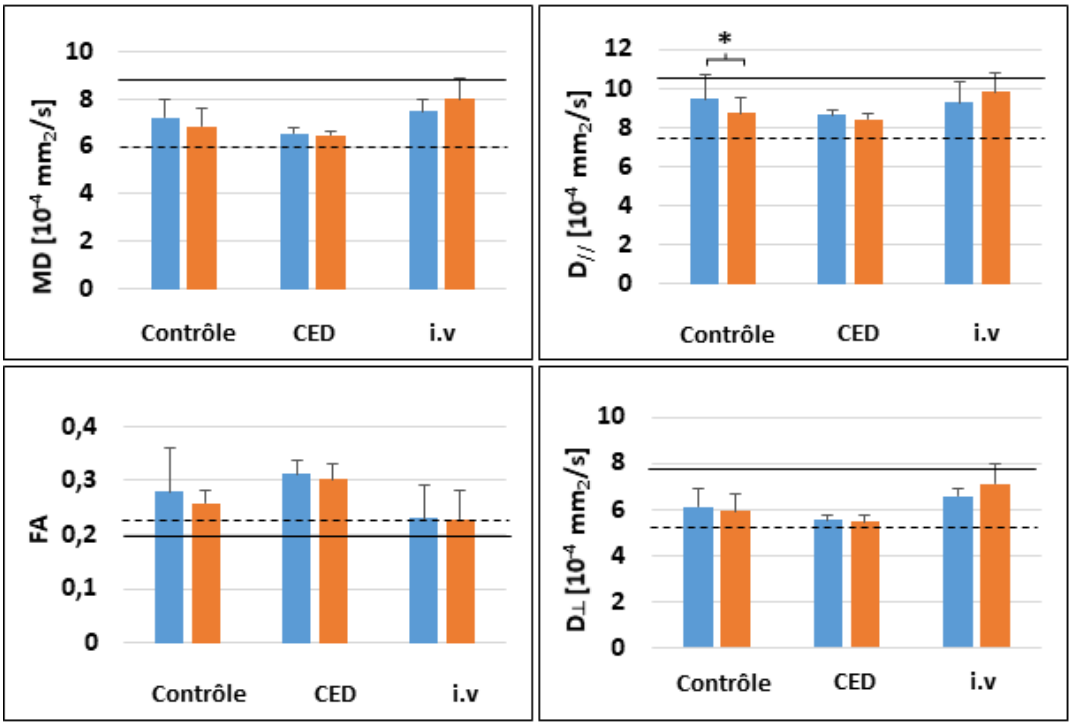


Figure V.8: Variation des paramètres de DTI dans le PTR du J14 entre J14 (couleur bleue) et J21 (couleur orange). Les valeurs de base des paramètres du DTI (n = 18) dans le TR et le CR obtenus à J14 sont indiquées par une ligne continue et une ligne pointillée respectivement. « * » montre une différence statistiquement significative entre les groupes étudiés.

Un comportement similaire a été observé pour les paramètres DTI dans le PTR à J21 (**figure 1**, région 2) entre J14 et J21 (**figure V.9**). Dans cette région, les valeurs des paramètres DTI étaient plus proches de celles de la région controlatérale.

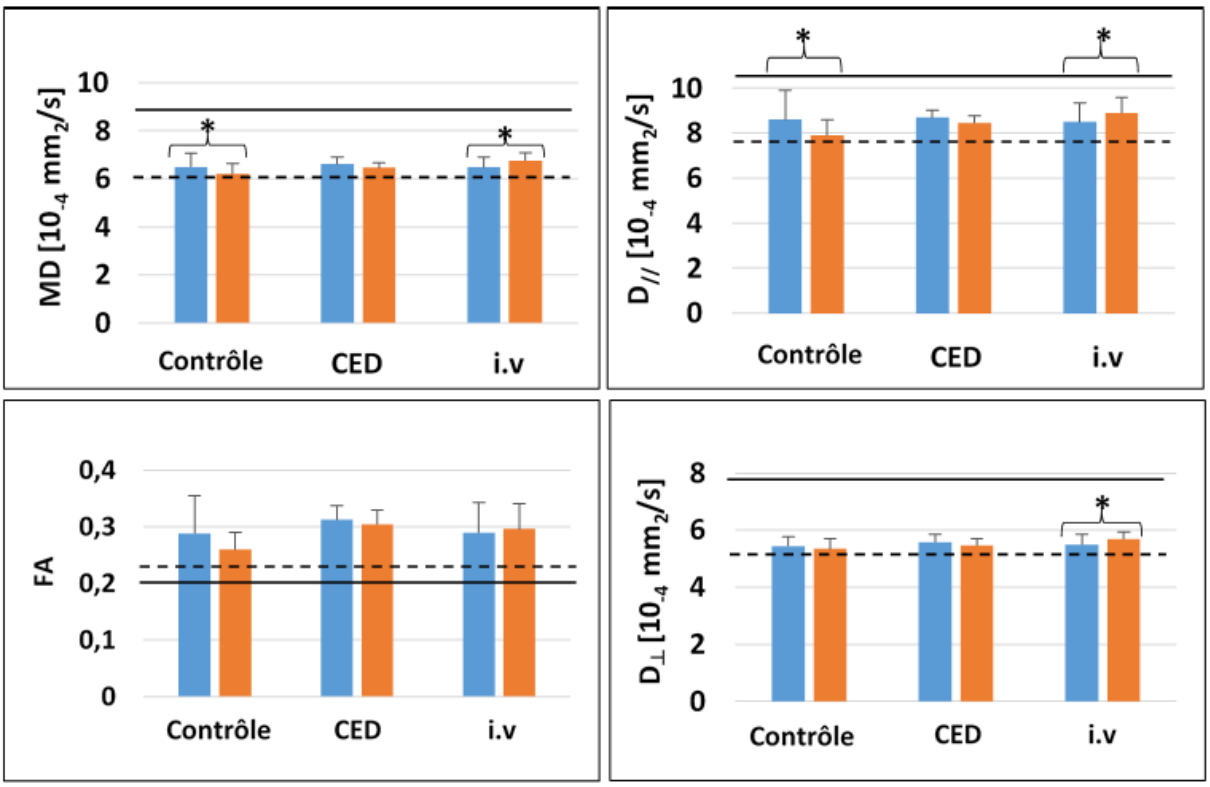


Figure V.9: Variation des paramètres DTI dans le PTR du J21 entre J14 (couleur bleue) et J21 (couleur orange). Les valeurs de base des paramètres DTI (n = 18) dans le TR et le CR obtenus à J14 sont indiquées par une ligne continue et une ligne pointillée respectivement. « * » montre une différence statistiquement significative entre les groupes étudiés

Le **tableau 1** résume le sens de la variation des paramètres DTI dans le PTR entre J14 et J21. Les valeurs des paramètres DTI ont diminué dans le groupe contrôle et lorsque le Bevacizumab a été administré par CED. Cependant, ces mêmes paramètres ont augmenté lorsque le Bevacizumab a été administré par i.v. ($P_{Wilcoxon} < 0,05$).

	MD	$D_{//}$	FA	$D_{\perp}$
Absence de Bevacizumab	↘*	↘*	↘	↘
Bevacizumab en CED	↘*	↘*	↘*	↘
Bevacizumab en i.v	↗*	↗*	↗	↗*

Table V.1: Variation des paramètres DTI dans le PTR à J14 et à J21 au cours de la progression tumorale en présence et en absence de traitement par Bevacizumab entre J14 et J21. Les changements significatifs sont marqués par des astérisques « * ».

Le volume tumoral (Figure 10) a augmenté significativement (de 2 à 500%) entre J14 et J28 après l'administration intraveineuse de Bevacizumab ($P_{Wilcoxon} < 0,02$). Lorsque le Bevacizumab était administré par CED, les changements de volume de la tumeur se situaient entre -11 et 52%. Pour le groupe contrôle, le volume tumoral a augmenté entre 0 et 43 %. Pour le groupe CED et le groupe contrôle le changement du volume tumoral entre J14 et J28 n'a pas été significatif ($P_{Wilcoxon} > 0,3$).

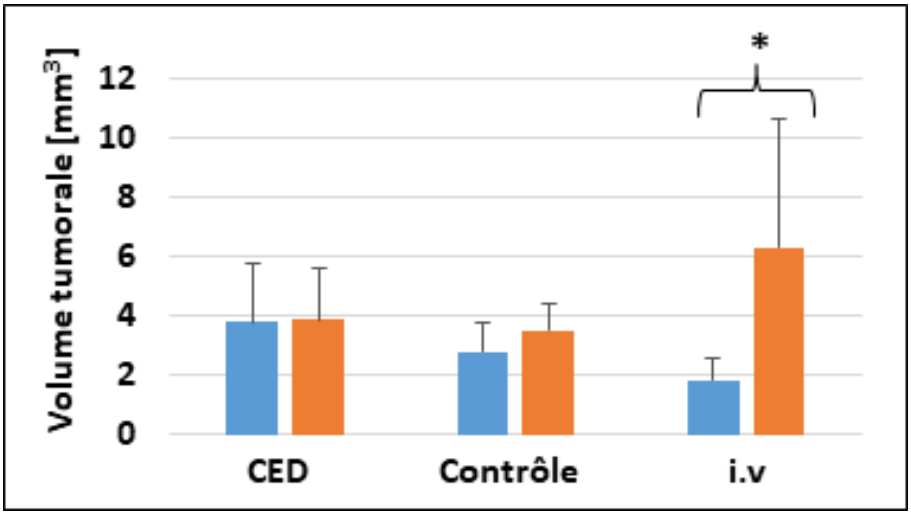


Figure V.10: L'histogramme du volume tumoral entre J14 (couleur bleue) et J28 (couleur rouge) pour tous les groupes. Les changements significatifs sont marqués par des astérisques « * ».

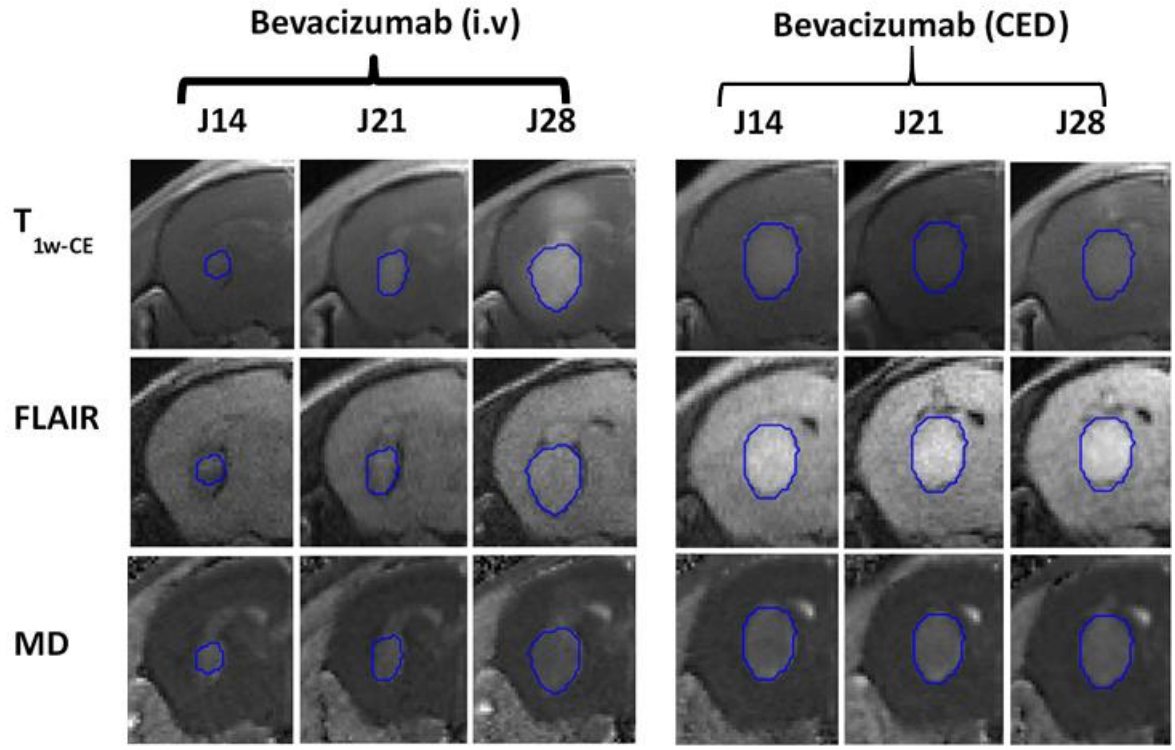


Figure V.11: Exemple représentatif de la progression du volume tumoral après un traitement par Bevacizumab administré par voie i.v versus CED. Les deux modalités d'imagerie anatomique, $T_{1w\text{-}CE}$ et FLAIR, ont montré la même progression du volume de la tumeur confirmée par la carte de diffusivité moyenne MD. Le volume tumoral a augmenté entre J14 et J28 lorsque le Bevacizumab a été administré par voie i.v. En revanche, le volume de la tumeur est resté stable dans le groupe traité par CED.

Nous avons corrélé la variation du volume tumoral avec la variation des valeurs de diffusivité moyen et maximal pour tous les groupes. Seul le groupe traité par injection intraveineuse a montré une corrélation significative (**figure V.12**).

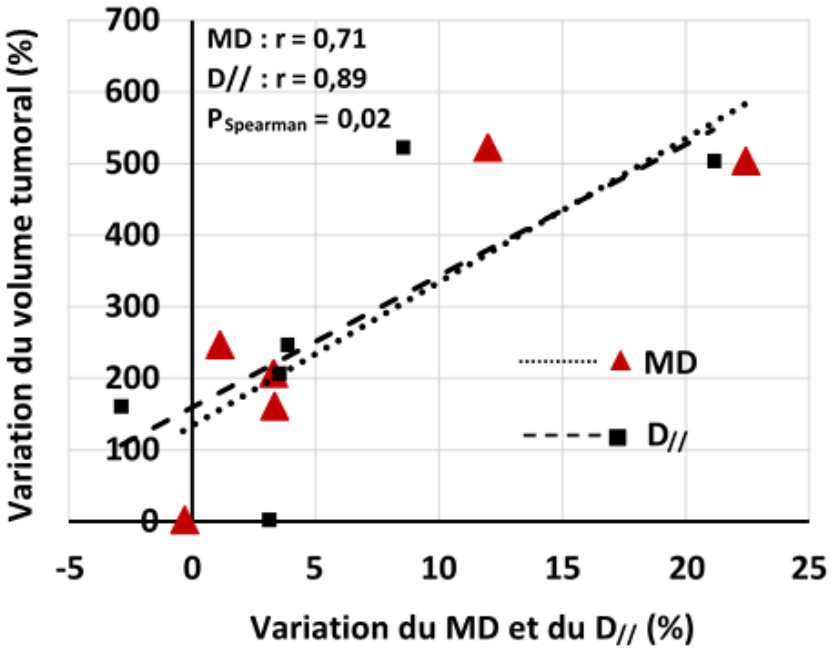


Figure V.12: Diagramme représentant la variation du volume tumoral entre J14 et J28 en fonction de la variation du MD et du $D_{//}$ entre J14 et J21 obtenus dans le PTR à J14 pour le groupe traité par injection i.v (n = 6).

V.5. Discussion et conclusion

En neuro-oncologie, les TR et les PTR sont généralement déterminés par les imageries anatomiques FLAIR et $T_{1W\text{-}CE}$. Les paramètres DTI sont utilisés comme biomarqueurs pour caractériser le TR et pour évaluer le PTR en vue d'une détection précoce de l'infiltration de cellules tumorales. Dans cette étude, nous avons montré les avantages et les inconvénients des méthodes FLAIR, $T_{1W\text{-}CE}$ et du DTI pour délinéer la tumeur U87 au cours de sa progression et sous traitement anti-angiogénique. A notre connaissance, les images FLAIR n'ont jamais été appliquées en préclinique pour ce type de tumeur. Nous avons proposé une méthode de détermination des PTRs d'une façon personnalisée en se basant sur une étude rétrospective des images FLAIR et $T_{1W\text{-}CE}$. Les paramètres DTI ont été évalués dans ces PTRs lorsque le traitement est administré par voie intraveineuse ou par CED, puis corrélés à l'invasion tumorale.

En effet, les médicaments délivrés par CED peuvent être plus efficaces. Ceci est dû à la concentration plus élevée du traitement et sa distribution plus homogène au site de la tumeur par rapport à une administration systémique du traitement (Bobo and others 1994) (voir aussi **chapitre 1 section I.2.4.4**). Dans le cas du traitement du glioblastome par des anti-angiogéniques ou des médicaments cytotoxiques, l'efficacité du traitement peut être améliorée par le CED, comme il a été démontré dans des études cliniques (Debinski and Tatter 2009) et précliniques (Schmidt and others 2004). En effet, une administration directe de médicament dans l'espace extracellulaire extravasculaire dans lequel le VEGF est sécrété par les cellules tumorales est censée réduire l'invasion et l'infiltration tumorales plus efficacement que l'administration systémique (de Groot and others 2010; Hoeben and others 2004; Wang and others 2015).

$T_{1W\text{-}CE}$ et FLAIR sont tous deux nécessaires pour délinéer le volume tumoral.

Dans la plupart des cas et même après l'administration du traitement, les images FLAIR et $T_{1W\text{-}CE}$ ont conduit au même volume tumoral ce qui n'était pas attendu. Cela s'explique par le caractère de l'U87 qui peut être décrit comme « solide » (Candolfi and others 2007b). La séquence $T_{1W\text{-}CE}$ était plus sensible à la détection de la tumeur au début de la progression tumorale que les images FLAIR. Toutefois, les images FLAIR permettent de mieux délimiter

une tumeur en présence de LCR que la séquence $T_{1W\text{-}CE}$. Par conséquent, les informations des deux images ont été utilisées pour délinéer les régions tumorales et péritumorales.

