



HAL
open science

DéTECTABILITÉ DES MATÉRIELS D'EMBOLISATION VASCULAIRE CONTRÔLÉE PAR IRM.

H. Jassar

► **To cite this version:**

H. Jassar. DéTECTABILITÉ DES MATÉRIELS D'EMBOLISATION VASCULAIRE CONTRÔLÉE PAR IRM.. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université de Technologie de Compiègne, 2009. Français. NNT : . tel-00455057

HAL Id: tel-00455057

<https://theses.hal.science/tel-00455057v1>

Submitted on 9 Feb 2010

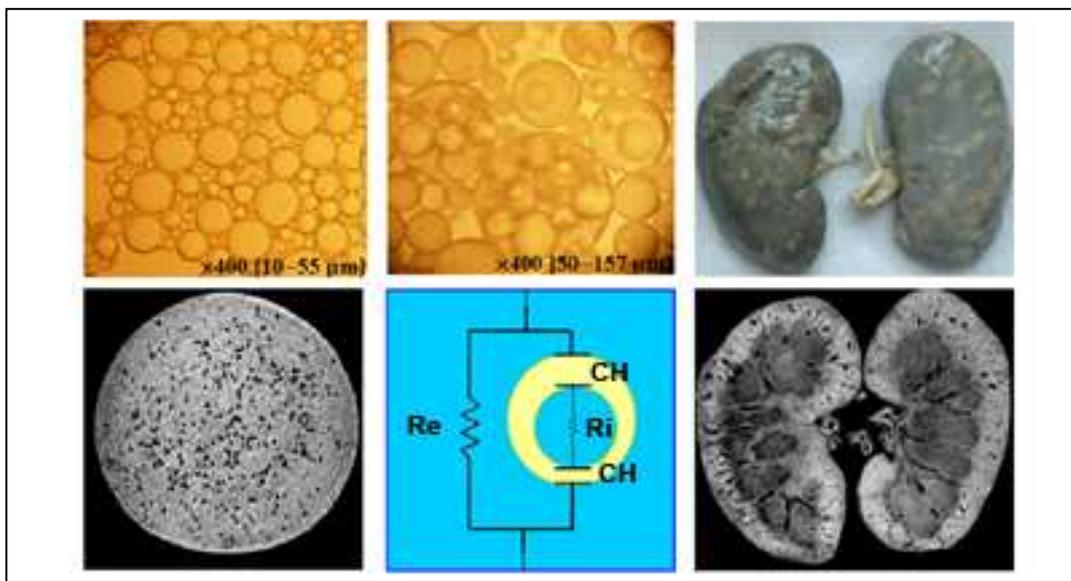
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

Par Hassan JASSAR

***DéTECTABILITÉ DES MATÉRIELS D'EMBOLISATION
VASCULAIRE CONTRÔLÉE PAR IRM***

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC.



Soutenue le : 22 Septembre 2009

Spécialité : Biomécanique et Bio-ingénierie

DéTECTABILITÉ DES MATÉRIELS D'EMBOLISATION VASCULAIRE CONTRÔLÉE PAR IRM

Soutenue le 22 Septembre 2009 devant le jury composé de :

Mme. Cécile Legallais	Directrice de Recherche CNRS, UTC	(Présidente)
M. André Briguët	Professeur, UCBL1	(Rapporteur)
M. Mohamad Khalil	Professeur, Université Libanaise	(Rapporteur)
M. François Langevin	Enseignant chercheur (HDR), UTC	(Directeur de thèse)
M. Francis Brunelle	Professeur (PU-PH), Necker, Paris	(Examineur)
M. Philippe Robert	PhD (R&D), GUERBET	(Examineur)

REMERCIEMENTS :

Ce travail de thèse a été effectué d'octobre 2005 à septembre 2009 sous la direction de M. François LANGEVIN. Je tiens à remercier cette personne qui m'a initié à la recherche lors de mon Master 2 et qui m'a soutenu et encouragé, d'une manière ou d'une autre, pendant les années de cette thèse au centre d'imagerie médicale avancée (CIMA).

M. André BRIGUET, ancien directeur du laboratoire RMN CNRS 5012, université Claude-Bernard (Lyon 1), a accepté d'être le rapporteur de cette thèse, et je l'en remercie, de même que pour sa participation au Jury. Il a également contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je lui en suis très reconnaissant.

En témoignage de mon profond respect, je remercie M. Mohamad KHALIL, professeur à l'Université Libanaise, faculté de Génie (Tripoli), de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteur.

Messieurs F. BRUNELLE, Professeur à l'Hôpital Necker de Paris, et Philippe ROBERT, Experimental Imaging Division Manager chez GUERBET GROUP (Roissy), m'ont fait l'honneur de participer au Jury de soutenance; je les en remercie profondément. Je pense ici en particulier à Mme Cécile LEGALLAIS, Directrice de recherche CNRS UTC, qui de plus m'a fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

Mes remerciements vont également à Dr. Alexandre LAURENT, directeur de Centre de Recherche en Imagerie Interventionnelles (CR2I), M. Philippe REB, BIOSPHERE MEDICAL, Mme Catherine BEDEL, laboratoire UMR 6022-CNRS UTC, Messieurs Jean-Marc GHERBEZZA et Patrick LANCELEUR, laboratoire UMR 6253-CNRS UTC, M. Jean-Luc DUVAL et Mesdames Agnès DROCHON et Clotilde VANHOUTTE, laboratoire UMR 6600-CNRS UTC, pour leur participation au projet et leur assistance matérielle qui m'ont permis de faire une thèse dans des bonnes conditions.

Je tiens à remercier tout le personnel du CIMA, et particulièrement Mme Christine DeBROUWER et M. Alain DONADEY de m'avoir rendu des services avec tant de sympathie et d'enthousiasme.

Je témoigne toute mon amitié aux collègues du laboratoire : Adnan ABDALMAJEED, Ayham DARWICH, Vincent ZALC, Zaher KHARBOUTLY et Maher SABBAH avec qui j'ai eu de très intéressantes discussions scientifiques.

Je tiens aussi à remercier les amis thésards dont l'aide sur le plan technique ont permis de mener à bout cette thèse : Aude GAUTIER et Benoît CARPENTIER pour la fabrication des billes d'alginate, Samah DOUMIATI pour le greffage des IgG sur les Hépasphères™, Julien NAMUR pour avoir les microsphères de Tris-acryl chargées avec le SPIO, Adoum TRAORE NDAMA et Marie-Valérie MORENO pour utiliser l'impédancemètre.

Je ne saurais oublier mes parents et tous les membres de ma famille qui m'ont sans cesse encouragé et soutenu tout au long de mes études, en me laissant entièrement libre de mes choix.

Enfin, je témoigne ma vivante reconnaissance devant celui qui tout m'a donné.

RESUME EN FRANCAIS :

L'embolisation artérielle a récemment émergé sur le plan interventionnel comme un traitement sûr et efficace pour arrêter une hémorragie ou induire la dévascularisation d'un tissu cible. La visualisation directe des agents d'occlusions vasculaires n'est pas toujours possible. L'estimation de leur position dans la branche vasculaire en se basant sur la distribution de produit opaque aux rayons X est partiellement incorrecte. Un marquage des agents d'occlusion vasculaire est souhaitable pour leur suivi par IRM pendant l'intervention ou *a posteriori*, ce, notamment en raison de la diffusion de l'IRM comme modalité d'imagerie anatomique et interventionnelle.

Dans ce travail, plusieurs protocoles ont été établis pour repérer des agents d'occlusion vasculaire marqués avec le SPIO, *in situ*, *in vitro* et dans des "conditions" *in vivo*, sous IRM 1,5T et 3T. Les agents d'occlusion étudiés sont des microsphères de tris-acryl (Embosphère®), et des microparticules ou microcapsules utilisées éventuellement comme vecteurs de principes actifs : parmi celles-ci, des microsphères gonflables (Hépasphère™) non dégradables ont été marquées, et des microbilles d'alginate et des systèmes d'émulsions dégradables réalisés par nos soins. L'établissement de protocoles de détectabilité sous IRM a impliqué le choix de séquences et l'optimisation des paramètres de ces séquences, le choix de l'antenne, ainsi que la mise au point d'une quantité suffisante de marqueur dans les agents d'occlusion afin qu'ils soient visibles à l'IRM. Une méthodologie de mesure de faible variation de l'intensité du signal des images IRM a été développée. Un modèle expérimental *in vitro* a été conçu avec la présence des microparticules marquées dans un environnement simulant grossièrement une vascularisation tumorale et son drainage veineux. La fixation des immunoglobulines (IgG1), équivalentes aux anti-VEGF, sur des microsphères (Hépasphères™) a été étudiée. Enfin, les propriétés mécaniques et électriques des systèmes de microémulsions ont été explorées par ultrasons et par impédancemétrie.

MOTS-CLES :

IRM	SPIO	Embolisation	Impédancemétrie
Microparticules	Microémulsions	Anti-VEGF	Alginate
Ultrasons	IgG1	Interventionnel	Non uniformité
Tris-acryl	Embosphère®	Hépasphère™	

ABSTRACT :

Arterial embolization appeared recently as a safe and an effective treatment to stop bleeding or induce devascularisation of a target tissue. Direct visualization of vascular occlusion agents is not always possible. The estimation of their position inside a vascular branch based on the distribution of X-ray contrast agent is partially incorrect. Marked vascular occlusion agents with MRI contrast agent is a good way for MRI follow-up during or after the intervention.

In this work, several protocols have been established to demonstrate the feasibility localization of vascular occlusion agents marked with SPIO, *in situ*, *in vitro* and *in vivo* “conditions”, at 1,5T and 3T. Studied occlusion agents were tris-acryl microspheres (Embosphere[®]), and microparticles or microemulsions possibly used as vehicles for drugs : among these, inflatable microspheres (Hepasphere[™]) aimed to permanent vessel occlusion were marked, alginate microspheres and emulsion droplets for temporary embolization were made by us. Established protocols for microspheres follow-up by MRI involve selection of MR sequences with optimized parameters, coil choice, and determination of contrast agent quantity inside the microparticles in order to make them visible on MRI. A measurement methodology for small variation of signal intensity in images has been proposed. An experimental *in vitro* model has been designed with the presence of SPIO marked microparticles in an environment simulating a vascular tumor with venous drainage. The fixation of immunoglobulin (IgG1), equivalent to anti-VEGF, to microspheres (Hepaspheres[™]) has been studied. Finally, mechanical and electrical properties of microemulsions have been explored by ultrasound and impedancemeter.

KEYWORDS :

IRM	SPIO	Embolization	Impedancemeter
Microparticles	Microemulsions	Anti-VEGF	Alginate
Ultrasound	IgG1	Interventional	Inhomogeneity
Tris-acryl	Embosphere [®]	Hepasphere [™]	

PUBLICATIONS

[1] H. Jassar, F. Langevin. Labelled microspheres assessment using 1.5T scanner for embolization follow up. *5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging ISBI*, From Nano to Macro; 189–192, May 2008.

[2] H. Jassar. Marked microspheres assessment using 1.5T scanner for embolization follow up. *16th International for magnetic resonance in medicine ISMRM*; 2995, May 2008.

[3] H. Jassar, F. Langevin. Marked droplet emulsion assessment using 1.5T scanner for embolization follow-up. *26th European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology ESMRMB*; 225, Octobre 2009.

