

# Master of Science conjoint HES-SO - UNIL en Sciences de la santé Technique en radiologie médicale

## Mise en place et évaluation d'un protocole d'imagerie multimodale préclinique dans le cadre du développement d'une nouvelle approche théranostique en oncologie

Fait par

**Marianna Gulizia**

Sous la direction de

Prof. Jean-Noël, Hyacinthe et Prof. Rares Salomir

Dans l'équipe Image guided interventions laboratory, Unige

Experts : Prof. Eric Alleman, Président de l'école de Pharmacie Genève - Lausanne

Prof. Rares Salomir, responsable du groupe Image guided intervention laboratory(département d'imagerie et des science de l'information médicale, Faculté de médecine, Université de Genève)

Président du Jury : Jean-Noël Hyaincthe , Prof. HES associé, Haute Ecole de Santé de Genève

Genève, HES-SO//Master, 2020

Accepté par la HES-SO//Master (Suisse, Lausanne) sur proposition de

Prof. Jean-Noël Hyacinthe, président du Jury

Lausanne, le 29 janvier 2020

Prof. Olivier Contal  
Responsable du module  
Travail de Master

Prof. Ludivine Soguel Alexander  
Responsable de la filière MScSa

## Table des matières

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE D'ABREVIATION .....</b>	<b>4</b>
<b>CONTEXTE.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
1.1 TRAITEMENT ONCOLOGIQUE ET NANOPARTICULE .....	6
1.2 TRAITEMENT HIFU .....	7
1.3 IRM FLUOR ET IMAGERIE DE FLUORESCENCE .....	8
1.4 LE PROJET .....	10
<b>METHODES ET MATERIELS .....</b>	<b>11</b>
2.1 ANIMAUX .....	11
2.2 PROJET PILOTE.....	12
2.2.1 Contrôle micro-IRM.....	12
2.2.2 Choix du traitement HIFU .....	13
2.3 LES NANOPARTICULES.....	14
2.4 HIGH INTENSITY FOCUSED ULTRASOUND .....	16
2.5 GUIDAGE IRM DU TRAITEMENT PAR HIFU .....	18
2.5.1 Imagerie proton .....	19
2.5.2 Thermométrie .....	21
2.6 IRM <sup>19</sup> F .....	22
2.7 IMAGERIE FLUORESCENCE.....	24
<b>RESULTATS.....</b>	<b>25</b>
3.1 SÉRIE PILOTE .....	26
3.1.1 Volume tumoral.....	26
3.1.2 Voie d'administration .....	27
3.1.3 Choix du traitement HIFU .....	28
3.2 PHASE EXPÉRIMENTALE.....	31
3.2.1 Groupe témoin.....	32
3.2.2 Groupe traitement.....	34
3.2.3 Groupe témoin VS Groupe traitement.....	37
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>38</b>
4.1 TAILLE DES TUMEURS .....	38
4.2 GROUPE TÉMOIN ET TRAITEMENT .....	38
4.2.1 Une heure post-injection.....	38
4.2.2 24 heures post-injection.....	41
4.2.3 72 heures post-injection.....	42
4.3 LE TRM DANS LA RECHERCHE PRÉ-CLINIQUE.....	42
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>47</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>50</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	<b>53</b>

## Abstract

### **Objectif :**

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet de recherche européen Sonotherag. Il a pour objectif le développement d'une nanotechnologie théranostique en oncologie. L'objectif de ce travail est d'analyser la capacité de concentration de nanoparticule de perfluorocarbone (PFOB) dans une tumeur sous l'effet d'application ciblée d'ultrasons émis à haute intensité et focalisés (HIFU). L'objectif de cette étude pilote est de développer les outils d'imagerie et de mettre en place un protocole expérimental pour évaluer l'efficacité du traitement HIFU à augmenter la captation par la tumeur de ces nanoparticules.

### **Matériel et méthode :**

10 souris immuno-déficiente BALB/cAnNRj-Foxn1 femelles porteuses d'une tumeur mammaire orthotopique 4T1 sont séparées en un groupe contrôle et un groupe traitement. A un stade de développement tumoral évalué par IRM proton, 300 µl de nanogouttes contenant du PFOB et un marqueur fluorescent sont injectés en IV aux deux groupes (J0). Le traitement HIFU est délivré après l'injection et guidé par IRM proton. Une séquence de thermométrie IRM contrôle en temps réel l'échauffement local induit. La concentration est analysée à l'aide de séquence IRM <sup>19</sup>F à J1 et J3 et d'imagerie de fluorescence le jour de l'injection, J1 et J3. Le rehaussement de la concentration est observé entre J0 et J1 (24h).

### **Résultat :**

L'IRM <sup>19</sup>F illustre qualitativement (du fait d'une sensibilité limitée) la présence de PFOB dans la tumeur à J1. L'imagerie de fluorescence permet la quantification de la concentration et donc la comparaison entre les différents groupes. D'après nos résultats préliminaires, un protocole HIFU mécanique permet d'augmenter la concentration de nanogouttes perfluorées dans la tumeur.

### **Conclusion :**

L'application d'insonications pulsées HIFU sous guidage IRM a permis le rehaussement de la concentration tumorale de nanoparticules perfluorées dans un modèle de tumeur mammaire chez la souris. Ces résultats préliminaires permettent d'envisager la deuxième phase de développement, avec traitement anti tumoral sono-activable.

Mot-clé : Oncologie, Theranostique, HIFU, IRM, MrgHIFU, nanomédecine, PFOB, IVIS, TRM.

## Liste d'abréviation

1. ATP : adénosine-triphosphate
2. AUC: area under the curve
3. BP: bande passante
4. CCD : charge-coupled device
5. CMU: centre medical universitaire
6. EPR : enhanced permeability and retention
7. FOV : field of view
8. FS : fat sat
9. FSE : fast spin echo
10. GE : gradient d'écho
11. Hz: hertz
12. HIFU : high intensity focused ultrasound
13. HUG : hôpitaux universitaires de Genève
14. IRM : imagerie par résonance magnétique
15. IVC : individually ventilated cage
16. IVIS : in vivo imaging system
17. KHz : kilo hertz
18. NaCl : chlorure de sodium
19. Nm : nanomètre
20.  $\mu$  : micro
21. m : mètre
22. Mhz : méga hertz
23. mm : millimètre
24. mT :
25. NEX : nombre d'excitation
26. PBPK : physiologically based pharmacokinetic
27. PFC : perfluorocarbure
28. PFOB : perfluorooctylbromide
29. ROI : region of interest
30. ST : slice thickness
31. TE : temps d'écho
32. TR : temps de répétition
33. TRM : technicien en radiologie médicale
34. W : watt

## Contexte

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet européen SONOTHERAG financé par la plateforme multilatérale Euronanomed II. Le projet est une collaboration entre 4 équipes universitaires et une entreprise du domaine de l'échographie : une équipe suisse coordonnée par le professeur Salomir à l'Université de Genève avec laquelle je collabore, une équipe à l'université d'Avignon, une équipe à l'université Paris Sorbonne et une à l'université d'Oslo. C'est une étude qui a pour objet le développement de nanogouttes de perfluorocarbone capables de transporter un agent thérapeutique sonoactivable sous guidage IRM  $^{19}\text{F}$ . L'objectif est de pouvoir induire une cytotoxicité sous double contrôle échographique et IRM  $^{19}\text{F}$  et ainsi de diagnostiquer et traiter une tumeur. Dans le cadre de mon travail de master, nous avons analysé et évalué la biodistribution de ces nanoparticules dans la zone tumorale avec et sans insonications HIFU pulsées.

Pour ce travail, j'ai suivi la formation à l'expérimentation animale du module 1 du Réseau des animaleries lémaniques. Elle m'a permis d'avoir une plus grande autonomie au sein du projet concernant toutes les manipulations aux différents stades du protocole expérimental. Grâce à ma collaboration avec les différents physiciens, biologistes et techniciens vétérinaires de l'Institut d'Imagerie Moléculaire Translationnelle (ITMI), j'ai acquis et mis en œuvre de nouvelles connaissances et compétences dans le cadre de la recherche préclinique et plus particulièrement de l'imagerie multimodale préclinique.

Grâce à l'encadrement et l'accompagnement de l'équipe, j'ai pu par mon expertise en radiologie être impliquée dans toutes les étapes du projet. Cette opportunité m'a permis de m'épanouir dans le domaine de la recherche préclinique, un domaine peu fréquenté des techniciens en radiologie en Suisse. Cette expérience m'a permis de réaliser et d'entrevoir les difficultés existantes dans le cadre du management et de la coordination de projet. Cela m'a également permis de valoriser certaines de mes compétences en tant que technicienne en radiologie médicale dans le cadre d'un projet de recherche. Cela ouvre la discussion à de nouvelles perspectives professionnelles futures pour le TRM expert dans ce domaine.

# Introduction

## 1.1 Traitement oncologique et nanoparticule

Actuellement, le cancer est responsable en Suisse de 30% des décès chez l'homme et 23% chez la femme. On note également que l'incidence augmente au fil des années avec le vieillissement de la population (OFSP, 2018).

Un grand nombre de facteurs de risques principalement environnementaux mais également génétiques sont également responsables de l'augmentation du risque. Bien heureusement, les techniques et technologies innovantes pour le traitement du cancer sont également en perpétuel développement. Les traitements classiques tels que la chirurgie, la chimiothérapie ou encore la radiothérapie présentent parfois des limites face à la maladie. Toutes les tumeurs n'ont pas la même sensibilité aux chimiothérapies, elles ne sont pas toujours accessibles en chirurgies ou dépassent la dose acceptable pour les organes à risque environnants dans le cadre de la radiothérapie. C'est pourquoi de nouvelles technologies plus ciblées se développent. La médecine de demain s'oriente vers une médecine personnalisée, avec une approche de la maladie et des traitements moins génériques que les traitements classiques cités précédemment (Wicky, 2018).

Il existe un terrain d'expérimentation préclinique issu du champ « théranostique » développant un certain nombre de nanotechnologie capable à la fois de diagnostiquer une lésion et de la soigner (INSERM, s.d.). Les nano-biotechnologies sont issues d'un croisement entre l'ingénierie et la biologie moléculaire, c'est l'application biomédicale d'une nanotechnologie (Fortina, Kricka, Surrey, & Grodzinski, 2005; Yezhelyev et al., 2006). L'ingénierie a développé ces dernières décennies des nanotechnologies plus petites allant jusqu'à 20 nm et permettant l'application de nano-matériel interagissant à un niveau moléculaire au sein d'un système biologique (Yezhelyev et al., 2006). Elle présente des avantages importants. Elle est principalement peu invasive. Grâce à sa sensibilité et spécificité élevée, elle permet l'amélioration et le contrôle de la cytotoxicité du traitement délivré (Fortina et al., 2005). Plusieurs études ont démontré l'efficacité de certaines nanotechnologies à un stade préclinique. Cependant, son application à la clinique est actuellement encore très limitée (Wilhelm, et al., 2016).

Ces nanoparticules s'accumulent dans une certaine mesure, au sein de la lésion tumorale par l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). Cet effet se décrit par divers facteurs biologiques dont deux prédominants. Le premier est le développement anarchique du tissu tumoral et principalement de ses vaisseaux issus de l'angiogenèse. Ces derniers sont constitués d'une couche de cellules endothéliales plus fines et irrégulières ainsi que d'une membrane basale dégradée et de péricytes détachés, cela permettant aux nanoparticules

d'infiltrer plus facilement le tissu tumoral. Les espaces de la membrane sont en moyenne situés entre 100 et 500 nm. C'est pourquoi la taille de nos nanoparticules utilisées ne semble pas influencer les concentrations observées dans notre travail. Le second facteur favorisant ce phénomène est le faible drainage lymphatique existant dans le tissu tumoral qui crée une pression favorisant la concentration des nanoparticules au sein de la lésion (Wilhelm, et al., 2016). Néanmoins, l'effet EPR ne permet pas une concentration suffisamment importante pour un traitement efficace. D'après la revue « Analysis of nanoparticle delivery to tumours », seul 0.7% (médiane) des nanoparticules injectées se retrouvent dans la tumeur. Ceci n'est donc pas satisfaisant pour le transfert vers la clinique car cela nécessiterait une quantité importante de nanoparticules à injecter et de ce fait une toxicité aiguë, un coût élevé et une demande importante à la fabrication (Wilhelm, et al., 2016).

## 1.2 Traitement HIFU

D'autres techniques de traitement théranostique ont été développées pour tenter d'améliorer la concentration des nanoparticules au sein de lésion tumorale. L'addition de microparticule permettrait avec l'application HIFU pulsée une augmentation de la perméabilité des vaisseaux tumoraux (Han, Lee, Kim, & Kim, 2017). L'HIFU est un moyen de traitement non-invasif utilisé actuellement pour certains cancers à une puissance élevée et pour un traitement de type thermique. Il a été validé par la States Food and Drug Administration (Shin et al., 2017). Son application est guidée par IRM, dans le but de visualiser la tumeur mais également pour contrôler l'échauffement local à l'aide de séquence de thermométrie (Hynynen, 2010, p.). Il existe deux catégories d'effets dépendants des paramètres d'application : l'effet thermique et non-thermique.

L'effet thermique est directement proportionnel à l'intensité et la fréquence des ondes échographiques ainsi que du coefficient d'absorption du matériel d'insonication (Wu & Du, 1990). Il permet une augmentation de la température des tissus visés lorsque ceux-ci sont dans l'incapacité d'évacuer cet apport d'énergie par convection ou conduction (Nyborg & Miller, 1983).

L'effet non-thermique est responsable d'altérations biologiques des tissus au niveau moléculaire et cellulaire telles que l'augmentation de la pression osmotique (Barnett, 1998). Le mécanisme de cavitation est le principal responsable des modifications biologiques du tissu lors d'une insonication non-thermique (Hancock et al., 2009). Il est responsable du processus de sonoporation qui amène à la formation de bulle de vapeur par un passage de l'état liquide à gazeux causé par une diminution de la pression locale. Ce phénomène est dépendant de divers facteurs tels que le diamètre ou encore la puissance et de l'onde acoustique émise (Lorton, Hyacinthe, et al., 2018).

Nous recherchons à travers ce phénomène une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins tumoraux grâce à des espaces créés entre les cellules endothéliales stimulées par les ondes ultrasonores (Hancock et al., 2009). On optimise de cette manière la concentration de l'émulsion de nanoparticules injectée. On a pu observer cet effet dans le cas d'injection de nanoparticules perfluorées concentrées dans un muscle murin avec application d'HIFU pulsé (O'Neill et al., 2009). Un autre article a réalisé une étude histologique sur l'impact d'insonications HIFU pulsés sur le muscle du mollet de souris. Ils ont pu observer que l'insonication a causé une augmentation de l'espace entre les faisceaux des fibres musculaires (Hancock et al., 2009).

Dans le cadre de ce projet, nous avons confronté un groupe témoin avec un groupe traitement pour tenter d'évaluer l'efficacité du traitement HIFU pulsé. Notre hypothèse est que l'application HIFU pulsé permette une augmentation de la concentration des nanoparticules dans la tumeur plus importante que dans le groupe témoin. Nous analysons cet effet d'après le signal émis par le marqueur de fluorescence contenu dans les nanoparticules et mesuré en imagerie de fluorescence

### 1.3 IRM fluor et imagerie de fluorescence

Pour évaluer le niveau d'efficacité de la technique, nous employons deux types d'imageries. Pour confirmer la présence de PFOB et sa co-localisation avec la tumeur, nous utilisons l'IRM  $^{19}\text{F}$ . L'IRM est principalement employée en clinique pour l'imagerie des protons de l'eau (noyau le plus présent dans le corps humain). Néanmoins, pour l'étude d'agents contrastes tels que le PFOB, l'IRM  $^{19}\text{F}$  présente de nombreux avantages.

Le fluor est présent naturellement dans le corps, et plus précisément dans les os et les dents. Mais leur mobilité restreinte induit un temps de relaxation transversale (spin-spin) très faible et donc difficilement détectable en IRM. Le faible signal background offre un ratio signal/bruit important et présente ainsi un réel avantage à l'étude d'agent de contraste fluoré (Ruiz-Cabello, Barnett, Bottomley, & Bulte, 2011). Le fluor présente un rapport gyromagnétique quasiment aussi élevé que celui de l'hydrogène (40.05 MHz/T) ce qui offre une sensibilité élevée (Mirau & Bovey, 1988).

Les nanoparticules doublement marquées au fluor et au Dir ( $\text{C}_{63}\text{H}_{101}\text{IN}_2$ ) que nous décrirons plus tard, nous permettent la réalisation d'un suivi et d'un moyen de quantification de la concentration des nanoparticules à l'aide de l'imagerie de fluorescence réalisée avec l'IVIS (Spectrum In Vivo Imaging System). L'imagerie optique est particulièrement adaptée aux animaux de petite taille. C'est une technique d'imagerie rapide et non-invasive pour l'animal. Il existe deux types de rapporteurs en imagerie optique, le rapporteur bioluminescent et le

fluorescent. Le premier inclut l'expression génétique de la protéine luciférase (Troy, Jekic-McMullen, Sambucetti, & Rice, 2004). Dans ce cas, la lumière est le produit d'une réaction chimique qui comprend 4 acteurs : la luciférase, la luciférine, l'oxygène et l'ATP (Troy et al., 2004). Cela implique l'addition de luciférine pour produire la réaction de fluorescence mais sans aucune excitation lumineuse nécessaire. A l'inverse, le rapporteur fluorescent n'a pas besoin de luciférine mais uniquement d'une excitation suffisante pour que le fluorophore atteigne un état d'énergie assez haut grâce à des longueurs d'onde adaptées (Troy et al., 2004). Tel est le cas de nos nanoparticules de PFOB contenant en leur centre du Dir capable d'émettre de la fluorescence en réponse à une excitation de 710 nm.