Les paramètres quantitatifs de DTI permettent de distinguer le tissu péritumoral du tissu tumoral et du tissu controlatéral.

Les valeurs de DTI dans le TR ont été plus élevées que celles dans le CR à J14, à l'exception de la FA qui était la plus faible dans le TR, en accord avec la littérature (Sinha and others 2002; Sun and others 2004b). Cela peut s'expliquer par une diminution de densité cellulaire et d'organisation structurelle dans le néoplasme, la présence d'un œdème et l'augmentation de la teneur en eau extracellulaire (Brunberg and others 1995; Sinha and others 2002; Wieshmann and others 1999).

Sur les cartes de FA, il existe un rebord étroit de valeurs élevées autour de la tumeur, indiquant une région péritumorale fortement anisotrope, tandis que les diffusivités diminuent par rapport à la région tumorale (Lu and others 2004; Tropine and others 2004). Ce rebord peut s'expliquer par des fibres de la matière blanche comprimées par la tumeur, une vascularisation accrue (comme constaté dans l'étude décrite **au chapitre 4**) et/ou une présence de cellules spatialement organisées le long de la néovascularisation péritumorale. Cette dernière explication peut indiquer la présence d'infiltration de cellules tumorales au bord de la tumeur (Demerath and others 2016; Price and others 2016).

En revanche, tous les paramètres DTI étaient plus élevés dans la région péritumorale que dans la région controlatérale. Cela peut s'expliquer par la présence d'infiltration de cellules tumorales ou par la présence de néovaisseaux causant une augmentation de la diffusivité (Price and others 2016; Sinha and others 2002; Sun and others 2004b) par rapport à la région controlatérale.

En conclusion, à J14, une différence statistiquement significative dans les paramètres de DTI a été observée entre les régions tumorale, péritumorale et controlatérale, à l'exception de la FA entre la région péritumorale et controlatérale, ce qui est probablement dû à la grande variabilité intra-groupe. Nous avons constaté que $D_{\perp}$ et la FA sont les paramètres les plus sensibles de DTI pour distinguer la tumeur des régions péritumorales.

Les paramètres quantitatifs DTI dans le tissu péritumoral sont des biomarqueurs sensibles de la réponse au Bevacizumab.

Afin de pouvoir évaluer la réponse de la région péritumorale au traitement, nous avons considéré les paramètres de DTI obtenus à J14 comme paramètres de référence. Dans cette étude, la surveillance du PTR au cours de la progression tumorale était notre objectif principal, les paramètres DTI dans le TR à J21 et J28 n'ayant pas été évalués.

Dans les études cliniques, la région péritumorale est souvent délimitée à une distance fixe, par rapport à un bord tumoral, présumé invariable au cours du temps (Lu and others 2003). Dans notre étude, une nouvelle stratégie est utilisée basée sur une délinéation personnalisée du péritumoral par étude rétrospective afin de maximiser la sensibilité des paramètres DTI à détecter l'infiltration tumorale et à montrer une différence de mesures entre les groupes étudiés.

Dans ce que nous considérons être la région péritumorale à J14 et à J21, les paramètres du DTI évoluent de la même manière chez les souris non traitées et traitées par CED entre J14 et J21 et se rapprochent des valeurs du DTI dans le controlatérale. Au contraire, lorsque le traitement est administré par i.v, ces valeurs s'approchent de celles trouvées dans la tumeur à J14. Des différences statistiquement significatives ont été trouvées pour les changements des paramètres DTI dans les PTR entre J14 et J21 pour la MD et le $D_{//}$ dans tous les groupes.

Néanmoins un groupe de contrôle avec une injection de solution saline par voie veineuse est nécessaire pour étudier si l'injection CED présente un impact sur la croissance tumorale.

La diffusivité dans la région péritumorale est corrélée à la croissance tumorale sous traitement par Bevacizumab par voie intraveineuse.

Nous avons montré que l'augmentation des valeurs de la MD et de $D_{//}$ dans le PTR est corrélée à la croissance tumorale observée sur les images $T_{1W\text{-}CE}$ et FLAIR, lorsque le traitement est administré par voie intraveineuse. Ceci est en accord avec la littérature (Lu and others 2003; Tropine and others 2004). De Groot et al (de Groot and others 2010) ont trouvé une corrélation radiographique et pathologique chez l'Homme et la souris, validant une invasion tumorale après traitement du glioblastome par Bevacizumab en utilisant l'imagerie FLAIR et le $T_{1W\text{-}CE}$ comme images radiographiques.

Le traitement anti-VEGF est connu pour augmenter l'infiltration cellulaire (Lamszus and others 2003; Lucio-Eterovic and others 2009), l'augmentation de la diffusivité et de la FA dans les régions péritumorales pourrait s'expliquer par la présence de cellules tumorales invasives bien délimitées et spatialement organisées (FA élevé) et par la présence de la néovascularisation (FA et MD élevées) (Demerath and others 2016; Price and others 2016; Sinha and others 2002; Sun and others 2004b).

En combinant nos résultats, le résultat de Groot et al et les résultats ci-dessus qui montrent la relation Bevacizumab/invasion des cellules tumorales nous pouvons conclure que le changement des paramètres DTI dans le péritumoral nous renseigne sur l'invasion tumorale.

À notre connaissance, il n'existe à ce jour aucune étude établissant une relation entre la variation du volume tumoral et le traitement par Bevacizumab injecté par CED. Cependant, des études ont montré une augmentation de la survie suggérant une diminution de l'invasion tumorale lorsque le traitement anti-angiogénique est injecté par le CED (Schmidt and others 2004; Wang and others 2015). Nos résultats ont montré que la croissance de la tumeur est ralentie lorsque le Bevacizumab est administré par CED, ce qui est en accord avec la suggestion précédente.

Selon les critères de RANO basés sur l'IRM, le traitement au Bevacizumab par CED conduit à stabiliser la maladie, tandis que l'administration de Bevacizumab par i.v entraîne une progression de la maladie, avec une corrélation entre la croissance tumorale et la MD ainsi que le $D_{//}$ dans les régions péritumorales.

Enfin, les paramètres DTI dans la CR n'ont pas changé de manière significative, ce qui indique qu'aucun changement microarchitectural ou d'infiltration tumorale n'a lieu dans le CR à J28. Cependant, une diminution du volume sanguin a été rapportée dans un tissu cérébral d'apparence normale après l'administration i.v Bevacizumab (Stadlbauer and others 2015).

<u>Les limites des paramètres du DTI.</u>

Des études menées chez des patients atteints de glioblastome ont montré que les paramètres DTI présentaient une variabilité interindividuelle considérable et une hétérogénéité spatiale élevée au sein des régions tumorales et péritumorales, ce qui excluait l'identification de fortes

différences entre les régions (Sinha and others 2002; Tropine and others 2004), alors que dans notre étude, nous avons pu distinguer les régions PTR et TR basé sur les paramètres DTI.

Malgré cela, le DTI n'est pas un biomarqueur direct de la tumeur et ne peut pas être spécifique pour la détection de l'invasion et de la migration de cellules tumorales pour les deux raisons suivantes : Premièrement, le gliome de haut grade est un microenvironnement hétérogène où des modifications macroscopiques et microscopiques (densité cellulaire, micro et macro-vascularisations, œdème vasogénique, œdème cellulaire, nécrose…) peuvent affecter les paramètres du DTI de façon différente et, deuxièmement, le glioblastome ne réagit pas toujours aux traitements, ce qui rend difficile l'évaluation des paramètres DTI. Des modalités d'imagerie quantitatives supplémentaires telles que l'imagerie de perfusion ainsi que la spectroscopie ^{1}H pourraient être utiles pour faciliter l'évaluation de la réponse du GBM au traitement anti-angiogénique.

Limites de l'étude.

Bien que les **figures V.8 et V.9** montrent que $D_{\perp}$ a également tendance à augmenter dans la région péritumorale sous traitement de Bevacizumab par injection i.v, l'absence de changement significatif du $D_{\perp}$ et de la FA dans les régions péritumorales pourrait être due aux raisons suivantes: (i) le nombre limité de souris (n = 6) dans chaque groupe, (ii) les caractéristiques de la tumeur U87, qui est dite avoir à la fois des aspects solides (Candolfi and others 2007a) et de tumeur invasive/infiltrante (de Groot and others 2010; Lucio-Eterovic and others 2009; Sun and others 2004b; Zhao and others 2009) avec un phénotype qui évolue dans le temps (Allen and others 2016), ou (iii) une dose faible de Bevacizumab qui est insuffisante pour favoriser l'invasion prononcée de l'U87, ce qui correspond à un volume tumoral identique détecté sur les images $T_{1w\text{-}CE}$ et FLAIR. Cette étude manque d'information sur le volume sanguin tumoral et péritumoral et les données histologiques (nécrose, œdème, zones de prolifération cellulaires, etc.) permettant de valider la corrélation entre les paramètres DTI et l'invasion de cellules tumorales.

En conclusion, peu d'études ont examiné les régions péritumorales par IRM de diffusion afin d'évaluer si cette technique d'IRM est capable de détecter l'infiltration tumorale après traitement par Bevacizumab et de prédire la réponse à ce traitement. Dans cette étude, nous avons aussi montré que les paramètres DTI, combinés aux images FLAIR et $T_{1w\text{-}CE}$, pouvaient

jouer un rôle important dans la délinéation des tissus anormaux et dans la différenciation de la tumeur de la région péritumorale.

En outre, le DTI a montré sa capacité à détecter des différences dans la région péritumorale quand le Bevacizumab est injecté par i.v versus CED. Certains changements de paramètres DTI dans le péritumoral étaient corrélés à l'invasion tumorale quand le Bevacizumab est administré par i.v. Ceci rejoint la présence d'une activité angiogénique constatée lors de la mesure de TBVf dans la périphérie de la tumeur U87 (voir **chapitre 4**). Pour donner suite à ces résultats encourageants, d'autres études devraient être élaborées pour établir une corrélation entre ces résultats et les résultats histopathologiques de l'U87 pour confirmer ou non l'infiltration de l'U87 sous traitement par Bevacizumab.

VI. Discussion générale

L'objectif principal de cette thèse était le développement et la mise en place des techniques d'IRM quantitatifs et qualitatifs permettant de caractériser le tissu tumoral et son environnement en termes de vascularisation et de microarchitecture. Le but ultime était d'effectuer un suivi tumoral et d'évaluer la réponse thérapeutique, notamment à un traitement anti-angiogénique, qui agit sur la vascularisation mais aussi sur la microarchitecture tumorale.

Le point de départ de ce travail reposait sur le développement de la technique $RSST_1$ initialement mise en place dans notre laboratoire pour la quantification du volume sanguin avec des AC intravasculaires. Le développement était axé sur 1) l'augmentation du RSB et de la fiabilité de la séquence d'acquisition et 2) le développement d'un modèle mathématique pour modéliser le signal $RSST_1$ dans le cas d'une extravasation de l'AC à cause d'une BHE lésée permettant de cartographier le volume sanguin tumoral et un coefficient apparent d'accumulation d'AC : le K_{model}.

Dans ce travail de thèse, nous avons montré théoriquement et expérimentalement les améliorations et les avantages de la séquence d'imagerie IR-MDEFT 3D : insensibilité aux flux sanguin et réduction des biais de la mesure. Ceci permet le suivi quantitatif des paramètres vasculaires dans le cerveau murin avec un RSB et une reproductibilité satisfaisante. Grâce au gain en RSB obtenu, des cartographies du volume sanguin à plus haute RS chez le rat et la souris sont également envisageables. Une RS plus élevée serait notamment utile pour cartographier l'hétérogénéité de la vascularisation tumorale et péritumorale.

Des stratégies d'augmentation de la RS avec la séquence IR-MDEFT 3D ont été envisagées et étudiées, mais nous n'avons malheureusement pas pu les mettre en place sur les appareils d'IRM durant ce travail de thèse, car elles nécessitaient une collaboration avec l'équipe d'ingénieurs Bruker.

Pour l'estimation des paramètres vasculaires dans les tumeurs où l'AC s'extravase, souvent des microvaisseaux, nous avons proposé un modèle mathématique simplifié (basé sur l'hypothèse d'un échange unidirectionnel de l'AC du compartiment vasculaire vers le compartiment extravasculaire extracellulaire) pour la modélisation du signal $RSST_1$. Ce modèle

n'est valide que pour une courte durée (1-2 min) après l'injection de l'AC tel que c'était le cas dans nos expériences, et/ou quand la perméabilité vasculaire n'est pas très élevée. Nous avons montré la faisabilité du modèle dans différents environnements tumoraux dans le cerveau du rat et de la souris. Quand les conditions d'application du modèle mathématique sont remplies, et la validation de certaines hypothèses (voir **annexe X.4**) nous discutons la possibilité de relier K_{model} à K^{trans}.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'analyse du signal $RSST_1$ en appliquant le modèle mathématique peut être réalisée d'une façon semi-automatique et permet la quantification du volume sanguin tumoral sans avoir recours à l'AIF dont la quantification reste difficile en pratique préclinique ainsi qu'en clinique. Les mesures du volume sanguin tumoral dans un modèle de gliome chez le rat ont été corrélées à la technique IRM de susceptibilité magnétique à l'état stationnaire et à l'histologie en 2D. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2015 (Sarraf and others 2015).

Dans un second temps, nous avons montré que le signal $RSST_1$ est reproductible et sensible aux changements du VS dans le tissu sain et tumoral dans le cerveau de souris et que les mesures du TBVf obtenus par la méthode $RSST_1$ étaient corrélées à celles obtenues ex vivo par imagerie 3D par microscopie à deux photons. Les mesures de K_{model} ont montré une grande variabilité dans les régions tumorales et ne nous ont pas permis de démontrer leur reproductibilité. Ceci est, probablement lié à l'injection manuelle de l'AC et/ou à l'intervalle de mesure entre chaque répétition (entre 5 et 8h) qui, en prenant en compte l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la perfusion tumorale, peut être considéré élevé pour évaluer la reproductibilité de ce paramètre. Une étude utilisant un injecteur automatique pourrait permettre de vérifier la reproductibilité de la mesure du K_{model}.

Les mesures quantitatives du TBVf et du K_{model} ont été étudiées lors d'un suivi longitudinal d'un modèle de glioblastome d'origine humaine (U87) sous thérapie anti-angiogénique mimant le cas clinique. Cette étude a confirmé que les changements des paramètres vasculaires sous traitement anti-angiogénique sont plus précoces et plus sensibles que le changement de contraste sur les images pondérées T_1 après injection d'AC ($T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$). Nos résultats quantitatifs de TBVf et du K_{model} ont été similaires à ceux trouvés dans la littérature

(Gahramanov and others 2011; Lemasson and others 2011; Lemasson and others 2009; Pechman and others 2011; Pechman and others 2012).

VII. Conclusion et perspectives

L'objectif de départ de ce travail de recherche était de développer une méthode quantitative et non invasive pour caractériser la microvascularisation dans des modèles de tumeurs cérébrales et afin d'évaluer l'effet d'une thérapie anti-angiogénique. Dans ce travail, nous n'avons pas seulement optimisé l'acquisition et validé la mesure par différentes techniques de référence. Nous avons pu pour la première fois utilisé un modèle mathématique pour l'estimation du TBVf et du paramètre K_{model} chez la souris, et également pour la première fois dans un modèle de tumeur d'origine humaine caractérisé par une hétérogénéité, une angiogenèse et une infiltration plus proches de celles observées en clinique. Ce développement méthodologique nous a permis de suivre non invasivement le volume sanguin tumoral lors d'un traitement anti-angiogénique, et de montrer la sensibilité précoce des mesures quantitatives et fonctionnelles par rapport à la taille tumorale sur les IRM anatomiques comme critère de réponse tumorale à la thérapie (**verrous N°3 est résolu**).

La méthode $RSST_1$ peut être maintenant considérée comme un outil fiable pour la quantification du volume sanguin tumoral en préclinique, qui permettra, non invasivement, en suivant le même animal, d'évaluer des nouvelles stratégies thérapeutiques susceptibles d'agir sur la microvascularisation tumorale.

Une stratégie thérapeutique innovante évaluée lors de notre travail de thèse est l'administration de l'agent thérapeutique par CED dans la tumeur U87. Le Bevacizumab étant suspecté de favoriser l'infiltration tumorale, une méthode non invasive d'imagerie des paramètres microstructuraux dans les régions péritumorales a été utilisée pour quantifier cet effet sous thérapie en i.v. et par CED.

Cette méthode, qui se base sur l'imagerie DTI complétée par l'IRM anatomique FLAIR et par le rehaussement de contraste en pondération T_1, a permis de mettre en évidence pour la première fois des différences remarquables concernant la progression tumorale, dans la zone péritumorale, du modèle U87 entre le traitement par CED et le traitement par voie i.v. par

Bevacizumab (**verrous N°4 est résolu à l'exception de l'étude histologique**). Cette étude n'avait jamais été réalisée dans la région péritumorale du modèle U87 à notre connaissance.

Dans la continuité des travaux de cette thèse, il serait intéressant de poursuivre différentes études méthodologiques, précliniques et enfin cliniques afin d'améliorer les techniques utilisées et de consolider et de valider une partie des résultats obtenus au cours de cette thèse :

1- Mettre en place le module de remplissage partiel du plan de Fourier sur l'imageur Bruker 4.7 T pour permettre une image $RSST_1$ plus résolue dans l'espace et ainsi de mieux sonder l'hétérogénéité vasculaire tumorale.