Table des matières

Chapitre 1 :	Physiologie microvasculaire saine et tumorale.....	7
Chapitre 2 :	Mesure de faible variation du signal image en IRM...35	
Chapitre 3 :	Délectabilité des matériels d'embolisation.....	89
Chapitre 4 :	Perspectives pour le relargage des principes actifs...160	

TABLE DES MATIERES	1
INTRODUCTION	1
CHAPITRE.1	7
1.1 Architecture des vaisseaux au sein d'un tissu normal	9
1.1.1 Structure de la paroi artérielle	11
1.1.1.1 Intima	11
1.1.1.2 Media.....	12
1.1.1.3 Adventice.....	12
1.1.2 Structures des réseaux capillaires.....	14
1.1.3 Structure de la paroi veineuse	17
1.2 Architecture des vaisseaux au sein d'un tissu tumoral	20
1.3 Angiogénèse.....	22
1.3.1 Angiogénèse tumorale.....	22
1.3.1.1 Facteurs angiogéniques activateurs et inhibiteurs (anti-angiogéniques).....	24
1.4 Hémodynamique vasculaire et microenvironnement tumoral.....	29
1.4.1 Flux sanguin.....	30
1.4.2 Taux de consommation en oxygène et oxygénation d'un tissu tumoral.....	31
1.4.3 Consommation de glucose	32
1.4.4 pH tumoral	32
1.5 Embolisation artérielle par cathéter.....	33
CHAPITRE.2.....	35
2.1 Description du phénomène physique de Résonance Magnétique Nucléaire	38
2.1.1 Principe physique.....	39
2.1.2 Séquences IRM	43
2.1.2.1 Séquence (SPGR)	44
2.1.2.2 Séquence Spin Echo (SE) et Fast Spin Echo (FSE).....	46
2.1.2.3 Séquence Balanced steady state-state free precession (Balanced SSFP).....	48
2.1.3 Produits de contraste	49
2.1.3.1 Effet de l'agent de contraste sur les temps de relaxation.....	49
2.1.3.2 Catégories d'agent de contraste et taux ou vitesse de relaxation.....	50
2.1.3.3 Effet de l'agent de contraste sur le signal image	52
2.1.4 Antennes	55
2.1.4.1 Antennes volumique.....	58
2.1.4.2 Antennes de surface.....	58
2.2 Sensibilité des antennes de surface en fonction de la profondeur	59
2.2.1 Sensibilité des antennes de surface en fonction de la profondeur	59
2.2.1.1 Matériels et Méthodes	59
2.2.1.2 Résultats et discussion.....	61
2.2.2 Sensibilité des antennes de surface en fonction de la largeur d'une direction transversale	63
2.2.2.1 Matériels et méthodes.....	63
2.2.2.2 Résultats et discussion.....	64
2.3 Sources des défauts d'intensité.....	67

2.3.1	Imageur	67
2.3.2	Séquence IRM.....	68
2.3.3	Objet.....	68
2.3.4	Corrections des défauts d'intensité en IRM	69
2.3.4.1	Méthodes de pré-traitement	69
2.3.4.2	Méthodes de post-traitement	70
2.3.5	Méthodologie de mesure et de correction	72
2.3.5.1	Position du problème.....	72
2.3.5.2	Principe de la méthode de correction	73
2.3.5.3	Matériels et méthodes.....	73
2.3.5.4	Résultats et discussion	81
2.4	Conclusion.....	87
CHAPITRE.3.....	89
3.1	Les types d'agents d'occlusion vasculaire principaux	93
3.1.1	Propriétés physicochimiques des microparticules :.....	95
3.1.2	Intérêts de la visualisation des microparticules sous IRM	96
3.2	Détectabilité de microsphères en gélatine de Tris-acryl	97
3.2.1	Premiers essais de détectabilité : modèles ex vivo et in vitro	97
3.2.2	Optimisation de la détectabilité des Microsphères de Tris-acryl	103
3.2.2.1	Premier facteur : choix de la séquence et de l'antenne.....	104
3.2.2.2	Deuxième facteur : optimisation selon le type d'agent de contraste.....	104
3.2.2.3	Troisième facteur : optimisation des acquisitions.....	112
3.2.2.4	Quatrième facteur : Effet de l'intensité du champ B_0 sur le SPIO.....	118
3.2.2.5	Résultats	119
3.2.2.6	Discussion	121
3.3	Détectabilité des HépasphèresTM	122
3.3.1	Matériels et méthodes	123
3.3.1.1	Préparation-1 : expansion initiale des Hépasphères TM dans du sérum physiologique puis addition d'un agent de contraste.....	124
3.3.1.2	Préparation-2 : expansion des Hépasphères TM dans une solution de sérum physiologique contenant préalablement un agent de contraste	124
3.3.1.3	Préparation-3 : préparation-2 avec pré-marquage léger des Hépasphères [®]	125
3.3.1.4	Préparation-4 : préparation-2 avec pré-marquage fort des Hépasphères [®]	126
3.3.1.5	Rinçage.....	126
3.3.1.6	Préparation des boîtes de Pétri.....	127
3.3.1.7	Séquences IRM.....	128
3.3.2	Résultats et discussions.....	128
3.3.2.1	Préparation-1 : expansion initiale des Hépasphères TM dans du sérum physiologique puis addition d'un agent de contraste.....	128
3.3.2.2	Préparation-2 : expansion des Hépasphères TM dans une solution de sérum physiologique contenant préalablement un agent de contraste	129
3.3.2.3	Préparation-3 : préparation-2 avec pré-marquage léger des Hépasphères [®]	130
3.3.2.4	Préparation-4 : préparation-2 avec pré-marquage fort des Hépasphères [®]	132
3.3.2.5	Conclusion.....	133
3.4	Détectabilité des billes d'alginate.....	134
3.4.1	Généralités et structure.....	135
3.4.2	Matériels et méthodes	136
3.4.3	Protocole expérimental	137
3.4.3.1	Etape-1 : préparation d'une solution d'alginate avec le marqueur	137
3.4.3.2	Etape-2 : extrusion et polymérisation de la solution d'alginate marquée	138
3.4.3.3	Préparation du support.....	139
3.4.3.4	Séquence IRM	139

3.4.4	Résultats.....	139
3.4.4.1	Encapsulation du Dotarem®.....	139
3.4.4.2	Encapsulation de l'Endorem®.....	140
3.4.5	Discussions.....	141
3.5	Délectabilité de différents types de gouttelettes d'émulsion eau-huile.....	142
3.5.1	Introduction.....	142
3.5.2	Généralités et structure.....	143
3.5.3	Matériels et Méthodes.....	151
3.5.3.1	Emulsion simple : eau dans l'huile.....	151
3.5.3.2	Emulsion double : eau dans l'huile dans l'eau.....	152
3.5.3.3	Préparation du support et images microscopiques.....	153
3.5.3.4	Imagerie par RM.....	154
3.5.4	Résultats.....	154
3.5.5	Discussion.....	155
3.6	Conclusion.....	158
CHAPITRE.4.....	160
4.1	Influence du drainage veineux sur le contenu des Hépasphères en SPIO.....	163
4.1.1	Position du problème.....	163
4.1.2	Matériels et méthodes.....	164
4.1.2.1	Matériels.....	164
4.1.2.2	Protocole de suivi.....	166
4.1.3	Résultats et discussion.....	177
4.1.3.1	Hépasphères™.....	177
4.1.3.2	Liquide de perfusion.....	180
4.1.3.3	Discussion.....	183
4.1.4	Conclusion : confrontation du signal du liquide prélevé et celui des Hépasphères.....	191
4.2	Greffage des immunoglobulines sur les Hépasphères™ avec et sans marqueur.....	192
4.2.1	Objectif.....	193
4.2.2	Procédures de couplage IgG-Hépasphères.....	194
4.2.2.1	Conditions pour la réaction de couplage.....	195
4.2.3	Matériels et méthodes.....	196
4.2.4	Résultats et discussion.....	198
4.2.4.1	Dosage et confirmation qualitative de l'avidine couplée aux Hépasphères™.....	199
4.2.4.2	Microscopie électronique à transmission.....	201
4.2.4.3	Biotinylation des anticorps.....	201
4.2.4.4	Stabilité dans un flux du complexe avidine-Hépasphère™ avec Endorem®.....	202
4.2.4.5	Dosage et confirmation qualitative du complexe Hépasphère-avidine-IgG.....	203
4.2.5	Conclusion.....	203
4.3	Caractérisation mécanique et électrique des gouttes et globules d'émulsion simple et double.....	204
4.3.1	Introduction.....	205
4.3.2	Préparation d'émulsions simple et double.....	208
4.3.3	Caractérisation mécanique par ultrasons.....	210
4.3.3.1	Matériels et méthodes.....	210
4.3.3.2	Résultats et discussion.....	212
4.3.4	Caractérisation électrique.....	217
4.3.4.1	Matériels et méthodes.....	217
4.3.4.2	Résultats et discussion.....	219
4.4	Conclusion.....	228
CONCLUSION.....	230

BIBLIOGRAPHIE	234
ANNEXE	258
NOTATION	275

Introduction

Depuis le début des années 80, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) connaît un essor considérable. C'est une modalité avant tout anatomique mais aussi fonctionnelle, cependant, elle fait appel à des différents processus physiques, recelant d'autres informations, potentiellement intéressantes sur le plan interventionnel dans des applications médicales, comme le guidage d'un outil en temps réel où l'imagerie de contrôle thermique par exemple.

Parmi ces informations, l'excellent contraste de l'IRM, généralement pour les tissus mous et particulièrement pour le microenvironnement tumoral (Hypoxie, pH, volume), revêt un intérêt particulier avec des images acquises dans tous les plans de l'espace. Par ailleurs, l'imagerie rapide, avec ou sans injection d'un agent de contraste, permettant une cadence d'image proche du "temps réel", offre la possibilité de quantifier les flux dans la vascularisation tumorale. Pour cela, les informations données par l'IRM en font une technique prometteuse et compétitive pour la radiologie interventionnelle. Celle-ci regroupe des techniques, peu invasives, permettant d'exercer une action thérapeutique en cheminant par les voies naturelles, qu'il s'agisse du réseau digestif, biliaire, urinaire ou vasculaire. Les techniques d'embolisation intra-artérielle par cathéter représentent une part importante de la radiologie interventionnelle vasculaire sous rayons X. Elles nécessitent l'utilisation de différents agents d'occlusion vasculaire. La plupart de ces agents utilisent des biomatériaux qui restent en place de façon définitive après embolisation.

L'embolisation artérielle a récemment émergé comme un traitement sûr et efficace pour arrêter une hémorragie ou induire la dévascularisation d'un tissu cible. Elle est systématiquement utilisée comme traitement palliatif chez des patientes qui présentaient un fibrome utérin hémorragique avec des contre-indications opératoire ou pré-opératoire, la tumeur bénigne la plus fréquente du pelvis chez 25% des femmes dans l'âge reproductif [Buttram1981]. Elle est aussi utilisée pour le traitement des carcinomes de foie, le troisième type de cancer malin et le plus mortel [Parkin2005] inopérable et non-transplantable chez plus de trois quart des patients [Lewis2006]. L'embolisation connaît actuellement un regain d'intérêt dans la prise en charge de plusieurs genres de néoplasies et également des malformations artério-veineuses [White2000 ; Yakes1997]. Les résultats cliniques obtenus par ce traitement sont généralement encourageants dans plusieurs applications médicales. Particulièrement, l'embolisation des fibromes utérin a démontré une efficacité comme traitement

alternatif à l'hystérectomie (ablation de l'utérus) de l'utérus tout en préservant le potentiel de fertilité de la femme [Stancato-Pasik1997 ; Pelage2005].