Nous avons utilisé l'imagerie de fluorescence pour quantifier les nanoparticules présentes sur la zone tumorale et péri-tumorale. Cette machine est composée d'une caméra CCD (charge-coupled device) qui reçoit l'énergie émise par le Dir excité au préalable (Kauskot et al., 2007). Cette caméra ultra-sensible reçoit les photons émis par l'animal après avoir traversés un filtre qui permet de régler les longueurs d'ondes d'intérêt. Comme le principe des détecteurs à scintigraphie, elle convertit le signal lumineux en signal électrique. La caméra enregistre l'origine de la source lumineuse pour former une image. Cependant, la résolution spatiale reste restreinte. Pour obtenir l'émission de ces photons, il faut au préalable avoir excité la source de fluorophore (PerkinElmer, 2016). Cette excitation provient d'un filtre d'excitation composé d'un faisceau de fibre optique qui illumine la cible depuis le haut ou le bas (PerkinElmer, 2016).

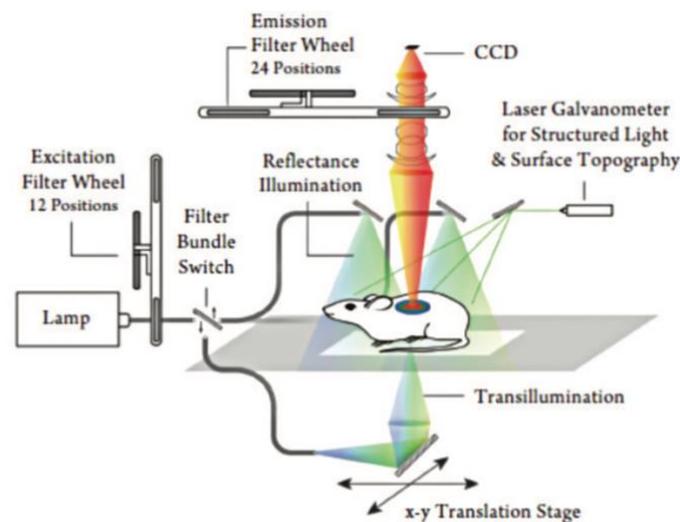


Figure 1 Tirée de PerkinElmer, 2013. Schéma du système IVIS utilisé pour l'imagerie de fluorescence

## 1.4 Le projet

L'objectif est d'analyser l'effet adjuvant du traitement HIFU pulsé sur la tumeur après injection de nanoparticule de PFOB mesurant entre 70 et 100 nm. L'analyse se fait en confrontant le groupe traité au groupe témoin qui ne recevra pas d'insonication HIFU.

Nous avons confronté un groupe traitement de 4 souris qui ont reçu le traitement HIFU et un groupe témoin de 4 souris sans HIFU. Les 8 souris sont greffées d'un carcinome mammaire murin (4T1) sur la patte arrière droite, selon un modèle tumoral bien établi et déjà employé au sein du projet SONOTHERAG à l'université d'Oslo. Pour coordonner les différentes étapes, nous avons suivi la croissance des tumeurs à l'aide d'une imagerie réalisée en micro-IRM proton. Pour le groupe traité, une fois l'émulsion de nanoparticule injectée en intraveineux, nous avons tout de suite réalisé une insonication localisée sur la tumeur. Le second groupe n'a pas reçu d'insonication. Nous avons enchainé ces manipulations avec l'acquisition d'images IRM  $^{19}\text{F}$  à 24h et 72h post-injection ainsi que des images de fluorescence à 1h, 24h et 72h post-injection. Nous avons ensuite quantifié les nanoparticules observées sur les images de fluorescence à l'aide d'un script créé sur Matlab 2011a (Natick, MA, USA). De plus, nous avons évalué qualitativement la localisation anatomique du signal fluorescent Dir et du signal IRM  $^{19}\text{F}$  PFOB. Nous avons enfin confronté les résultats observés dans les deux groupes.

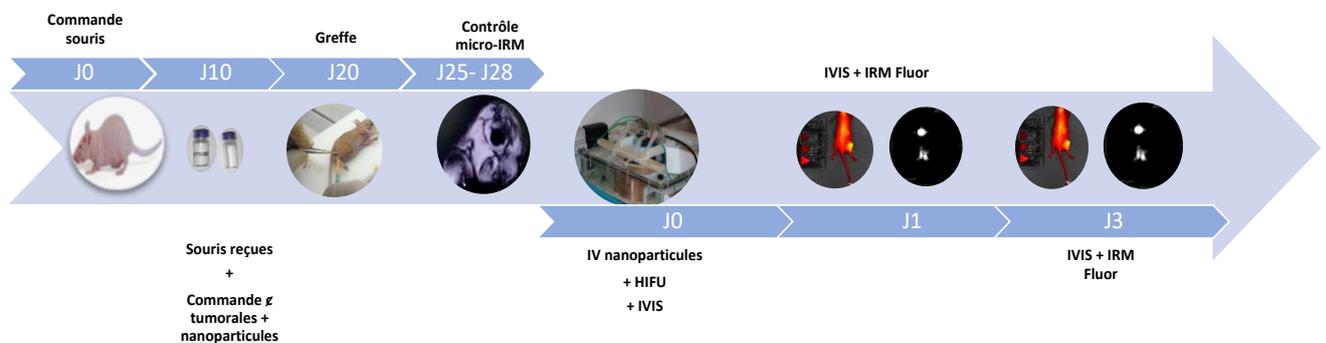


Figure 2 Timing expérience

# Méthodes et matériels

## 2.1 Animaux

Pour cette étude, une demande d'autorisation pour des expériences sur animaux a été établie selon l'article 18 de la loi fédérale sur la protection des animaux (LPA), l'article 141 de l'ordonnance sur la protection des animaux (OPAn) et l'article 30 de l'ordonnance sur l'expérimentation animale (confère Annexe 1). Notre numéro de projet est le GE/140/17. Ce document contient toutes les informations concernant le projet mis en place : titre du projet, les adresses, les personnes impliquées, le domaine et la durée du projet, ainsi que le degré de gravité prospectif maximal. Il décrit les différents objectifs du projet avec toutes ses étapes. Il indique les précautions prises pour le bien-être de l'animal dans le cadre des diverses manipulations avec une justification du nombre d'animaux utilisés.

Pour ce projet, nous avons utilisé 14 souris issues de l'élevage d'animal d'expérience reconnu JANVIER. Ce sont des souris immunodéficientes BALB/cAnNRj-Foxn1. Ces souris sans poils permettent de faciliter la préparation au traitement HIFU mais également lors de l'imagerie de fluorescence. Cela évite de devoir raser la zone traitée qui par la suite peut être fragilisée par le développement de la tumeur.

Ces souris sont surveillées selon les règles régissant les animaleries de l'Université de Genève. Elles sont entreposées à l'animalerie du Centre médical universitaire (CMU) dans des cages IVC (individually ventilated cage), ce qui permet de les protéger des contaminations externes grâce à la filtration d'air. Ces cages sont enrichies de matériel de nidification et maisonnette en carton. La température de leur environnement est maintenue à environ 22° et l'humidité relative est d'environ 60%. Elles suivent un régime sans particularité. Lors de leur arrivée à l'animalerie, elles bénéficient d'une période d'acclimatation de 7 à 10 jours pour qu'elles puissent s'habituer à leur nouvel environnement quelques jours avant de commencer les manipulations. En plus de la surveillance des gardiens de l'animalerie, j'ai réalisé une surveillance de leur état grâce à une fiche de suivi (score sheet) complétée avant chaque manipulation et présentée en annexe dans ce travail.

Toutes les souris sont greffées de la même manière. Nous greffons 250'000 cellules tumorales de type carcinomes mammaires murins (4T1-luc-GFP) transfectées avec un gène rapporteur, la luciférase. Après anesthésie et désinfection locale, les cellules sont injectées en sous-cutané dans la cuisse droite de la souris à l'aide d'une aiguille 24G pour un volume de 100 µl. Pour toutes les manipulations, les souris bénéficient de la même méthode d'anesthésie. L'anesthésie est induite par isoflurane à 4% et maintenue à 2.5% durant les diverses expériences (imagerie et traitement HIFU). Chaque souris est identifiée à l'aide d'un marquage à l'oreille.

## 2.2 Projet Pilote

### 2.2.1 Contrôle micro-IRM

Pour assurer un effet suffisant, nous avons respecté un critère de taille minimal de la lésion tumorale pour réaliser le traitement. Une lésion trop petite n'aurait pas permis d'observer un effet suffisamment important. Une lésion trop développée peut présenter des zones de nécrose qui constituent une barrière à l'effet de concentration recherché et présente une limite pour le bien-être animal. Selon l'Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires (OSAV), la restriction de taille de la tumeur greffée en sous-cutané se base sur l'état général de la souris selon son volume et sa localisation (OSAV, 2018). On estime que la taille adaptée au traitement est observée à J10 post-greffe pour une taille maximale de 1 cm au diamètre le plus grand (un volume de 0,5cc au maximum).

Pour évaluer la croissance de la greffe, nous avons mesuré le volume des tumeurs à l'aide d'une micro-IRM 3 Tesla de la marque Mediso© avec un diamètre de 160 mm et une puissance de gradient de 450 mT/m (« PET/MRI 3T », 2016).

Nous avons testé et optimisé différentes séquences et choisi celle qui présentait le contraste le plus fort entre le tissu tumoral et sain pour distinguer la lésion et pouvoir la mesurer.

Voici les différentes séquences testées :

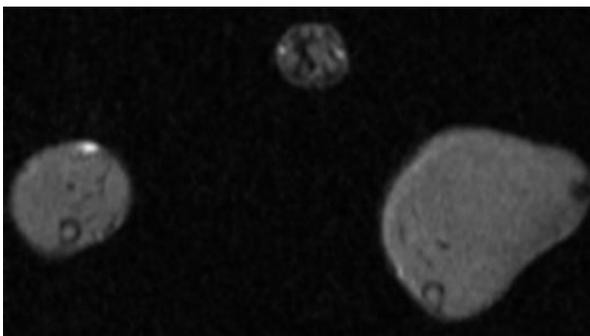


Figure 3 Gradient d'écho T1

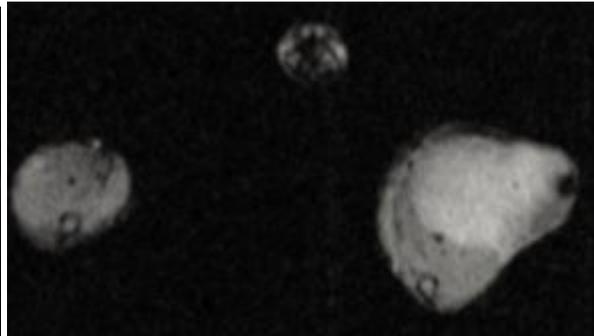


Figure 4 Gradient d'écho T2\*

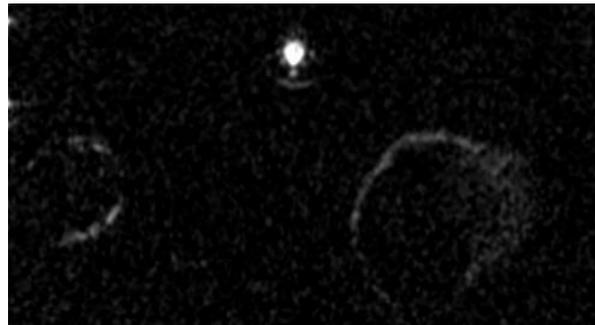
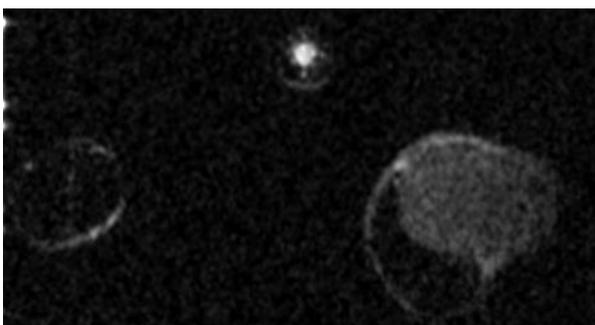


Figure 5 Fast Spin Echo T2

Figure 6 Fast Spin Echo T2 Fat Sat

	TR	TE	NEX	Matrice	ST	FOV	Echo train	Flip Angle
GE T1	342	4.81	12	268 x 200	0,7	40 x 30	1	70
GE T2*	700	10	8	266 x 200	0,7	40 x 30	1	20
FSE T2	4133	124.48	12	266 x 200	0,7	40 x 30	16	90
FSE T2 FS	4451	124.48	12	266 x 200	0,7	40 x 30	16	90

Tableau 1 Paramètre des 4 séquences proton présentées

La séquence GE T2\* présente un contraste plus important que les trois autres entre le tissu tumoral et sain. C'est pourquoi le suivi de la taille de la tumeur s'est basé sur cette séquence qui présente une meilleure résolution spatiale et en contraste que les images protons réalisées sur l'IRM clinique PRISMA.

Pour le calcul du volume, une segmentation manuelle de la tumeur a été réalisée à l'aide du logiciel d'imagerie médicale Osirix®. Pour obtenir le volume, un ROI manuel a été défini sur les coupes comprenant la tumeur. Le programme a ainsi calculé le volume sur la base de cette segmentation.



Figure 8 ROI défini sur la séquence GRE T2\* Axial

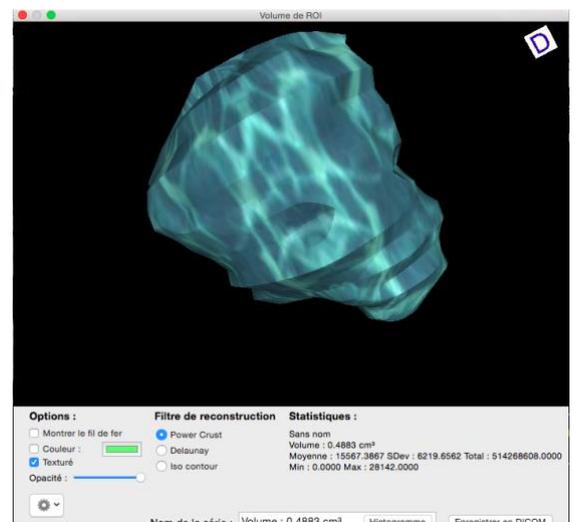


Figure 7 Rendu volumique de la tumeur segmentée

### 2.2.2 Choix du traitement HIFU

Nous avons testé 3 applications HIFU différentes afin d'assurer le traitement HIFU le plus efficace possible. Faute de temps, nous avons testé les traitements sur quatre souris uniquement.

Initialement, un protocole HIFU avait été mis au point par l'équipe d'Oslo (avec un transducteur HIFU très différent) pour permettre une augmentation de la concentration des nanoparticules au sein de la tumeur. Les paramètres employés étaient les suivants : 2 cercles composés de 24 points avec une fréquence de 1031kHz et une puissance acoustique de 25%. L'application était de 1 ms (on) suivi d'une pause de 399 ms pour 40 exécutions.

Nous avons également évalué l'efficacité de l'application d'HIFU thermique avec les paramètres suivants : 1 cercle de 2 mm composé de 24 points avec une puissance de 25%. L'application était de 1 ms suivie d'une pause de 25ms répétée 600 fois. Nous avons cependant stoppé le traitement avant (~480 exécutions) car nous avons atteint les 8° pour l'effet thermique ciblé. Nous avons testé ce protocole sur deux souris.

A la suite de ces différents tests, les médecins ont optimisé l'application HIFU d'Oslo qui ne semblait pas convaincante. Pour cela, la puissance a été diminuée à 60W (20%). Le temps d'application a été doublé à 2 ms suivi d'un temps de pause de 31 ms le tout répété 600 fois. Nous présentons les résultats obtenus au chapitre Résultats.

### 2.3 Les nanoparticules

Le vecteur étudié est une nanoémulsion de bromure de perfluorooctyle (C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>Br, PFOB), un perfluorocarbure (PFC) linéaire et un marqueur lipophile et hydrophobe (Li et al., 2018). Les nanoparticules sont contenues dans des flacons sous forme lyophilisée et préparées avec de l'eau à 0.9% de NaCl et un tensioactif fluorocarboné F8TAC13 indiqué dans la description des doses envoyées. Pour reconstituer les gouttes, nous ajoutons 300µl d'eau déionisée dans chaque flacon. La taille des gouttes après reconstitution est comprise entre 70 et 100 nm. Elles doivent être conservées au frigo avant et après reconstitution.

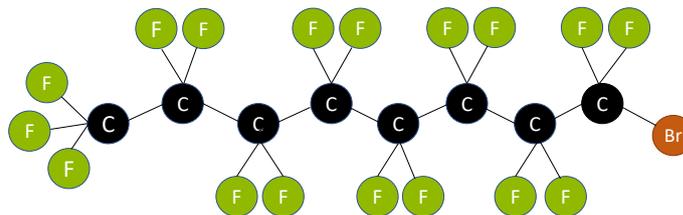


Figure 9 Représentation de Cram du PFOB

Le PFOB nous permet la détection de ces nanoparticules en IRM <sup>19</sup>F. Il est encapsulé par un surfactant fluoré biodégradable et ajustable (cf Annexe 1). Il permet de contenir à la fois des sono-sensibilisateurs hydrophobes et de l'oxygène exogène permettant le traitement de la tumeur par thérapie sonodynamique activée par HIFU (cf Annexe 1). Les nanoparticules étudiées sont biocompatibles et ont un diamètre mesurant entre 70 et 100 nanomètres, ce qui

permet leur injection et leur distribution par voie veineuse chez la souris.