2- Il serait intéressant d'approfondir la compréhension du K_{model} en confrontant des mesures de perméabilité entre la technique $RSST_1$ et celles qui existent actuellement en clinique, telle que DCE-T_{1w} et DSC-$T_2^*{}_w$ et ceci pour différents types tumoraux. Des techniques avancées utilisant les ultrasons peuvent contrôler spatialement la perméabilité des vaisseaux permettant ainsi d'étudier la réponse de la technique $RSST_1$ suite à l'effet des ultrasons sur la perméabilité des vaisseaux.

3- Il sera nécessaire de confronter les résultats sur l'infiltration tumorale obtenus par IRM de diffusion à l'histologie qui reste une technique de référence pour toutes validations de résultats obtenus in vivo.

4- Il sera intéressant d'effectuer une étude d'IRM combinant les différentes séquences IR-MDEFT 3D, DTI, $T_{1W\text{-}GD\text{-}DOTA}$, T_{2W} et FLAIR pour le suivi tumoral de l'U87 qui permettra de corréler la réponse microvasculaire avec l'infiltration, de mieux caractériser le tissu tumoral et péritumoral et d'aider à l'analyse des paramètres DTI. Les informations obtenues de ces techniques IRM permettraient de mieux identifier les états physiopathologiques du tissu tumoral, tel que l'oedème vasculaire, l'oedème cellulaire, la vascularisation tumorale, la nécrose, les cellules tumorales etc.

5- Durant cette thèse nous avons rencontré des difficultés pour extraire les informations pertinentes à partir d'un grand nombre de données utilisant plusieurs outils de post-traitement dédiés à chaque modalité d'acquisition. Pour remédier à cela, nous avons

envisagé de mettre en place un seul logiciel pour effectuer l'ensemble des analyses (analyse des images de diffusion, paramètres de la vascularisation, recalages d'images, ect…). Nous nous sommes basés sur l'outil 'DTI TOOL' initialement développé dans notre équipe par Franck MAUCONDUIT et qui est dédié aux analyses des images de diffusion. Dans ce travail de thèse nous avons continué à développer l'outil 'DTI TOOL'. Dorénavant, il permet de calculer les paramètres de la vascularisation obtenus par la méthode $RSST_1$ et de réaliser différents types de recalages et d'analyse d'images qui seront utilisés principalement pour les études de suivi longitudinal. DTI-TOOL est devenu maintenant 'MultiPAT', pour Multi-Parametric-Analysis-Tool. Il serait intéressant de continuer à optimiser et développer les fonctions suivantes dans cet outil :

- L'analyse IVIM du tenseur de diffusion qui permet de séparer la contribution venant de la diffusion des molécules d'eau tissulaire de la circulation des molécules d'eau dans les microvaisseaux.

- La fonction de recalage d'image (Kroon and Dirk-Jan 2011) pourrait être optimisée pour permettre un recalage élastique, fiable et rapide, notamment un recalage entre modalité IRM/IRM et IRM/microscopie à deux photons.

- La fonction de visualisation de multiples paramètres de façon simultanée (≥ 5 paramètres), dont le développement a été entamé durant cette thèse mais n'a pas été finalisé.

Le transfert clinique des études menées dans cette thèse a aussi été envisagé. Ceci a déjà commencé avec la cartographie du volume sanguin cérébral chez le patient par la technique $RSST_1$: une étude clinique a été menée au centre hospitalier universitaire de Grenoble et un article scientifique a été publié dans « Médical Physics » auquel j'ai contribué à l'analyse des données (Perles-Barbacaru and others 2015).

VIII. Publications

Michel Sarraf, Adriana Teodora Perles-Barbacaru, Marie France Nissou, Boudewijn van der Sanden, François Berger and Hana Lahrech.**Rapid -Steady -State -T_1 signal modeling during contrast agent extravasation: towards tumor blood volume quantification without requiring the arterial input function.** **Magnetic Resonance in Medicine 2015.**

Perles-Barbacaru TA, Tropres I, **Sarraf MG**, Chechin D, Zaccaria A, Grand S, Le Bas JF, Berger F, Lahrech H**. Technical Note: Clinical translation of the Rapid-Steady-State-T_1 MRI method for direct cerebral blood volume quantification.** **Medical Physics 2015.**

Remerciement:

Gimenez U, Perles-Barbacaru AT, Millet A, Appaix F, El-Atifi M, Pernet-Gallay K, van der Sanden B, Berger F, Lahrech H. **Microscopic DTI accurately identifies early glioma cell migration: correlation with multimodal imaging in a new glioma stem cell model.** **NMR in Biomedicine 2016.**

IX. Communications orales et poster

Orales :

Michel Sarraf, Georges Fares, Hana Lahrech. **Follow-up of brain microstructure changes in Glioblastoma human model by multiparametric MRI: the effect of Avastin®.** **ESMRMB-2016, Vienne Autriche**.

Giuseppe Ferrauto**, Michel Sarraf,** Enza Di Gregorio, Vincent Auboiroux, Ulysse Gimenez, François Berger, Silvio Aime, and Hana Lahrech. **Use of Yb-HPDO3A probe for CEST-MRI pH mapping in glioblastoma mouse models.** **ISMRM-2016, Singapore Singapore**.

G. Ferrauto, **M. Sarraf**, E. Di Gregorio, V. Auboiroux, F. Berger, S. Aime, H. Lahrech **CEST-MRI pH mapping in glioblastoma mouse models: the use of Yb-HPDO3A probe.** **ESMRMB-2015, Edinburgh UK**.

Michel Sarraf, Adriana Teodora Perles-Barbacaru, Francois Berger, and Hana Lahrech. **Tumor blood volume quantification by RSST$_1$-MRI method despite contrast agent leakage and without arterial input function determination.** **SCMC-2014, Paris France**.

Perles-Barbacaru AT, **Sarraf M**, Farion R, Nissou MF, van der Sanden B, Berger F, Lahrech H. **Pharmacokinetic model for fractional blood volume quantification with the Rapid Steady State T_1 MRI technique in tumors.** **ESMRMB-2012 Lisbon Portugal**.

Posters :

Giuseppe Ferrauto, **Michel Sarraf**, Enza Di Gregorio, Ulysse Gimenez, Vincent Auboiroux, François Berger, Silvio Aime and Hana Lahrech. **Glioblastoma pH mapping by using Yb-HPDO3A CEST MRI probe. EMIM-2016, Ultrech Pays Bas**.

N. Khater, C. El Khoury, **M. Sarraf**, J. Barouky, D. Nehme Nasr, F. Azoury, T. Felefly, R. Sayah, N. Farah, S. Achkar, E. Nasr.**Volumetric quality assurance of RapidArc plans for multiple intracranial targets using gel dosimetry. ESTRO-2016, Turin Italie**.

Michel Sarraf, Flavien Caraguel, François Berger, Boudewijn Van Der Sanden, and Hana Lahrech. **Monitoring quantitative tumor blood volume in mouse brain under Bevacizumab by the $RSST_1$-MRI method. ISMRM-2015, Toronto Canada**.

Michel Sarraf, Laurent Selek, Vincent Auboiroux, François Berger, CHU-Grenoble, Hana Lahrech**. $RSST_1$-MRI method for monitoring quantitative tumor blood volume and vessel permeability in humain glioblastoma implented in mouse brain under Bevacizumab. (Journée CLARA-2015, Lyon France)**.

Michel Sarraf, Laurent Selek, François Berger, Georges Fares, Boudewijn Van Der Sanden and Hana Lahrech. **Sensibilité de la méthode $RSST_1$ aux variations quantitatives de l'angiogenèse tumorale: suivi de croissance du gliome U87 chez la souris et effet du Bevacizumab. SFRMBM-2015, Grenoble France**.

Perles-Barbacaru TA, **Sarraf M**, Farion R, Nissou MF, Van der Sanden BP, Berger F, Lahrech H. **Novel pharmacokinetic model for fractional blood volume quantification with the Rapid Steady State T_1 MRI technique in tumors with Gd-DOTA permeable vasculature. ISMRM-2012 Melbourne Australia**.

X. Annexes

X.1. Où et comment mesurer l'AIF

L'AIF doit être mesurée idéalement dans l'artériole le plus près possible du site de mesure des paramètres physiologiques vasculaires car idéalement chaque voxel du tissu doit avoir sa propre AIF.

La méthode la plus utilisée en clinique pour déterminer l'AIF se base sur l'inhomogénéité locale du champ magnétique induit lors du passage de l'AC dans le compartiment vasculaire, provoquant une différence de susceptibilité magnétique et une diminution de T_2*. L'AIF est mesuré dans une artère et est déterminée par l'**équation X.1**

$$\mathrm{AIF} = C_a(t) = -\frac{x_{AIF}}{TE} \ln\left(\frac{S_t}{S_{pré}}\right) \qquad [\text{Eq. X.1}]$$

x_{AIF} est une constante qui est égale à l'inverse de la relaxivité transversale r_2 de l'AC dans l'artère, $S_{pré}$ est le signal de base avant injection de l'AC et S_{post} (t) est le signal après injection de l'AC et TE est le temps d'écho.

X.2. Source d'erreurs obtenues lors de la mesure de l'AIF

Conversion du signal IRM en concentration d'agent de contraste

La relation entre le signal IRM et la concentration d'AC n'est pas toujours linéaire (Boxerman and others 1995; Calamante and others 2007) (**figure X.1**) notamment quand la concentration de l'AC est très importante(Boxerman and others 1995) dans les macro-vaisseaux comme dans les artères. En outre, cette non-linéarité s'explique par la variation de la relaxivité locale longitudinale et transverse (r_1 et r_2) qui varient selon la taille des vaisseaux (Kiselev 2005; O'Connor and others 2011). Ainsi le facteur x de proportionnalité n'est pas le même entre les macro- et les microvaisseaux.

En effet, dans le cas des microvaisseaux le changement des valeurs de R_2^* au cours du premier passage de l'AC est du aux spins extravasculaires. En revanche, dans le cas des macro-vaisseaux, notamment les artères, le changement des valeurs de R_2^* est également du à

l'augmentation du gradient du champ magnétique causée par la différence de susceptibilité magnétique entre les globules rouges et le plasma. Cette modification de R_2^* affecte la linéarité entre le ΔR_2^* et la concentration de l'AC. (Barbier and others 2001; Boxerman and others 1995).

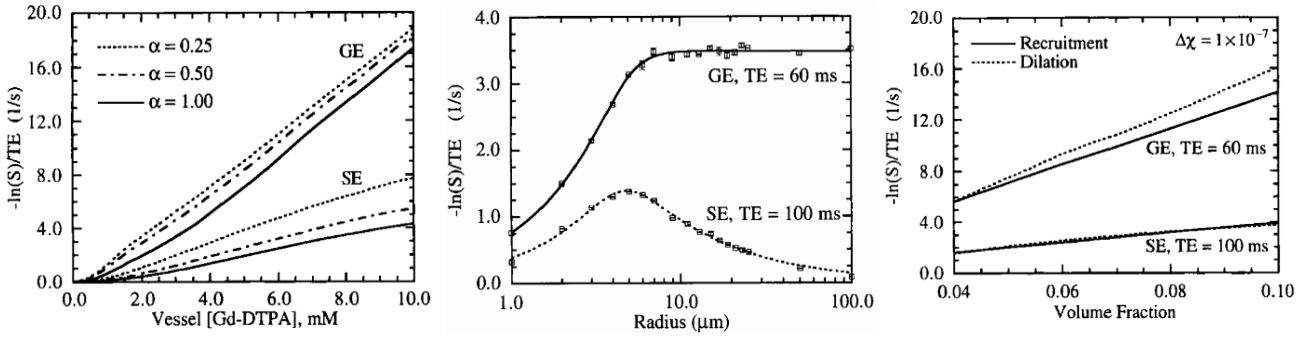


Figure X.1: Courbes illustrant la relation non linéaire entre la variation de la relaxation transversale et la concentration de l'AC (a), la taille des vaisseaux (b) et le volume sanguin (c). α représente la pondération des capillaires (Rc = 3µm), 1- α représente la pondération des veinules (Rv= 25µm) (Boxerman and others 1995).

Effet du volume partiel

En général, les acquisitions de DSC-$T_2^*{}_w$ ou de DCE-T_{1w} ont une résolution spatiale faible, inférieure à celle d'une artère. Par conséquent la mesure de l'AIF souffre de l'artéfact de volume partiel qui conduit à une mesure biaisée de la forme de l'AIF. La **figure X.2** ci-dessous montre une mesure de l'AIF dans trois artères avec et sans correction de l'effet de volume partiel (EVP) (van Osch and others 2001). L'EVP peut resserrer ou élargir l'AIF induisant ainsi une sous-estimation ou une surestimation du volume sanguin.

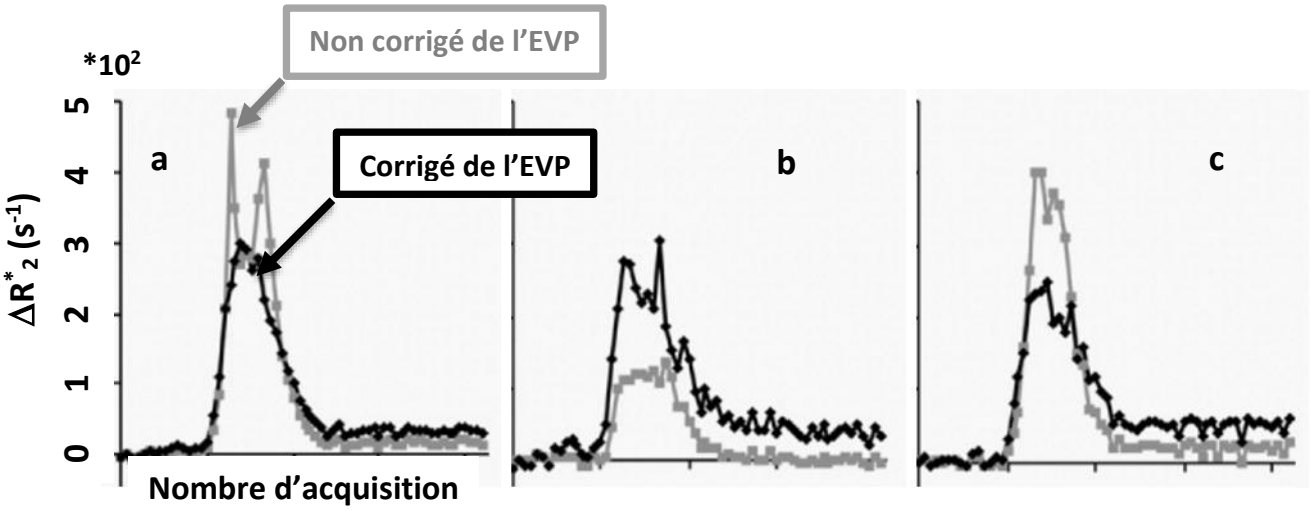


Figure X.2: mesure de l'AIF (van Osch and others 2001) dans trois voxels différents (a, b, c) contenant des artères (ligne grise) du même patient et leur correction de l'effet de volume partiel (ligne noir). Les trois différentes formes de l'AIF aboutissent à des valeurs sur- ou sous-estimées du VSC.

Effet de recirculation et de la troncature du signal

Comme pour le tissu, l'AC recircule dans les artères et une correction de recirculation est nécessaire. Cependant, les méthodes de correction sont nombreuses et n'aboutissent pas aux mêmes résultats (voir **figure I.22** du **chapitre 1**). Ceci montre une différence de la forme de l'AIF obtenue par différentes méthodes affectant la quantification de VS.

Dans certain cas les points de mesure de l'AIF peuvent atteindre le niveau de bruit. La prise en compte de ces points lors de la conversion du signal en courbe de concentration coupe le sommet de la courbe de l'AIF, une sous-estimation de l'AIF est alors constatée. Ce phénomène est appelé effet de troncature du signal.

Retard et dispersion du Bolus

L'AIF est mesurée dans une artère qui est en général distale de la région d'intérêt de mesure des paramètres vasculaires. L'AIF mesurée ne correspond plus alors à l'AIF idéale qui doit être mesurée à l'entrée de la région d'intérêt. Ce qui induit un décalage temporel et une dispersion de l'AIF mesurée par rapport à l'AIF idéale. Ceci est connu sous le nom d'effet 'bolus delay and

dispersion'. Différentes approches et approximations sont conseillées afin de s'affranchir de ces erreurs, mais elles conduisent à une divergence des résultats. Ainsi, des comparaisons inter centre pour un même type de tumeur deviennent difficiles voire impossible à interpréter.

Pour résumer, plusieurs approximations, approches correctives et opérations mathématiques sont nécessaires pour déterminer l'AIF et pour obtenir par les techniques DSC-$T_2^*{}_w$ et DCE-T_{1W} des paramètres quantitatifs de la vascularisation tumorale. L'accumulation des biais d'incertitude complique alors l'obtention de résultats quantitatifs fiables. Ceci est bien traduit par le nombre limité d'études quantitatives effectuées selon ces deux méthodes depuis une dizaine d'années.

X.3. Injection en i.v chez la souris et le rat

Pour permettre une injection dans la veine caudale de la queue chez les souris il faut tenir compte de deux choses :

1- Du volume total à injecter : il est de l'ordre de 5ml/kg à 10 ml/kg (Université Montréal, Guide pratique d'administration et de prélèvements sanguins) permettant un volume maximal de 300 µL (Université de Sherbrooke, Guide pratique d'administration et de prélèvements sanguins).
2- Du diamètre interne de la veine caudale qui est de l'ordre de 0,45 mm. Ce qui rend la cathéterisation et l'injection du produit de contraste très délicates surtout pour des poses répétitives.