Il est en effet clair que le diagnostic d'une affection et son suivi par procédure de radiologie interventionnelle augmentent régulièrement et font, de plus, appel à un outil permettant la discrimination entre les tissus sains et pathologiques. Un outil tel que l'IRM est non-invasif et non irradiant pour le patient ainsi que pour le médecin. Il s'agit, dans ce cas, d'étudier la morphologie des organes et les modifications liées au traitement, et de mesurer également le flux. Cependant, l'IRM ne s'intéresse que rarement aux gestes de traitement interventionnel, notamment les matériels d'embolisation vasculaire dont la visualisation directe n'est pas toujours possible. Par ailleurs, la radiologie ne permet pas réellement de visualiser des agents d'occlusion après leur injection. Les interventionnistes comptent sur la distribution de l'agent de contraste radio-opaque mélangé avec les microparticules pour en déduire l'occlusion des vaisseaux et ensuite leur localisation. Cette technique n'est pas fiable dans la mesure où après embolisation le produit de contraste ne peut plus circuler ni en amont ni en aval de l'embolie. Ceci a pour conséquence directe de rendre invisible la branche vasculaire cible et donc de laisser partiellement inconnue l'anatomie du réseau vasculaire, ce qui peut entraîner des erreurs d'embolisation de quelques centimètres.

Un marquage des agents d'occlusion injectables par des produits de contraste permettrait une visualisation directe de l'agent d'embolisation pendant l'intervention sous contrôle IRM en temps réel, ou *a posteriori* sans faire la scopie par rayons X. La détection des agents d'occlusions est donc aujourd'hui un enjeu pour la communauté médicale afin de déterminer leurs positions intra-vasculaires en fonction de leur calibre. Le choix du calibre est fait en fonction de la taille des artères à occlure et en fonction de leur efficacité au cours de l'embolisation mesurée par l'obtention ou non d'un ralentissement circulatoire. La détermination des shunts artério-veineux au sein des tumeurs reste cependant imprécise. Quelques études de traçage à l'aide d'un marqueur isotopique [Schroth1996] ont permis de vérifier la taille des shunts. L'obtention des particules marquées devrait permettre leur localisation immédiatement au cours de l'embolisation. Dans ce sens, des agents trop larges ne seraient visibles qu'en périphérie du tissu embolisé, sans remplissage dans les vaisseaux intra-tissulaires. Réciproquement, des particules trop petites peuvent rejoindre la circulation veineuse. De plus, la visibilité en IRM de microparticules permet d'apprécier, après embolisation, leur tenue dans le temps. Le vaisseau embolisé à une certaine position peut être

débouché par les pulsations artérielles provoquant le déplacement de microparticules plus en aval [Dion1986], ou l'occlusion peut être temporaire et les particules se désagrègent avec le temps.

Depuis une vingtaine d'années, la chimioembolisation par des microparticules transportant des agents anticancéreux se révèle être également une approche prometteuse pour cibler localement les cellules cancéreuses [Gregoriadis1977], notamment les carcinomes hépatocellulaires. Elle devrait surmonter la faiblesse de la dose de l'agent thérapeutique injecté par voie systémique par infusion intraveineuse [Maatman1986 ; Willmot1987]. Le ralentissement du taux dans le flux sanguin, après occlusion intra-artérielle par la chimioembolisation, augmente la concentration locale de l'agent anticancéreux [Anderson1981] ce qui a pour conséquence une amélioration de la réponse tumorale hépatique [oberfield1979]. Cependant, cette amélioration n'est pas totalement satisfaisante chez tous les patients en raison de la diminution rapide de la dose de l'agent thérapeutique qui pourrait être emporté par le flux dans les shunts-artérioveineux (drainage veineux). Ceux-ci laissent passer 30% du sang artériel irriguant une tumeur maligne [Endrich1982, Weiss1979, et Vaupel 1989].

D'ailleurs, malgré l'efficacité de la chimioembolisation, elle a récemment démontré un effet paradoxal après son utilisation dans le traitement des carcinomes du foie. Plus de métastases intra et extra-hépatique et l'augmentation de la sécrétion des facteurs de croissance vasculaire (VEGF) circulant dans le plasma sanguin apparaissent après la chimioembolisation [Li2004, Xiong2004, Kim2001].

A cet effet, nous avons orienté notre travail de recherche, d'une part sur le marquage d'agents d'occlusion vasculaire et d'autre part sur les conditions d'association de molécules actives sur ces agents d'occlusion avec des agents anti-VEGF.

Cette thèse contribue à répondre à certains aspects de ces problèmes, spécialement celui des agents d'occlusion vasculaire qui sont souvent utilisés en routine clinique et qui pourraient être marqués par un agent de contraste visible à l'IRM. A cet effet, plusieurs protocoles ont été établis concernant le choix d'une séquence, l'optimisation de paramètres de cette séquence et la mise au point d'une quantité suffisante de marqueur dans les microparticules pour qu'elles soient visibles à l'IRM. Pour améliorer la détection des microparticules marquées en condition *in vivo*, la recherche d'un compromis idéal entre le rapport signal sur bruit (S/B), le temps d'acquisition et la

résolution spatiale s'avère nécessaire. Une méthodologie de quantification précise du signal mesuré sur les images RM a été développée. Puis les conditions de dissociation d'un marqueur et d'accrochage des anticorps sur des microsphères ont été explorées, enfin les caractéristiques mécaniques et électriques des émulsions, dont la neutralité chimique est particulièrement intéressante, ont été étudiées.

Ce manuscrit comporte quatre chapitres composés de la manière suivante :

Le premier chapitre donne quelques éléments sur la physiologie micro-vasculaire et le microenvironnement d'un tissu sain et d'une tumeur.

Le deuxième chapitre aborde l'étude des séquences et des paramètres IRM avec lesquels les microparticules pourraient être visualisées sous IRM. Dans ce cadre, nous avons essayé des séquences qui sont souvent utilisées dans la routine clinique. Les caractéristiques des antennes sont aussi étudiées car leur choix a un impact important sur les résultats. Les facteurs contribuant à la détérioration de la précision et de la fiabilité d'un algorithme d'analyse quantitative des images RM sont présentés en soulignant grossièrement l'effet des défauts d'intensité, ainsi que les méthodes de correction pré et post-traitement proposées, et notre contribution a été de développer une méthodologie de correction amenant à une quantification précise du signal IRM mesuré.

Le troisième chapitre concerne la détectabilité des agents d'occlusion vasculaire par IRM, mise au point par des essais expérimentaux. Les agents étudiés sont des microparticules marquées (microsphères de Tris-acryl), ainsi que des microparticules et microcapsules utilisées éventuellement comme vecteurs de drogues. Parmi celles-ci, des microsphères gonflables (HépasphèresTM) ont été marquées, et de plus des microbilles d'alginate et des émulsions ont été réalisées par nos soins. Ce chapitre contient également une étude du compromis entre le temps d'acquisition imposé pour les acquisitions en conditions *in vivo*, de la résolution et du choix de l'antenne afin d'obtenir le meilleur signal possible. La quantité du marqueur mise dans les agents d'occlusions est bien définie afin qu'ils soient visibles à l'IRM. Des essais de détectabilité sont réalisés sur un imageur IRM d'intensité 1,5T et 3T.

Enfin, le quatrième chapitre étudie des perspectives de relargage des principes actifs, anti-cancéreux ou d'anti-angiogénèse à partir des agents d'occlusion vasculaire. Les facteurs physiologiques tumoraux qui pourraient avoir un rôle principal dans la diminution de l'efficacité des principes actifs après leur relargage ainsi que dans la

dissociation du marqueur des microparticules sont brièvement soulignés, notamment le drainage veineux. A cet effet, un modèle expérimental *in vitro* avec la présence des HépasphèresTM marquées dans un microenvironnement simulant grossièrement une vascularisation tumorale et son drainage veineux a été conçu. Le signal du liquide de drainage est quantifié, et la méthode proposée précédemment permettant la détermination d'une très faible quantité de produit relargué, a été utilisée. Des tentatives de greffage des immunoglobulines (IgG1), équivalents aux anti-VEGF, sur des microsphères ont réalisées en collaboration avec des biochimistes. Une exploration des propriétés mécaniques et électriques des couples eau et huile, pouvant constituer des véhicules inertes pour les principes actifs, est prise en considération.

Chapitre.1

Physiologie microvasculaire saine et tumorale

**Architecture et hémodynamique
vasculaire, angiogénèse
embolisation par micro-cathéter**

Sommaire :

1. CHAPITRE	7
1.1 Architecture des vaisseaux au sein d'un tissu normal	9
1.1.1 Structure de la paroi artérielle	11
1.1.1.1 Intima	11
1.1.1.2 Media.....	12
1.1.1.3 Adventice.....	12
1.1.2 Structures des réseaux capillaires.....	14
1.1.3 Structure de la paroi veineuse	17
1.2 Architecture des vaisseaux au sein d'un tissu tumoral.....	20
1.3 Angiogenèse.....	22
1.3.1 Angiogenèse tumorale.....	22
1.3.1.1 Facteurs angiogéniques activateurs et inhibiteurs (anti-angiogéniques).....	24
1.4 Hémodynamique vasculaire et microenvironnement tumoral.....	29
1.4.1 Flux sanguin.....	30
1.4.2 Taux de consommation en oxygène et oxygénation d'un tissu tumoral.....	31
1.4.3 Consommation de glucose	32
1.4.4 pH tumoral	32
1.5 Embolisation artérielle par cathéter	33

Ce chapitre bibliographique est focalisé sur la physiologie micro-vasculaire et le microenvironnement d'un tissu sain et d'une tumeur dans le but bien comprendre la différence qui existe entre ces deux situations du point de vue de la microcirculation sanguine, de l'angiogénèse c'est à dire du processus de la formation de néo-vaisseaux sains ou pathologiques, et enfin de la résistance à l'encontre des opérations thérapeutiques.

Nous abordons dans les paragraphes 1.1 et 1.2 l'architecture des vaisseaux au sein d'un tissu normal et tumoral, ensuite nous décrivons l'angiogénèse et les facteurs de croissance vasculaire (1.3), puis nous donnons quelques éléments sur l'hémodynamique vasculaire dans les deux cas. Nous présentons le comportement du microenvironnement tumoral en ce qui concerne le métabolisme, le pH, et l'approvisionnement en O₂ et en éléments nutritifs (1.4), enfin nous faisons part de notre intérêt pour la voie de traitement tumoral de l'embolisation ou de l'occlusion artérielle des fibromes utérins chez la femme (1.5).

1.1 Architecture des vaisseaux au sein d'un tissu normal

Un tissu normal dans le corps humain est alimenté par un flux sanguin circulant dans une toile vasculaire close composée d'artères, d'artérioles, de capillaires, de veinules et de veines (Figure 1-1). Cette arborescence vasculaire se caractérise par une densité uniforme et une architecture régulière (Figure 1-2). Le sang, liquide complexe et hétérogène, véhicule dans un sens unique des substances, nutriments et dioxygène, indispensables aux organes à travers les artères et les gros vaisseaux qui s'organisent en rameaux d'artérioles de plus en plus nombreux et étroits à mesure qu'ils s'approchent des tissus. Puis, au contact des organes, le sang circule dans des réseaux sanguins de plus en plus ramifiés et fins, les capillaires. Le sang sortant des capillaires est rassemblé par des veinules et des veines de plus en plus grosses à mesure qu'elles s'éloignent des tissus. Les déchets sont conduits vers les reins et le dioxyde de carbone vers les poumons.

La géométrie et la structure de la paroi vasculaire paraissent essentielles à la compréhension de l'hémodynamique vasculaire en situation physiologique normale et

anormale (cas d'une tumeur). Chaque section de l'arborescence vasculaire a sa forme géométrique, son propre comportement viscoélastique des parois, et son propre diamètre (Figure 1-3). Une modification des propriétés géométriques et structurales des vaisseaux (architecture irrégulière) et de leur paroi (manque des fibres élastiques et des éléments contractiles), aboutissent à une perfusion hétérogène du milieu irrigué (résistance au flux), ensuite une altération métabolique et physiologique tissulaire.