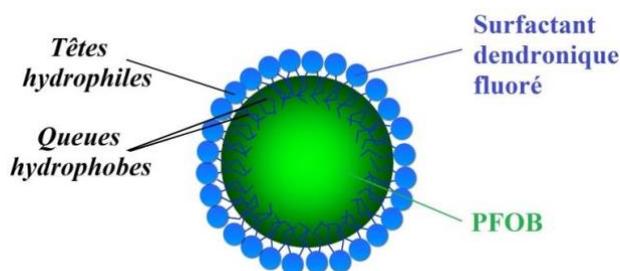


Figure 10 Tiré de : (Doussot, 2016). Schéma d'une particule de nanoémulsion de PFOB

En plus du PFOB, les nanoparticules contiennent un autre marqueur: le Xenolight DiR (DiIC18(7) ou 1,1'-dioctadecyltetramethyl indotricarbocyanine Iodide) (Caliper, 2009). Cette molécule  $C_{63}H_{101}IN_2$  présente une longueur d'onde d'absorption de 748 nanomètres et d'émission à 780 nanomètres, ce qui permet sa détection en imagerie de fluorescence (IVIS) (Caliper, 2009).

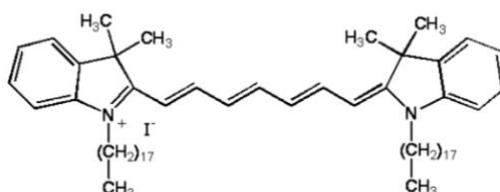


Figure 11 Tiré de : Caliper, 2009. Représentation de Cram du Dir

Pour le travail, nous avons à disposition des préparations lyophilisées de 300  $\mu$ litres d'émulsion stérile de ces nanoparticules contenues dans des tubes. L'émulsion est reconstituée dans 2% de sérum physiologique (NaCl). Cette émulsion reconstituée est introduite dans l'animal grâce à une injection intraveineuse à l'aide d'une aiguille 100U. Les nanoparticules se distribuent dans l'organisme à travers la voie veineuse et s'accumulent au niveau de la tumeur grâce à l'effet EPR décrit au-paravent.

La concentration de Dir contenue dans les doses que nous avons eu à disposition sont les suivantes :

	DT21B	DT22	DT44	DT45	DT62A	DT62B	DT62C
[c] $\mu$ g/ml	56 $\pm$ 3	64 $\pm$ 1	29 $\pm$ 1	25 $\pm$ 1	5.6 $\pm$ 0.1	4.8 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.2
[c] $\mu$ M	55 $\pm$ 3	63 $\pm$ 1	28 $\pm$ 1	25 $\pm$ 1	5.5 $\pm$ 0.1	4.7 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.2

Tableau 2 Concentration de Dir contenu dans les différents échantillons de nanoparticules envoyés

Pour corriger cette variabilité, nous avons réalisé une calibration avec une solution issue du même batch de nanogouttes que celle injectée à la souris. Une calibration a été réalisée à l'aide d'une dose de nanoparticules reconstituées avec 300  $\mu$ l. Le 3<sup>ème</sup> compartiment est composé de 12 gouttes déposées avec une aiguille de

	NaCl	PFOB
1 <sup>er</sup> compartiment	12	0
2 <sup>ème</sup> compartiment	10	2
3 <sup>ème</sup> compartiment	8	4
4 <sup>ème</sup> compartiment	6	6

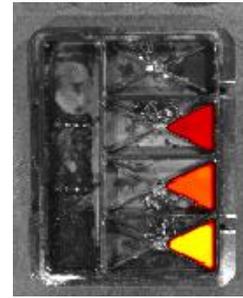


Figure 12 Différentes concentrations des calibrations et image de fluorescence d'une calibration

## 2.4 High intensity focused ultrasound

Nous avons utilisé le traitement HIFU pulsé dans le but d'augmenter l'accumulation des nanoparticules au sein de la tumeur grâce à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux et capillaires tumoraux.



Figure 13 Système HIFU-IRM-compatible avec le transducteur à gauche équipé de l'antenne et du système de monitoring et anesthésie de la souris. A droite le générateur.

L'HIFU est un appareil IRM-compatible composé d'un transducteur ultrasonore matriciel qui permet l'émission et la concentration de faisceaux ultrasonores (Auboiroux, 2006). Ce

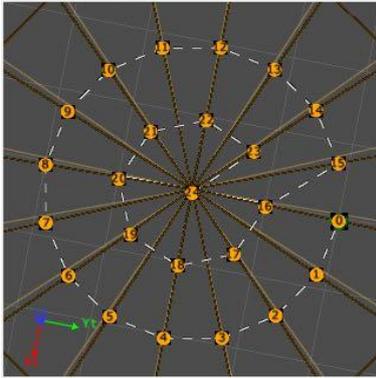


Figure 14 Schéma du tir HIFU

transducteur est composé de 256 canaux capables d'émettre de manière indépendante à une fréquence allant de 974 à 1049 kHz (Lorton, Guillemin, et al., 2018, p.). Ces vibrations mécaniques sont émises par une source de vibration dépassant les 20'000 Hz (Auboiroux, 2006). Le diamètre d'ouverture du transducteur est de 140 mm pour une couverture de faisceau de 130 mm (Lorton, Guillemin, et al., 2018). Ce principe permet d'obtenir une augmentation en pic de la pression sur un point focal défini. Le transducteur génère

un champ acoustique qui peut être décrit par plusieurs paramètres tels que la vitesse locale des particules, la pression ou encore l'intensité acoustique (Auboiroux, 2006). Le but de son utilisation ici n'est pas de brûler la tumeur, mais d'induire un effet mécanique en échauffant la zone tumorale de 4° à 6° maximum pour induire une augmentation de la perméabilité des tissus. Pour ce traitement, nous émettons l'hypothèse qu'il induise une augmentation de la perméabilité des tissus par effet de cavitation et que cela augmente la concentration des nanoparticules de PFOB dans la tumeur.

Les tirs employés pour l'application d'insonications pulsées sont composés de 24 points répartis sur 2 cercles (le plus grand mesurant 4 mm de diamètre) et un point central. La fréquence est de 1,031 MHz et une puissance de 60W (20%). La durée de tir par point est de 2 ms suivi de 31 ms de pause entre deux points le tout répété 600 fois, ce qui équivaut à environ 8 minutes de tirs.

Un circuit d'eau chaude est mis en place à l'aide d'un long tuyau disposé en cercle autour de l'antenne pour maintenir la souris dans un environnement suffisamment chaud. Pour maintenir cette chaleur nous disposons un drap au-dessus du système. La souris est positionnée pour le traitement en décubitus latéral droit pour permettre à la tumeur d'être placée entre les bobines de l'antenne dans le but de laisser passer le faisceau HIFU. On recouvre la cuisse de gel échographique (sans bulles) pour optimiser l'adaptation d'impédance acoustique et permettre une propagation efficace du faisceau d'ultrasons jusqu'à l'organe cible.

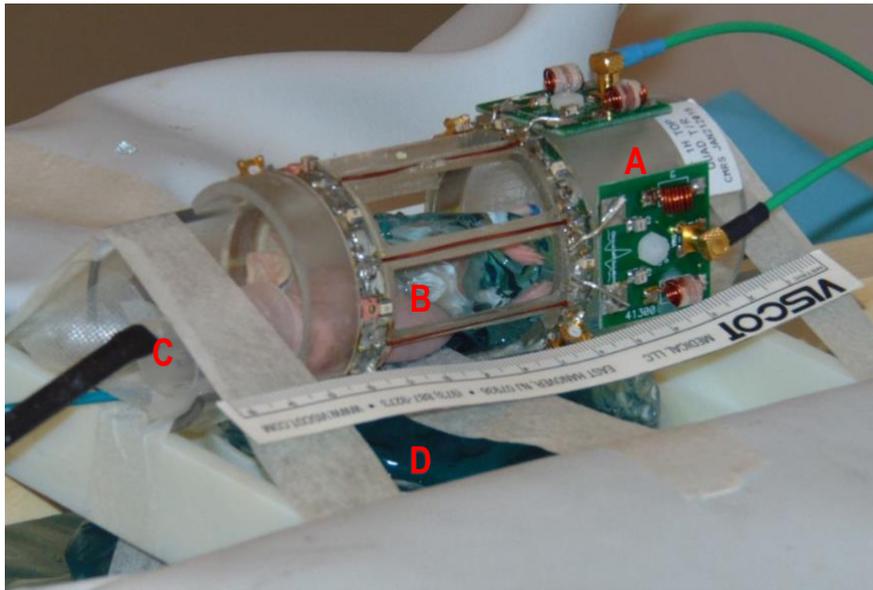


Figure 15 Souris en position de traitement avec la fixation de l'antenne proton sur une base qui repose sur l'HIFU.  
 A : antenne proton. B : Souris positionnée en décubitus latéral droit. C : système d'anesthésie. D : HIFU.

La souris est monitorée pour la respiration et maintenue sous anesthésie durant toute la durée du traitement.

## 2.5 Guidage IRM du traitement par HIFU

Nous réalisons l'expérience sur une IRM clinique 3 tesla (Prisma Fit) ayant un diamètre de 60 cm. Elle est équipée de gradients de 80mT/m (Lorton, Hyacinthe, et al., 2018). L'antenne que nous utilisons est conçue pour l'imagerie du petit animal avec un diamètre de 4.4 cm. C'est une antenne en quadrature de phase qui nous permet de réaliser nos images proton et fluor grâce à la partie de l'antenne interchangeable (proton/fluor). Le design de l'antenne avec ses différentes ouvertures entre les boucles conductrices permet le traitement HIFU de la souris sous contrôle IRM. Par mesure de précaution, les conducteurs de l'antenne sont protégés des faisceaux HIFU par une mousse isolatrice.



Figure 16 Tiré de : Doussot, 2016. Antenne proton et fluor avec l'interface permettant l'acquisition d'image fluor et proton

## 2.5.1 Imagerie proton

### **T1\_vibe\_FOV240**

Avant de réaliser le tir HIFU, on s'assure du bon positionnement de la souris en fonction de l'antenne, de la focale et de l'orientation de la tumeur. Pour cela, nous réalisons une séquence proton en pondération T1 rapide avec une faible résolution spatiale et un Field of View (FOV) suffisamment grand pour visualiser la grille du transducteur et ainsi mesurer la focale et réaliser les modifications nécessaires. Cela permet aussi de corriger le positionnement de la souris par rapport à l'antenne. Une résolution spatiale plus importante est nécessaire pour mieux visualiser la tumeur et s'assurer du bon positionnement avant le tir.

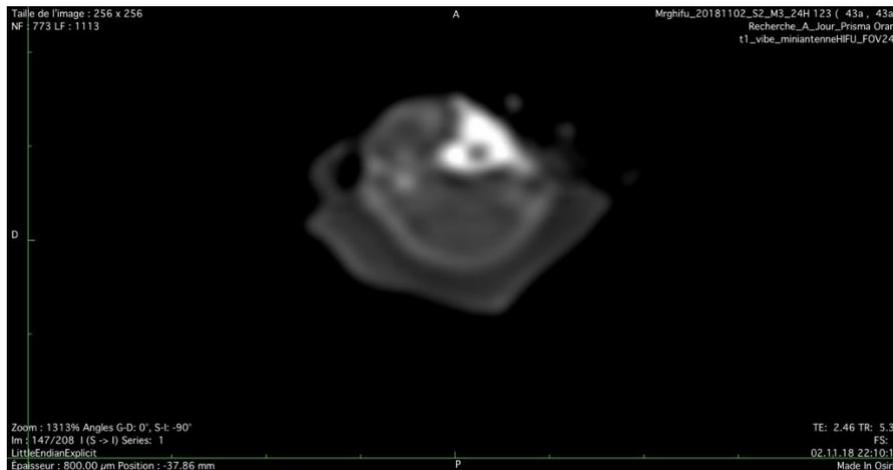


Figure Séquence T1 vibe 2D FOV 240 - souris 3 série 2

	TR	TE	NEX	Matrice	ST	FOV	Echo train	Flip Angle	BP
T1 vibe	5.36	2.46	1	256 x 256	0,8	240 x 240	1	70	390

Tableau 3 Paramètre de la séquence T1 vibe avec un grand FOV permettant la visualisation de la grille HIFU

### **T1\_vibe**

Une fois les modifications appliquées, nous réalisons une seconde image T1 mais cette fois-ci avec une meilleure résolution spatiale pour assurer la bonne localisation de la tumeur et son positionnement optimal. Les bobines de l'antenne constituant un obstacle au faisceau, il est important de s'assurer que la tumeur soit en face du faisceau et exactement entre les deux bobines.

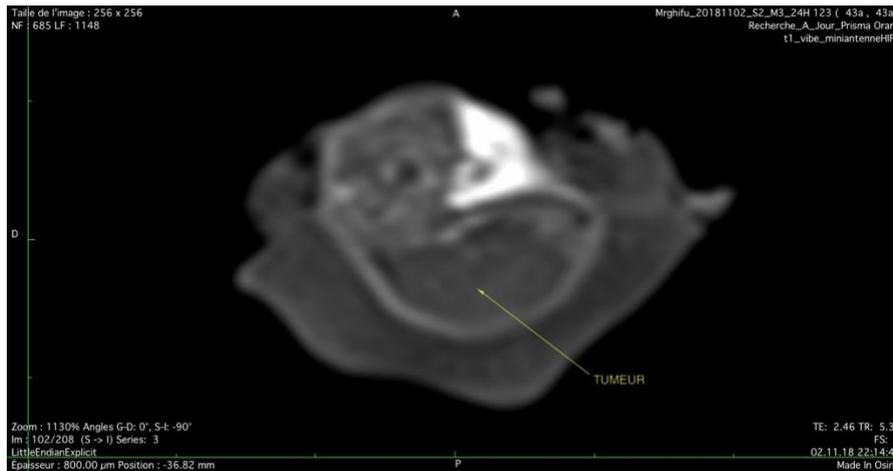


Figure 17 Séquence T1 vibe 2D ; plan axial de la souris 3 série 2

	TR	TE	NEX	Matrice	ST	FOV	Echo train	Flip Angle	BP
GE T1	5.36	2.46	2	256 x 256	0,8	140 x 140	1	70	390

Tableau 4 Paramètre de la séquence gradient d'écho T1

### ***T2\_TSE\_cor***

La dernière image réalisée en proton est une T2 turbo spin echo dans le plan coronal. Elle permet un dernier contrôle de l'installation et du positionnement. Elle sert également d'image de repérage pour le contrôle de l'échauffement lors de la séquence de thermométrie.



Figure 18 T2\_TSE\_cor \_2D, plan coronal S2 M3 souris 3 série 2

	TR	TE	NEX	Matrice	ST	FOV	Echo train	Flip Angle	BP
TSE T2	4590	73	2	208 x 256	0,8	104 x 128	19	150	170

Tableau 5 Paramètre de la séquence turbo spin écho T2

## 2.5.2 Thermométrie

Avant le tir HIFU pulsé, un contrôle du point d'échauffement au sein de la tumeur est réalisé à l'aide de la séquence IRM de thermométrie utilisée également durant le tir de traitement. La technique employée se nomme Proton Resonance Frequency Shift (PRFS). La séquence de thermométrie est une imagerie proton 2D qui mesure l'élévation de la température locale sur la base de l'altération de la phase induite par le changement de température (Rieke & Butts Pauly, 2008). Une image est formée par une séquence echo de gradient echo-planar dans deux plans (coronal et sagittal souvent) pour permettre un repérage anatomique et contrôle sur deux axes de l'échauffement.

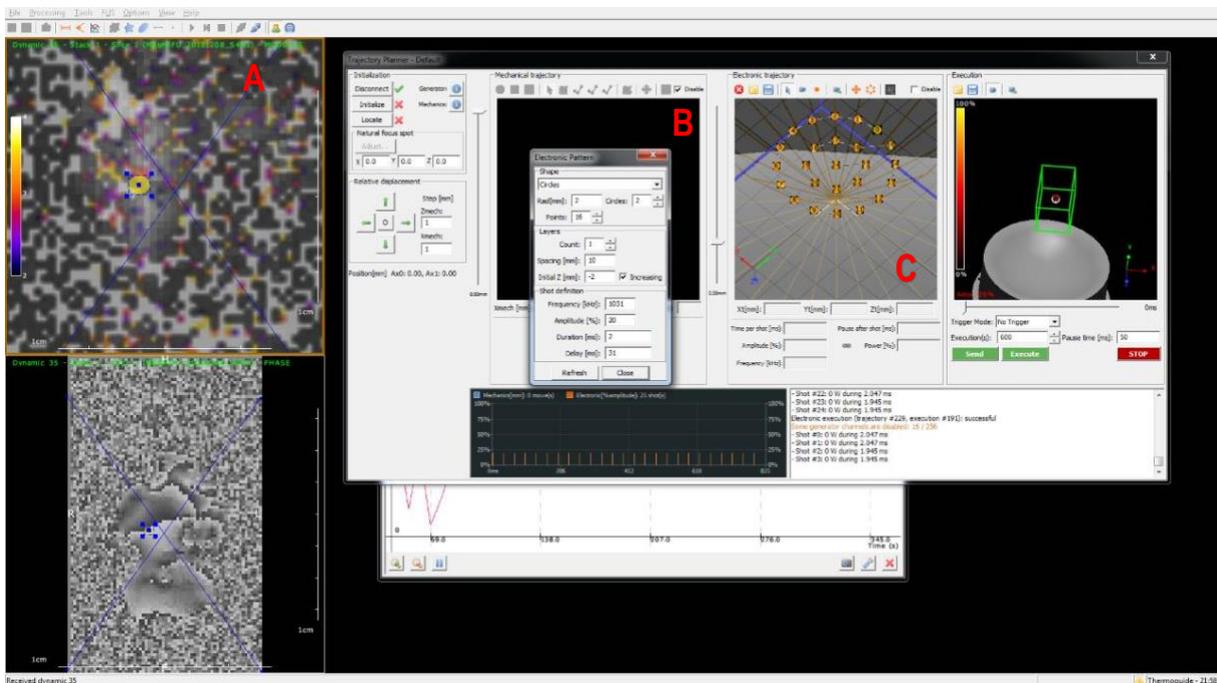


Figure 19 Interface du logiciel utilisé pour le contrôle du tir. A) Image de phase transmise de la console IRM à l'ordinateur satellite qui contrôle le tir. Un ROI est dessiné en jaune sur l'image de phase pour le contrôle local de l'élévation de la température. B) Paramètre du tir C) Modélisation 3D du tir.