La difficulté de cette étape est la mise en place d'un outil d'injection et d'un mode opératoire qui permettent de réaliser des injections en i.v dans la veine caudale de la queue des souris reproductibles et parfois multiples (avec environ 6h entre chaque injection). Ce mode opératoire doit être compatible avec notre protocole expérimental d'imagerie sans induire des biais de mesures lié à la mise en place/au mouvement des souris dans l'aimant. Ci-dessous les matériels choisis de façon à ce que les extrémités puissent se connecter entre elles tout en réduisant les volumes morts (**figure X.3**).

1- Tubulure polyéthylène PE 10 (SIGMA : code 800/100/100) de diamètre interne de 0,28 mm
2- Seringue d'insuline de volume 500 µl avec une aiguille de diamètre externe de 0,31 mm (30 Gauge)
3- Prolongateurs polytube PE (Sigma ref 0066087J).
4- Tubulure polyéthylène PE (intermédiaire)
5- Cathéter BD Neoflon^{TM} en F.E.P Polymère de diamètre externe = 0,45 mm (26 Ga), volume mort environ 60 µl

Le volume interne total du prolongateur fabriqué et du catheter est d'environ 320 µl (dont 60 µl du volume résiduel du cathéter).

Le remplissage du volume résiduel du cathérer par du sérum physiologique (0,9 % NaCl) et non pas par du Gd-DOTA est préconisé pour éviter tout mélange de Gd-DOTA avec le sang (lors du serrage du prolongateur polytube au cathéther ou par le biais de la pression vasculaire) ce qui compromettrait les acquisitions sans injection de Gd-DOTA.

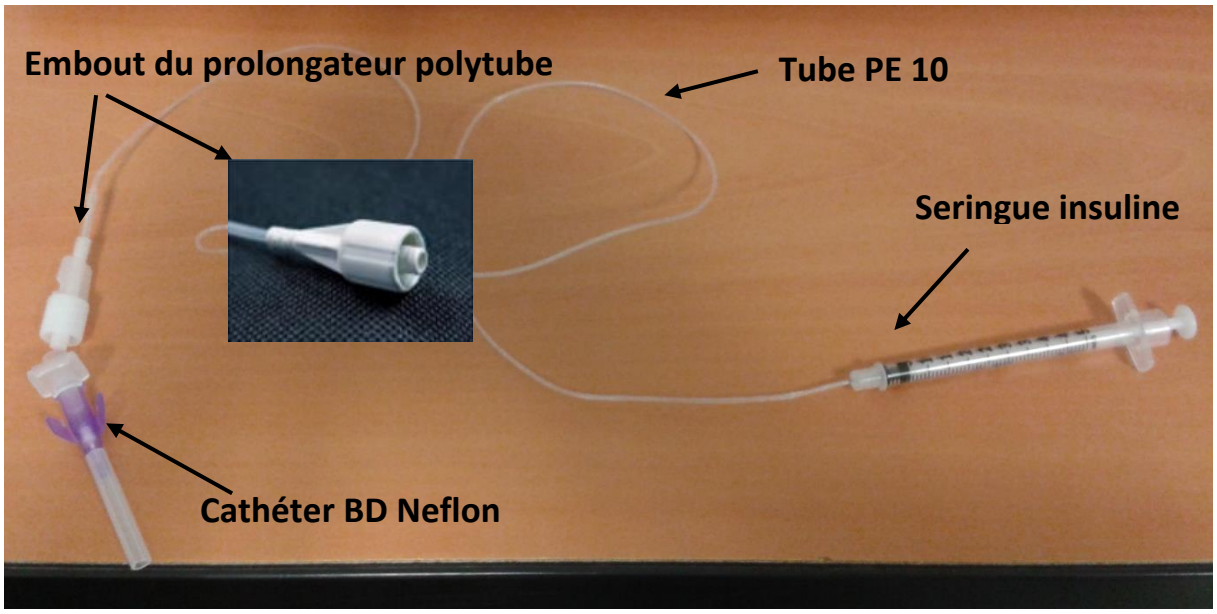


Figure X.3 : montage du circuit d'injection du Gd-DOTA chez la souris

Nous avons choisi de maximiser le volume total à injecter (concentration diluée du Gd-DOTA) pour minimiser les erreurs de préparation du Gd-DOTA et pour minimiser les erreurs

d'injection dû au volume mort du cathéter. En pratique et pour une même dose à injecter (0,7mmol/kg), il a été préférable d'injecter un grand volume de Gd-DOTA à faible concentration plutôt qu'un faible volume de Gd-DOTA à forte concentration.

Chez le rat l'administration d'un agent de contraste par voie intraveineuse est moins délicate que chez la souris car le volume total injectable est plus grand ; Pour un rat de 250 g le volume d'injection permis est de 1,25 mL. En plus le diamètre interne de la veine caudale chez le rat est plus large que celui de la souris.

Le prolongateur utilisé est modifié, le tube PE 10 est remplacé par un tube PE 20 (diamètre interne de 0,38 mm). La seringue d'insuline est remplacée par une seringue sans aiguille (1ml).

Le volume total préparé à injecter est de l'ordre de 500 µL.

X.4. Relation hypothétique entre K_{model} et K^{trans}

La méthode $RSST_1$ est appliquée quelques secondes après injection du Gd-DOTA en i.v et pendant une courte durée, de l'ordre d'une minute. La méthode $RSST_1$ se base sur une injection du Gd-DOTA à forte concentration.

1- Hypothèse 1 : Clairance très faible donc n'est pas pris en compte.
2- Hypothèse 2 : L'échange de l'AC est mené uniquement par l'extravasation du compartiment vasculaire vers le compartiment extravasculaire (monodirectionnel, i.e K^{trans} du tissu, **figure X.4**).
3- Hypothèse 3 : Le signal vasculaire est supposé à son maximum et constant pendant la courte durée d'analyse du signal $RSST_1$ mais la concentration plasmatique est très élevée mais décroît uniquement vers le compartiment extravasculaire.

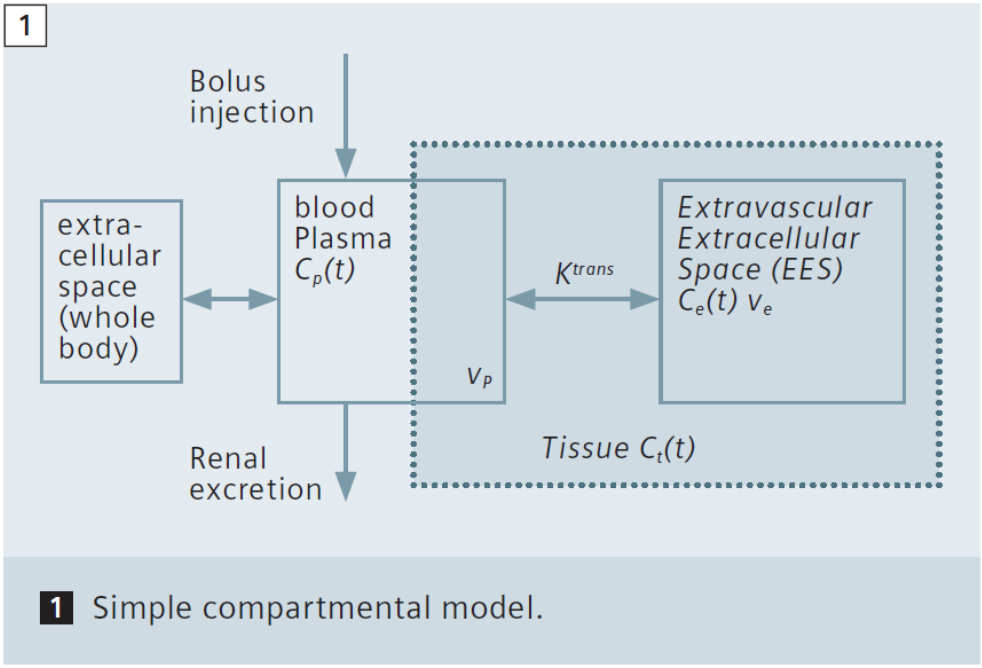


Figure X.4 : schéma représentatif de l'échange bi-compartimental entre le compartiment intravasculaire et extravasculaire extracellulaire (Tofts 2010)

En prenant en compte les hypothèses cités ci-dessus, la variation de la concentration plasmatique dans le tissu tumoral du compartiment vasculaire vers les compartiments extravasculaires extracellulaires est donnée par l'**équation** suivante :

$$\int \frac{dC_p(t)}{C_p(t)} = \int -K^{trans}\, dt \qquad \text{[Eq. X.2]}$$

L'**équation X.2** peut être écrite sous deux formes:

$$\int C_p(t) = -\int \frac{dC_p(t)}{K^{trans}\, dt} \qquad \text{[Eq. X.3]}$$

Et intégré entre t = 0 et t =∞

$$C_p(t) = C_{p0} * e^{-K^{trans}\, x\, t} \qquad \text{[Eq. X.4]}$$

La variation de la concentration de l'AC dans le compartiment extravasculaire extracellulaire est donnée par l'**équation** suivante:

$$\int \frac{dC_{ev}(t)}{C_p(t)} = \int K^{trans}\, dt \qquad \text{[Eq. X.5]}$$

Remplaçons l'**équation X.3** dans l'**équation X.5**, nous obtenons la solution suivante:

$$C_{ev}(t) = -C_p(t) + cte \qquad \text{[Eq. X.6]}$$

Remplaçons l'**équation X.4** dans l'**équation X.6** nous obtenons l'équation suivante:

$$C_{ev}(t) = -C_{p0} * e^{-K^{trans}\, x\, t} + cte \qquad \text{[Eq. X.7]}$$

A t = 0 ; $C_e(t) = 0$.

La solution de l'équation X.7 abouti à: cte = C_{p0}

Remplaçons la cte par sa valeur « C_{p0} » dans l'**équation X.7** nous obtenons:

$$C_{ev}(t) = C_{p0} * (1 - e^{-K^{trans}\, x\, t}) \qquad \text{[Eq. X.8]}$$

Comme déjà mentionné dans le chapitre 2 (**équation II.13** i.e **X.9** et **équation II.14** i.e **X.10**) :

$$S_{tissu}(t) = V_p * (1) + V_e * \left(1 - \frac{2\exp(-T_{inv}.R_{1ev}(t))}{(1+\exp(-TR.R_{1ev}(t)))}\right) \qquad \text{[Eq. X.9]}$$

Avec $$R_{1ev} = R_{10ev} + r_1 * [C_{ev}(t)] \qquad \text{[Eq. X.10]}$$

Remplaçons l'**équation X.8** et **X.10** dans l'**équation X.9** nous obtenons :

$$S_{tissu}(t) = V_p + V_e * \left(1 - \frac{2\exp\left(-T_{inv}.\{R_{10ev} + r_1 C_{p0}[1-\exp(-K^{trans}.t)]\}\right)}{\left(1+\exp\left(-TR.\{R_{10ev} + r_1 C_{p0}[1-\exp(-K^{trans}.t)]\}\right)\right)}\right) \qquad \text{[Eq. X.11]}$$

Avec

$$\frac{M_{z\,(ev)}}{M_{0\,(ev)}}(t) = 1 - \frac{2\exp\left(-T_{inv}.\{R_{10ev} + r_1 C_{p0}[1-\exp(-K^{trans}.t)]\}\right)}{\left(1+\exp\left(-TR.\{R_{10ev} + r_1 C_{p0}[1-\exp(-K^{trans}.t)]\}\right)\right)} \qquad \text{[Eq. X.12]}$$

Nous proposons de simplifier cette expression par le terme exponentiel suivant :

$$\frac{M_{z\,(ev)}}{M_{0}\,(ev)}(t) = 1 - \exp(-K_{model} * t) \qquad \text{[Eq. X.13]}$$

Afin de comprendre dans quelles conditions cette proposition est valable nous avons simulé les **équations X.12** et **X.13** et nous avons ensuite cherché la solution qui minimise l'écart entre ces deux équations (algorithme G.R.G i.e Generalized reduced Gradient) en fonction de K^{trans} et K_{model} et pour les paramètres expérimentaux suivants : Concentration plasmatique après injection de Gd-DOTA [C_p] = 5.85 mmol.L^{-1}, Relaxivité r_1 = 3.3 L.mmol^{-1}.s^{-1}, T_{10} = 1000 ms, T_{inv} = 305 ms et TR = 750 ms (**figure X.5**).

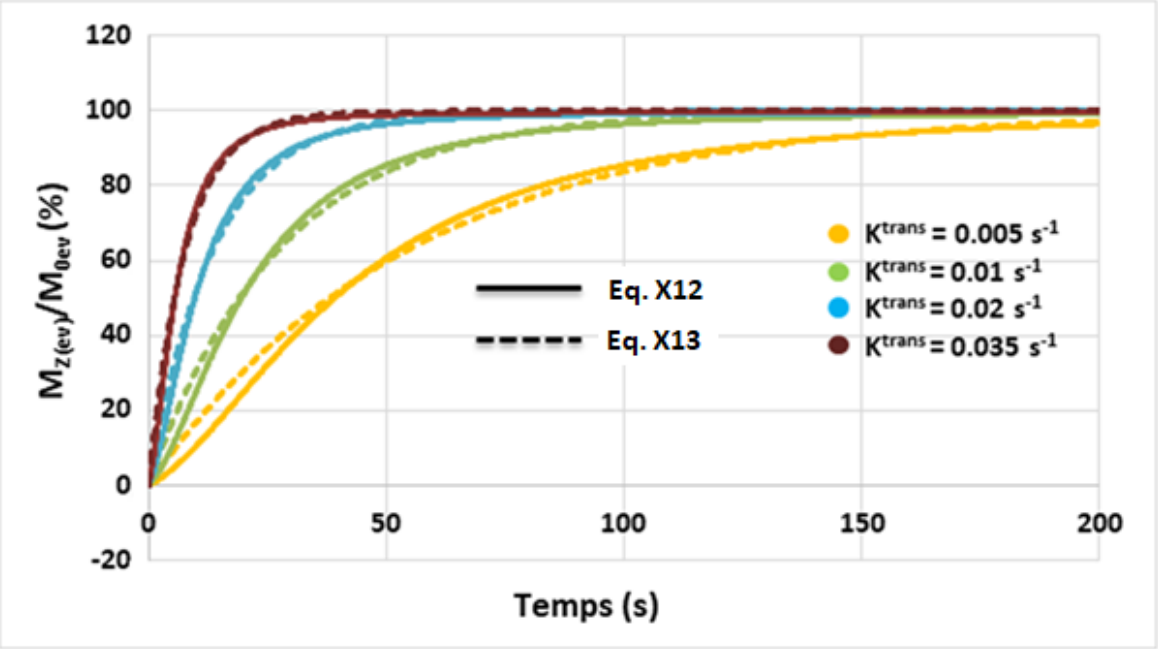


Figure X.5 : Aimantation longitudinale du compartiment extravasculaire extracellulaire touché par l'AC en fonction du temps. Solution obtenue de la simulation entre l'équation X.12 et son homologue simplifié, l'équation X.13, pour différentes valeurs de perméabilité vasculaire K^{trans} et K_{model} (R > 0.99).

Nous constatons d'après la **figure X.5** que les deux expressions (**équations X.12 et X.13**) donnent des graphes très similaires (R > 0.99) surtout pour des valeurs de perméabilité prononcées, au-delà de K^{trans} = 0.01 s^{-1} comme dans le cas des tumeurs de glioblastome (Gahramanov and others 2011; Kickingereder and others 2014). De plus, pour des valeurs de

K^{trans} supérieures ou égales à 0.01 s^{-1} la valeur de l'aimantation longitudinale du compartiment extravasculaire extracellulaire atteint par l'AC atteint son maximum durant la période du régime stationnaire ($t_{RSS} \cong 100$ s). Nous pouvons donc conclure que l'**équation** simplifiée **X.13** peut remplacer l'**équation X.12** dans le cas où le paramètre K^{trans} est ≥ 0.01 s^{-1}. Dans le cas où K^{trans} est inférieure à 0,01 le modèle mathématique (**équation X.13**) modélise moins bien le comportement du signal.

La solution qui minimise l'écart entre les deux équations nous permet d'établir une relation entre le K^{trans} et le K_{model}. Nous avons tracé les valeurs de K^{trans} (entre 0.005 s^{-1} et 0.4 s^{-1}) en fonction des valeurs de K_{model} trouvées.

La **figure X.6** montre la fonction de calibration (issue de cette solution) entre K^{trans} qui prend en compte l'échange pharmacocinétique bicompartimental unidirectionnel entre le compartiment vasculaire et extravasculaire extracellulaire selon Patlak et al (Patlak and others 1983) et K_{model}. Nous avons trouvé une relation linéaire entre ces deux paramètres (K_{model} = 3.63 x K^{trans}, R = 1).