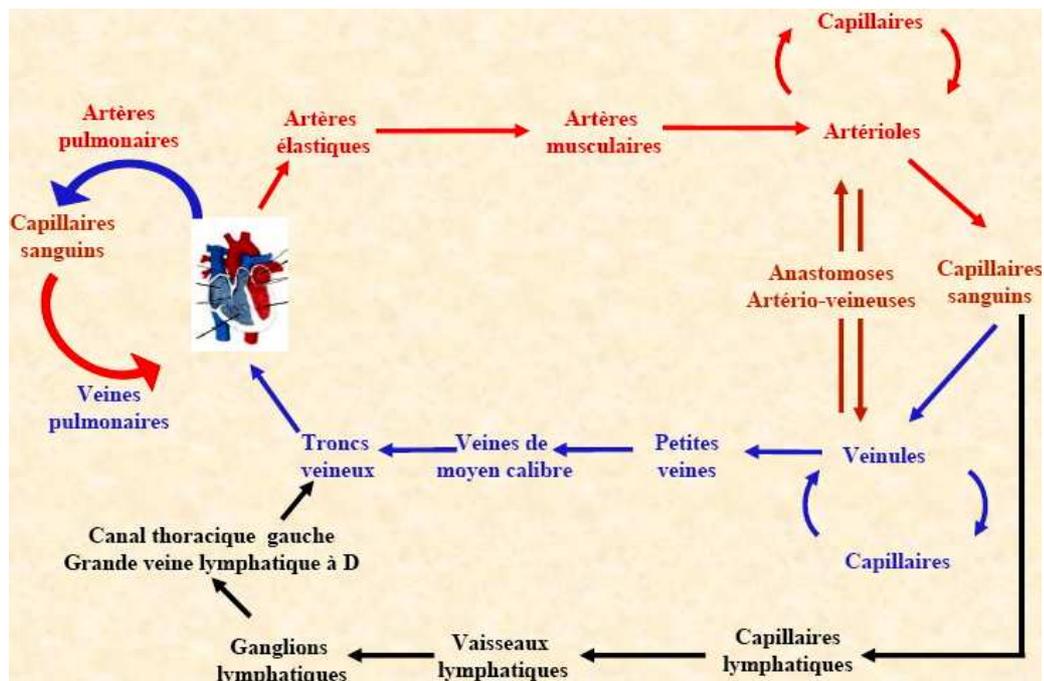


Figure 1-1 : Organisation générale de l'architecture vasculaire. [Heymann2005]

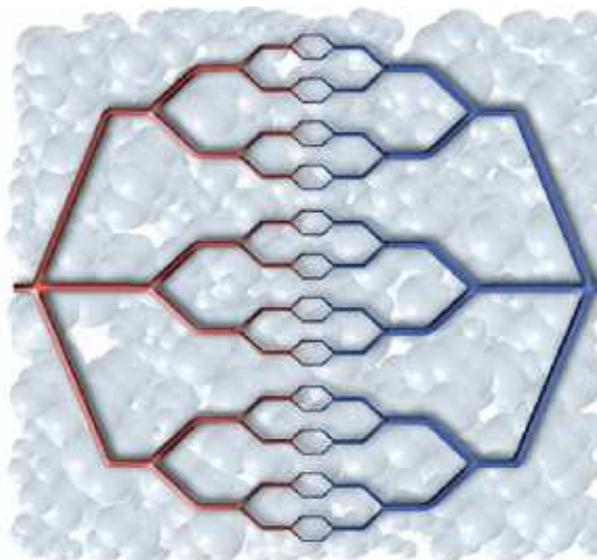


Figure 1-2 : Représentation schématique d'une structure micro vasculaire normale bien organisée. La couleur rouge correspond au sang artériel oxygéné, le bleu correspond au sang veineux dépourvu d'oxygène, et le violet correspond au sang pauvrement oxygéné. [Jain2002]

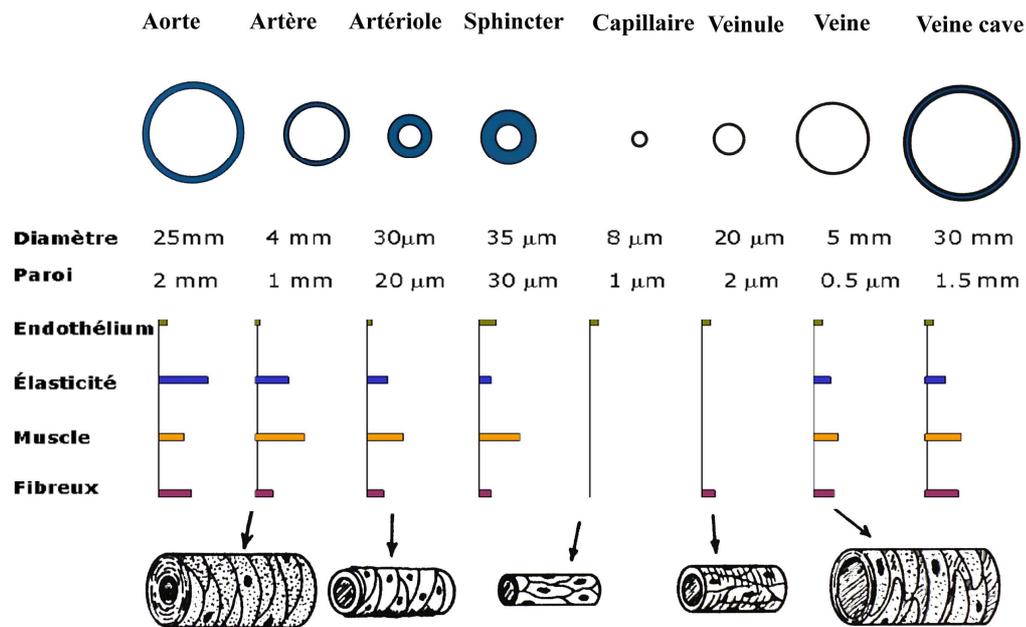


Figure 1-3 : Schéma représentatif de la taille, de l'épaisseur et de la composition relative (endothélium, élasticité, muscle, fibreux) de la paroi, pour différente section de la vascularisation. D'après [Holtz1996].

1.1.1 Structure de la paroi artérielle

La paroi artérielle est constituée de trois tuniques disposées de manière concentrique de la cavité endoluminale vers la périphérie du vaisseau (Figure 1-4). Ces tuniques, de l'intérieur vers l'extérieur, sont l'intima, la média, et l'adventice.

1.1.1.1 Intima

C'est la tunique la plus interne et la plus fine de la paroi artérielle, elle est en contact direct avec le sang. Elle est composée:

- D'une couche monocellulaire de cellules endothéliales dont l'épaisseur est d'environ 15 µm. Cette couche repose sur une lame basale riche en collagène et sur un tissu conjonctif¹ sous-endothélial fibro-élastiques assurant un rôle mécanique de glissement de l'endothélium sur les couches sous-jacentes, un rôle de diffusion des nutriments et de métabolites. Le tissu conjonctif sous-endothélial peut être le siège de manifestations pathologiques (réactions inflammatoires) [Munsch1995] et également le

¹ Tissus conjonctifs (TC) : Tissus dont les cellules sont séparées par la matrice extracellulaire formée de fibres de collagène et élastiques, contrairement aux épithéliums où les cellules sont jointives. Leur rôle est d'unir, soutenir, protéger et d'isoler les organes du corps.

siège de la formation de dépôts lipidiques plus ou moins calcifiés (plaque d'athérome).

Les cellules endothéliales ont plusieurs rôles [Camilleri1987] : une première fonction est celle de barrière de perméabilité, et concerne la pénétration contrôlée des composantes sanguines (molécules et cellules) destinées à nourrir les parties internes de l'artère et à en assurer la défense. Une fonction est celle de maintien du sang à l'état liquide (activités d'hémostase), et enfin une troisième fonction est celle de calibration du diamètre vasculaire (sécrétion des substances vasocontractantes ou vasorelaxantes) [Tedgui1994].

- D'une limitante élastique interne (LEI), une couche bien individualisée (épaisseur 40-80 μm) de fibre élastique (élastine) séparant l'intima de la média. L'intima est séparée de la LEI par un espace virtuel acellulaire : la zone sous-endothéliale (endartère).

1.1.1.2 Media

C'est la tunique moyenne de l'artère et la plus épaisse. Elle est limitée par les limitantes élastiques interne et externe (**LEI et LEE**), épaisses lames d'élastine percées de fenestrations. Ces ouvertures sont suffisamment grandes pour permettre le passage bidirectionnel de substances et de cellules. La média est constituée par l'empilement concentrique d'unités lamellaires formées de cellules musculaires lisses entourées d'une matrice conjonctive constituée des protéines fibreuses et élastique (élastine, collagène) et de mucopolysaccharides². Cette media assure les fonctions propres à la paroi dans la région considérée (élasticité et modification de calibre présentés par la diminution du diamètre de l'artère lors de contraction, appelée vasoconstriction, et par la vasodilatation lors du relâchement) selon des proportions variables de lames élastiques et de fibres musculaires lisses.

1.1.1.3 Adventice

C'est la tunique externe de la paroi vasculaire, séparée de la média par la LEE. Cette tunique est composée : d'un tissu conjonctif peu organisé riche en collagène et en

² Mucopolysaccharides : Molécules de sucre de longue chaîne souvent localisées dans un liquide visqueux, le mucus.

fibres élastiques, contenant des fibroblastes³ et des cellules adipeuses. D'une enveloppe qui assure l'ancrage des artères aux structures avoisinantes. D'un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés permettant une stimulation des cellules musculaires lisses dans la média et une dilatation ou diminution du calibre de la paroi. Cette tunique est irriguée par un réseau microvasculaire, le vasa vasorum, qui assure la nutrition de l'adventice et de la partie externe de la média.

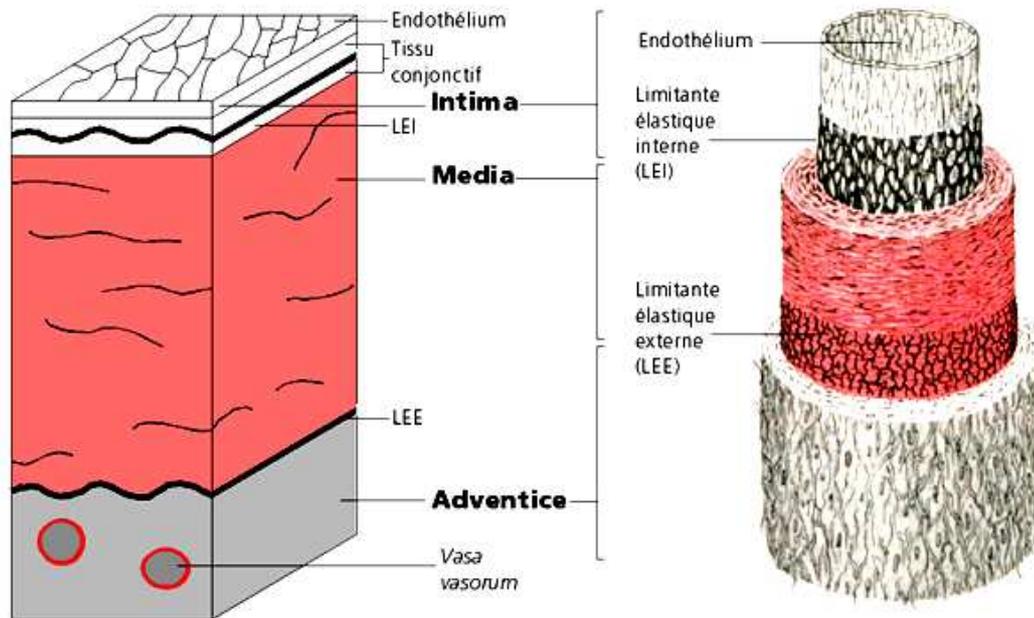


Figure 1-4 : Structure de la paroi artérielle. D'après [Kahle1990].