Elle est accompagnée par un monitoring de la température représenté par une courbe définie par le signal mesuré et localisé sur la base d'un ROI sur l'image de phase. Cette séquence nécessite une acquisition rapide et dégrade la résolution spatiale des images obtenues.

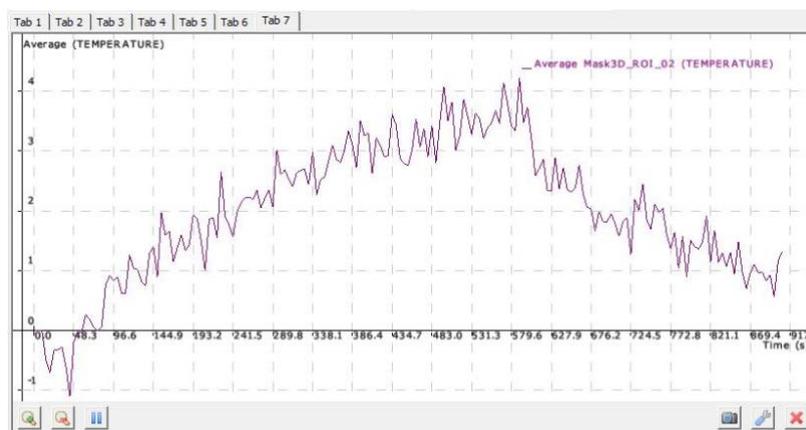


Figure 20 Courbe représentant l'augmentation de la température jusqu'à environ 10 minutes pour une température maximale supérieur à 4°

Cette faible résolution constitue une limite pour la localisation du point d'échauffement dans le cas du contrôle pré-traitement. Cette séquence est initialement destinée au contrôle de traitement de tumeur par ablation. Les températures utilisées pour ce type de traitement sont plus importantes. Pour l'échauffement de 1 à 2 ° pour le contrôle du point d'échauffement, la sensibilité de la séquence et le rapport signal sur bruit sont limités.

	TR	TE	NEX	Matrice	ST	FOV	Echo train	Flip Angle	BP
thermométrie	100	8	1	68 x 112	4	60 x 99	1	45	645

Tableau 6 Paramètre de la séquence de thermométrie

En réponse à cette limite, il existe une séquence de thermométrie nommée ARFI (acoustic radiation force imaging). Cette séquence se base sur la mesure du déplacement des tissus in vivo, cela permettant la localisation précise du point focal induit par HIFU même pour de faible température (Auboiroux et al., 2012). Cette séquence IRM développée dans le groupe n'est plus disponible sur cette version software de l'IRM. Adapter cette séquence à cette nouvelle version dépassait largement les objectifs de ce travail de master et aurait eu un impact limité du fait d'un nouveau changement de version software de l'IRM qui a eu lieu mi-décembre 2018.

## 2.6 IRM <sup>19</sup>F

Les nanoparticules de PFOB contiennent naturellement du <sup>19</sup>F (abondance naturelle proche de 100%) (Hudlicky & Pavlath, 1995). La séquence présentée est faiblement mais suffisamment sensible pour détecter le fluor mais ne permet pas de le quantifier. Elle nous permet de confirmer la présence de PFOB et de s'assurer de sa co-localisation avec la tumeur et de ce fait avec le signal mesuré du Dir en imagerie de fluorescence.

La séquence utilisée est centrée sur le pic du C<sup>19</sup>F3 du PFOB. Cette résonance est le singulet le plus intense du spectre RMN <sup>19</sup>F du PFOB (Figure 20). Pour maximiser le rapport signal sur bruit, la séquence a une durée de 23 minutes et 55 secondes. Nous plaçons une sphère d'un centimètre de diamètre complètement remplie d'une dose de nanoparticules reconstituée et diluée 3 fois. Elle sert de référence au signal observé chez la souris.

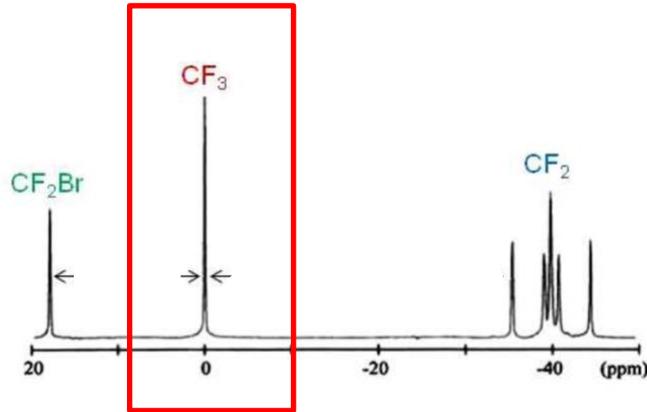


Figure 21 Spectre <sup>19</sup>F de la molécule de PFOB

Les paramètres de la séquence 3D d'imagerie fluor sont les suivants :

	TR	TE	NEX	Matrice	ST	FOV	Echo train	Flip Angle	BP
C <sup>19</sup> F3	300	5.07	24	80 x 80	4	128 x 128	1	50	325

Tableau 7 Paramètre de la séquence IRM fluor

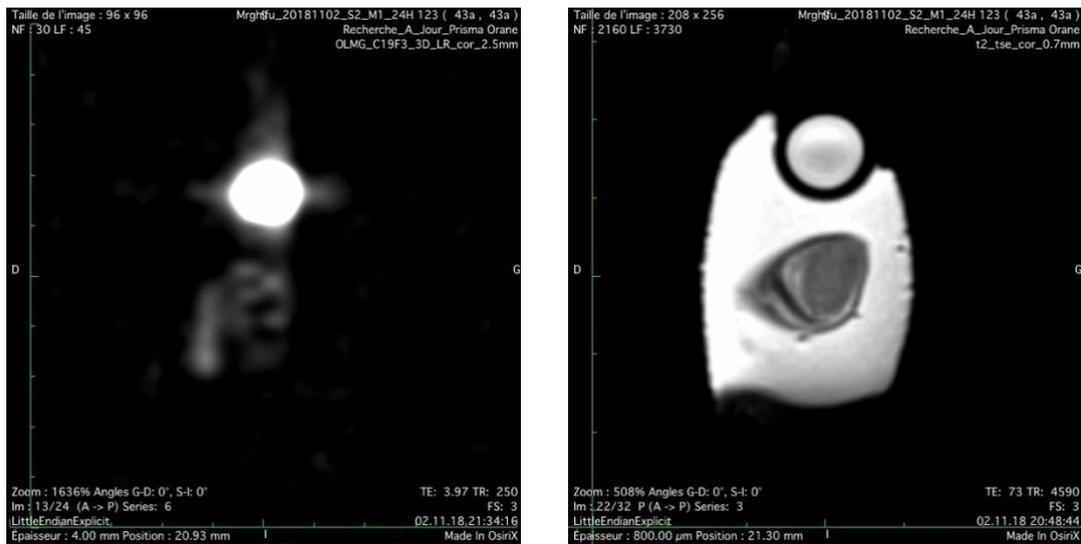


Figure 22 Séquence fluor coronal 24h post-injection pour la souris 1 série 2 avec présence de sphère témoin ainsi qu'une image T2 TSE coronal.

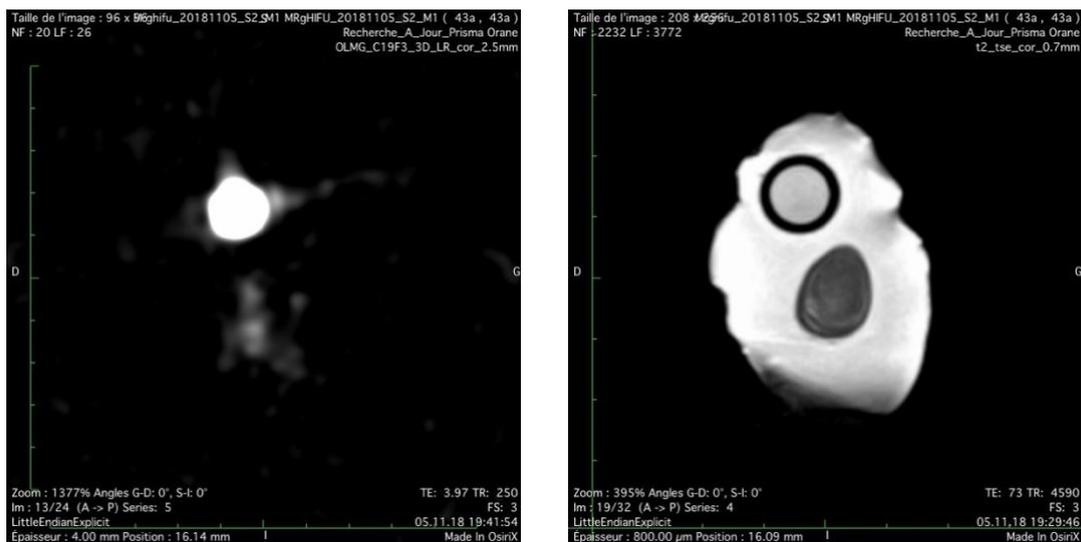


Figure 23 Mêmes séquences pour la même souris à 72 heures.

## 2.7 Imagerie fluorescence

Dans notre cas, c'est le XenoLight DiR (DiIc18(7) ou 1,1'-dioctadecyltetraméthyl indotricarbocyanine Iodide) contenu dans les nanoparticules injectées par voie veineuse à la souris qui est mesuré en imagerie de fluorescence (Caliper, 2009). Ce phénomène est possible grâce à sa longueur d'onde d'absorption de 748 nanomètres et d'émission à 780 nanomètres (Caliper, 2009).

Nous utilisons pour nos souris un filtre d'émission de 760 et un filtre d'excitation de 710 comme recommandé sur la fiche technique du XenoLight DiR. L'acquisition des images crée un fichier TIF qui contient une image en noir et blanc composée d'un modèle linéaire de 16 bits et représentant le niveau de fluor compté. L'unité de la mesure est le count. Il offre une image couleur dont l'échelle est définie avec le maximum et minimum local contenu dans le FOV pour offrir une représentation visuelle de la concentration.

Voici les paramètres d'acquisition des images de fluorescence :

Largeur pixel	1	FOV	12.8
Hauteur pixel	1	Read Bias Level	1214.48
Image Units	counts	Emission filter	760
Binning Factor	4	Excitation filter	710
Luminescent Exposure	2 sec	Fluorescence level	4.7

Tableau 8 Paramètres d'acquisition des mesures de l'imagerie de fluorescence

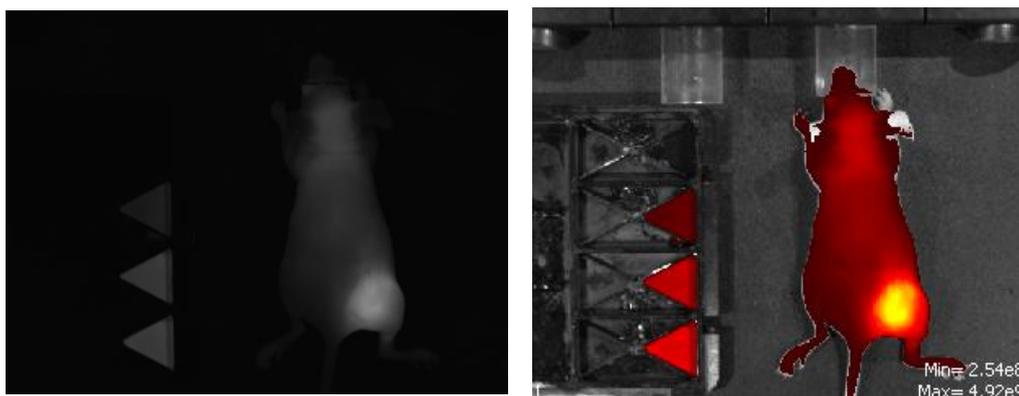


Figure 25 Fichier TIF et cartographie couleur

Grâce à cet outil, nous avons pu comparer la différence de concentration présente de nanoparticules entre les deux groupes étudiés aux différents temps ainsi que la distribution de l'émulsion dans l'organisme de l'animal. Les images sont réalisées à 1 heure, 24h et 72h post-injection. Elles permettent d'analyser la cinétique du produit dans le temps. Certaines souris ont dû être sacrifiées avant les 72h post-injection parce qu'elles atteignaient un critère d'arrêt décrit dans le protocole expérimental validé par l'office vétérinaire cantonal. Nous avons alors analysé pour ces cas uniquement l'imagerie du jour de l'injection et du jour suivant.

Pour l'analyse, nous avons utilisé le langage de programmation MATLAB® pour quantifier le signal contenu dans la tumeur et pouvoir ainsi apprécier la dynamique des nanoparticules injectées. Pour ce faire, un script a été créé pour pouvoir quantifier les nanoparticules. A partir d'un ROI défini manuellement autour de la zone tumorale, le programme définit le point maximal présent dans le ROI, et mesure l'intégrale du signal autour du point max avec un seuil défini à 20%. L'intégrale est ensuite divisée par la pente formée par 3 points défini manuellement au centre de chaque triangle contenant les différentes concentrations.

## Résultats

L'expérience est composée de 5 séries dont une série pilote. Nous présentons dans ce chapitre les résultats obtenus pour l'analyse du groupe pilote et les résultats de nos observations pour le groupe témoin et traitement. Dans le groupe expérimental nous analysons et comparons un groupe témoin et un groupe traitement HIFU comprenant chacun 4 souris.

### 3.1 Série Pilote

Dans cette série, nous avons réalisé les premiers tests. Elle nous a permis d'observer les besoins et précautions techniques ainsi que les limites de l'expérience. Nous avons fait des choix en fonction des besoins et difficultés rencontrés. Nous avons de cette manière pu planifier au mieux les différentes étapes de l'expérience selon un planning flexible et adaptable à chaque cas.

Les séquences IRM optimisées durant cette phase pilote nous ont permis d'analyser la variabilité existante de la croissance tumorale dans le modèle utilisé. Nous avons également réalisé une analyse du signal mesuré aux différents temps selon deux modes d'injections des nanoparticules pour s'assurer de choisir la méthode la plus efficace et la plus reproductible pour notre étude. Pour déterminer le paramétrage du traitement HIFU, nous avons évalué l'efficacité de trois protocoles sur 3 souris.

#### 3.1.1 Volume tumoral

La croissance tumorale a présenté une certaine variabilité selon les séries mais également entre souris d'une même série. La taille de la tumeur était notre condition à la réalisation du traitement HIFU. Cette variabilité a présenté une difficulté dans l'organisation et la coordination du projet. Elle est un facteur influençant la concentration des nanoparticules observée aux différents temps. C'est pourquoi nous avons fait le choix de l'introduire dans nos calculs.

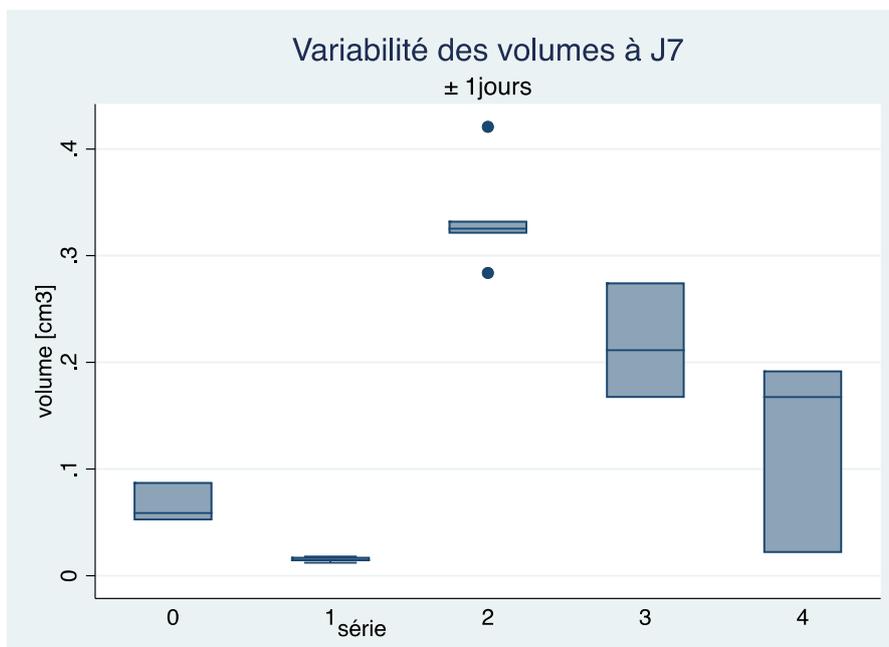


Figure 26 Variabilité de mesure de volume 7 jours  $\pm$  1 jour post-greffe

Ces volumes ont été mesurés à partir d'images acquises  $7 \pm 1$  jours après la greffe. Un technicien vétérinaire a réalisé toutes les greffes sauf la série 1 que j'ai greffé moi-même. Nous discuterons de l'impact de ce changement dans le chapitre suivant. L'étendue de ces valeurs est comprise entre  $[0,0122 ; 0,4868]$  cm<sup>3</sup>. La série pilote et 1 sont les deux groupes avec les médianes les plus basses (respectivement 0,0589 et 0,0146). Leur étendue n'est également pas très élevée et principalement pour la série 1  $[0,0519 ; 0,0879]$ . Les deux extrêmes se notent entre la série 1 et 2. La différence entre la médiane des deux groupes est définie par un facteur très important qui est d'environ 22.

On observe une grande variabilité entre les différentes séries avec une forte étendue pour les résultats observés aux séries 3 et 4. Notons que les souris de ces deux séries sont issues de la même portée. Pour une question d'organisation, ces 6 souris ont été séparées en deux groupes avec des dates de greffe distinctes. La forte étendue de la série 4  $[0,0214 ; 0,1925]$  s'explique principalement par la valeur de la dernière souris qui est 8 fois plus petite que les deux autres (0,0214 cm<sup>3</sup>).