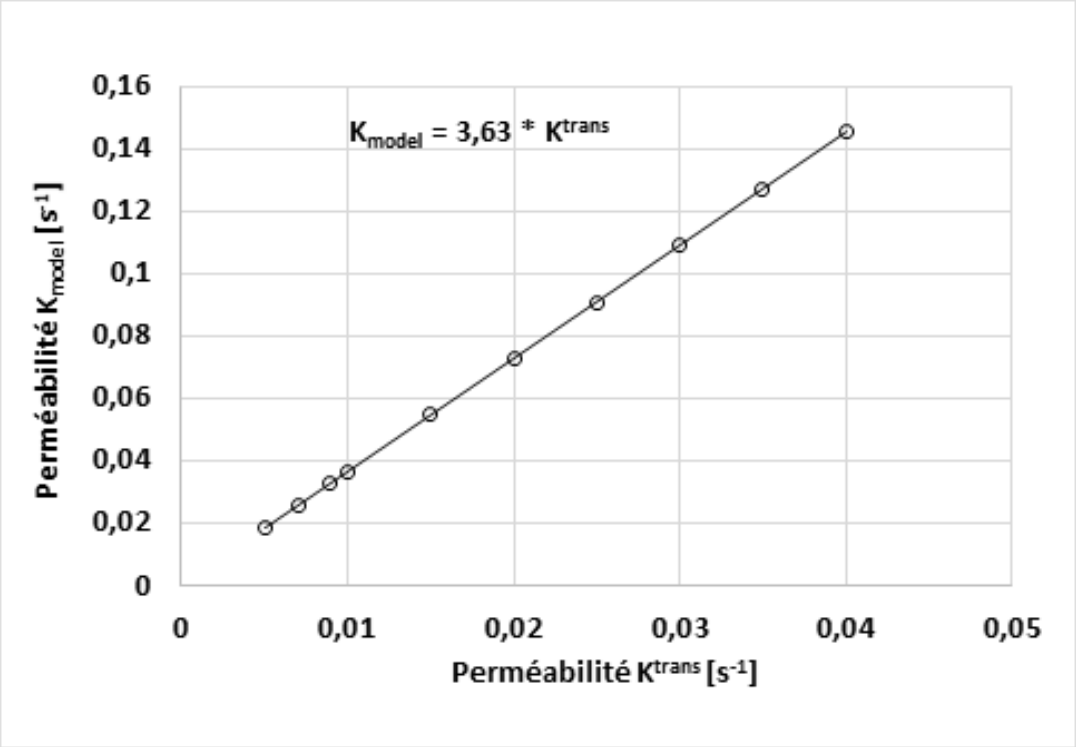


Figure X.6 : Valeurs de perméabilité vasculaire K_{model} en fonction de K^{trans} selon le modèle simplifié de Patlack. Les valeurs de K_{model} représentent la solution qui minimise l'écart entre l'équation X.12 et l'équation X.13.

X.5. Curriculum vitea

SARRAF Michel (30 ans)
✉ 13 rue du Martinet
Brie Comte Robert, 77170 France

☎ 06 03 29 80 10
michel.g.sarraf@hotmail.com
Franco-Libanais

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

2013- 2019	**Doctorant:** IRM quantitative de la microvascularisation et la microstructure en neuro-oncologie: les effets de l'Avastin sur la tumeur et le tissu péritumoral (Grenoble, France).
2016- 2019	**Physicien médical** au service de radiothérapie a l'hôpital Forcilles Cognacq-Jay (Seine et Marne, France).
2018	**Conférence dédiée à l'utilisation du TPS BrainLab (Elements)** pour la radiothérapie stéroétaxique intra et extra-craniênne et à l'utilisation du produit ExacTrac X-Ray (Munich, Germany).
2018	**Formation en radiothérapie stéréotaxique intra et extra-craniênne** au CLCC Leon Bérard (Lyon, France).
2017	**Formation à l'utilisation du TPS MONACO 5.11 *(***Crawley, UK)
2016	**Physicien Médical** au centre d'Oncologie Saint Vincent (Saint Malo, France).
2011- 2012	**Formation en radiothérapie, radiologie, et en médecine nucléaire** à l'Institut Curie (Paris, France).
2011- 2016	**Cours à domicile:** Math et Physique, niveau seconde et premières S-ES (Grenoble, France).
2009- 2011	**Stage de Master I and II** à l'Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN) (Grenoble, France).

ETUDES ET FORMATIONS UNIVERSITAIRES

2013- Present	**Doctorant en** IRM à Grenoble (Grenoble, France).
2014	**Expérimentation animale** (Surgery & histology) à l'Université Joseph Fourier (UJF) (Grenoble, France).
2011- 2012	**Diplôme de Qualification en Physique Radiologique et Médicale** à l'INSTN (Saclay, France).
2010- 2011	**Master II en Physique Médical** à l'UJF (Grenoble, France).
2010- 2011	**Radioprotection des patients** à l'INSTN (Saclay, France).
2009- 2010	**Master I en Ingenierie pour la Santé et le Médicament, Section Physique Médical** à l'UJF (Grenoble, France).
2006- 2009	**Licence de Physique** à l'Université Libanaise (Beirut, Liban).

MISSIONS EN CHARGES & REALISATIONS

2018- 2019	Préparation de la mise en place du l'accélérateur ***Novalis STX Varian***.
2018- 2019	Préparation de la mise en place de la **radiothérapie stéréotaxique** (intra et extra-cranienne).
2017	Mise en place du **TPS MONACO 5.11** (Commission & Acceptance).
2017	Contrôle de qualité **Equal Estro**.

2016- 2018	**Métrologie des faisceaux de traitement** TRS 398 & 277.
2017- 2018	Mise en place et application d'un **système d'audit de qualité pour la délivrance de dose en radiothérapie et le suivie du patient**.
2017- 2018	Mise en place du système de contrôle de qualité **"Qualiformed-MLC et EPID"**.
2017- 2018	Lister et organiser les tests de contrôle de qualité des accélérateurs linéaires ainsi qu'optimiser le temps de la realisation de ces contrôles.
2016- 2018	**Contrôle de qualité des appareils de traitement et de diagnostic** (i.e. CLINAC & SYNERGY, CT-Scan, IRM, TEP, SPECT).
2015- 2017	Mise en place et application du protocole d'assurance qualité **"3D end-to-end"** en Radiochirurgie par modulation d'intensité des multiples lésions cérébrales.
2015- 2018	**Dosimétries RC3D, IMRT, VMAT, IMRS** (i.e. **PINNACLE** & MONACO; ARIA & **MOSAIQUE**).
2015- 2018	**Contrôle de qualité des faisceaux du plan de traitement des patients.**
2015- 2018	**Rédaction des protocoles d'assurance qualité en Radiothérapie**.
2009- 2015	**Mise en place des séquences d'imagerie IRM** (i.e. $RSST_1$, DTI, FLAIR, Spectroscopie ^1H, T_1, T_2, T_2^*).

LANGUAGES ET INFORMATIQUES

Français: Bilingue
Anglais: parler couramment
Arabe: Langue maternelle
Microsoft office (Word, Excel, Power point): compétent.
Gérer les outils de recherche (on-line et offline)
Programmation et Analyze d'image: Matlab, Language Algorithmique, Fiji (ImageJ), SPM.

REFERENCES

Teodora-Adriana PERLES-BARBACARU
Medical Doctor
PhD in Neuro-Imaging Physics
Assistant Professor in Medical Imaging and Neurosicences at Aix-Marseilles University - France.
Phone: +33 (0)4 91 32 48 04
e-mail : teodora.perles-barbacaru@univ-amu.fr

Boudewijn VAN DER SANDEN
PhD in Tumor Physiology By Magnetic Resonance
Reaserch Director at INSERM U1039, "Radiopharmaceutiques biocliniques"
Faculté de Médecine de Grenoble - France
Phone: +33 (0)6 48 54 67 12
e-mail : boudewijn.vandersanden@univ-grenoble-alpes.fr

Nabil Khater
Chief physicist in Medical Physics
Assistant Professor in Medical
Department of radiation oncology, Saint Louis University, MISSOURI, USA
Nabil.khater@health.slu.edu

Nabil ZAHRA
PhD in Medical physics « hadrotherapy : radiochromic mesurements and monte Carlo simulation »
Medical physicist at CMC Valence-France (Projet Coordinator).
Founder and President at CMRT
Phone : +33 (0)6 77 87 12 64

Références

A E. 1956. Investigations on the Theory of the Brownian Movement. Dover publications, Inc. p. p.17.

A. Stinson B. 2013. Clinical review : Dotarem, Gadoterate Meglumine.

Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD. 2009. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. Expert Opinion on Investigational Drugs 18(8):1061-1083.

Akella NS, Twieg DB, Mikkelsen T, Hochberg FH, Grossman S, Cloud GA, Nabors LB. 2004. Assessment of brain tumor angiogenesis inhibitors using perfusion magnetic resonance imaging: Quality and analysis results of a phase I trial. Journal of Magnetic Resonance Imaging 20(6):913-922.

Alexander, L A. 2007. Diffusion Tensor Imaging of the Brain.

Allen M, Bjerke M, Edlund H, Nelander S, Westermark B. 2016. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. Sci Transl Med 8(354):354re3.

ANOCEF. 2012. REFERENTIEL DE L'ANOCEF POUR LES GLIOMES DE L'ADULTE.

Arganda-Carreras I, O.S. Sorazano C, Marabini R, Carazo JM, Ortiz-de-Solorzano C, Kybic J. 2006. Consistent and Elastic Registration of Histological Sections

Using Vector-Spline Regularization.

Aronen HJ, Glass J, Pardo FS, Belliveau JW, Gruber ML, Buchbinder BR, Gazit IE, Linggood RM, Fischman AJ, Rosen BR et al. . 1995. ECHO-PLANAR MR CEREBRAL BLOOD-VOLUME MAPPING OF GLIOMAS - CLINICAL UTILITY. Acta Radiologica 36(5):520-528.

Aronen HJ, Perkio J. 2002. Dynamic susceptibility contrast MRI of gliomas. Neuroimaging Clinics of North America 12(4):501-+.

Bagri A, Berry L, Gunter B, Singh M, Kasman I, Damico LA, Xiang H, Schmidt M, Fuh G, Hollister B et al. . 2010. Effects of anti-VEGF treatment duration on tumor growth, tumor regrowth, and treatment efficacy. Clin Cancer Res 16(15):3887-900.

Bailey WM. 2006. Fast Fluid Attenuated Inversion Recovery-FLAIR imaging and associated artefacts in Magnetic Resonance

Imaging-MRI. Radiography.

Bammer R. 2003. Basic principles of diffusion-weighted imaging. Eur J Radiol 45(3):169-84.

Barbier EL, Lamalle L, Decorps M. 2001. Methodology of brain perfusion imaging. Journal of Magnetic Resonance Imaging 13(4):496-520.

Barbier EL, St Lawrence KS, Grillon E, Koretsky AP, Décorps M. 2002. A model of blood-brain barrier permeability to water: accounting for blood inflow and longitudinal relaxation effects. Magn Reson Med 47(6):1100-9.

Barsky D, Pütz B, Schulten K. 1997. Theory of heterogeneous relaxation in compartmentalized tissues. Magn Reson Med 37(5):666-75.

Barth RF. 1998. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. J Neurooncol 36(1):91-102.

Bas JL. 2006. IRM de perfusion des tumeurs cérébrales. J Radiol.

Bastien JIL, McNeill KA, Fine HA. 2015. Molecular Characterizations of Glioblastoma, Targeted Therapy, and Clinical Results to Date. Cancer 121(4):502-516.

Beaumont M, Lemasson B, Farion R, Segebarth C, Remy C, Barbier EL. 2009. Characterization of tumor angiogenesis in rat brain using iron-based vessel size index MRI in combination with gadolinium-based dynamic contrast-enhanced MRI. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 29(10):1714-1726.

Behroozi M, Chwiesko C, Ströckens F, Sauvage M, Helluy X, Peterburs J, Güntürkün O. 2018. In vivo measurement of T. Magn Reson Med 79(2):1090-1100.

Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jougla E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinie F, Danzon A, Bara S et al. . 2008. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. Revue D Epidemiologie Et De Sante Publique 56(3):159-175.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. Science 161(3839):370-1.

Benda P, Someda K, Messer J, Sweet WH. 1971. Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. J Neurosurg 34(3):310-23.

Beppu T, Inoue T, Shibata Y, Kurose A, Arai H, Ogasawara K, Ogawa A, Nakamura S, Kabasawa H. 2003. Measurement of fractional anisotropy using diffusion tensor MRI in supratentorial astrocytic tumors. J Neurooncol 63(2):109-16.

Beppu T, Inoue T, Shibata Y, Yamada N, Kurose A, Ogasawara K, Ogawa A, Kabasawa H, Black PM. 2005. Fractional anisotropy value by diffusion tensor magnetic resonance imaging as a predictor of cell density and proliferation activity of glioblastomas. Surgical Neurology 63(1):56-61.

Bergonié J-A. 1906. Interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. Comptes-rendus de l'Académie des Sciences (Paris).

Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Worinoff A-S, Bossard N. 2013. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012.

Bjornerud A, Emblem KE. 2010. A fully automated method for quantitative cerebral hemodynamic analysis using DSC-MRI. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 30(5):1066-1078.

Bjornerud A, Sorensen AG, Mouridsen K, Emblem KE. 2011. T-1- and T-2*-dominant extravasation correction in DSC-MRI: Part I-theoretical considerations and implications for assessment of tumor hemodynamic properties. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 31(10):2041-2053.

Black PM. 1991. MEDICAL PROGRESS - BRAIN-TUMORS .1. New England Journal of Medicine 324(21):1471-1476.

Blankenbecler R. 2010. LOW-DOSE PRETREATMENT FOR RADIATION THERAPY. Dose-Response 8(4):534-542.

Blomstrand F, Venance L, Sirén AL, Ezan P, Hanse E, Glowinski J, Ehrenreich H, Giaume C. 2004. Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. Eur J Neurosci 19(4):1005-15.

BM E. 2009. Comparison of cytotoxic and anti-angiogenic treatment responses using functional diffusion maps in FLAIR abnormal regions. Proc Intl Soc Mag Reson Med.

Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH. 1994. CONVECTION-ENHANCED DELIVERY OF MACROMOLECULES IN THE BRAIN. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91(6):2076-2080.

Bottaro DP, Liotta LA. 2003. Cancer: Out of air is not out of action. Nature 423(6940):593-5.

Boxerman JL, Hamberg LM, Rosen BR, Weisskoff RM. 1995. MR CONTRAST DUE TO INTRAVASCULAR MAGNETIC-SUSCEPTIBILITY PERTURBATIONS. Magnetic Resonance in Medicine 34(4):555-566.

Brandes AA, Tosoni A, Spagnolli F, Frezza G, Leonardi M, Calbucci F, Franceschi E. 2008. Disease progression or pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy treatment: Pitfalls in neurooncology. Neuro-Oncology 10(3):361-367.

Breiman L. 2001. Random forests. p. 5-32.

Brouiland Jp, Hottinger AF. 2017. Nouvelle classification OMS 2016 des gliomes : quels changements ? . Rev Med Suisse.

Brunberg JA, Chenevert TL, McKeever PE, Ross DA, Junck LR, Muraszko KM, Dauser R, Pipe JG, Betley AT. 1995. In vivo MR determination of water diffusion coefficients and diffusion anisotropy: correlation with structural alteration in gliomas of the cerebral hemispheres. AJNR Am J Neuroradiol 16(2):361-71.

Calamante F. 2013. Arterial input function in perfusion MRI: A comprehensive review. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 74:1-32.

Calamante F, Vonken E-jPA, van Osch MJP. 2007. Contrast agent concentration measurements affecting quantification of bolus-tracking perfusion MRI. Magnetic Resonance in Medicine 58(3):544-553.

Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, Muhammad AG, King GD, Pluhar GE, McNiel EA, Ohlfest JR, Freese AB, Moore PF et al. . 2007a. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. J Neurooncol 85(2):133-48.

Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, Muhammad AKMG, King GD, Pluhar GE, McNiel EA, Ohlfest JR, Freese AB, Moore PF et al. . 2007b. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. Journal of Neuro-Oncology 85(2):133-148.

Cao Y, Tsien CI, Nagesh V, Junck L, Ten Haken R, Ross BD, Chenevert TL, Lawrence TS. 2006. Clinical investigation survival prediction in high-grade gliomas by MRI perfusion before and during early stage of RT. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 64(3):876-885.

Carlsson A, Persson O, Ingvarsson J, Widegren B, Salford L, Borrebaeck CAK, Wingren C. 2010. Plasma proteome profiling reveals biomarker patterns associated with prognosis and therapy selection in glioblastoma multiforme patients. Proteomics Clinical Applications 4(6-7):591-602.

Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 407(6801):249-257.

Cha S, Knopp EA, Johnson G, Litt A, Glass J, Gruber ML, Lu S, Zagzag D. 2000. Dynamic contrast-enhanced T2*-weighted MR imaging of recurrent malignant gliomas treated with thalidomide and carboplatin. American Journal of Neuroradiology 21(5):881-890.

Chamberlain MC. 2009. BEVACIZUMAB FOR RECURRENT MALIGNANT GLIOMAS: EFFICACY, TOXICITY, AND PATTERNS OF RECURRENCE. Neurology 72(8):772-773.

Chan AA, Nelson SJ, Ieee. 2004. Simplified gamma-variate fitting of perfusion curves. 2004 2ND IEEE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOMEDICAL IMAGING: MACRO TO NANO, VOLS 1 and 2:1067-1070.

Chinot O, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Hilton M, Abrey L, Cloughesy T. 2012. PHASE III TRIAL OF BEVACIZUMAB ADDED TO STANDARD RADIOTHERAPY AND TEMOZOLOMIDE FOR NEWLY-DIAGNOSED GLIOBLASTOMA: MATURE PROGRESSION-FREE SURVIVAL AND PRELIMINARY OVERALL SURVIVAL RESULTS IN AVAGLIO. Neuro-Oncology 14:101-101.