La structure histologique des artères (intima, média et adventice) diffère selon le segment vasculaire considéré et elle conduit à des fonctions différentes (Figure 1-5). Il existe trois types d'artères : *les artères élastiques*, *les artères musculaires* et *les artérioles*.

- *les artères élastiques* correspondent aux plus gros vaisseaux (diamètre entrée : 10-20 mm) [Mc Donald1974] dont la lumière est ronde et la paroi est relativement peu épaisse par rapport au diamètre (aorte, artères pulmonaires, carotides, sous-clavières). Elles sont de type élastique, riche en élastine afin d'amortir l'onde systolique, et de transformer le débit cardiaque discontinu en courant sanguin-semi continu [Lavabre-Bertrand2005].

³ Fibroblastes : Cellules du tissu conjonctif qui produisent la substance fondamentale de la matrice extracellulaire comme la collagène, l'élastine, la fibronectine et les protéoglycanes.

- les artères musculaires font suite aux précédentes mais avec un calibre moindre (diamètre entrée : 1-10 mm), une lumière arrondie en coupe, une paroi relativement épaisse par rapport au diamètre, et des fibres musculaires prédominantes [Frayon2005]. Leur rôle est de distribuer le sang aux différents territoires et d'adapter le débit aux besoins métaboliques de la région. Pour cela, la média dans ce type d'artères est très riche en fibres musculaires lisses capables d'ajuster le calibre.
- les artérioles, dont le calibre est fin (diamètre entrée : 0.008-0.06 mm) [MCDonald1974], font suite aux artères musculaires pour déboucher sur un réseau capillaire. Leur rôle est de contrôler le débit sanguin vers les capillaires d'un tissu selon une vasodilatation artériolaire (ceci entraîne une augmentation du débit sanguin vers les capillaires) ou une vasoconstriction artériolaire (ceci entraîne une diminution du débit sanguin vers les capillaires). La vasomotricité artériolaire (vasodilatation et vasoconstriction) est réglée par des sphincters pré-capillaires, anneaux en cellules musculaires lisses, situés à l'extrême des artérioles (Figure 1-8).

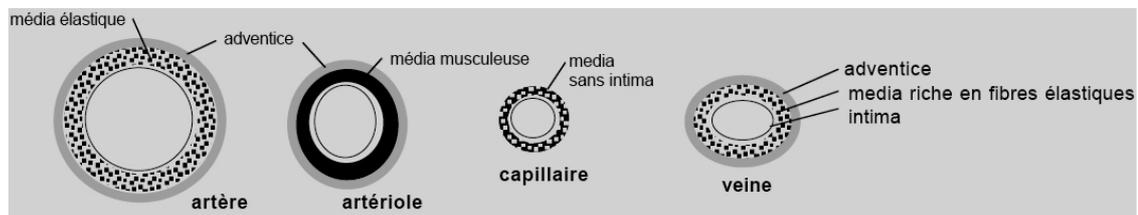


Figure 1-5 : Structure simplifiée de la paroi des vaisseaux sanguins. Les artères sont toujours plus circulaires en coupe que les veines.

1.1.2 Structures des réseaux capillaires

Ce sont les vaisseaux les plus fins de l'organisme (5-10 μm) [Mc Donald1974]. Ils sont disposés en réseau enchevêtré entre une artériole et une veinule au sein même des organes, à l'exception des endroits où ils s'articulent entre deux artérioles (glomérule rénal) ou entre deux veinules (drainage du sang venu de la veine porte du foie). C'est à leur niveau que se produisent les échanges entre le sang et le compartiment interstitiel en fournissant aux cellules les nutriments et le dioxygène et en transportant les déchets et le dioxyde de carbone éliminés.

La paroi des capillaires, très mince, n'est formée que d'une seule couche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale. Ces vaisseaux sont dépourvus de

média et d'adventice, en plus de cellules contractiles (cellules musculaires lisses). Donc ils sont incapables de réaliser une vasoconstriction ou une vasodilatation.

Selon la structure de leur paroi, les capillaires peuvent être divisés en trois catégories : *les capillaires non fenestrés* (continus), *les capillaires fenestrés* et *les capillaires discontinus* (sinusoïdes) (Figure 1-6).

Les capillaires non fenestrés, dont les cellules endothéliales unies par des jonctions serrées, sont présents dans la plupart des territoires de l'organisme (peau, cerveau, muscle et poumon). L'absence des pores intercellulaires contraint le transport des fluides et des solutés par des vésicules qui résultent d'une invagination continue de la membrane plasmique des cellules endothéliales (pinocytose) (Figure 1-7). Un tel arrangement convient aux organes particulièrement exposés aux microbes extérieurs, tel le poumon, ou aux organes où il est extrêmement critique que le passage de substances soit très sélectif et contrôlé, tel le système nerveux central. *Les capillaires fenestrés*, dont les cellules endothéliales séparées par des pores (400-800 Å) [Jain1988], s'observent dans les organes où les échanges sont intenses (glomérules rénaux, intestin et glandes endocrines) (Figure 1-7). *Les capillaires discontinus*, dont les ouvertures entre les cellules endothéliales sont larges et la membrane basale est absente ou discontinue, se trouvent essentiellement dans les organes responsables de la production des éléments cellulaires du sang (rate, foie et moelle osseuse). Ce type de capillaire permet un passage facile du plasma et des cellules sanguines.

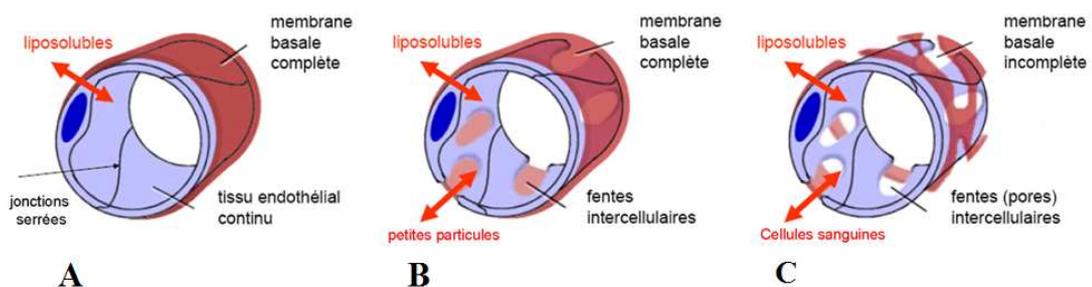


Figure 1-6 : Structure générale de la paroi d'un capillaire. (A) Capillaire continu, (B) Capillaire fenestré, (C) Capillaire discontinu.

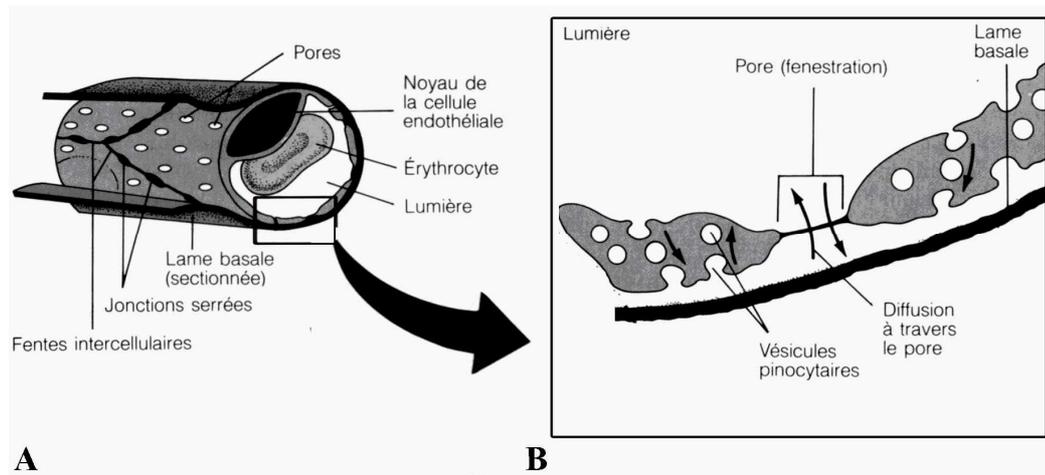


Figure 1-7 : (A) Structure d'un capillaire fenestré. Les capillaires continus sont semblables, mais ils sont dépourvus de pores. (B) Deux de quatre voies de passage possibles à travers la paroi d'une cellule endothéliale (en coupe transversale), la voie pore (fenestration) correspond au capillaire fenestré et la voie vésicules pinocytaires correspond au capillaire continu. [Marieb1993]

Les capillaires se divisent en trois catégories selon la complexité de ramification : *le capillaire de jonction, le réseau de capillaires vrais et l'anastomose artério-veineuse* (Figure 1-8). *Le capillaire de jonction ou métartériole*, de 200 μm de diamètre, est sur lequel centré le réseau capillaire. Sa paroi contient des péricytes (cellules contractiles non musculaire) qui n'assurent pas une fermeture complète de ce type de capillaire. *Le réseau de capillaires vrais*, de 4-10 μm de diamètre, concerne des embranchements anastomosés entre les capillaires artériels et veineux auxquels s'opèrent les échanges des gaz respiratoires et substances diverses entre le sang et les tissus. Au début de chaque capillaire, une valve ou sphincter précapillaire formé d'un ensemble de cellules musculaires lisses dont le rôle est de contrôler le débit dans le capillaire suivant les besoins cellulaires. *L'anastomose⁴ artério-veineuse* met directement en communication une artériole et une veinule sans de nombreux embranchements intermédiaires. A ce niveau, l'artériole est particulièrement riche en fibres musculaires qui permettent de contrôler le débit du sang passant dans le réseau capillaire. Ces shunts se trouvent dans les régions où le sang varie significativement au cours du temps : peau, bout de doigts, thyroïde, lèvres, etc.

⁴ Anastomose : S'agit de connexion entre vaisseaux sanguins.

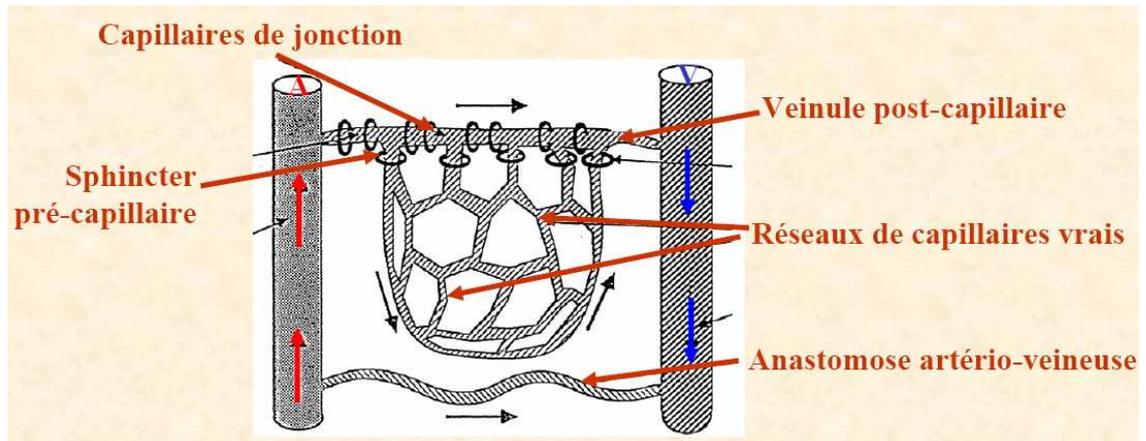


Figure 1-8 : Schéma typique d'un capillaire de jonction, d'un réseau capillaire, ou d'une anastomose artérioveineuse qui sont enchevêtrés entre l'artériole à gauche (en rouge) et la veinule à droite (en bleu). [Heymann2005]

1.1.3 Structure de la paroi veineuse

A la fin du réseau capillaire, les vaisseaux convergent pour former la veinule post-capillaire (Figure 1-8) à partir de laquelle un nouveau système vasculaire commence par des veinules, des veines moyennes et des grosses veines.