### 3.1.2 Voie d'administration

Dans le protocole (cf Annexes), il était initialement défini une injection intra-veineuse caudale de la souris. Face à la difficulté technique de cette méthode, y compris pour les professionnels expérimentés d'ITMI, nous avons évalué la capacité de diffusion des nanoparticules par voie intra-péritonéale et rétro-orbitale. Nous avons pu constater, comme attendu, une diffusion plus lente par voie intrapéritonéale qu'avec l'injection rétro-orbitale aux trois temps.

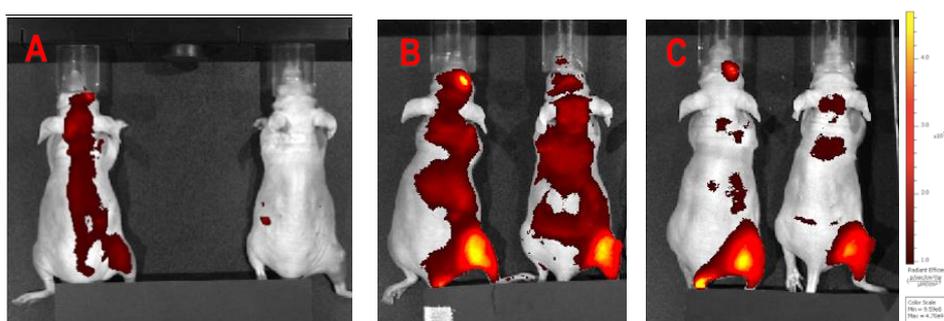


Figure 27 Première souris injectée en rétro-orbitale et la deuxième intrapéritonéale. A : Imagerie de fluorescence 5 minutes post-injection. B : Imagerie de fluorescence 24h post-injection. C : Imagerie de fluorescence 72h post-injection

	J0	J1	J3
Intra-Orbital	3,39E+07	1,63E+08	4,52E+07
Intra-Péritonéal	2,85E+06	8,42E+07	3,57E+07

Tableau 9 Valeurs de l'intégrale des counts mesurés en imagerie de fluorescence à l'aide d'un ROI de 1 cm placé sur la tumeur. La mesure a été réalisée à l'aide du logiciel Living Image ® pour les deux techniques aux trois temps.

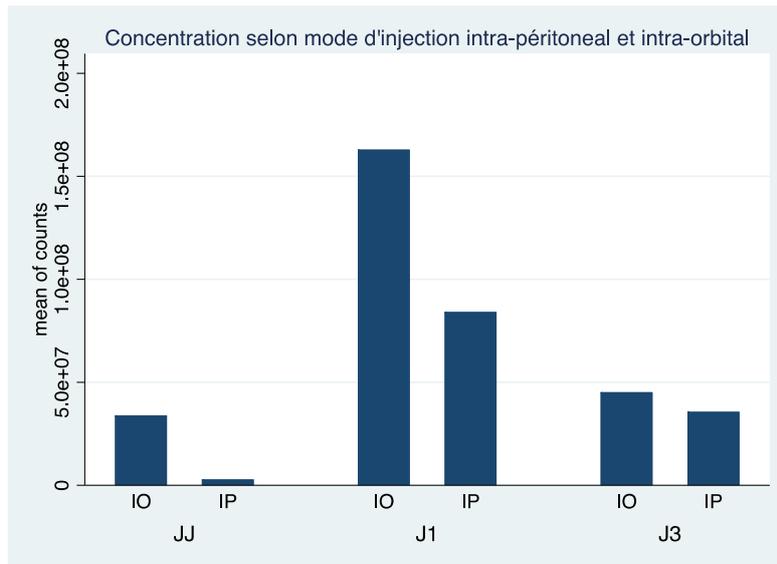


Figure 28 Comparaison entre efficacité de concentration selon le mode d'injection.

Nous observons pour la concentration intra-orbitale à J1 post-injection un facteur d'environ 2 (1,93) par rapport à la concentration observée à J1 en utilisant le mode d'injection intra-péritoneal. Nous avons conclu que la voie rétro-orbitale était le moyen le moins douloureux et stressant pour la souris mais également le moyen d'injection le plus efficace et rapide à l'exécution. Nous avons pour cela demandé une modification du protocole A qui a été (numéro d'autorisation GE/127/18).

### 3.3.3 Choix du traitement HIFU

Nous sommes conscients du nombre limité de cas testés pour évaluer l'efficacité d'un traitement. Néanmoins, nous voulions assurer un minimum l'effet du traitement HIFU délivré et pour cela nous avons réalisé un premier test pour trois paramètres différents.

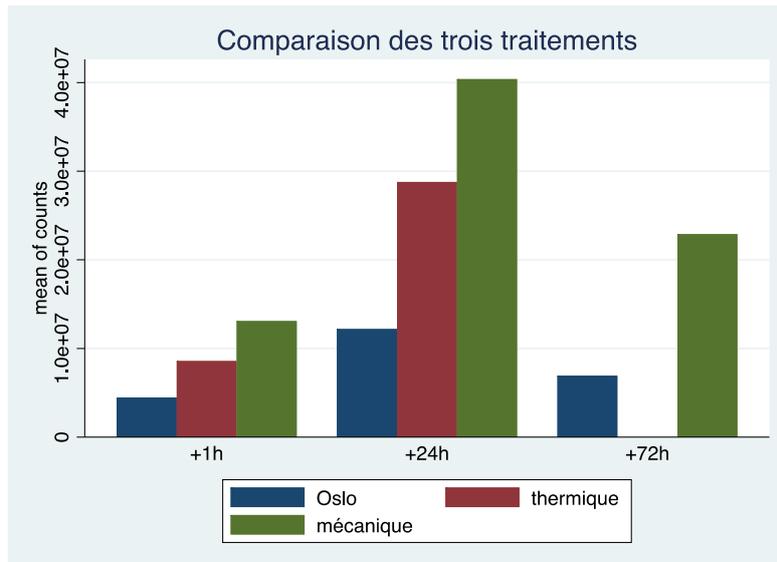


Figure 29 Comparaison des traitements HIFU. L'analyse se base sur l'imagerie de fluorescence et les counts mesuré avec Matlab.

Notre choix se base sur l'effet observé à 24 heures. A première vue, le traitement « Oslo » présente l'effet le plus faible des trois. Nous avons estimé que son application était trop courte (1 ms) avec un temps de pause trop important (399ms), cela ne permettant probablement pas un dépôt d'énergie suffisant sur la zone tumorale aux vues de la dispersion dans le temps trop importante.

Le traitement thermique démontre une mesure plus élevée que le traitement d'Oslo mais 1,4 fois inférieur au traitement mécanique.

Pour cette raison, nous avons tenté à nouveau l'expérience du traitement thermique pour nous conforter dans notre choix. Lors de ce deuxième essai, nous avons observé un effet inhabituel. Une prise de contraste au niveau du bas dos de la souris apparait à 1 heure post-injection et semble se diriger vers la cuisse greffée de la souris à 24 heures.

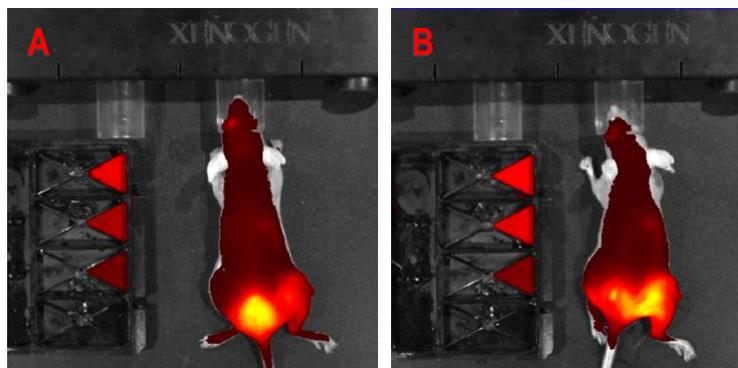


Figure 30 A : image de fluorescence le jour du traitement par HIFU thermique. B : image de fluorescence pour la même souris le lendemain du traitement

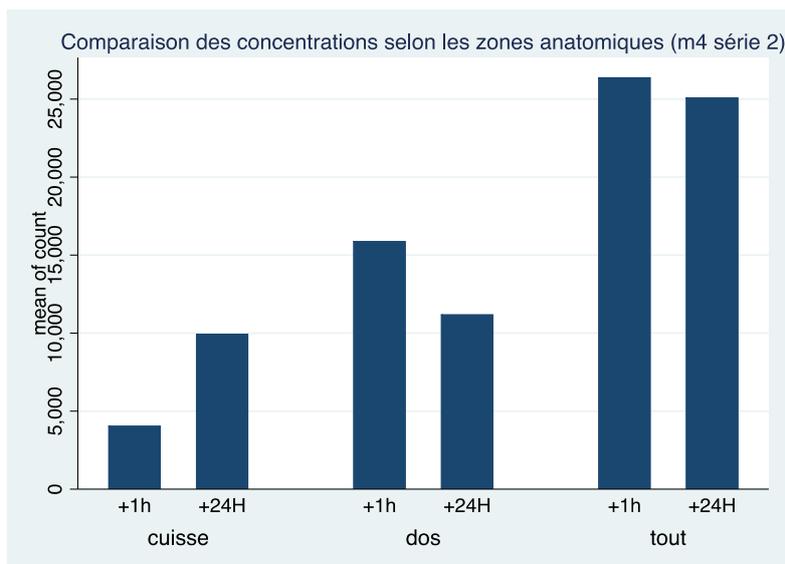


Figure 31 Comparaison des zone anatomiques ayant présentés une augmentation de la concentration ainsi que les deux zones additionnées.

En analysant le tableau des mesures de counts de cette souris à 1 heure et 24 heures, on observe une différence de dynamique en fonction de la zone étudiée. Notons premièrement la faible échelle de l'axe des ordonnées qui représente les counts mesurés. On observe une augmentation de la concentration du Dir au niveau de la cuisse d'un facteur 2,45 entre J0 et J1. Tandis que l'effet inverse est observé au niveau du dos avec une diminution d'un facteur 1,4 entre J0 et J1.

Cependant au vu de l'échelle, la concentration de manière générale chez cette souris est extrêmement faible comparé aux autres souris étudiées dans ce test.

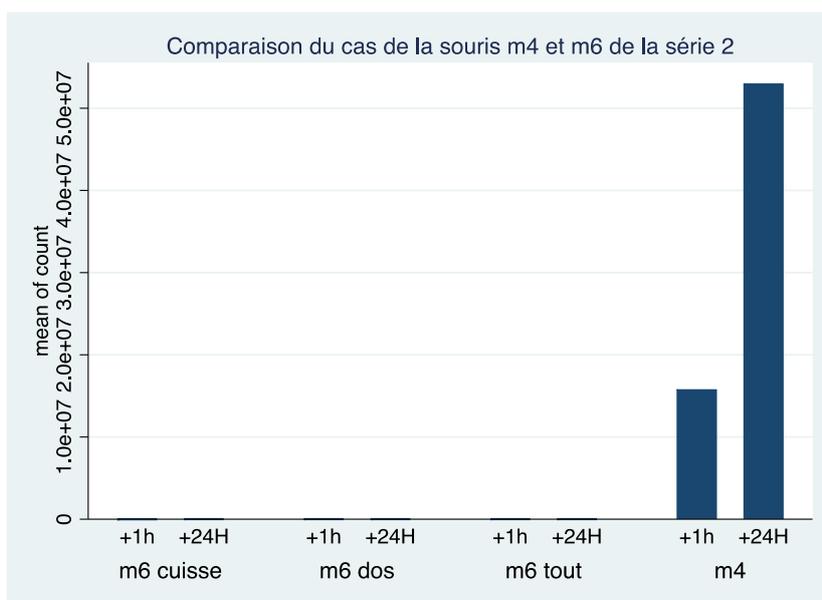


Figure 32 Comparaison de la souris m4 et m6

On observe ici facilement dans ce graphique l'importante différence existante entre la faible concentration observée pour la souris m6 comparé à la souris m4 (série 2).

Nous avons observé une réaction cutanée sur le dos de la souris m6 à la suite du traitement HIFU qui paraît être co-localisée avec la concentration observée en imagerie de fluorescence.

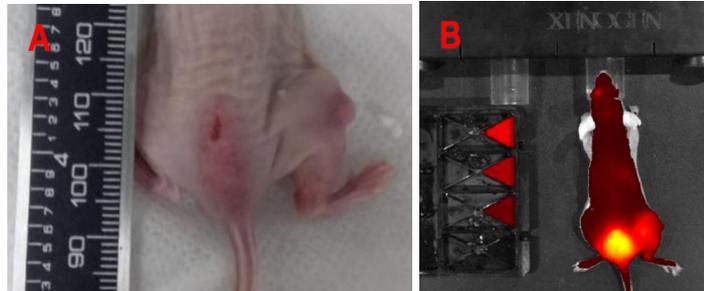


Figure 33 A : Photo de la lésion observée sur la souris m6 après le traitement HIFU thermique. B : image de fluorescence de cette même souris 1 heure post-traitement

Il est difficile actuellement d'expliquer les raisons de ce phénomène et de cette faible concentration mesurée. Nous pensons néanmoins, que les faisceaux ont pu être déviés et amplifiés autour de la colonne vertébrale de l'animal par un effet la réflexion des faisceaux. Une deuxième hypothèse serait que la souris ait été blessée par la morsure d'une autre souris à cet endroit avant le traitement, ce qui causerait une inflammation ou infection locale qui concentrerait les nanoparticules dans cette zone. Néanmoins, les effets secondaires sont difficiles à prouver ou expliquer au vu des moyens et du temps que nous avons à disposition. En conclusion, au vu des effets secondaires importants et des faibles résultats que le traitement thermique présente, nous avons donc privilégié le traitement dit mécanique pour les dernières séries.

### 3.2 Phase expérimentale

Pour évaluer la faisabilité du traitement et son efficacité, nous réalisons une analyse en trois temps. Premièrement, nous analysons le groupe témoin et le groupe expérimental séparément grâce à une représentation des données quantitatives par un box plot. Il nous permet de décrire les données et d'identifier les outliers s'il en existe. Cela nous permet d'observer la variabilité inter-groupe dans un premier temps. Ce n'est qu'à la suite de ces deux analyses que nous comparerons l'effet du traitement en confrontant les groupes témoin et traitement.

Nous avons fait le choix de retirer la série 1 de nos analyses car la petite taille des tumeurs et la différence de quantité de nanoparticules injectées présentent un biais trop important. De plus, nous avons testé dans ce groupe sur deux souris le traitement HIFU d'Oslo ainsi qu'un second traitement HIFU thermique qui nous ont permis d'orienter le paramétrage du traitement définitif dans le cadre du projet pilote.

Nous basons alors nos observations sur les séries 2, 3 et 4. Cela représente au total 4 souris dans le groupe témoins et 4 souris dans le groupe traitement.

### 3.2.1 Groupe témoin

Nous avons analysé dans un premier temps le niveau de signal observé aux trois temps chez le groupe témoin pour évaluer l'effet EPR sur le niveau de concentration intra-tumoral des nanoparticules ainsi que leur cinétique. Cela nous permet également d'observer la variabilité intra-groupe.

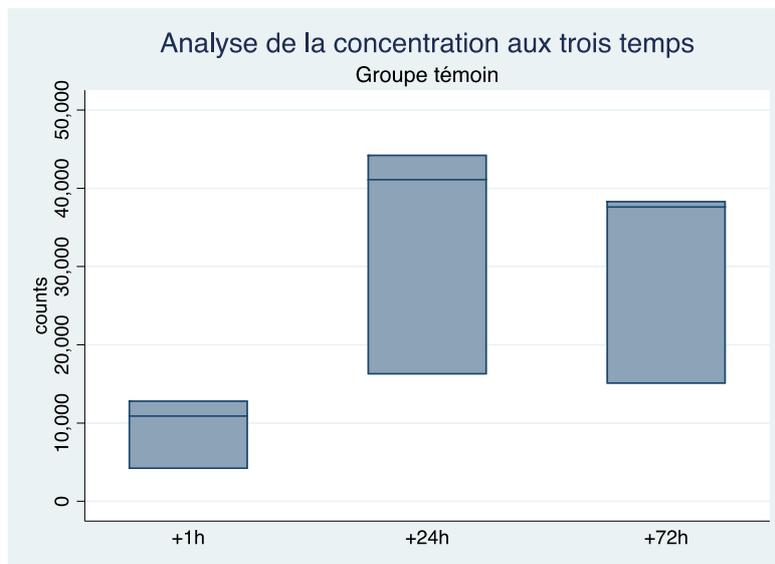


Figure 34 Analyse des counts mesurés aux trois temps pour le groupe témoin

Nous notons à première vue, une absence de valeurs extrêmes sur le graphique. L'étendue des valeurs à 1 heure post-injection est la plus faible des trois temps et définie par la valeur minimale non-extrême de  $4,13E+03$  et la valeur maximale de  $1,29E+04$ .

En revanche, l'étendue des counts mesurés à 24 heures post-injection est plus importante. Nous observons une étendue importante allant de  $1,62E+04$  à  $4,43E+04$ , ce qui représente un facteur d'environ 2,7.

La médiane que nous observons à 72 heures post-injection est 1,1 fois plus faible que la médiane calculée à 24 heures. Les valeurs mesurées à 72 heures sont légèrement inférieures à 24 heures mais reste néanmoins proche. L'étendue des valeurs à 72 heures est plus basse mais reste proche de l'étendue observée à 24 heures. L'étendue à 72 heures est caractérisée par une valeur maximale de  $3,84E+04$  et une valeur minimale de  $1,5E+04$  pour un facteur de 2,6. La haute médiane observée dans les trois temps est définie par les faibles valeurs que présente la souris m1 de la série 3 qui sont en moyenne 2,5 fois plus faibles que les autres.