Chinot OL, Macdonald DR, Abrey LE, Zahlmann G, Kerloeguen Y, Cloughesy TF. 2013. Response Assessment Criteria for Glioblastoma: Practical Adaptation and Implementation in Clinical Trials of Antiangiogenic Therapy. Current Neurology and Neuroscience Reports 13(5).

Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D et al. . 2014. Bevacizumab plus Radiotherapy-Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. New England Journal of Medicine 370(8):709-722.

Claes A, Gambarota G, Hamans B, van Tellingen O, Wesseling P, Maass C, Heerschap A, Leenders W. 2008a. Magnetic resonance imaging-based detection of glial brain tumors in mice after antiangiogenic treatment. Int J Cancer 122(9):1981-6.

Claes A, Wesseling P, Jeuken J, Maass C, Heerschap A, Leenders WPJ. 2008b. Antiangiogenic compounds interfere with chemotherapy of brain tumors due to vessel normalization. Molecular Cancer Therapeutics 7(1):71-78.

Cohen P. 2002. Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? Nature Reviews Drug Discovery 1(4):309-315.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochemical Journal 351:95-105.

de Groot JF, Fuller G, Kumar AJ, Piao Y, Eterovic K, Ji Y, Conrad CA. 2010. Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. Neuro Oncol 12(3):233-42.

Debinski W, Tatter SB. 2009. Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors. Expert Review of Neurotherapeutics 9(10):1519-1527.

Demerath T, Simon-Gabriel CP, Kellner E, Schwarzwald R, Lange T, Heiland DH, Reinacher P, Staszewski O, Mast H, Kiselev VG et al. . 2016. Mesoscopic imaging of glioblastomas: Are diffusion, perfusion and spectroscopic measures influenced by the radiogenetic phenotype? Neuroradiol J.

DeVries HE, Kuiper J, DeBoer AG, VanBerkel TJC, Breimer DD. 1997. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. Pharmacological Reviews 49(2):143-155.

Dhermain FG, Hau P, Lanfermann H, Jacobs AH, van den Bent M. 2010. Advanced MRI and PET imaging for assessment of treatment response in patients with gliomas. Lancet Neurology 9(9):906-920.

Donahue KM, Weisskoff RM, Burstein D. 1997. Water diffusion and exchange as they influence contrast enhancement. Jmri-Journal of Magnetic Resonance Imaging 7(1):102-110.

Drexel-University. 2007. A compendium of drugs used for laboratory animal anesthesia, analgesia, tranquilization and restraint. Philadelphia: Drexel University IACUC; 2007.

Dufour P, Dufour S, Castonguay A, McCarthy, Nathalie, De Koninck Y. 2006. Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle : avantages et enjeux ou Un photon c'est bien… mais deux c'est mieux ! .

Einstein A. 1956. Investigations on the Theory of the Brownian Movement. Dover publications, Inc. p. p.17.

Ellingson BM, Malkin MG, Rand SD, Connelly JM, Quinsey C, LaViolette PS, Bedekar DP, Schmainda KM. 2010. Validation of Functional Diffusion Maps (fDMs) as a Biomarker for Human Glioma Cellularity. Journal of Magnetic Resonance Imaging 31(3):538-548.

Ellingson BM, Malkin MG, Rand SD, LaViolette PS, Connelly JM, Mueller WM, Schmainda KM. 2011. Volumetric analysis of functional diffusion maps is a predictive imaging biomarker for cytotoxic and anti-angiogenic treatments in malignant gliomas. Journal of Neuro-Oncology 102(1):95-103.

Fellner F, Holl K, Held P, Fellner C, Schmitt R, Böhm-Jurkovic H. 1996. A T1-weighted rapid three-dimensional gradient-echo technique (MP-RAGE) in preoperative MRI of intracranial tumours. Neuroradiology 38(3):199-206.

Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase.

Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov 3(5):391-400.

Finn JP, Edelman RR. 1993. Black-blood and segmented k-space magnetic resonance angiography. Magn Reson Imaging Clin N Am 1(2):349-57.

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. J Natl Cancer Inst 59(1):221-6.

Folkman J. 1995. ANGIOGENESIS IN CANCER, VASCULAR, RHEUMATOID AND OTHER DISEASE. Nature Medicine 1(1):27-31.

Folkman J, Bach M, Rowe JW, Davidoff F, Lambert P, Hirsch C, Goldberg A, Hiatt HH, Glass J, Henshaw E. 1971. TUMOR ANGIOGENESIS - THERAPEUTIC IMPLICATIONS. New England Journal of Medicine 285(21):1182-&.

Folkman J, Hanahan D. 1992. SWITCH TO THE ANGIOGENIC PHENOTYPE DURING TUMORIGENESIS. Multistage Carcinogenesis 22:339-347.

Fonchy E, Lahrech H, Francois-Joubert A, Dupeyre R, Benderbous S, Corot C, Farion R, Rubin C, Decorps M, Remy C. 2001. A new gadolinium-based contrast agent for magnetic resonance imaging of brain tumors: Kinetic study on a C6 rat glioma model. Journal of Magnetic Resonance Imaging 14(2):97-105.

Frahm J, Haenicke W. Rapid Scan Techniques.

Franklin K, George P. 2008. The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact. 3rd ed.

Gahramanov S, Muldoon LL, Li X, Neuwelt EA. 2011. Improved Perfusion MR Imaging Assessment of Intracerebral Tumor Blood Volume and Antiangiogenic Therapy Efficacy in a Rat Model with Ferumoxytol. Radiology 261(3):796-804.

Gerber H-P. 2005. Pharmacology and Pharmacodynamics of Bevacizumab as Monotherapy or in Combination with Cytotoxic Therapy in Preclinical Studies. In: Napoleone F, editor. Cancer Res.

Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N. 2000. Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. Cancer Res 60(22):6253-8.

Gerstner ER, Chen PJ, Wen PY, Jain RK, Batchelor TT, Sorensen G. 2010. Infiltrative patterns of glioblastoma spread detected via diffusion MRI after treatment with cediranib. Neuro Oncol 12(5):466-72.

Gerstner ER, Sorensen AG, Jain RK, Batchelor TT. 2008. Advances in neuroimaging techniques for the evaluation of tumor growth, vascular permeability, and angiogenesis in gliomas. Current Opinion in Neurology 21(6):728-735.

Gimenez U, Perles-Barbacaru AT, Millet A, Appaix F, El-Atifi M, Pernet-Gallay K, van der Sanden B, Berger F, Lahrech H. 2016. Microscopic DTI accurately identifies early glioma cell migration: correlation with multimodal imaging in a new glioma stem cell model. NMR Biomed 29(11):1553-1562.

Glas M, Rath BH, Simon M, Reinartz R, Schramme A, Trageser D, Eisenreich R, Leinhaas A, Keller M, Schildhaus H-U et al. . 2010. Residual Tumor Cells Are Unique Cellular Targets in Glioblastoma. Annals of Neurology 68(2):264-269.

Gossmann A, Helbich TH, Kuriyama N, Ostrowitzki S, Roberts TPL, Shames DM, van Bruggen N, Wendland MF, Israel MA, Brasch RC. 2002. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a surrogate marker of tumor response to anti-angiogenic therapy in a xenograft model of glioblastoma multiforme. Journal of Magnetic Resonance Imaging 15(3):233-240.

Grobben B, De Deyn PP, Slegers H. 2002. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. Cell Tissue Res 310(3):257-70.

Gupta A, Young RJ, Karimi S, Sood S, Zhang Z, Mo Q, Gutin PH, Holodny AI, Lassman AB. 2011. Isolated diffusion restriction precedes the development of enhancing tumor in a subset of patients with glioblastoma. AJNR Am J Neuroradiol 32(7):1301-6.

Haase A. 1990. SNAPSHOT FLASH MRI - APPLICATIONS TO T1, T2, AND CHEMICAL-SHIFT IMAGING. Magnetic Resonance in Medicine 13(1):77-89.

Hajnal J. 1992. Use of fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) pulse sequences in MRI of the brain. J Comput Assist Tomogr.

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. Cell 100(1):57-70.

Heye AK, Culling RD, Valdés Hernández MeC, Thrippleton MJ, Wardlaw JM. 2014. Assessment of blood-brain barrier disruption using dynamic contrast-enhanced MRI. A systematic review. Neuroimage Clin 6:262-74.

Hicklin DJ, Ellis LM. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol 23(5):1011-27.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacological Reviews 56(4):549-580.

Hong Li, Emmanuel Blot CS, Yves Legrand, He Lu. 1998. Emergence de la thérapie anti-angiogénique : un pari stratégique dans le traitement du cancer.

Hutterer M, Hattingen E, Palm C, Proescholdt MA, Hau P. 2015. Current standards and new concepts in MRI and PET response assessment of antiangiogenic therapies in high-grade glioma patients. Neuro Oncol 17(6):784-800.

Iacob G, Dinca EB. 2009. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. Journal of medicine and life 2(4):386-93.

INCA. 2007. ANALYSE ECONOMIQUE DES CÔUTS DU CANCER EN FRANCE ;

Impact sur la qualité de vie, prévention, dépistage, soins, recherche (INCA).

Iwamoto FM, Lamborn KR, Robins HI, Mehta MP, Chang SM, Butowski NA, DeAngelis LM, Abrey LE, Zhang W-T, Prados MD et al. . 2010. Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. Neuro-Oncology 12(8):855-861.

Jahng G-H, Li K-L, Ostergaard L, Calamante F. 2014. Perfusion Magnetic Resonance Imaging: A Comprehensive Update on Principles and Techniques. Korean Journal of Radiology 15(5):554-577.

Jahnke K, Muldoon LL, Varallyay CG, Lewin SJ, Kraemer DF, Neuwelt EA. 2009. Bevacizumab and carboplatin increase survival and asymptomatic tumor volume in a glioma model. Neuro Oncol 11(2):142-50.

Jain R, Scarpace LM, Ellika S, Torcuator R, Schultz LR, Hearshen D, Mikkelsen T. 2010. Imaging response criteria for recurrent gliomas treated with bevacizumab: Role of diffusion weighted imaging as an imaging biomarker. Journal of Neuro-Oncology 96(3):423-431.

Jain RK. 2005. Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. Science 307(5706):58-62.

Jain RK, Di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. 2007. Angiogenesis in brain tumours. Nature Reviews Neuroscience 8(8):610-622.

Jivan A, Horsfield MA, Moody AR, Cherryman GR. 1997. Dynamic T-1 measurement using snapshot-FLASH MRI. Journal of Magnetic Resonance 127(1):65-72.

Johnson G, Wetzel SG, Cha S, Babb J, Tofts PS. 2004. Measuring blood volume and vascular transfer constant from dynamic, T(2)*-weighted contrast-enhanced MRI. Magn Reson Med 51(5):961-8.

Julien C, Payen JF, Tropres I, Farion R, Grillon E, Montigon O, Remy C. 2004. Assessment of vascular reactivity in rat brain glioma by measuring regional blood volume during graded hypoxic hypoxia. British Journal of Cancer 91(2):374-380.

Ka-Loh L, Buonaccorsi G, Thompson G, Cain JR, Watkins A, Russell D, Qureshi S, Evans DG, Lloyd SK, Xiaoping Z et al. . 2012. An improved coverage and spatial resolution-using dual injection dynamic contrast-enhanced (ICE-DICE) MRI: a novel dynamic contrast-enhanced technique for cerebral tumors. Magnetic Resonance in Medicine 68(2):452-62.

Kamoun WS, Chae SS, Lacorre DA, Tyrrell JA, Mitre M, Gillissen MA, Fukumura D, Jain RK, Munn LL. 2010. Simultaneous measurement of RBC velocity, flux, hematocrit and shear rate in vascular networks. Nat Methods 7(8):655-60.

Kassner A, Annesley DJ, Zhu XP, Li KL, Kamaly-Asl ID, Watson Y, Jackson A. 2000. Abnormalities of the contrast re-circulation phase in cerebral tumors demonstrated using dynamic susceptibility contrast-enhanced imaging: A possible marker of vascular tortuosity. Journal of Magnetic Resonance Imaging 11(2):103-113.

Kesselheim JC, Norden AD, Wen PY, Joffe S. 2011. Discontinuing Bevacizumab in Patients with Glioblastoma: An Ethical Analysis. Oncologist 16(10):1435-1439.

Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SA, Fack F, Thorsen F, Taxt T, Bartos M, Jirik R et al. . 2011. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A 108(9):3749-54.

Kickingereder P, Sahm F, Wiestler B, Roethke M, Heiland S, Schlemmer HP, Wick W, von Deimling A, Bendszus M, Radbruch A. 2014. Evaluation of Microvascular Permeability with Dynamic Contrast-Enhanced MRI for the Differentiation of Primary CNS Lymphoma and Glioblastoma: Radio logic-Pathologic Correlation. American Journal of Neuroradiology 35(8):1503-1508.

Kim KJ, Li B, Houck K, Winer J, Ferrara N. 1992. The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. Growth Factors 7(1):53-64.

Kiselev VG. 2005. Transverse relaxation effect of MRI contrast agents: A crucial issue for quantitative measurements of cerebral perfusion. Journal of Magnetic Resonance Imaging 22(6):693-696.

KJ Z. 1979. Histological typing of tumours of the central nervous system.

Kober F, Iltis I, Cozzone PJ, Bernard M. 2005. Myocardial blood flow mapping in mice using high-resolution spin labeling magnetic resonance imaging: influence of ketamine/xylazine and isoflurane anesthesia. Magn Reson Med 53(3):601-6.

Koh D-M, Collins DJ. 2007. Diffusion-weighted MRI in the body: Applications and challenges in oncology. American Journal of Roentgenology 188(6):1622-1635.

Kreisl TN, Kim L, Moore K, Duic P, Royce C, Stroud I, Garren N, Mackey M, Butman JA, Camphausen K et al. . 2009. Phase II Trial of Single-Agent Bevacizumab Followed by Bevacizumab Plus Irinotecan at Tumor Progression in Recurrent Glioblastoma. Journal of Clinical Oncology 27(5):740-745.

Kremer, S. 2007. Imagerie de diffusion : principes et applications cliniques. J Radiol.

Kroon, Dirk-Jan. 2011. B-spline grid, image and point based registration. Mathworks.

Kuo YT, Herlihy AH, So PW, Bhakoo KK, Bell JD. 2005. In vivo measurements of T1 relaxation times in mouse brain associated with different modes of systemic administration of manganese chloride. J Magn Reson Imaging 21(4):334-9.

Lamour G. 2010. Influence de la nanostructuration énergétique des substrats dans l'adhésion et la différenceiation des cellules neuronales modèles PC12.

Lamszus K, Kunkel P, Westphal M. 2003. Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. Acta neurochirurgica. Supplement 88:169-77.

Landis CS, Li X, Telang FW, Coderre JA, Micca PL, Rooney WD, Latour LL, Vétek G, Pályka I, Springer CS. 2000. Determination of the MRI contrast agent concentration time course in vivo following bolus injection: effect of equilibrium transcytolemmal water exchange. Magn Reson Med 44(4):563-74.

Larkman DJ, Hajnal JV, Herlihy AH, Coutts GA, Young IR, Ehnholm G. 2001. Use of multicoil arrays for separation of signal from multiple slices simultaneously excited. J Magn Reson Imaging 13(2):313-7.

Larsson HBW, Courivaud F, Rostrup E, Hansen AE. 2009. Measurement of Brain Perfusion, Blood Volume, and Blood-Brain Barrier Permeability, Using Dynamic Contrast-Enhanced T-1-Weighted MRI at 3 Tesla. Magnetic Resonance in Medicine 62(5):1270-1281.

Larsson HBW, Stubgaard M, Frederiksen JL, Jensen M, Henriksen O, Paulson OB. 1990. QUANTITATION OF BLOOD-BRAIN-BARRIER DEFECT BY MAGNETIC-RESONANCE-IMAGING AND GADOLINIUM-DTPA IN PATIENTS WITH MULTIPLE-SCLEROSIS AND BRAIN-TUMORS. Magnetic Resonance in Medicine 16(1):117-131.

Law M, Young RJ, Babb JS, Peccerelli N, Chheang S, Gruber ML, Miller DC, Golfinos JG, Zagzag D, Johnson G. 2008. Gliomas: Predicting time to progression or survival with cerebral blood volume measurements at dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging. Radiology 247(2):490-498.

Le Bas JF, Grand S, Krainik A, Lefournier V, Tropres I, Remy C. 2006. Perfusion MR imaging in brain tumors. Journal De Radiologie 87(6):807-821.

Le Bihan D. 2003. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. Nat Rev Neurosci 4(6):469-80.

Lemasson B. 2010. Evaluation de l'IRM multiparamétrique comme indicateur de l'effet de thérapies anti-angiogénéniques sur des modèles de gliomes implantés chez le rat. Université Joseph Fourier.

Lemasson B, Christen T, Tizon X, Farion R, Fondraz N, Provent P, Segebarth C, Barbier EL, Genne P, Duchamp O et al. . 2011. Assessment of multiparametric MRI in a human glioma model to monitor cytotoxic and anti-angiogenic drug effects. NMR Biomed 24(5):473-82.

Lemasson B, Duchamp O, Barbier E, Provent P, Tizon X, Segebarth C, Van der Sanden B, Rémy C. 2009. multiparametric MRI characterization of six glioma models-Link to Carmustine Treatment Outcome.

Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, Com E, de Tayrac M, Eliat PA, Henry C, Rousseau A, Mosser J, Menei P. 2015. Characterizing the peritumoral brain zone in glioblastoma: a multidisciplinary analysis. J Neurooncol 122(1):53-61.

Levy B. 2014. Le système des éphrines dans l'angiogenèse normale et tumorale E-VEGF-IMMUNO-ACTU.