La structure des parois veineuses est comparable à celle des artères, mis à part la présence de valvules ou clapets qui sont situés tous les quatre à cinq centimètre, pour empêcher le reflux et imposer un sens unique à la circulation du sang (Figure 1-9). Les veines ont des parois plus minces et une compliance plus élevée (capacité de distension) que celle des artères de même calibre. La structure histologique des veines comprend les trois tuniques classiques : l'intima, la media et l'adventice. L'intima est faite d'un endothélium, doublé d'une basale et d'un conjonctif sous endothéliale. La média comprend un mélange, en proportions variables, de fibres musculaires lisses, de fibres collagènes et élastiques. L'adventice est faite de tissu conjonctif pouvant contenir quelques faisceaux musculaires lisses.

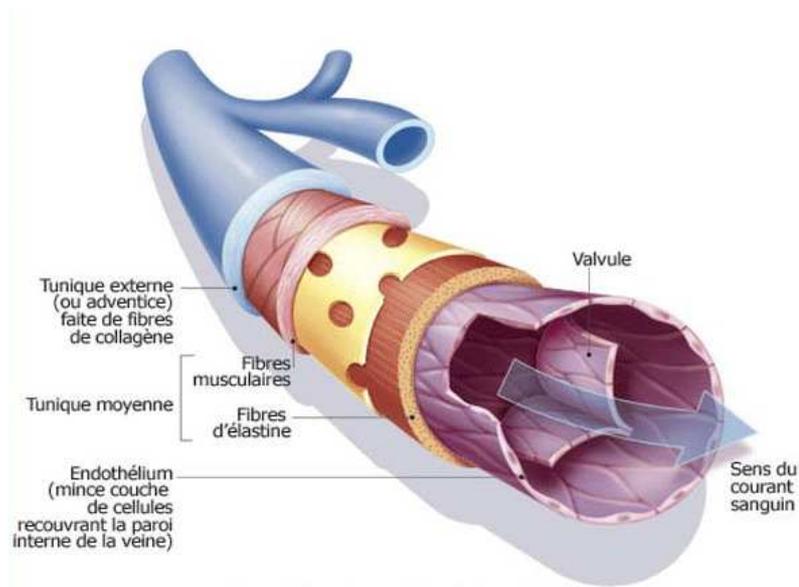


Figure 1-9 : Schéma représentatif des différentes parties de la paroi d'une veine. [Illustration médicale et didactique réalisée par Sophie Jacobin2004]

Les veines peuvent être classifiées selon la structure microscopique de leur paroi qui évolue quand on s'éloigne du réseau capillaire ou selon l'anatomie et la fonction. Selon la structure des parois, *les veinules post-capillaires*, avec un diamètre de 10-25 μm [Frayon2005], ont une couche de cellules endothéliales soutenues par une lame basale et une adventice de fibres de collagène et de fibroblastes. C'est le site préféré des cellules sanguines pour migrer dans les tissus. Les veinules post-capillaires convergent pour former *les veinules musculaires*. Elles ont une paroi riche en cellules musculaires lisses, apparaissant entre l'endothélium et le tissu conjonctif. *Les veinules musculaires* fusionnent pour former les veinules collectrices (20-50 μm de diamètre), aboutissant à une série de veinules et de veines de diamètre progressivement croissant et de structure pariétale plus développée, où les trois tuniques (intima, média et adventice) sont plus individualisées. A ce niveau, la structure pariétale des veines devient alors comparable à celle des artères, mais, dans les veines, la média est beaucoup plus mince et l'adventice, composée principalement de fibres de collagène, constitue la majeure partie de la paroi, (Figure 1-10).

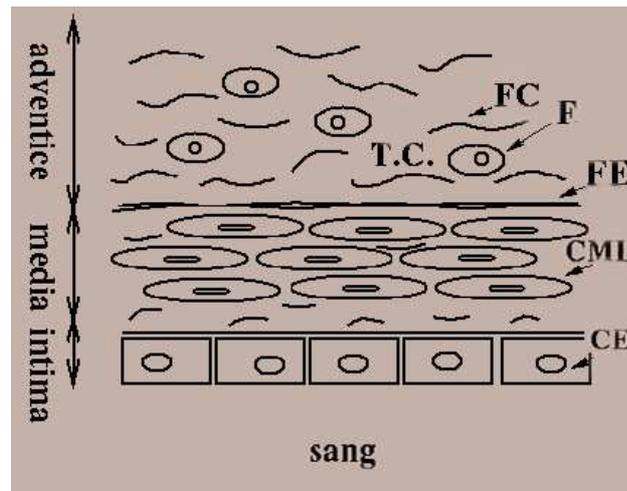


Figure 1-10 Structure microscopique de la paroi veineuse. **TC** : tissu conjonctif, **FE** : fibre élastiques, **FC** : fibres collagènes, **F** : fibrocytes, **CML** : cellules musculaires lisses, **CE** : Cellules endothéliales.

Selon l'anatomie et la fonction, les veines se différencient en trois catégories: les *veines de drainage*, les *veines collectrices* et les *veines centrales* [Lemaire1983].

Les *veines de drainage* font partie d'un tissu et conduisent le sang en dehors des organes. Elles forment le versant veineux de la circulation capillaire. Elles sont classifiées en :

- Microveinules, 8-100 μm de diamètre, reçoivent le sang des organes et se réunissent pour former les microveinules d'écoulement.
- Miniveinules, dont le diamètre est compris entre 100 et 300 μm , possèdent une paroi dont la structure musculaire est susceptible de mettre hors circuit une partie du territoire capillaire (sphincter postcapillaire). Parallèlement, des anastomoses artério-veineuses contrôlable par contraction sur le versant artériolaire constituent de véritables shunts de l'unité capillaire qui débouchent dans les veinules dont le diamètre est compris entre 300 et 500 μm .

Les *veines collectrices profondes* reçoivent par de nombreuses branches le sang des tissus des différents organes pour le conduire vers les structures centrales. La valeur moyenne de leur diamètre est de 5 mm.

Les *veines centrales* sont les derniers collecteurs terminaux qui conduisent directement le sang veineux à l'oreillette droite. Il s'agit de la veine cave supérieure et de la veine cave inférieure.

1.2 Architecture des vaisseaux au sein d'un tissu tumoral

La tumeur est une excroissance des tissus provoquée par la prolifération anormale de certaines cellules qui se multiplient plus rapidement que les cellules voisines. La tumeur est formée à partir de la transformation par mutation et/ou instabilité génétique, d'une cellule initialement normale. La transformation cellulaire tumorale se traduit notamment par une perte de contrôle du cycle cellulaire, une insensibilité à la mort cellulaire programmée ou à l'apoptose et des anomalies de répartition de l'ADN.

Dans une tumeur, la structure microvasculaire est complètement différente de celle d'un tissu normal. C'est une structure chaotique, les vaisseaux sont typiquement dilatés, tortueux, non organisés en artérioles, capillaires, et veinules (Figure 1-11). Les vaisseaux sanguins, au sein d'une tumeur, sont classifiés en neuf catégories selon leur structure et leur caractéristique [Warren1979]. Catégorie (1), artères et artérioles ; (2), capillaires non fenestrés ; (3), capillaires fenestrés ; (4) capillaires discontinus (*sinusoïdes*) ; (5) canaux sanguins sans une couche endothéliale ; (6) bourgeons capillaires ; (7) veinules post-capillaires (*capillaires géants*) ; (8) veinules et veines ; et catégorie (9), anastomoses artério-veineuses. Mis à part les canaux sanguins (catégorie 5) et les bourgeons capillaires (catégorie 6), les vaisseaux tumoraux restant ont une structure analogue à celle des vaisseaux dans le tissu normal, mais, avec la présence des cellules tumorales dans la couche monocellulaire de cellules endothéliales [Hammersen1985].

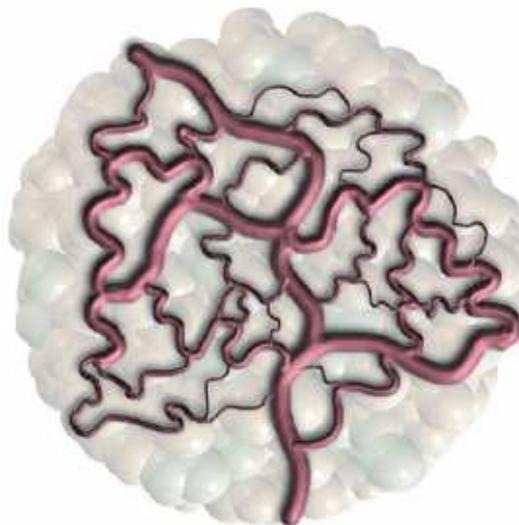


Figure 1-11 Structure microvasculaire chaotique dans une tumeur. [Jain2002]

On va détailler la structure microvasculaire à partir de la catégorie (5) jusqu'à la catégorie (9) du point de vue de leur importance dans la progression et la métastase tumorale. Catégorie (5) canaux sanguins : leur paroi est dépourvue de cellules endothéliales. Leur présence dans un certain type tumoral permet au sang de passer parmi et autour des cellules tumorales [Warren1979]. Les globules rouges sont en contact direct avec les cellules tumorales. Catégorie (6), bourgeons capillaires : ils sont formés par le processus d'angiogénèse tumoral concernant la néovascularisation qui sera expliquée ultérieurement. Ces bourgeons peuvent être du type effilé ou sacculaire selon le calibre de la lumière. Les cellules endothéliales qui recouvrent la paroi interne de ces néovaisseaux diffèrent de celles rencontrées dans les vaisseaux normaux [Cliff1965]. Par conséquent, ces néovaisseaux sont extrêmement fragiles, ils sont entourés par des globules rouges et des dépôts de fibrine en raison d'hémorragie locale. Catégorie (7), veinules post-capillaires : ces vaisseaux sont tortueux et larges en diamètre. Au contraire des veinules post-capillaires normaux, ces vaisseaux sont dépourvus d'une membrane basale. Par conséquent les cellules cancéreuses passent plus facilement dans le sang (intravasation vasculaire) [Jain1987]. Catégorie (8), veinules et veines : ces vaisseaux sont aussi tortueux, sacculaires, et dilatés. Leur contenu en débit sanguin et oxygène change avec le temps. Catégorie (9), les anastomoses artério-veineuses : ces anastomoses se trouvent en grande quantité dans une tumeur. Elles concernent un shunt direct des capillaires du côté artériel vers le côté veineux.

D'après cette représentation même succincte sur l'architecture vasculaire dans une tumeur, il est possible que le parcours du sang entre le côté artériel (catégorie 1) et veineux (catégorie 8) se fasse à travers les vaisseaux de la catégorie 2 jusqu'à la catégorie 7, ou directement à travers les shunts artério-veineuses. Il est encore possible que le parcours du sang soit dans le même côté veinule (catégorie 8) par l'intermédiaire des capillaires non-fenestrés (catégorie 2) jusqu'aux veinules post-capillaires (catégorie 7). D'ailleurs, la circulation du sang à travers une certaine architecture vasculaire tumorale dépend également de la zone tumorale si elle est bien perfusée, semi-nécrosée, ou complètement nécrosée.

1.3 Angiogénèse

L'étude bibliographique présentée dans les paragraphes précédents, concernant l'architecture vasculaire et sa structure pariétale dans un tissu normal et tumoral, nous permet, dans ce paragraphe, de souligner le processus de l'angiogénèse du point de vue son déclenchement et son rôle dans des différentes situations.