La médiane à 24 heures est 3,8 fois supérieur à celle observée à 1 heure. L'écart est donc important contrairement à celui qui la sépare de la médiane à 72 heures (1,09).

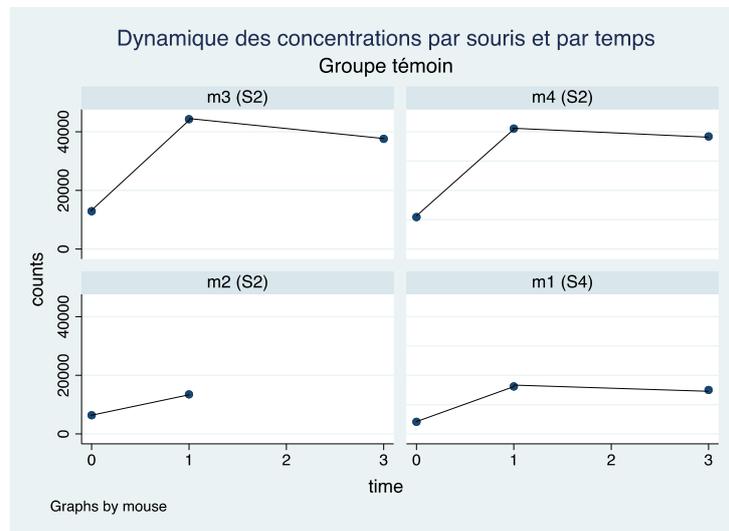


Figure 35 Dynamique des concentrations des souris du groupe témoin aux différents temps

La représentation visuelle des différentes dynamiques observées pour chaque souris permet de décrire les différences intra-groupe existantes et d'observer les résultats de l'effet de concentration. Visuellement, malgré l'absence de données pour J3 de la souris m2 (S2), le schéma de cette souris et de la souris m1 (S4) est semblable. De même les schémas des souris m3 et m4 de la série 2 semblent identiques avec une augmentation de la concentration à 24 heures plus importantes que pour le binôme précédent.

On note également pour les trois cas une diminution lente de la concentration entre 24 heures et 72 heures post-injection ce qui correspond à la description précédente concernant les médianes pour les deux temps. Pour évaluer la dynamique, nous comparons les valeurs d'aire sous la courbe (AUC) mesuré.

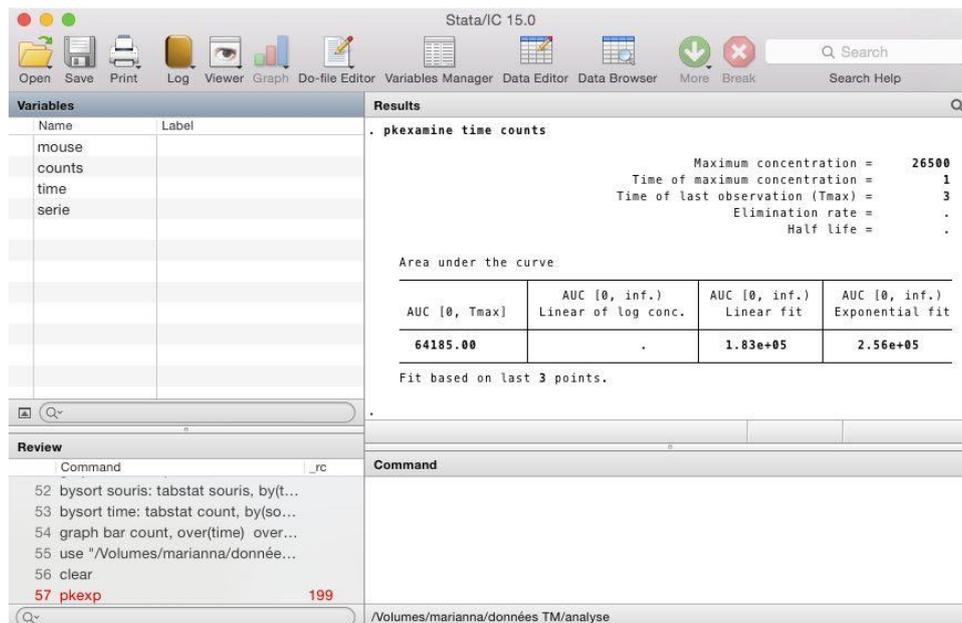


Figure 36 Logiciel de statistique Stata et formule pour le calcul automatique de l'air sous la courbe selon 3 données de counts à trois temps différents

Nous ne réalisons pas cette analyse pour la souris m2 qui n'a que 2 valeurs. En mesurant l'aire sous la courbe à l'aide du logiciel de statistique STATA®, on note un facteur moyen de 2,6 entre l'air mesuré pour la dynamique de la souris m3 (1,28E+05) et m4 (1,21E+05) comparé à la valeur obtenue pour la souris 1 (4,77E+04).

La valeur que nous observons pour la souris m1 à J1 est 2,6 fois plus petite que les valeurs au même temps des souris 3 et 4. Cette valeur est responsable de la grande étendue observée à 24 heures sur le diagramme en boîte présenté précédemment. La valeur de cette même souris à 72 heures est responsable de la même manière de l'étendue observée dans l'analyse présentée plus haut.

Nous discuterons plus loin des différentes hypothèses possibles concernant cette différence de cinétique entre les deux cas.

### 3.2.2 Groupe traitement

Pour ce groupe nous évaluons également la variabilité existante à l'intérieur du groupe et aux différents temps.

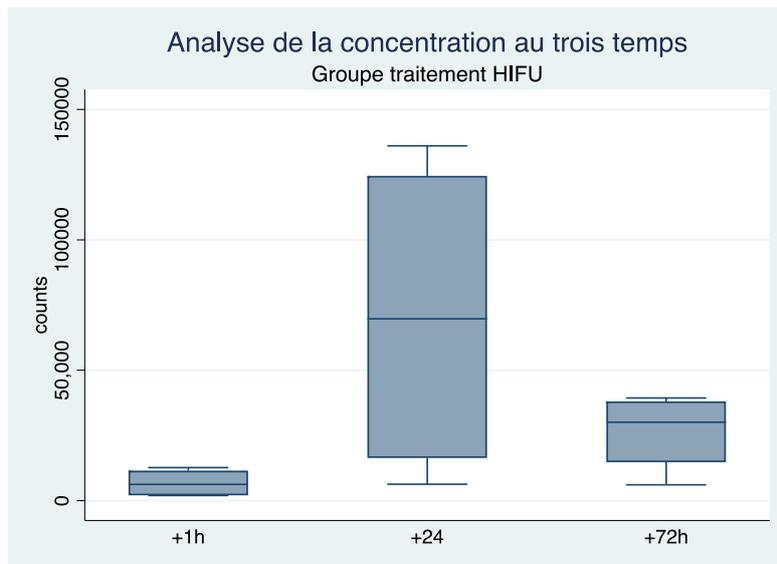


Figure 37 Différence des concentrations observée en imagerie de fluorescence au niveau de la tumeur pour les 3 temps pour le groupe traitement

Comme dans le cas du groupe témoin, nous ne notons aucunes valeurs extrêmes. L'étendue des counts mesurés 1 heure après injection est petite variant de  $1,96E+03$  à  $1,27E+04$  tout comme les cas présentés dans le groupe témoin. La variabilité des valeurs mesurées à 24 heures après injection est plus importante qu'aux deux autres temps avec une étendue allant de  $6,30E+03$  à  $1,13E+05$ .

Contrairement au groupe témoin, on observe ici une différence importante entre les valeurs à 24 heures et 72 heures. La médiane de ce groupe à 24 heure ( $6,01E+04$ ) est 2,7 fois plus élevée qu'à 72 heures ( $2,28E+04$ ). Cette différence est quasiment identique entre 24 heures et 72 heures ( $6,63E+04$ ).

L'étendue des mesures à 72 heures est plus faible que dans le groupe témoin avec une valeur maximale à  $3,67E+04$  et une valeur minimale de  $6,08E+03$ . Nous discuterons plus loin de la relation qui existe entre ce résultat et l'application HIFU.

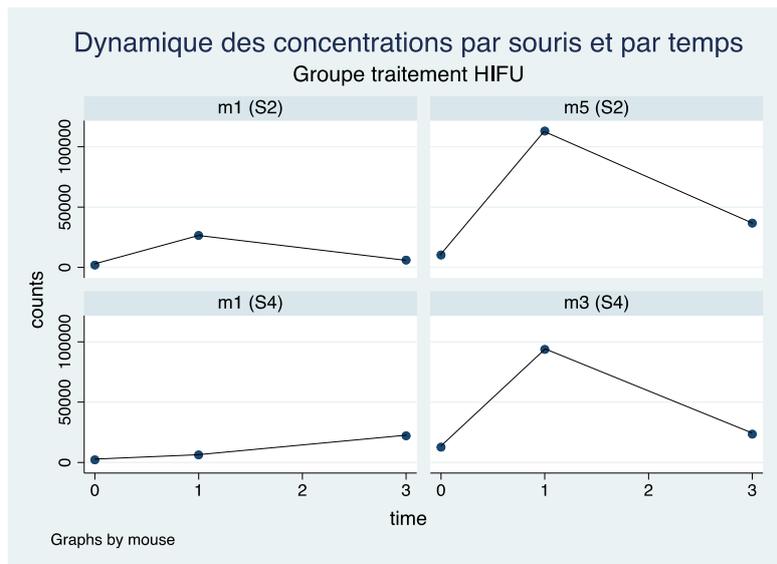


Figure 38 Dynamique des concentrations des souris du groupe HIFU aux différents temps

Nous observons dans cette analyse un schéma de dynamique identique pour tous les cas sauf pour la souris 1 série 4 qui elle ne présente pas son maximum à 24 heures.

On observe également deux schémas de dynamique quasiment identiques entre la souris m3 et m5. Si l'on calcule l'air sous la courbe de ces deux cas, on obtient un AUC de  $2,82E+05$  pour la souris m5 et de  $2,28E+05$  pour la souris m3. Ce qui correspond à une différence d'un facteur 1,23. Si nous comparons la moyenne de ces deux AUC avec celle de la souris 1 de la série 4 (AUC= $6,42E+04$ ), nous obtenons un facteur de 3,97. La dynamique observée pour les deux premiers cas est effectivement plus importante que pour la souris m1 de la série 2.

La dynamique de la souris 1 série 4 est différente des autres cas observés. Le point maximal de la concentration est de  $3,94E+04$  et se situe à 72 heures. Le schéma de cette dynamique décrit quasiment une droite. On observe une augmentation de la concentration dans le temps avec un facteur d'augmentation de 16,9 entre le jour de l'injection et J-3 contrairement aux autres cas de cette étude qui présentent un facteur variant entre 2,64 et 0,85.

### 3.2.3 Groupe témoin VS Groupe traitement

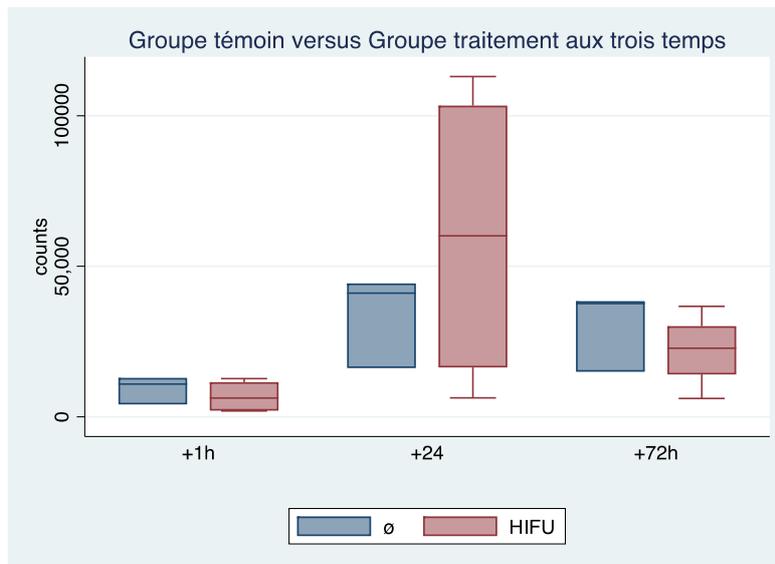


Figure 39 Comparaison de la distribution des données aux différents temps entre le groupe témoin et traitement

Le signal mesuré 1 heure post-injection semble être identique dans les deux groupes. L'étendue des deux groupes est faible et leurs médianes sont proches l'une de l'autre avec pour le groupe témoin une valeur de  $1,09E+04$  et pour le groupe traitement de  $6,25E+03$ , soit un facteur de 1,7.

Nous ne retrouvons pas cette même stabilité dans le temps suivant. A 24 heures, une plus importante variabilité inter-groupe intervient. Nous observons des étendues avec une différence importante entre le groupe traitement et témoin. L'étendue du groupe traitement est 3,8 fois plus élevée que l'étendue du groupe témoin. La valeur maximale observée à 24 heures pour le groupe traitement est de 113'000 counts soit 2,6 fois plus que la valeur maximale à 24 heures pour le groupe témoin. Nous discuterons ensuite des probables hypothèses pouvant expliquer cette différence si importante et l'implication de l'effet du traitement HIFU sur cette augmentation. Comme évoqué précédemment, la moyenne du groupe traitement à 24 heures est 2,7 fois plus élevée qu'à 72 heures. Tandis que cette différence n'est que de 1,21 dans le groupe témoin. Nous évoquerons dans le chapitre développement, la probable relation entre cette différence et le traitement HIFU.

Les box représentant l'étendue des valeurs pour les deux groupes à 72 heures semblent proches. La variation de l'étendue du groupe témoin est 1,3 fois plus élevée que l'étendue du groupe traitement à 72 heures. Nous développerons des hypothèses autour de cette similitude dans le paragraphe qui suit.

# Discussion

## 4.1 Taille des tumeurs

Cette méthode d'imagerie préclinique a été optimisée pour aboutir à une séquence d'environ 13 minutes. En comptant l'installation, le scout, la calibration et l'image corps entier de repérage nous sommes capables de donner une estimation du volume tumoral en moins de 30 minutes. La méthode de calcul manuel du volume tumoral obtenu à l'aide d'Osirix comprend une certaine variabilité inter-opérateur. Néanmoins, cette technique permet une estimation du volume tumoral rapide et suffisante pour cette expérience. Pour la suite, une imagerie scanner serait à envisager car plus adaptée à ces mesures.

Dans le contexte de cette étude, on estime que la variabilité est importante car elle empêche une certaine reproductibilité dans le temps du schéma établi pour le timing de l'étude. Les outliers tels que ceux que nous pouvons observer dans la série 2 ainsi que les variabilités importantes des étendues observées dans la série 3 et 4 présentent un défaut de reproductibilité. Cela représente une difficulté supplémentaire à la réalisation et à l'organisation de cette étude (disponibilité de l'équipe, des salles, des machines...).

Malgré la lignée de souris identique, les mêmes conditions de greffe et les mêmes conditions environnementales, chaque tumeur se développent différemment. Cette variabilité naturelle est intrinsèque aux principales caractéristiques d'une lésion tumorale. Certaines se développent plus rapidement, d'autres présentent des zones nécrotiques plus rapidement ou peinent à se développer etc... Il est probable que la variabilité de développement des lésions tumorales influence la concentration des nanoparticules mesurée aux différents temps.

Cette variabilité peut également être influencée par le manipulateur qui réalise la greffe. Nous notons que la série 1 présente la moyenne et l'étendue la plus faible des 5 séries ce qui est un avantage. Néanmoins, elle demande plus d'attente pour obtenir la taille requise au traitement. Cela s'explique probablement par le changement d'opérateur qu'il y a eu à ce moment-là car j'ai greffé moi-même la série 1. Les autres souris ont été greffées par un vétérinaire expérimenté et exerçant dans le domaine de la recherche pré-clinique. Néanmoins, la variabilité observée dans la série 1 est faible car son étendue est petite.

## 4.2 Groupe témoin et traitement

### 4.2.1 Une heure post-injection

L'effet EPR est observé à 1 heure post-injection avec une concentration des nanoparticules dans la tumeur supérieure au côté controlatéral sain. On explique ce phénomène par les

diverses caractéristiques composant la mise en circulation, la diffusion et l'élimination de la substance injectée dans l'animal.

Les nanoparticules injectées en rétro-orbital traversent le système veineux jusqu'au poumon pour rejoindre le système artériel. Elles parcourent ensuite leur chemin à travers différents organes tel que le foie qui éliminera une première partie des nanoparticules circulantes (macrophages). Elles passeront du système artériel sain au système circulatoire de la tumeur (vaisseaux et capillaires) et par ce biais dans l'espace extracellulaire de la tumeur.

Ce passage a lieu principalement entre les vaisseaux issus de la néoangiogenèse reliés au système circulatoire sain et à l'espace extracellulaire de la tumeur. Ces membranes présentent des espaces intra-cellulaire plus importants que dans les vaisseaux sains. Ces caractéristiques augmentent la perméabilité des vaisseaux et ainsi la diffusion de protéines plasmatiques dans la tumeur. Cela augmente l'hématocrite et la viscosité du sang circulant localement (Wilhelm et al., 2016). De plus, l'épaisseur de la membrane endothéliale des capillaires est plus importante que celle qui composent les vaisseaux de la tumeur (Wilhelm et al., 2016). La vitesse de diffusion entre les capillaires tumoraux et l'espace extracellulaire est par conséquent ralentie.

Cela peut expliquer la médiane faible observée à 1 heure et 72 heures post-injection dans les deux groupes. Quant à la faible étendue observée à 1 heure et 72 heures, il est probable que les différents systèmes (circulatoire et d'élimination) et caractéristiques citées (porosité des vaisseaux et pression osmotique) aient une influence stable sur la concentration des nanoparticules au sein de la tumeur.

Leurs faibles étendues ainsi que les médianes proches des deux groupes peuvent également justifier une probable reproductibilité du geste d'injection des nanoparticules et un certain niveau de stabilité dans leur production.