Lin W, Abendschein DR, Celik A, Dolan RP, Lauffer RB, Walovitch RC, Haacke EM. 1997. Intravascular contrast agent improves magnetic resonance angiography of carotid arteries in minipigs. J Magn Reson Imaging 7(6):963-71.

Livramento JB, Weidensteiner C, Prata MI, Allegrini PR, Geraldes CF, Helm L, Kneuer R, Merbach AE, Santos AC, Schmidt P et al. . 2006. First in vivo MRI assessment of a self-assembled metallostar compound endowed with a remarkable high field relaxivity. Contrast Media Mol Imaging 1(1):30-9.

Lu H, Law M, Johnson G, Ge Y, van Zijl PC, Helpern JA. 2005. Novel approach to the measurement of absolute cerebral blood volume using vascular-space-occupancy magnetic resonance imaging. Magn Reson Med 54(6):1403-11.

Lu S, Ahn D, Johnson G, Cha S. 2003. Peritumoral diffusion tensor imaging of high-grade gliomas and metastatic brain tumors. AJNR Am J Neuroradiol 24(5):937-41.

Lu S, Ahn D, Johnson G, Law M, Zagzag D, Grossman RI. 2004. Diffusion-tensor MR imaging of intracranial neoplasia and associated peritumoral edema: Introduction of the tumor infiltration index. Radiology 232(1):221-228.

Lucio-Eterovic AK, Piao Y, de Groot JF. 2009. Mediators of Glioblastoma Resistance and Invasion during Antivascular Endothelial Growth Factor Therapy. Clinical Cancer Research 15(14):4589-4599.

Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, Cairncross JG. 1990. RESPONSE CRITERIA FOR PHASE-II STUDIES OF SUPRATENTORIAL MALIGNANT GLIOMA. Journal of Clinical Oncology 8(7):1277-1280.

Mahaley MS, Odom GL, Woodhall B. 1963. HISTOLOGICAL CHANGES AFTER REGIONAL CHEMOTHERAPY - BRAIN AND FACE TUMORS. Archives of Surgery 87(5):765-774.

Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, Yao VJ, Inai T, Brooks P, Freimark B et al. . 2006. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. Journal of Clinical Investigation 116(10):2610-2621.

Mauconduit, Franck. 2012. Imagerie cérébrale par résonance magnétique du tenseur de diffusion: de la modélisation à l'imagerie 3D haute résolution. Applications et fibre tracking dans un modèle de schizophrénie chez la souris. In: Grenoble Ud, editor.

McRobbie. 2007. MRI From picture to Proton. Cambridge University Press.

Meier P, Zierler KL. 1954. ON THE THEORY OF THE INDICATOR-DILUTION METHOD FOR MEASUREMENT OF BLOOD FLOW AND VOLUME. Journal of Applied Physiology 6(12):731-744.

Meme W, Vandecasteele M, Giaume C, Venance L. 2009. Electrical coupling between hippocampal astrocytes in rat brain slices. Neurosci Res 63(4):236-43.

Mettra B, Appaix F, Olesiak-Banska J, Le Bahers T, Leung A, Matczyszyn K, Samoc M, van der Sanden B, Monnereau C, Andraud C. 2016. A Fluorescent Polymer Probe with High Selectivity toward Vascular Endothelial Cells for and beyond Noninvasive Two-Photon Intravital Imaging of Brain Vasculature. ACS Appl Mater Interfaces 8(27):17047-59.

Miraux S, Massot P, Ribot EJ, Franconi JM, Thiaudiere E. 2008. 3D TrueFISP imaging of mouse brain at 4.7T and 9.4T. J Magn Reson Imaging 28(2):497-503.

MK S. 1998. Perfusion imaging with echo-planar imaging. Echo-planar imaging-Theory, technique and application.

Moffat BA, Chenevert TL, Lawrence TS, Meyer CR, Johnson TD, Dong Q, Tsien C, Mukherji S, Quint DJ, Gebarski SS et al. . 2005. Functional diffusion map: A noninvasive MR1 biomarker for early stratification of clinical brain tumor response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(15):5524-5529.

Moré JJ. 2006. The Levenberg-Marquardt algorithm: Implementation and theory. p. 105-116.

Muldoon LL, Gahramanov S, Li X, Marshall DJ, Kraemer DF, Neuwelt EA. 2011. Dynamic magnetic resonance imaging assessment of vascular targeting agent effects in rat intracerebral tumor models. Neuro-Oncology 13(1):51-60.

Nagasawa H, Little JB. 1992. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. Cancer Res 52(22):6394-6.

Nagashima G, Suzuki R, Hokaku H, Takahashi M, Miyo T, Asai J, Nakagawa N, Fujimoto T. 1999. Graphic analysis of microscopic tumor cell infiltration, proliferative potential, and vascular endothelial growth factor expression in an autopsy brain with glioblastoma. Surgical Neurology 51(3):292-299.

Narayana A, Kelly P, Golfinos J, Parker E, Johnson G, Knopp E, Zagzag D, Fischer I, Raza S, Medabalmi P et al. . 2009. Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent high-grade glioma: impact on local control and patient survival. Journal of Neurosurgery 110(1):173-180.

Newlands ES, Stevens MFG, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. 1997. Temozolomide: A review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. Cancer Treatment Reviews 23(1):35-61.

Nieder C. 2015. Target Volume Definition in Radiation Oncology. p. 10.

Noel G, Guillevin R. 2011. Delineation of glioblastoma, simplicity to complexity, the contribution of imaging. Cancer Radiotherapie 15(6-7):484-494.

Norden AD, Young GS, Setayesh K, Muzikansky A, Klufas R, Ross GL, Ciampa AS, Ebbeling LG, Levy B, Drappatz J et al. . 2008. Bevacizumab for recurrent malignant gliomas - Efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. Neurology 70(10):779-787.

O'Connor JPB, Tofts PS, Miles KA, Parkes LM, Thompson G, Jackson A. 2011. Dynamic contrast-enhanced imaging techniques: CT and MRI. British Journal of Radiology 84:S112-S120.

Ohnishi T, Sher PB, Posner JB, Shapiro WR. 1991. Increased capillary permeability in rat brain induced by factors secreted by cultured C6 glioma cells: role in peritumoral brain edema. J Neurooncol 10(1):13-25.

Ostergaard L, Weisskoff RM, Chesler DA, Gyldensted C, Rosen BR. 1996. High resolution measurement of cerebral blood flow using intravascular tracer bolus passages .1. Mathematical approach and statistical analysis. Magnetic Resonance in Medicine 36(5):715-725.

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM et al. . 2014. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. Neuro-Oncology 16(7):896-913.

Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. 2009. Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. Cancer Cell 15(3):220-231.

Paldino MJ, Desjardins A, Friedman HS, Vredenburgh JJ, Barboriak DP. 2012. A change in the apparent diffusion coefficient after treatment with bevacizumab is associated with decreased survival in patients with recurrent glioblastoma multiforme. British Journal of Radiology 85(1012):382-389.

Park JY, Garwood M. 2009. Spin-echo MRI using pi/2 and pi hyperbolic secant pulses. Magn Reson Med 61(1):175-87.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL et al. . 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma Multiforme. Science 321(5897):1807-1812.

Patil V, Johnson G. 2011. An improved model for describing the contrast bolus in perfusion MRI. Medical Physics 38(12):6380-6383.

Patlak CS, Blasberg RG, Fenstermacher JD. 1983. GRAPHICAL EVALUATION OF BLOOD-TO-BRAIN TRANSFER CONSTANTS FROM MULTIPLE-TIME UPTAKE DATA. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 3(1):1-7.

Paulson ES, Schmainda KM. 2008. Comparison of Dynamic Susceptibility-weighted Contrast-enhanced MR Methods: Recommendations for Measuring Relative Cerebral Blood Volume in Brain Tumors. Radiology 249(2):601-613.

Pauly J, Nishimura D, Macovski A. 2011. A k-space analysis of small-tip-angle excitation. 1989. J Magn Reson 213(2):544-57.

Paxinos G, Charles W. 2007. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th ed.

Payen JF, Vath A, Koenigsberg B, Bourlier V, Decorps M. 1998. Regional cerebral plasma volume response to carbon dioxide using magnetic resonance imaging. Anesthesiology 88(4):984-92.

Pechman KR, Donohoe DL, Bedekar DP, Kurpad SN, Hoffmann RG, Schmainda KM. 2011. Characterization of bevacizumab dose response relationship in U87 brain tumors using magnetic resonance imaging measures of enhancing tumor volume and relative cerebral blood volume. Journal of Neuro-Oncology 105(2):233-239.

Pechman KR, Donohoe DL, Bedekar DP, Kurpad SN, Schmainda KM. 2012. Evaluation of combined bevacizumab plus irinotecan therapy in brain tumors using magnetic resonance imaging measures of relative cerebral blood volume. Magnetic Resonance in Medicine 68(4):1266-1272.

Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. 2003. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. Cancer Cell 3(4):347-61.

Perles-Barbacaru A. 2007. Magnetic resonance imaging of the cerebral blood volume for the characterization of experimental brain tumor neovascularization.

Perles-Barbacaru A. 2011. Magnetic resonance imaging of the cerebral blood volume for the characterization of experimental brain tumor neovascularization.

Perles-Barbacaru A, Lamalle L, Barbier E, Segebarth C, Lahrech H. 2008. Rapid steady state T1 method for cerebral blood volume fraction mapping using SINEREM as contrast agent and a three dimensional projection reconstruction acquisition mode.

Perles-Barbacaru AT, Berger F, Lahrech H. 2013. Quantitative Rapid Steady State T-1 Magnetic Resonance Imaging for Cerebral Blood Volume Mapping in Mice: Lengthened Measurement Time Window with Intraperitoneal Gd-DOTA Injection. Magnetic Resonance in Medicine 69(5):1451-1456.

Perles-Barbacaru AT, Lahrech H. 2007. A new magnetic resonance imaging method for mapping the cerebral blood volume fraction: the rapid steady-state T-1 method. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 27(3):618-631.

Perles-Barbacaru AT, van der Sanden BPJ, Farion R, Lahrech H. 2012a. How stereological analysis of vascular morphology can quantify the blood volume fraction as a marker for tumor vasculature: comparison with magnetic resonance imaging. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 32(3):489-501.

Perles-Barbacaru T-A, Lahrech H. 2013. Quantitative Mapping of Angiogenesis by Magnetic Resonance Imaging IntechOpen.

Perles-Barbacaru T-A, Tropres I, Sarraf MG, Chechin D, Zaccaria A, Grand S, Le Bas J-F, Berger F, Lahrech H. 2015. Technical Note: Clinical translation of the Rapid-Steady-State-T-1 MRI method for direct cerebral blood volume quantification. Medical Physics 42(11):6369-6375.

Perles-Barbacaru TA, Procissi D, Demyanenko AV, Jacobs RE. 2012b. Quantitative pharmacologic MRI in mice. NMR Biomed 25(4):498-505.

Petrecca K, Guiot M-C, Panet-Raymond V, Souhami L. 2013. Failure pattern following complete resection plus radiotherapy and temozolomide is at the resection margin in patients with glioblastoma. Journal of Neuro-Oncology 111(1):19-23.

Pope WB, Young JR, Ellingson BM. 2011. Advances in MRI Assessment of Gliomas and Response to Anti-VEGF Therapy. Current Neurology and Neuroscience Reports 11(3):336-344.

Preda A, Novikov V, Moglich M, Turetschek K, Shames DM, Brasch RC, Cavagna FM, Roberts TPL. 2004. MRI monitoring of avastin (TM) antiangiogenesis therapy using B22956/1, a new blood pool contrast agent, in an experimental model of human cancer. Journal of Magnetic Resonance Imaging 20(5):865-873.

Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. 2009. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. Bioinformatics 25(11):1463-5.

Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N. 1997. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. Cancer Res 57(20):4593-9.

Price SJ, Young AM, Scotton WJ, Ching J, Mohsen LA, Boonzaier NR, Lupson VC, Griffiths JR, McLean MA, Larkin TJ. 2016. Multimodal MRI can identify perfusion and metabolic changes in the invasive margin of glioblastomas. J Magn Reson Imaging 43(2):487-94.

Price WS. 1997. Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion .1. Basic theory. Concepts in Magnetic Resonance 9(5):299-336.

Provenzale JM, McGraw P, Mhatre P, Guo AC, Delong D. 2004. Peritumoral brain regions in gliomas and meningiomas: Investigation with isotropic diffusion-weighted MR imaging and diffusion-tensor MR imaging. Radiology 232(2):451-460.

Ranpura V, Hapani S, Wu S. 2011. Treatment-Related Mortality With Bevacizumab in Cancer Patients A Meta-analysis. Jama-Journal of the American Medical Association 305(5):487-494.

Reichardt W, Hu-Lowe D, Torres D, Weissleder R, Bogdanov A. 2005. Imaging of VEGF receptor kinase inhibitor-induced antiangiogenic effects in drug-resistant human adenocarcinoma model. Neoplasia 7(9):847-853.

Ren Y, Fleischmann D, Foygel K, Molvin L, Lutz AM, Koong AC, Jeffrey RB, Tian L, Willmann JK. 2012. Antiangiogenic and Radiation Therapy Early Effects on In Vivo Computed Tomography Perfusion Parameters in Human Colon Cancer Xenografts in Mice. Investigative Radiology 47(1):25-32.

Rieger J, Bähr O, Müller K, Franz K, Steinbach J, Hattingen E. 2010a. Bevacizumab-induced diffusion-restricted lesions in malignant glioma patients. J Neurooncol 99(1):49-56.

Rieger J, Bähr O, Ronellenfitsch MW, Steinbach J, Hattingen E. 2010b. Bevacizumab-induced diffusion restriction in patients with glioma: tumor progression or surrogate marker of hypoxia? J Clin Oncol 28(27):e477; author reply e478.

Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann HJ. 2005. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. Investigative Radiology 40(11):715-724.

Rosen BR, Belliveau JW, Aronen HJ, Kennedy D, Buchbinder BR, Fischman A, Gruber M, Glas J, Weisskoff RM, Cohen MS et al. . 1991a. SUSCEPTIBILITY CONTRAST IMAGING OF CEREBRAL BLOOD-VOLUME - HUMAN-EXPERIENCE. Magnetic Resonance in Medicine 22(2):293-299.

Rosen BR, Belliveau JW, Buchbinder BR, McKinstry RC, Porkka LM, Kennedy DN, Neuder MS, Fisel CR, Aronen HJ, Kwong KK et al. . 1991b. CONTRAST AGENTS AND CEREBRAL HEMODYNAMICS. Magnetic Resonance in Medicine 19(2):285-292.

Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. Science 322(5907):1551-5.

Ruiz-Ontanon P, Orgaz JL, Aldaz B, Elosegui-Artola A, Martino J, Berciano MT, Montero JA, Grande L, Nogueira L, Diaz-Moralli S et al. . 2013. Cellular Plasticity Confers Migratory and Invasive Advantages to a Population of Glioblastoma-Initiating Cells that Infiltrate Peritumoral Tissue. Stem Cells 31(6):1075-1085.

S. Gribbestad I. 2005. An Introduction to Dynamic Contrast-Enhanced MRI in Oncology. Medical Radiology (Diagnostic Imaging).

Saito T, Sugiyama K, Ikawa F, Yamasaki F, Ishifuro M, Takayasu T, Nosaka R, Nishibuchi I, Muragaki Y, Kawamata T et al. . 2017. Permeability Surface Area Product Using Perfusion Computed Tomography Is a Valuable Prognostic Factor in Glioblastomas Treated with Radiotherapy Plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide. World Neurosurg 97:21-26.

Salas S. 2011. Bevacizumab: A controversial agent against high grade gliomas. JHN Journal.

San-Galli F, Vrignaud P, Robert J, Coindre JM, Cohadon F. 1989. Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. J Neurooncol 7(3):299-304.

Sarraf M, Perles-Barbacaru AT, Nissou MF, van der Sanden B, Berger F, Lahrech H. 2015. Rapid-Steady-State-T-1 Signal Modeling during Contrast Agent Extravasation: Toward Tumor Blood Volume Quantification without Requiring the Arterial Input Function. Magnetic Resonance in Medicine 73(3):1005-1014.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B et al. . 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 9(7):676-82.

Schmainda KM, Zhang Z, Prah M, Snyder BS, Gilbert MR, Sorensen AG, Barboriak DP, Boxerman JL. 2015. Dynamic susceptibility contrast MRI measures of relative cerebral blood volume as a prognostic marker for overall survival in recurrent glioblastoma: results from the ACRIN 6677/RTOG 0625 multicenter trial. Neuro-Oncology 17(8):1148-1156.

Schmidt NO, Ziu M, Carrabba G, Giussani C, Bello L, Sun YP, Schmidt K, Albert M, Black PM, Carroll RS. 2004. Antiangiogenic therapy by local intracerebral microinfusion improves treatment efficiency and survival in an orthotopic human glioblastoma model. Clinical Cancer Research 10(4):1255-1262.

Schricker AA, Pauly JM, Kurhanewicz J, Swanson MG, Vigneron DB. 2001. Dualband spectral-spatial RF pulses for prostate MR spectroscopic imaging. Magn Reson Med 46(6):1079-87.

Schülen V, Schick F, Loichat J, Helber U, Huppert PE, Laub G, Claussen CD. 1996. Evaluation of K-space segmented cine sequences for fast functional cardiac imaging. Invest Radiol 31(8):512-22.