Le processus d'angiogénèse concerne la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, essentielle dans la vie pré- et post-natale pour la croissance et l'hémostase (processus de coagulation et de cicatrisation) [Pepper2000]. Il prend naissance par bourgeonnement, sous l'effet des stimuli hormonaux ou dans des conditions ischémiques, à partir d'une microcirculation préexistante (capillaires) [Folkman1995 ; Scahper1996 ; Riseau1997]. Ce processus s'observe durant la vie embryonnaire [Wagner1994], lors de la maturation de la muqueuse utérine durant le cycle menstruel [Kamat1995] et lors la réparation tissulaire concernant la cicatrisation d'une blessure cutanée [Singer1999]. En dehors de ces situations, l'angiogénèse est absente des tissus normaux. Un défaut de régulation spatiale et temporelle peut conduire à une angiogénèse excessive contribuant à la croissance des cellules cancéreuses et aux métastases [Folkman1971].

1.3.1 Angiogénèse tumorale

Le détail du processus de l'angiogénèse est fondamental pour comprendre, dans les chapitres suivants, les stratégies thérapeutiques nécessaires pour inhiber le développement tumoral.

La cellule cancéreuse est à l'origine une cellule normale qui a subi une transformation par l'intermédiaire des changements génétiques distincts. Ces changements comprennent une activation d'un oncogène⁵, une perte de télomérase⁶ et une induction d'une aneuploïde⁷ [Hahn2002]. La phase tumorale débute par une phase prévasculaire où la taille est inférieure ou égale à 2-3 mm³, et, à partir d'une certaine

⁵ Oncogène : Gène, à l'origine normal, a subi une mutation pour provoquer l'apparition des tumeurs.

⁶ Tolomérase : Enzyme qui, lors de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes, permet de conserver la longueur des chromosomes.

⁷ Aneuploïde : Cellule qui présente un nombre anormal de chromosomes.

taille tumorale, on observe une transition vers une phase vasculaire, appelée «angiogenic-switch» (induction vasculaire tumorale) (Figure 1-12) [Folkman1995]. D'où, une dépendance étroite entre la croissance tumorale et le développement vasculaire [Folkman1971]. Les cellules tumorales dans la phase prévasculaire sont dormantes, elles prolifèrent rapidement, sans développement néovasculaire, jusqu'à ce qu'elles atteignent un taux d'équilibre avec le taux de mort cellulaire programmée (apoptose). A ce stade, des bourgeons vasculaires issus de vaisseaux préexistants sont recrutés par le processus d'angiogénèse tumorale afin d'accorder les besoins cellulaires en oxygène et en nutriments (Figure 1-13) [Folkman1990 ; Filder1994 ; Rafii2002]. Les bourgeons vasculaires recrutés sont accompagnés d'une mobilisation des progéniteurs⁸ endothéliaux et d'une surexpression des facteurs angiogéniques⁹ par les cellules tumorales.

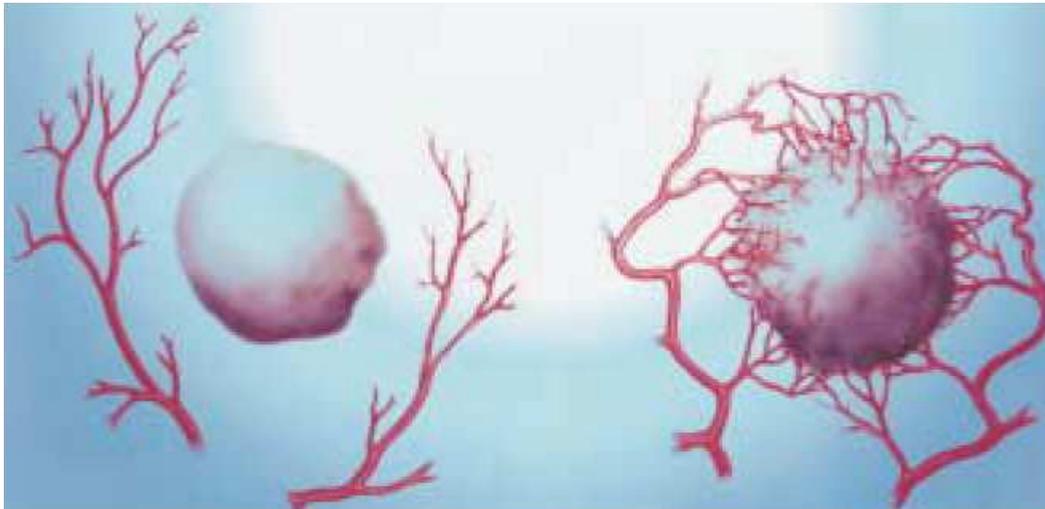


Figure 1-12 Schéma d'un «switch» angiogénique qui illustre la transition d'une phase prévasculaire (image à gauche) à une phase vasculaire (image à droite). [Folkman1974]

⁸ Progéniteurs endothéliaux : Cellules souches qui se différencient en cellules endothéliales.

⁹ Facteurs angiogéniques : Protéines qui activent l'angiogénèse.

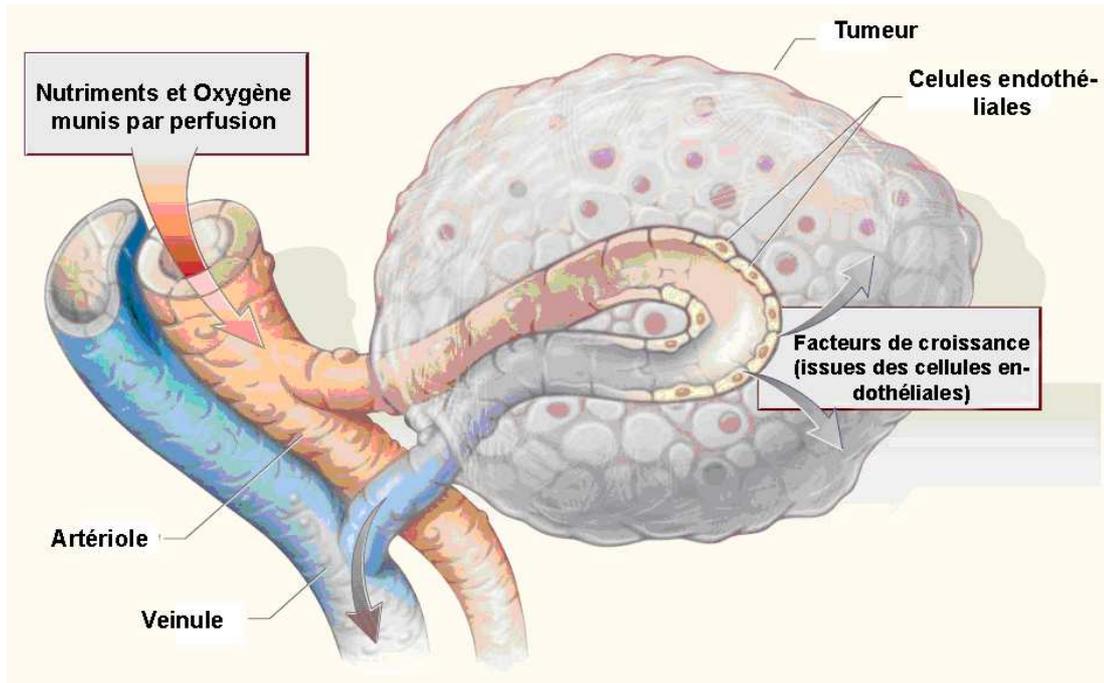


Figure 1-13 Représentation schématique du développement tumoral par la néovascularisation aboutissant à : augmentation du taux d'oxygène et des nutriments perfusés, et sécrétion locale des facteurs de croissance par les cellules endothéliales pour agir sur les tissus de voisinage. D'après [Folkman1995]

1.3.1.1 Facteurs angiogéniques activateurs et inhibiteurs (anti-angiogéniques)

Durant un processus d'angiogénèse normale, les néovaisseaux se développent rapidement et deviennent stables. Cette stabilité est orchestrée par un équilibre entre les facteurs stimulateurs et inhibiteurs de l'angiogénèse. En revanche, dans un processus d'angiogénèse pathologique, un déséquilibre entre les stimulateurs et les inhibiteurs angiogéniques devient notable et le taux des activateurs vasculaires devient également considérable. Par conséquent, le développement vasculaire devient moins stable [Dvorak1986].

- *Les facteurs angiogéniques activateurs*

Ce sont des molécules polypeptidiques, ou cytokines, essentielles à la communication cellulaire. Elles sont produites par la tumeur sous des conditions d'hypoxie. Ces molécules sont capables de moduler le comportement des cellules endothéliales suivant plusieurs fonctions : la prolifération, la migration, et la différenciation. Plusieurs types d'activateurs sont impliqués dans la régulation positive de l'angiogénèse (Tableau 1), tels que : le «vascular endothelial growth factor» (VEGF), le «fibroblast growth factor» (FGF), le «platelet derived growth factor» (PDGF), le «tumor growth factor β » (TGF β), l'«angiogénine», le «tumor necrosis

factor α” (TNFα), “l’interleukine 8” et les “*prostaglandines*”. Les facteurs de croissance qui jouent un rôle crucial dans l’activation de l’angiogénèse appartiennent aux familles du “*vascular endothelial growth factor*” (VEGF) et du “*fibroblast growth factor*” (FGF).

Facteur	Masse moléculaire	Mitogène Endothéliale	Année de publication	Auteurs
Fibroblast growth factors				
Basic	18,000	Oui	1984	Shing et al.
Acidic	16,400	Oui	1984	Maciag et al.
Angiogenin	14,100	Non	1985	Esch et al.
Transforming growth factor α	5,500	Oui	1986	Fett et al.
Transforming growth factor β	25,000	Non	1986	Schreiber et al.
Tumor necrosis factor α	17,000	Non	1987	Roberts et al.
Vascular endothelial growth factor	45,000	Oui	1983 1989	Fräter-Schröder et al., Leibovich et al. Senger et al., Ferrara et al., Connolly et al., Plouet et al.
Platelet-derived endothelial-cell growth factor	45,000	Provoque la synthèse de l’ADN	1989	Ishikawa et al.
Granulocyte colony-stimulating factor	17,000	Oui	1991	Bussolino et al.
Placental growth factor	25,000	Faible	1991	Maglione et al.
Interleukin-8	40,000	Oui	1992	Koch et al.
Hepatocyte growth factor	92,000	Oui	1993	Rosen et al., Bussolino et al.
Proliferin	35,000	Oui	1994	Jackson et al.

Tableau 1 : Facteurs angiogéniques. [Folkman1995]

Le VEGF, aussi dénommé “vascular permeability factor” (VPF), est une glycoprotéine de poids moléculaire 45 kd [Folkman1995]. Il se lit à deux récepteurs à activité tyrosine kinase¹⁰ exprimés par la membrane des cellules endothéliales : le récepteur de type 1 (*VEGF receptor-1* ou VEGFR-1) et le récepteur de type 2 (*VEGF receptor-2* ou VEGFR-2). Après liaison avec le VEGF dans un cas pathologique, des signaux mitogéniques¹¹ puissants et migratoires sont transmis (VEGFR-2) et induits (VEGFR-1 et VEGFR-2) afin de stimuler la prolifération des cellules endothéliales (Figure I-14 B), la mobilisation des progéniteurs endothéliaux (endotheliale progenitor cells, *EPCs*) de la moelle osseuse vers la circulation périphérique (Figure I-14 A), la production des enzymes protéolitiques¹² extracellulaires pour faciliter la migration des cellules endothéliales (Figure I-15 B) [Zachary2001 ; Meadows2001], la survivance des

¹⁰ Activité tyrosine kinase : Activité enzymatique intracellulaire concernant la phosphorylation d’un acide aminé, la tyrosine.