Nous pouvons illustrer le mécanisme de diffusion de ces nanoparticules entre les tissus sains et la lésion tumorale à l'aide d'un modèle pharmacocinétique physiologique (PBPK). Ce modèle est extrêmement simplifié et nous permet simplement d'illustrer notre exemple. Il ne prend pas en compte certains facteurs tel que les caractéristiques du modèle tumoral, l'agent injecté, les systèmes d'élimination (foie) ou encore les caractéristiques de l'animal (sexe, âge, poids ...).

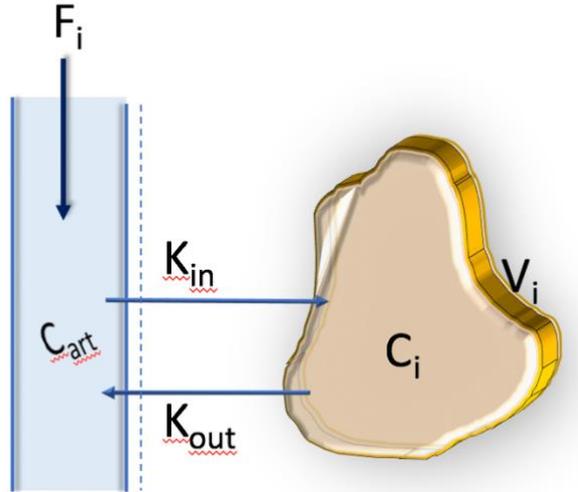


Figure 40 Ce modèle simplifié illustre le mécanisme de diffusion des nanoparticules circulantes. On y représente par un coefficient  $K$ , la capacité de diffusion des nanoparticules de la circulation vers la tumeur et dans le sens inverse.  $C_i$  correspond à la concentration de nanoparticules existantes dans la tumeur et  $V_i$  le volume de cette lésion.  $C_{art}$  traduit la concentration de nanoparticules qu'on retrouve dans le système circulatoire artériel sain.

$$\frac{\Delta C_i}{\Delta t} = F_i (\sum_i^n K_{in} C_{art}(t) - \sum_j^m K_{out} C_i(t))$$

Équation 1 Modèle PBPK pour décrire le mode de diffusion des nanoparticules et d'accumulation dans la tumeur

Dans l'équation présentée ci-dessus, on décrit la concentration des nanoparticules au sein de la tumeur par rapport au temps J0 (1 heure post-injection) et J1 (24 heures post-injection) qui présente le point maximal de counts dans notre expérience. Ce rapport est défini par la différence des sommes des concentrations de nanoparticule à l'intérieur de la tumeur et à l'extérieur en fonction du temps (Vinckenbosch, 2018) Le tout est multiplié par le flux sanguin ( $F_i$ ). Le coefficient  $K$  permet de caractériser la capacité d'échange entre les deux milieux (Bois, Jamei, & Clewell, 2010).

Nous estimons que le facteur de diffusion  $K_{in}$  est naturellement plus élevé que le facteur  $K_{out}$ . Cela signifie que les nanoparticules sont capables de rentrer dans l'espace extracellulaire plus rapidement qu'elles n'en sortent, ce qui justifie la présence d'une concentration des nanoparticules au sein de la tumeur. L'effet EPR est observé à 1 heure post-injection avec une concentration des nanoparticules dans la tumeur supérieure au côté controlatéral sain.

De plus, les valeurs proches des médianes à 1 heure des groupes traitement et témoin permettent également d'affirmer l'absence d'effet induit par le traitement HIFU à un temps si précoce.

#### 4.2.2 24 heures post-injection

Comme décrit précédemment, la lente diffusion au sein de la tumeur permet une certaine stagnation des nanoparticules entrées dans l'espace extracellulaire avant d'en ressortir. Une accumulation des nanoparticules a lieu dans la tumeur jusqu'à son point maximal dans une certaine fenêtre temporelle. Selon nos observations, la concentration plus grande observée se situe à environ 24 heures post-injection pour la quasi-totalité de nos cas (sauf pour la souris 1 série 4).

La variabilité existante entre les diverses caractéristiques physiologiques et morphologiques du métabolisme animal et de la lésion tumorale présentées précédemment peuvent être en partie responsables de la forte étendue observée sur la mesure du signal de concentration dans les deux groupes à 24 heures. Nous avons pu observer macroscopiquement une certaine variabilité de la physiologie et morphologie des tumeurs. D'après le modèle décrit précédemment et selon le développement de la néoangiogenèse et des caractéristiques morphologiques de la tumeur, les facteurs  $K_{in}$  et  $K_{out}$  peuvent varier. Ces multiples facteurs sont susceptibles d'être en partie responsables de la forte étendue présentée à 24 heures.

En plus de critères liés au développement tumoral, d'autres facteurs biologiques peuvent également entrer en jeu dans cette variabilité à 24 heures. La variabilité intrinsèque à chaque animal du système réticulo-endothélial (macrophages) peut jouer un rôle dans la filtration et l'élimination des nanoparticules injectées plus ou moins important d'un animal à l'autre.

Nous observons une augmentation plus importante du signal à 24 heures dans le groupe traitement que dans le groupe témoin. Nous émettons l'hypothèse que cette augmentation soit en partie induite par le traitement HIFU pulsé. Dans la littérature, il est décrit que l'application d'onde acoustique telle que celle induite par HIFU mécanique engendrerait une variation de la densité des liquides amenant à un effet de cavitation acoustique. Cet effet de cavitation a déjà prouvé son efficacité in vitro sur le traitement de dissolution de caillot dans le cadre d'une étude sur la thrombolyse (Rego & Tan, 2006). Dans cette même étude, ils ont testé l'efficacité de la thrombolyse par HIFU selon différente puissance. A 70 Watt, on décèle déjà un effet induit par l'effet de cavitation recherché. On s'attend dans notre cas, à un effet de cavitation qui engendre l'ouverture d'espace plus importants dans la membrane des vaisseaux et capillaires tumoraux décrite précédemment. Cela amenant à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux dans un certain laps de temps. Cette durée de l'effet correspondrait à 24 heures selon nos observations.

Il reste néanmoins difficile à décrire la forte étendue observée dans le groupe traitement. Elle est principalement influencée par le cas de la souris 1 série 4 qui présente le facteur d'augmentation le plus faible du groupe à 24 heures et qui est de 1,86 (contrairement aux

autres qui sont en moyenne de 10,73). Nous pouvons donc conclure que la différence entre le groupe témoin et traitement semble importante mais que le phénomène de cavitation reste hypothétique et dans notre cas est difficile à prouver.

#### 4.2.3 72 heures post-injection

La différence de médiane entre 24 heures et 72 heures pour le groupe témoin est assez faible et certainement significative d'une élimination lente des nanoparticules dans le temps. Cela peut s'expliquer par les arguments évoqués précédemment concernant la faible diffusion et ainsi lente élimination des nanoparticules au sein du milieu extracellulaire de la tumeur.

Dans le groupe traitement, la différence de moyenne et variabilité existante entre 24 heures et 72 heures est plus importante que pour le groupe témoin. Selon nos hypothèses, un effet de wash-out pourrait probablement être décrit dans ces données. L'effet de wash-out pourrait marquer la fin d'un système de perméabilité augmenté par le traitement HIFU jusqu'à 24 heures et indiqué ainsi une reprise de la dynamique « naturelle » sans influence induite par le traitement.

### 4.3 Le TRM dans la recherche pré-clinique

L'avènement de ce nouveau master amène au développement de nouveau profil de TRM. Ces nouveaux profils répondent à une demande existante du terrain. Certaines activités sont actuellement occupées par d'autres professionnels. Actuellement, rares sont les TRMs intégrés dans des équipes de recherche préclinique. La plate-forme ITMI dans laquelle j'ai réalisé les diverses manipulations de ce travail n'engage aucun TRM. Pourtant, la manipulation et la gestion des micro-machines de radiologie préclinique correspondent aux compétences des techniciens en radiologie.

La réalisation d'exams et de post-traitements sont à la portée d'un TRM avec une formation Bachelor. De plus, l'expertise technique issue de l'expérience clinique et ses connaissances pratiques présentent un réel avantage à son introduction. Il est cependant essentiel d'avoir les compétences et connaissances nécessaires à la manipulation des animaux en laboratoire. Pour cela, une formation qualifiante de base est obligatoire pour autoriser la personne à la manipulation des animaux.

Néanmoins, il existe une limite à la pratique du TRM dans le domaine de la recherche préclinique. Pour occuper un de ces postes, il est nécessaire d'acquérir certaines connaissances concernant le domaine de la recherche pour pouvoir travailler de manière indépendante et plus active. Autrement, l'activité du TRM ne se limiterait uniquement à

l'acquisition des données. Néanmoins, cela représente une première ouverture à notre profession dans le domaine. En effet, le TRM serait capable d'améliorer le flux de travail avec l'optimisation de paramètre d'acquisition et leur réalisation. Cela laisserait aux chercheurs plus de temps dédié à d'autres activités plus académiques (Dillenseger, 2018).

Pour permettre au TRM une plus grande implication dans le domaine, l'acquisition de titres de formations supérieurs tels que ce master pourrait être un avantage et ainsi combler certaines lacunes. La méthodologie de recherche et les divers outils statistiques sont essentiels à la bonne compréhension des processus employés pour le développement de projet de recherche.

Le TRM maîtrisé doit pouvoir être introduit dans ce domaine avec une occupation qualitativement plus importante plutôt que limitée à la production d'images. Il doit pouvoir occuper une place de collaborateur qui intervient dans les processus et mise en place de projets pour donner son avis d'expert et ainsi améliorer la qualité et l'organisation du travail. Avec l'opportunité qu'on m'a offerte, j'ai pu découvrir le milieu de la recherche pré-clinique et ses multiples facettes. De l'élaboration du projet à la synthèse et interprétation des résultats, j'ai pu participer aux différentes étapes de la réalisation d'un projet de recherche en appréciant le rôle de chaque participants et leur collaboration. J'ai appris à travers ce travail, l'importance de trois facteurs essentiels : l'organisation, la traçabilité et le stockage des informations.

L'organisation et la planification des différentes étapes de la réalisation du travail sont fondamentales pour établir une bonne coordination du projet. Le temps accordé aux réunions de groupe pour discuter du déroulement et des divers éléments du travail est primordial. Il permet un consensus général de l'équipe sur les différentes prises de décision. La principale difficulté rencontrée lors dans ce travail était la coordination des plannings des différents membre de l'équipe. L'utilisation d'un outil de gestion en ligne et partagé aurait par exemple permis d'assurer un planning en accord avec la disponibilité de toute l'équipe et des salles et matériels nécessaires.

J'ai utilisé pour ce travail, un fichier Word® dans lequel je prenais note des différentes manipulations réalisées ainsi que leurs dates. Néanmoins, un cahier des charges avec en présentation un tableau recensant les différentes informations essentielles à l'expérience offrirait une certaine traçabilité des informations de manière systémique. De même, pour les données récoltées au fur et à mesure de l'avancement du travail, il est primordial d'installer une routine et de définir un lieu de stockage et sauvegarde des données pour permettre de les centraliser et de les rendre accessibles à l'ensemble de l'équipe à tout moment.

Ces trois éléments permettent d'établir un management de qualité au sein de l'équipe. Cela améliore la communication dans l'équipe et sécurise le projet. Le stockage centralisé des

données offre une sécurité supplémentaire et principalement un gain de temps pour le traitement et l'utilisation des données.

La planification d'une étude et sa réalisation demande beaucoup de temps et d'organisation. Il est primordial de prendre le temps de connaître son sujet et de réfléchir à tous les paramètres de réalisation du projet avant de le commencer. Se renseigner auprès de spécialistes et de la littérature pour assurer la bonne cohérence de l'étude et de sa faisabilité.

## Conclusion

Le projet a présenté de nombreux défis techniques et la sollicitation de différents corps de métier (physicien, ingénieurs, biologistes, chimistes, vétérinaires etc...). La machine de traitement HIFU n'était pas dédiée au traitement du petit animal, ce qui nous a demandé un certain nombre d'adaptations. Cela a également rendu les séances de traitement chronophages. Cependant, nous avons été capables de mettre en place un système de traitement et de suivi pour permettre le bon déroulement de cette expérience.

La méthode de suivi de la croissance tumorale est rapide et suffisante pour estimer la faisabilité de l'expérience. L'imagerie proton optimisée permet d'assurer le bon positionnement de l'animal par rapport à l'antenne et l'HIFU. Cependant, la qualité des images obtenues avec la séquence de thermométrie mériterait une meilleure résolution spatiale et une meilleure sensibilité pour un repérage du point d'échauffement plus précis. Pour la suite, la séquence ARFI devra être développée pour la remplacer. L'imagerie de fluorescence est un bon moyen de quantifier le Dir contenu dans les nanoparticules. La technique est suffisamment rapide et sensible. Néanmoins, l'addition d'une calibration dans le FOV était importante pour assurer une certaine linéarité des mesures au vu de la variabilité de la concentration du Dir dans les différents batch de nanogouttes produites par nos collaborateurs de l'université d'Avignon. L'IRM fluor nous a permis d'assurer la présence de PFOB dans la tumeur malgré une sensibilité et une résolution spatiale limitée.

Concernant l'analyse de nos résultats, nous notons la concentration la plus importante dans le temps à 24 heures dans les deux groupes. Ce modèle correspond à ce qui est décrit actuellement dans la littérature. Néanmoins, il serait intéressant d'évaluer cette dynamique dans une fenêtre plus courte les premières 24 heures jusqu'à 48 heures pour être capables de définir le point de concentration maximal au temps  $t$  de manière plus précise.

On observe également une augmentation importante de la médiane à ce temps dans le groupe traitement. Notre hypothèse consiste à dire que le traitement HIFU a eu un certain effet sur la concentration des nanoparticules grâce à une augmentation de la perméabilité. Il est néanmoins difficile d'affirmer de manière certaine que ce soit le cas. La stabilité et similitude

des valeurs observée à J0 et J3 entre les deux groupes pourrait justifier une dynamique similaire à ces temps indépendamment du traitement HIFU. Avec davantage de données à divers autres temps, cela permettrait de définir une fenêtre d'action du traitement HIFU plus précise, néanmoins nous l'estimons actuellement à 24 heures.

La forte variabilité de nos mesures à 24 heures expliquée dans nos hypothèses est difficilement justifiée ou prouvée avec les moyens que nous avons à disposition. Pour affiner les résultats de ce travail, une étude histologique permettrait de mieux décrire la nature des lésions ainsi que leur stade de développement. L'augmentation de la perméabilité pourrait également être évaluée en histologie mais également avec la mise en place d'un protocole d'imagerie proton et d'injection de produit de contraste en IRM.

Malgré les difficultés techniques et de timing, l'accomplissement de ce travail nous a permis de mettre en place un protocole de traitement et de suivi efficace pour la seconde phase de ce projet qui consiste à évaluer l'efficacité du traitement anti tumoral sono-activable. L'expérience a été riches en apprentissage et en partage, elle m'a personnellement beaucoup apporté. Elle a permis de soulever un certain nombre de question et de solutions à apporter tout au long du travail.

## Remerciements

Je souhaiterais remercier mon directeur de thèse le professeur Jean-Noël Hyacinthe et mon co-directeur le professeur Rares Salomir pour la confiance et le temps qu'ils m'ont accordés pour ce travail. Leurs enseignements et conseils m'ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances et compétences dans le domaine de la recherche et dans la physique appliquée à l'IRM.

Je remercie vivement le Professeur Eric Alleman d'avoir accepté de partager ses connaissances et sa clairvoyance au sujet de mon travail lors de ma présentation orale.

Je suis très reconnaissante envers Orane Lorton et Pauline Coralie Guillemain d'avoir été à mes côtés lors des diverses manipulations et de m'avoir fait part de leurs connaissances concernant la technique HIFU employée dans ce projet.

Dans le cadre de mes activités au laboratoire ITMI, je souhaiterais tout particulièrement remercier Yohan Van De Looij pour le temps qu'il m'a accordé à l'apprentissage de l'utilisation de la micro-IRM, au partage de son expertise, mais également aux manipulations qu'il a pu réaliser.

Mes remerciements vont également à Stéphane Germain qui m'a appris diverses manipulations sur les souris et qui a également su me soutenir et m'aider tout au long du projet.

Je remercie vivement Laurent Vinet qui m'a appris à utiliser la machine IVIS et qui m'a fait bénéficier de divers enseignements et de son expertise dans le cadre de l'imagerie de fluorescence.

Je souhaiterais également remercier Didier Colin pour son implication dans la production des cellules tumorales et ses divers conseils tout au long de ce projet.

Enfin, je remercie mes proches qui ont su me soutenir et m'épauler tout au long de ce travail. C'est grâce à toutes ces personnes que j'ai pu intégrer l'équipe et participer de manière active à ce projet.

## Bibliographie

Auboiroux, V. (2006). *Développement d'une nouvelle génération de transducteur HIFU IRM-compatible à capacité de déflexion élargie*. Claude Bernard Lyon, Lyon.

Auboiroux, V., Viallon, M., Roland, J., Hyacinthe, J.-N., Petrusca, L., Morel, D. R., ... Salomir, R. (2012). ARFI-prepared MRgHIFU in liver: Simultaneous mapping of ARFI-displacement and temperature elevation, using a fast GRE-EPI sequence. *Magnetic Resonance in Medicine*, 68(3), 932-946. <https://doi.org/10.1002/mrm.23309>

Barnett, S. (1998). WFUMB Symposium on Safety of Ultrasound in Medicine. Conclusions and recommendations on thermal and non-thermal mechanisms for biological effects of ultrasound. Kloster-Banz, Germany. 14-19 April, 1996. World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 24 Suppl 1, i-xvi, S1-58.

Bois, F. Y., Jamei, M., & Clewell, H. J. (2010). PBPK modelling of inter-individual variability in the pharmacokinetics of environmental chemicals. *Toxicology*, 278(3), 256-267. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.06.007>

Caliper. (2009). IVIS | Xenolight DiR Fluorescent Reagent for In Vivo Imaging.