Seiz M, Krafft U, Freyschlag CF, Weiss C, Schmieder K, Lohr F, Wenz F, Thome C, Tuettenberg J. 2010. Long-term adjuvant administration of temozolomide in patients with glioblastoma multiforme: experience of a single institution. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 136(11):1691-1695.

Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. 2011. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. Lancet Oncology 12(11):997-1003.

Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A. 2015. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. Semin Cell Dev Biol 38:2-6.

Sheline GE. 1976. IMPORTANCE OF DISTINGUISHING TUMOR GRADE IN MALIGNANT GLIOMAS - TREATMENT AND PROGNOSIS. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 1(7-8):781-786.

Sherriff J, Tamangani J, Senthil L, Cruickshank G, Spooner D, Jones B, Brookes C, Sanghera P. 2013. Patterns of relapse in glioblastoma multiforme following concomitant chemoradiotherapy with temozolomide. British Journal of Radiology 86(1022).

Shu HKG, Kim MM, Chen PC, Furman F, Julin CM, Israel MA. 1998. The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(24):14453-14458.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. 1992. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH-FACTOR INDUCED BY HYPOXIA MAY MEDIATE HYPOXIA-INITIATED ANGIOGENESIS. Nature 359(6398):843-845.

Sinha S, Bastin ME, Whittle IR, Wardlaw JM. 2002. Diffusion tensor MR imaging of high-grade cerebral gliomas. American Journal of Neuroradiology 23(4):520-527.

Sommer C. Interactive Learning and Segmentation Toolkit. Eighth IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI); 2011. p. 230-233.

Sorensen AG, Batchelor TT, Zhang WT, Chen PJ, Yeo P, Wang M, Jennings D, Wen PY, Lahdenranta J, Ancukiewicz M et al. . 2009. A "vascular normalization index" as potential mechanistic biomarker to predict survival after a single dose of cediranib in recurrent glioblastoma patients. Cancer Res 69(13):5296-300.

Stadlbauer A, Ganslandt O, Buslei R, Hammen T, Gruber S, Moser E, Buchfelder M, Salomonowitz E, Nimsky C. 2006. Gliomas: Histopathologic evaluation of changes in directionality and magnitude of water diffusion at diffusion-tensor MR imaging. Radiology 240(3):803-810.

Stadlbauer A, Pichler P, Karl M, Brandner S, Lerch C, Renner B, Heinz G. 2015. Quantification of serial changes in cerebral blood volume and metabolism in patients with recurrent glioblastoma undergoing antiangiogenic therapy. Eur J Radiol 84(6):1128-36.

Stejskal, E. 1965. Spin diffusion measurements: Spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. The Journal of Chemical Physics 42(1):288-292.

Strojnik T, Kavalar R, Lah TT. 2006. Experimental model and immunohistochemical analyses of U87 human glioblastoma cell xenografts in immunosuppressed rat brains. Anticancer Res 26(4B):2887-900.

Stuckey SL, Goh TD, Heffernan T, Rowan D. 2007. Hyperintensity in the subarachnoid space on FLAIR MRI. AJR Am J Roentgenol 189(4):913-21.

Stummer W, van den Bent MJ, Westphal M. 2011. Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. Acta Neurochirurgica 153(6):1211-1218.

Stupp R, Mason WP, van den Beuf MJ. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma (vol 352, pg 19, 2005). Annals of Oncology 16(6):949-949.

Sun Y, Schmidt NO, Schmidt K, Doshi S, Rubin JB, Mulkern RV, Carroll R, Ziu M, Erkmen K, Poussaint TY et al. . 2004a. Perfusion MRI of U87 brain tumors in a mouse model. Magn Reson Med 51(5):893-9.

Sun YP, Mulkern RV, Schmidt K, Doshi S, Albert MS, Schmidt NO, Ziu M, Black P, Carrol R, Kieran MW. 2004b. Quantification of water diffusion and relaxation times of human U87 tumors in a mouse model. Nmr in Biomedicine 17(6):399-404.

Taylor JS, Reddick WE. 2000. Evolution from empirical dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging to pharmacokinetic MRI. Advanced Drug Delivery Reviews 41(1):91-110.

Thompson EM, Frenkel EP, Neuwelt EA. 2011. The paradoxical effect of bevacizumab in the therapy of malignant gliomas. Neurology 76(1):87-93.

Tofts PS. 1997. Modeling tracer kinetics in dynamic Gd-DTPA MR imaging. Jmri-Journal of Magnetic Resonance Imaging 7(1):91-101.

Tofts PS. 2010. T1-weighted DCE Imaging Concepts: Modelling, Acquisition and Analysis

Tofts PS, Brix G, Buckley DL, Evelhoch JL, Henderson E, Knopp M, Larsson HBW, Lee TY, Mayr NA, Parker GJM et al. . 1999. Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusable tracer: Standardized quantities and symbols. Journal of Magnetic Resonance Imaging 10(3):223-232.

Towner RA. 2011. Assessment of Rodent Glioma Models Using

Magnetic Resonance Imaging Techniques.

Tropine A, Vucurevic G, Delani P, Boor S, Hopf N, Bohl J, Stoeter P. 2004. Contribution of diffusion tensor imaging to delineation of gliomas and glioblastomas. Journal of Magnetic Resonance Imaging 20(6):905-912.

Tropres I, Lamalle L, Peoc'h M, Farion R, Usson Y, Decorps M, Remy C. 2004. In vivo assessment of tumoral angiogenesis. Magnetic Resonance in Medicine 51(3):533-541.

Ungersma SE, Pacheco G, Ho C, Yee SF, Ross J, van Bruggen N, Peale FV, Ross S, Carano RA. 2010. Vessel imaging with viable tumor analysis for quantification of tumor angiogenesis. Magn Reson Med 63(6):1637-47.

Urgoiti GBR, Singh AD, Easaw JC. 2012. Extended adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. Journal of Neuro-Oncology 108(1):173-177.

Valable S, Lemasson B, Farion R, Beaumont M, Segebarth C, Remy C, Barbier EL. 2008. Assessment of blood volume, vessel size, and the expression of angiogenic factors in two rat glioma models: a longitudinal in vivo and ex vivo study. NMR Biomed 21(10):1043-56.

Van der Sanden B, Rijken P, Heerschap A, Bernsen H, Van der Kogel A. 1997. In vivo 31P magnetic resonance spectroscopy and morphometric analysis of the perfused vascular architecture of human glioma xenografts in nude mice.

van Osch MJP, Vonken E, Bakker CJG, Viergever MA. 2001. Correcting partial volume artifacts of the arterial input function in quantitative cerebral perfusion MRI. Magnetic Resonance in Medicine 45(3):477-485.

Varallyay CG, Muldoon LL, Gahramanov S, Wu YJ, Goodman JA, Li X, Pike MM, Neuwelt EA. 2009. Dynamic MRI using iron oxide nanoparticles to assess early vascular effects of antiangiogenic versus corticosteroid treatment in a glioma model. J Cereb Blood Flow Metab 29(4):853-60.

Verlhac S, Bernaudin F. 2008. Place du Doppler transcrânien et de l'imagerie en résonance magnétique dans la drépanocytose.

Vogelbaum MA, Aghi MK. 2015. Convection-enhanced delivery for the treatment of glioblastoma. Neuro-Oncology 17:II3-II8.

Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, Dowel JM, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Wagner M et al. . 2007. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. Clinical Cancer Research 13(4):1253-1259.

Vérant P, Serduc R, Van Der Sanden B, Rémy C, Vial JC. 2007. A direct method for measuring mouse capillary cortical blood volume using multiphoton laser scanning microscopy. J Cereb Blood Flow Metab 27(5):1072-81.

Wang W, Sivakumar W, Torres S, Jhaveri N, Vaikari VP, Gong A, Howard A, Golden EB, Louie SG, Schoenthal AH et al. . 2015. Effects of convection-enhanced delivery of bevacizumab on survival of glioma-bearing animals. Neurosurgical Focus 38(3).

Weis SM, Cheresh DA. 2011. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. Nature Medicine 17(11):1359-1370.

Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, DeGroot J, Wick W, Gilbert MR, Lassman AB et al. . 2010. Updated Response Assessment Criteria for High-Grade Gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology Working Group. Journal of Clinical Oncology 28(11):1963-1972.

Wieshmann UC, Clark CA, Symms MR, Franconi F, Barker GJ, Shorvon SD. 1999. Reduced anisotropy of water diffusion in structural cerebral abnormalities demonstrated with diffusion tensor imaging. Magn Reson Imaging 17(9):1269-74.

Wilking N, Jonsson B. 2005. A pan-European comparison regarding patient access to cancer drugs.

Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, Garkavtsev I, Xu L, Hicklin DJ, Fukumura D, di Tomaso E et al. . 2004. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. Cancer Cell 6(6):553-63.

Wolbers JG. 2014. Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. Chinese Journal of Cancer 33(1):8-15.

Yablonskiy DA, Haacke EM. 1994. Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime. Magn Reson Med 32(6):749-63.

Yamahara T, Numa Y, Oishi T, Kawaguchi T, Seno T, Asai A, Kawamoto K. 2010. Morphological and flow cytometric analysis of cell infiltration in glioblastoma: a comparison of autopsy brain and neuroimaging. Brain Tumor Pathology 27(2):81-87.

Yang AD, Bauer TW, Camp ER, Somcio R, Liu W, Fan F, Ellis LM. 2005. Improving delivery of antineoplastic agents with anti-vascular endothelial growth factor therapy. Cancer 103(8):1561-70.

Yeung TP, Kurdi M, Wang Y, Al-Khazraji B, Morrison L, Hoffman L, Jackson D, Crukley C, Lee TY, Bauman G et al. . 2014. CT perfusion imaging as an early biomarker of differential response to stereotactic radiosurgery in C6 rat gliomas. PLoS One 9(10):e109781.

Yu L, Wu X, Cheng Z, Lee CV, LeCouter J, Campa C, Fuh G, Lowman H, Ferrara N. 2008a. Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. Invest Ophthalmol Vis Sci 49(2):522-7.

Yu S-c, Ping Y-f, Yi L, Zhou Z-h, Chen H-h, Yao X-h, Gao L, Wang JM, Bian X-w. 2008b. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. Cancer Letters 265(1):124-134.

YUAN F. 1996. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factoryvascular permeability factor antibody

Zhang W, Fulci G, Buhrman JS, Stemmer-Rachamimov AO, Chen JW, Wojtkiewicz GR, Weissleder R, Rabkin SD, Martuza RL. 2012. Bevacizumab with angiostatin-armed oHSV increases antiangiogenesis and decreases bevacizumab-induced invasion in U87 glioma. Mol Ther 20(1):37-45.

Zhang Y, Reckow S, Webhofer C, Boehme M, Gormanns P, Egge-Jacobsen WM, Turck CW. 2011. Proteome Scale Turnover Analysis in Live Animals Using Stable Isotope Metabolic Labeling. Analytical Chemistry 83(5):1665-1672.

Zhao H, Tang C, Cui K, Ang BT, Wong ST. 2009. A screening platform for glioma growth and invasion using bioluminescence imaging. Laboratory investigation. J Neurosurg 111(2):238-46.

Zhu X, Wu S, Dahut WL, Parikh CR. 2007. Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: Systematic review and meta-analysis. American Journal of Kidney Diseases 49(2):186-193.

Zuniga RM, Torcuator R, Jain R, Anderson J, Doyle T, Ellika S, Schultz L, Mikkelsen T. 2009. Efficacy, safety and patterns of response and recurrence in patients with recurrent high-grade gliomas treated with bevacizumab plus irinotecan. J Neurooncol 91(3):329-36.

Abstract

In neuro-oncology, the effects of anti-angiogenic treatments are not predictable, as observed in glioblastomas treated with Avastin. Only a minority of patients show a significant response to treatment. Conventional imaging modalities are not able to evaluate the efficiency in the early phase of the treatment. Thus, the challenge remains to find and to validate new biomarkers that are able to predict the early response to such therapies.

The aim of this work is to develop and implement a preclinical multiparametric magnetic resonance imaging (MRI) protocol for the characterization and follow up of early microvascular and microstructural changes in the tumor and its peritumoral regions after treatment with Avastin. For this purpose, the quantification of the blood volume and K_{model} (an apparent coefficient that is related to the contrast agent (CA) uptake rate), and evaluation of brain microarchitecture by diffusion tensor imaging were developed and evaluated as biomarkers.

The Rapid Steady State T_1 ($RSST_1$) method was initially developed for blood volume quantification in the absence of CA extravasation. In the first part of this thesis, we have implemented and adapted this MRI technique for the quantification of both blood volume and K_{model} in tumors where the CA extravasates. We developed a mathematical model for the $RSST_1$ signals that accounts for the unidirectional bi-compartmental exchange of CA from the vascular towards the extravascular compartment. This development allows to the quantification of vascular parameters in a rat glioma model (C6). The results were confirmed using another MRI modality, the steady state magnetic susceptibility method, and quantitative histology.

In the second part, we studied the sensitivity of the $RSST_1$ method for the follow up of the glioma response to anti-angiogenic treatment under clinical conditions. In this study, the effect of Avastin treatment in a murine orthotopic U87 MG glioma model was analyzed. The $RSST_1$ method demonstrated a high reproducibility in the blood volume quantification and a superior sensitivity in comparison to CA enhanced T_1-weighted imaging ($T_{1W\text{-}Gd\text{-}DOTA}$) for the detection and follow-up of the tumor response to Avastin, especially in early stages of tumor progression. Blood volume quantification by MRI was correlated to measures obtained by two-photon microscopy.

In the last part of this thesis, we have studied the capacity of diffusion tensor imaging (DTI) coupled with FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) MRI and $T_{1w\text{-}Gd\text{-}DOTA}$, to characterize tumor, peritumoral, and contralateral regions of the U87MG glioma model. We quantified DTI parameters before and during the invasion of tumor cells induced by Avastin in the peritumoral zone for different administration modes: intravenous and intratumoral via Convention-Enhanced Delivery. Therefore, the delineation of peritumoral regions for each tumor in an early stage was based on anatomical images, that took into account the individual tumor progression at later stages. Significant differences were detected for DTI parameters between the tumor, peritumoral, and contralateral regions and a different evolution of these parameters was noticed according to the Avastin injection mode.

Résumé

En neuro-oncologie, les effets des traitements anti-angiogéniques utilisés pour inhiber la microvascularisation tumorale ne sont pas bien maîtrisés, comme dans le cas des glioblastomes traités par Avastin. Seulement une partie des patients montre une réponse significative au traitement. L'imagerie conventionnelle anatomique ne permet pas d'évaluer l'efficacité de ce traitement. Le défi est de trouver et valider des nouveaux biomarqueurs capables de prédire la réponse tumorale précocement.

L'objectif principal de cette thèse est de développer et de mettre en place un protocole préclinique d'imagerie par résonance magnétique (IRM) multiparamétrique, qui est capable de caractériser et de suivre précocement l'évolution après traitement par l'Avastin : la microvascularisation et des microstructures dans la tumeur et sa région péritumorales. Dans ce but, la quantification du volume sanguin (VS), du K_{model} (i.e coefficient apparent d'accumulation de l'agent de contraste (AC)) et l'évaluation de la microarchitecture par la technique d'IRM de diffusion DTI ont été développées et évaluées comme biomarqueurs.

Dans un premier temps, nous avons développé et mis en place la méthode Rapid Steady State T_1 ($RSST_1$) pour la quantification du VS et du K_{model} dans la tumeur où l'AC s'extravase. Cette technique a été développée initialement pour quantifier le volume sanguin en l'absence d'extravasation de l'AC. Le développement ainsi effectué durant ma thèse repose sur la modélisation du signal d'extravasation $RSST_1$ par un modèle mathématique qui prend en compte l'échange bi-compartimental et unidirectionnel de l'AC du compartiment vasculaire vers le compartiment extravasculaire. Ce développement a permis de quantifier les paramètres vasculaires dans le cas du gliome C6 chez le rat. Les résultats ont été confirmés par d'autres modalités d'imagerie (Technique stationnaire de susceptibilité magnétique et par histologie).

Dans un second temps, nous avons étudié la sensibilité de la méthode $RSST_1$ pour le suivi de la réponse tumorale à un traitement antiangiogénique dans des conditions proches de la clinique. Pour cette étude, le modèle du gliome humain U87 MG a été utilisé chez la souris sous traitement par Avastin. La méthode $RSST_1$ s'est avérée reproductible pour la mesure du VS et plus sensible que l'imagerie pondérée T_1 (avec injection du Gd-DOTA comme AC, $T_{1w\text{-}Gd\text{-}DOTA}$) pour détecter et pour suivre la réponse tumorale à l'Avastin notamment à des stades précoces de la progression tumorale. Nos résultats concernant la mesure du VS ont été corrélés aux mesures effectuées par la microscopie à deux photons.

Enfin, dans la dernière partie de cette thèse nous avons étudié la capacité de l'imagerie du tenseur de diffusion (DTI), couplée à l'IRM de type FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) et $T_{1w\text{-}Gd\text{-}DOTA}$, pour caractériser les régions tumorales, péritumorales et controlatérales dans le modèle U87MG. La quantification des paramètres DTI nous a permis d'évaluer les changements des microstructures dans la région péritumorale avant et pendant l'invasion cellulaire provoquée par l'Avastin pour différents modes d'administration : intraveineux, intratumoral par convection-enhanced delivery. La délinéation des régions péritumorales a été basée sur les images anatomiques, mais nous avons aussi pris en compte la progression intrinsèque de chaque tumeur. Une différence significative des paramètres DTI a été détectée entre les régions tumorales, péritumorales et controlatérales et une évolution différente de ces paramètres a été constatée selon le mode d'injection de l'Avastin.