Dillenseger, J.-P. (2018). Existe-t-il une place pour le MERM en recherche préclinique? *Le Manipulateur*, p. 36-43.

Doussot, M. (2016). *Caractérisation physique par IRM de nanoémulsions sonosensible*.

Fortina, P., Kricka, L. J., Surrey, S., & Grodzinski, P. (2005). Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition. *Trends in Biotechnology*, 23(4), 168-173. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.02.007>

Han, H., Lee, H., Kim, K., & Kim, H. (2017). Effect of high intensity focused ultrasound (HIFU) in conjunction with a nanomedicines-microbubble complex for enhanced drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 266, 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.022>

Hancock, H. A., Smith, L. H., Cuesta, J., Durrani, A. K., Angstadt, M., Palmeri, M. L., ... Frenkel, V. (2009). Investigations into Pulsed High-Intensity Focused Ultrasound-Enhanced Delivery: Preliminary Evidence for a Novel Mechanism. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 35(10), 1722-1736. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2009.04.020>

Hudlicky, M., & Pavlath, A. E. (Éd.). (1995). *Chemistry of organic fluorine compounds II: a critical review*. Washington, DC: American Chemical Society.

Hynnen, K. (2010). MRI-guided focused ultrasound treatments. *Ultrasonics*, 50(2), 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2009.08.015>

Kauskot, A., Manent, J., Chareyre, F., Cominetti, M., Chopin, M., Giovannini, M., ... Bonnefoy, A. (2007). L'imagerie par bioluminescence pour visualiser la progression tumorale et la métastase chez le petit animal. *Journal de la Société de Biologie*, 201(3), 223-228. <https://doi.org/10.1051/jbbo:2007032>

Li, X., Sui, Z., Li, X., Xu, W., Guo, Q., Sun, J., & Jing, F. (2018). Perfluorooctylbromide nanoparticles for ultrasound imaging and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine, Volume 13*, 3053-3067. <https://doi.org/10.2147/IJN.S164905>

Lorton, O., Guillemain, P., Mori, N., Crowe, L. A., Boudabbous, S., Terraz, S., ... Gui, L. (2018). Self-scanned HIFU ablation of moving tissue using real-time hybrid US-MR imaging. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1-1. <https://doi.org/10.1109/TBME.2018.2885233>

Lorton, O., Hyacinthe, J.-N., Desgranges, S., Gui, L., Klauser, A., Celicanin, Z., ... Salomir, R. (2018). Molecular oxygen loading in candidate theranostic droplets stabilized with biocompatible fluorinated surfactants: Particle size effect and application to in situ <sup>19</sup>F MRI mapping of oxygen partial pressure. *Journal of Magnetic Resonance*, 295, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2018.07.019>

Mirau, P. A., & Bovey, F. A. (1988). TWO-DIMENSIONAL NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY. In *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (p. 325-356). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091699-6.50011-8>

O'Neill, B. E., Vo, H., Angstadt, M., Li, K. P. C., Quinn, T., & Frenkel, V. (2009). Pulsed High Intensity Focused Ultrasound Mediated Nanoparticle Delivery: Mechanisms and Efficacy in Murine Muscle. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 35(3), 416-424. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2008.09.021>

OSAV. (2018). Information technique expérimentation animale. Consulté à l'adresse [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwiLg5CVhL7fAhXDyaQKHczQDQWYQFjAAegQICRAC&url=https%3A%2F%2Fwww.blv.admin.ch%2Fdam%2Fblv%2Ffr%2Fdokumente%2Ftiere%2Fpublikationen-und-forschung%2Ftierversuche%2Fklassifikation-schweregrad-tv.pdf.download.pdf%2F116104\\_FR.pdf&usg=AOvVaw1xDR\\_WWCd3FH0sO39orGOg](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwiLg5CVhL7fAhXDyaQKHczQDQWYQFjAAegQICRAC&url=https%3A%2F%2Fwww.blv.admin.ch%2Fdam%2Fblv%2Ffr%2Fdokumente%2Ftiere%2Fpublikationen-und-forschung%2Ftierversuche%2Fklassifikation-schweregrad-tv.pdf.download.pdf%2F116104_FR.pdf&usg=AOvVaw1xDR_WWCd3FH0sO39orGOg)

PerkinElmer. (2016). Advanced preclinical optical imaging. Consulté à l'adresse [https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-156819BRO\\_010572A\\_01\\_PRD\\_IVIS\\_Spectrum.pdf](https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-156819BRO_010572A_01_PRD_IVIS_Spectrum.pdf)

PET/MRI 3T. (2016). Consulté à l'adresse <http://www.rs2d.com/fr/imagerie-preclinique/collaboration-rs2d-mediso/tefirm-3t/>

Rego, J., & Tan, K. (2006). Advances in imaging-the changing environment for the imaging specialist. *The Permanente Journal*, 10(1), 26-28.

Rieke, V., & Butts Pauly, K. (2008). MR thermometry. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 27(2), 376-390. <https://doi.org/10.1002/jmri.21265>

Ruiz-Cabello, J., Barnett, B. P., Bottomley, P. A., & Bulte, J. W. M. (2011). Fluorine (<sup>19</sup>F) MRS and MRI in biomedicine. *NMR in Biomedicine*, 24(2), 114-129. <https://doi.org/10.1002/nbm.1570>

Shin, S. H., Park, E.-J., Min, C., Choi, S. I., Jeon, S., Kim, Y.-H., & Kim, D. (2017). Tracking Perfluorocarbon Nanoemulsion Delivery by <sup>19</sup>F MRI for Precise High Intensity Focused Ultrasound Tumor Ablation. *Theranostics*, 7(3), 562-572. <https://doi.org/10.7150/thno.16895>

Troy, T., Jekic-McMullen, D., Sambucetti, L., & Rice, B. (2004). Quantitative Comparison of the Sensitivity of Detection of Fluorescent and Bioluminescent Reporters in Animal Models. *Molecular Imaging*, 3(1), 9-23. <https://doi.org/10.1162/153535004773861688>

Vinckenbosch, E. (2018). *Ultra high magnetic field for glial contribution into brain metabolism studied by MR spectroscopy and CEST methods for molecular imaging of glycogen*. EPFL. Consulté à l'adresse <https://drive.switch.ch/index.php/s/DojYYriBjagK1RJ>

Wilhelm, S., Tavares, A. J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H. F., & Chan, W. C. W. (2016). Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1(5). <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>

Yezhelyev, M. V., Gao, X., Xing, Y., Al-Hajj, A., Nie, S., & O'Regan, R. M. (2006). Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *The Lancet Oncology*, 7(8), 657-667. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70793-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70793-8)

# Annexes

## Annexe 1 : Autorisation pour expérience sur animaux

 <p>REPUBLIQUE ET CANTON DE GENEVE Département de l'emploi, des affaires sociales et de la santé Direction générale de la santé Domaine de l'expérimentation animale</p>	<b>GE/140/17</b>
Direction générale de la santé, Rue Adrien-Lachenal 8, 1207 Genève Lucia Henchoz, personne responsable	<b>29362</b>

### Autorisation pour expériences sur animaux (Formulaire B)

Art. 18 al. 1 Loi fédérale sur la protection des animaux (LPA, RS455)

Directeur/trice de l'expérimentation animale  Marjolaine Philit	Institut  UNI DUFOUR rue du Général Dufour 24  1211 Genève 4 022 000 000
---	--

Directeur/trice de l'expérience

Lindsey Crowe

Titre de l'expérience

### Evaluation du potentiel d'un nouveau agent theranostique pour le cancer

Type de la demande

[N] nouvelle demande

Décision La demande fait partie intégrante de l'autorisation.

### Autorisée

Date de l'autorisation

**31.08.2017**

Valid From\_fr

**31.08.2017**

Autorisation valable jusqu'à

**30.09.2020**

Charges et conditions

- Les groupes expérimentaux ne comprendront que 8 souris et non 10.

Annexe 2 : Tableau des valeurs du signal IVIS mesurées à l'aide de MATLAB

DATE	mouse	time	volume	tumorSignalIntegral	tumorSignal/pente	signal/volume	J1:J0/J0	J3:J0/J0
<b>SERIE 1</b>								
10.09.2018	m1	JJ-18H51	0,2544	4,14E+06		1,63E+07	1,70	HIFU Oslo
11.09.2018	m1	J1-15H39	0,2544	1,12E+07		4,41E+07		
13.09.2018	m1	J3-22H27	0,2544	7,39E+06		2,91E+07		
17.09.2018	m1	J7-16H31	0,2544	5,39E+06				
13.09.2018	m2	JJ-22H18	0,2128	2,52E+06				
13.09.2018	m2	JJ-22H43	0,2128	2,98E+06		1,40E+07	1,29	ø
14.09.2018	m2	J1-16H06	0,2128	6,82E+06		3,21E+07		
13.09.2018 (14.09.18)	m4	JJ-01h11	0,5437	7,24E+06		1,33E+07	0,81	HIFU therm
14.09.2018	m4	J1-15H49	0,5437	1,31E+07		2,42E+07		
02.09.2018	m5	JJ-2h53		1,23E+06				
02.09.2018	m5	JJ-2h55		1,28E+06				
02.09.2018	m5	JJ-3h04		1,32E+06				
02.09.2018	m5	JJ-4h28	0,0726	2,57E+06		3,54E+07	1,92	ø
03.09.2018	m5	J1-12h53	0,0726	7,51E+06		1,03E+08		
05.09.2018	m5	J3-12h00	0,0726	4,89E+06		6,74E+07		
13.09.2018	m5	J1-11-22H35	0,0726	4,89E+06				
<b>SERIE 2</b>								
01.11.18	M1	JJ-23h44	0,523	1,31E+07	1,03E+03	1,96E+03	12,50	HIFU mec
02.11.18 (03.11.18)	M1	J1-02H16	0,523	4,04E+07		1,39E+04		
05.11.18	M1	J3-14H52	0,523	2,29E+07	3,18E+03	6,08E+03		
01.11.2018 (02.11.2018)	M3	JJ-00h06	0,4368	3,87E+07	5,65E+03	1,29E+04	2,43	ø
02.11.2018 (03.11.18)	M3	J1-02H14	0,4368	5,68E+07		4,43E+04		1,90
05.11.18	M3	J3-14H48	0,4368	5,79E+07	1,64E+04	3,76E+04		
01.11.18 (02.11.18)	M4	JJ-00H15	0,4678	3,48E+07	5,11E+03	1,09E+04	2,76	ø
02.11.18 (03.11.18)	M4	J1-02H08	0,4678	5,32E+07		4,11E+04		2,51
05.11.18	M4	J3-14H34	0,4678	6,51E+07	1,80E+04	3,84E+04		
01.11.18 (02.11.18)	M5	JJ-00H38	0,4045	1,32E+07	4,17E+03	1,03E+04	9,99	HIFU mec
02.11.18 (03.11.18)	M5	J1-2H25	0,4045	1,46E+08	4,58E+04	1,13E+05		
05.11.18	M5	J3-14H41	0,4045	5,44E+07	1,48E+04	3,67E+04		
05.11.18	M2	JJ-23H24	0,6071	4,33E+07	3,87E+03	6,38E+03	1,11	ø
06.11.18	M2	J1-21h57	0,6071	6,21E+07	8,18E+03	1,35E+04		
05.11.18 (PATTE)	M6	JJ-23H21	0,7534	3,55E+07	3,06E+03	4,07E+03	1,45	HIFU therm
06.11.18 (PATTE)	M6	J1-21H52	0,7534	5,83E+07	7,50E+03	9,96E+03		
<b>SERIE 3</b>								
29/11/2018	M1	JJ-16h45	0,1929	3,36E+06	7,97E+02	4,13E+03	2,92	ø
30/11/2018	M2	J1-16h53	0,1929	1,15E+07	3,12E+03	1,62E+04		2,64
02/12/2018	M3	J3-16h32	0,1929	1,10E+07	2,90E+03	1,50E+04		
<b>SERIE 4</b>								
08/12/2018	M1	JJ-23H05	0,3898	3,13E+06	8,59E+02	2,20E+03	1,86	HIFU mec
09/12/2018	M1	J1-20H24	0,3898	9,57E+06	2,45E+03	6,30E+03		16,89
11/12/2018	M1	J3	0,3898	1,17E+07	1,54E+04	3,94E+04		
		J1						
10.12.18	M2	JJ	0,1675	2,52E+06	7,62E+02	4,55E+03	2,52	HIFU mec
13.12.18	M2	J3	0,1675	6,85E+06	2,68E+03	1,60E+04		
10.12.18	M3	JJ	0,0214	8,04E+05	2,72E+02	1,27E+04	9,68	HIFU mec
11.12.18	M3	J1	0,0214	6,38E+06	2,90E+03	1,36E+05		0,85
13.12.18	M3	J3	0,0214	1,21E+06	5,02E+02	2,35E+04		

Annexe 3: Mesure des volumes des lésions tumorales aux différents temps

SERIE	MOUSE	J5	J7	J8	J9	J10	J12	J15
P1	M1		0,0879				0,3836	0,452
P1	M2		0,0589				0,2067	0,3272
P1	M3		0,0519				0,1246	0,4844
P2	M1			0,1226				
P2	M2			0,2677				
P2	M3			0,4868				
1	M1		0,0122					0,1458
1	M2		0,0146					0,0547
1	M3		0,0180					0,1429
1	M4		0,0177				0,0261	0,0493
1	M5		0,0138				0,0321	0,0708
2	M1			0,3328				
2	M2			0,3258				
2	M3			0,4208				
2	M4			0,3207				
2	M5			0,3250				
2	M6			0,2838				
3	M1	0,2115						
3	M2	0,2749						
3	M3	0,1667						
4	M1	0,1925				0,5950		
4	M2	0,1675					0,6690	
4	M3	0,0214					0,2733	

## Liste des figures et tableaux

Figure 1 Timing experience .....	10
Figure 2 Souris Nude Immunodéficente.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 3 Gradient d'écho T1 .....	12
Figure 4 Gradient d'écho T2* .....	12
Figure 5 Fast Spin Echo T2 .....	13
Figure 6 Fast Spin Echo T2 Fat Sat.....	13
Figure 7 Rendu volumique de la tumeur segmentée .....	13
Figure 8 ROI défini sur la séquence GRE T2* Axial .....	13
Figure 9 Représentation de Cram du PFOB.....	14
Figure 10 Particule de PFOB MODIF .....	15
Figure 11 Système HIFU IRM-compatible avec le transducteur à droite équipé de l'antenne et du système de monitoring et anesthésie de la souris. A gauche le générateur.....	16
Figure 12 Schéma du tir HIFU .....	17
Figure 13 Souris en position de traitement avec la fixation de l'antenne proton sur une base qui repose sur l'HIFU .....	18
Figure 14 Antenne proton et fluor avec l'interface permettant l'acquisition d'image fluor et proton.....	18
Figure 15 Séquence T1 vibe 2D – souris 3 série 2.....	20
Figure 16 T2_TSE_cor_2D S2 M3 souris 3 série 2 .....	20
Figure 17 Interface du logiciel utilisé pour le contrôle du tir. A) Image de phase transmise de la console IRM à l'ordinateur satellite qui contrôle le tir. Un ROI est dessiné en jaune sur l'image de phase pour le contrôle local de l'élévation de la température. B) Paramètre du tir C) Modélisation 3D du tir.....	21
Figure 18 Courbe représentant l'augmentation de la température jusqu'à environ 10 minutes pour une température maximale supérieur à 4° .....	22
Figure 19 Spectre 19F de la molécule de PFOB .....	23
Figure 20 Séquence fluor 24h post-injection pour la souris 3 série 2 avec présence de sphère témoin .....	23
Figure 21 Fichier TIF et cartographie couleur.....	25
Figure 22 Variabilité de mesure de volume 7 jours $\pm$ 1 jour post-greffe.....	26
Figure 23 Première souris injectée en rétro-orbitale et la deuxième intrapéritonéal; a. Imagerie de fluorescence 5 minutes post-injection. B. Imagerie de fluorescence 24h post-injection. C. Imagerie de fluorescence 72h post-injection.....	27
Figure 24 Comparaison entre efficacité de concentration selon le mode d'injection.....	28
Figure 25 Comparaison des traitements HIFU. L'analyse se base sur l'imagerie de fluorescence et les counts mesuré avec Matlab.....	29
Figure 26 Analyse des counts mesurés aux trois temps pour le groupe témoin .....	32
Figure 27 Dynamique des concentrations des souris du groupe témoin aux différents temps .....	33
Figure 28 Dynamique des concentrations des souris du groupe HIFU aux différents temps.....	36
Figure 29 Comparaison de la distribution des données aux différents temps entre le groupe témoin et traitement .....	37
Figure 30 Ce modèle simplifié décrit le mécanisme de diffusion des nanoparticules circulantes. On y représente par une constante K, la capacité de diffusion des nanoparticules de la circulation vers la tumeur et dans le sens inverse.....	40
Tableau 1 Paramètre des 4 séquences proton présentées .....	13
Tableau 2 Concentration de Dir contenu dans les différents échantillons de nanoparticules envoyés.....	15
Tableau 3 Paramètre de la séquence T1 vibe avec un grand FOV permettant la visualisation de la grille HIFU ..	19
Tableau 4 Paramètre de la séquence gradient d'écho T1 .....	20
Tableau 5 Paramètre de la séquence turbo spin écho T2.....	20
Tableau 6 Paramètre de la séquence de thermométrie .....	22
Tableau 7 Paramètre de la séquence IRM fluor .....	23
Tableau 8 Paramètres d'acquisition des mesures de l'imagerie de fluorescence .....	24
Tableau 9 Valeurs de l'intégrale des counts mesurés en imagerie de fluorescence à l'aide d'un ROI de 1 cm placé sur la tumeur. La mesure a été réalisée à l'aide du logiciel Living Image® pour les deux techniques aux trois temps. ....	27