¹¹ Signaux mitogéniques : Signaux favorisant la mitose et la division cellulaire.

¹² Enzymes protéolitiques : Enzymes qui détruisent les protéines.

cellules endothéliales par activation de certains types de protéines inhibant l'apoptose [Gerber1998, Thakker1999] et l'organisation des cellules endothéliales en des structures tubulaires pourvues de lumière ressemblant à des capillaires sanguins (Figure I-15 A, B) [Pepper2000]. D'ailleurs, le VEGF a la capacité de rendre les veinules hyperperméables, en créant des pores entre les jonctions des cellules endothéliales, pour faciliter la circulation des protéines plasmatiques (fibrine) vers l'espace extravasculaire [Dvorak1995]. Cette hyperperméabilité moléculaire retarde l'élimination d'un oedème et transforme la fonction antiangiogénique du stroma¹³ d'un tissu normal en une fonction proangiogénique [Dvorak1995 ; Dvorak2002].

Plusieurs membres peuvent se compter dans la famille de VEGF : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C et VEGF-D. Certains de ces membres sont seulement impliqués dans les processus d'angiogénèse en se liant sur les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, comme le VEGF-A et VEGF-B, tandis que le VEGF-C et VEGF-D, selon le contexte biologique, sont en plus impliqués dans la régulation de la lymphangiogénèse¹⁴ par la stimulation d'un récepteur (*VEGF receptor-3* ou VEGFR-3) sur la surface de cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques (Figure I-14 A) [Veikkola1999]. L'expression du VEGF-A dans le milieu tumoral est large. Elle est induite dans des conditions ischémiques qui s'accroissent lors de l'augmentation de la tumeur en masse et l'apport des nutriments par des vaisseaux préexistants devient insuffisant.

¹³ Stroma : Charpente fibreuse et nutritionnelle des cellules.

¹⁴ Lymphangiogénèse : Formation de néovaisseaux lymphatique.

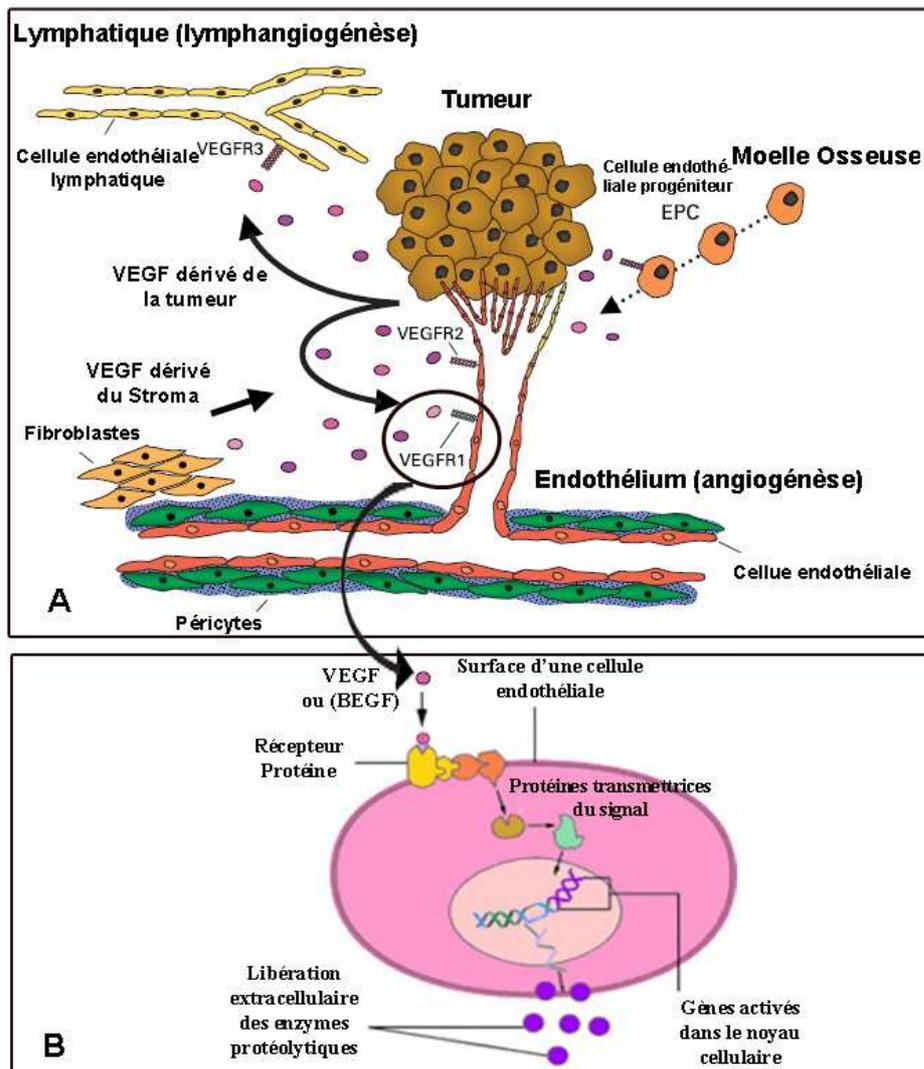


Figure 1-14 : Modèle représentant le rôle du facteur de croissance vasculaire (VEGF) et de son récepteur dans une angiogénèse tumorale. (A) Le VEGF produit par les cellules tumorales ou cellules du stroma, stimule les récepteurs des cellules endothéliales vasculaires VEGFR-1, VEGFR-2 ou VEGFR-3, et également mobilise les cellules endothéliales progéniteurs (EPCs). VEGF-C et VEGF-D stimulent le récepteur des cellules endothéliales lymphatiques VEGFR-3. (B) Gènes dans le noyau d'une cellule endothéliale sont activés après la transmission d'un signal induit lors de la fixation du VEGF aux récepteurs membranaires aboutissant à une libération des enzymes protéolytiques. D'après [Hicklin2005; April Palmer2004]

Le FGF est considéré comme un facteur de croissance en synergie avec le VEGF en ce qui concerne l'invasion des cellules endothéliales dans la matrice extracellulaire. Il s'agit d'un peptide d'environ 150 acides aminés [Burgess1989] qui se trouve associé aux cellules endothéliales et sous-endothéliales dans la matrice extracellulaire [Baird1987 ; Vlodavsky1987]. Le FGF existe en deux formes, le FGF acide (FGFa) de poids moléculaire 18 kd et le FGF basique (FGFb) de poids moléculaire 16.4 kd [Folkman1995]. Ils possèdent une activité mitogène [Gospodarowicz1987 ; Thomas1985] et chimiotactique [Terranova1985] qui s'exerce sur les cellules

endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules jeunes, ou fibroblastes, du tissu conjonctif qui élaborent la matrice extracellulaire. Le FGF pourrait favoriser la libération des activateurs de la cellule endothéliale conduisant à l'activation des protéinases capables de dégrader la membrane basale des capillaires [Mignatti1989] et d'induire la migration des cellules endothéliales vers la matrice extracellulaire afin de construire des tubes en capillaires [Montesano1986].

En plus de la stimulation de l'angiogénèse par des facteurs angiogéniques, la stimulation mécanique serait un autre stimulus important de l'angiogénèse. Elle concerne les interactions des éléments figurés du sang avec les cellules endothéliales, l'exsudation des protéines et d'éléments figurés du sang vers la matrice extracellulaire et enfin l'augmentation des contraintes de cisaillements [Davies1997] qui varient proportionnellement à la viscosité et la vitesse sanguine et inversement proportionnelle au diamètre du vaisseau.

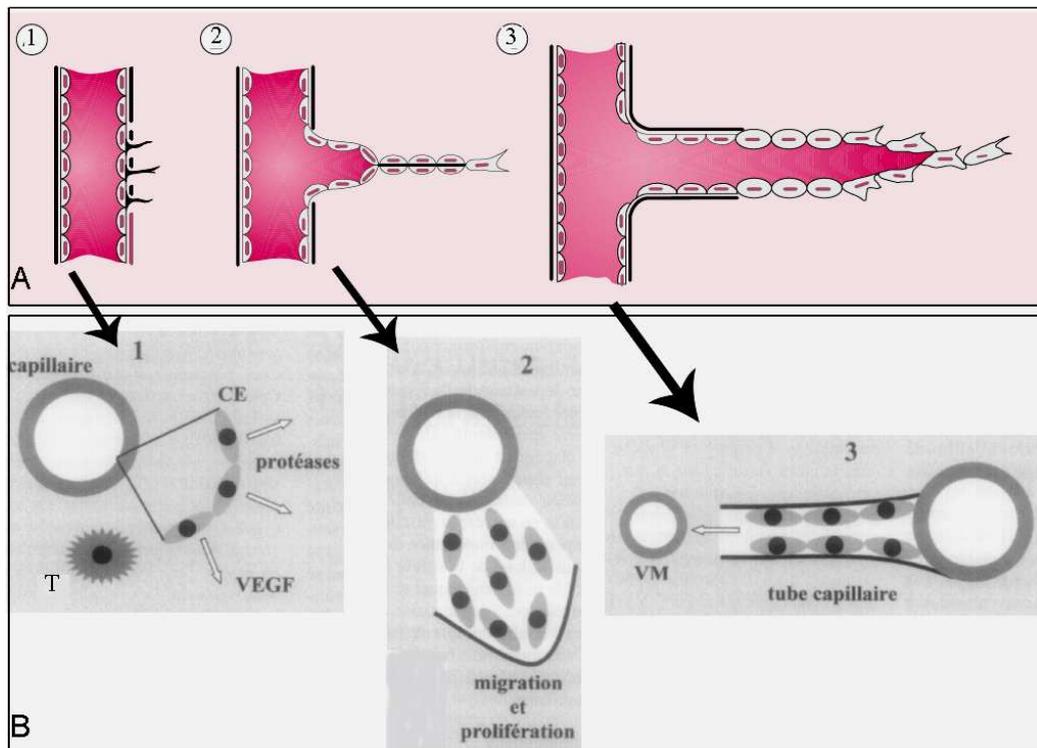


Figure 1-15 : Représentation schématique du déroulement du processus de l'angiogénèse. (A) représentation de l'angiogénèse au niveau vasculaire et (B) au niveau moléculaire. 1 : Activation des cellules endothéliales (CE) suite à l'induction des facteurs angiogéniques (VEGF) par une cellule tumorale (T). Les cellules endothéliales contribuent à la formation de protéases, digérant la membrane basale et une zone de la matrice extracellulaire (MEC), et l'extension de fins processus cytoplasmiques en direction de la source du stimulus. 2 : Migration des cellules endothéliales dans la matrice et formation d'un bourgeon capillaire. Prolifération des cellules situées en arrière du front migratoire. Formation d'une lumière dans la région proximale du bourgeon capillaire. 3 : Maturation du bourgeon capillaire, impliquant la reconstitution de la lame basale et la formation du vaisseau mère (VM) de la néovascularisation. D'après [Stephan2000 ; Pepper2000].

- *Les facteurs angiogéniques inhibiteurs :*

Ces facteurs sont des anti-angiogéniques qui empêchent la stimulation mitogène des cellules endothéliales produite par les facteurs angiogéniques. Par conséquent, le développement néovasculaire peut être bloqué par ces facteurs au moment où la croissance tumorale et la formation néovasculaire sont atteintes [Stephan2000]. En revanche, le taux des inhibiteurs angiogéniques est atténué lors le déclenchement de l'angiogénèse [Dameron1994]. Il existe plusieurs types de facteurs angiogéniques qui diffèrent selon leur fonction comme le montre le tableau (Tableau 2).

Facteur	Inhibiteur de prolifération	Inhibiteur de chimiotactisme	Existe dans la circulation	Existe dans la matrice extracellulaire	Auteurs
Platelet factor 4	Oui	Oui	Oui	Non	Sharpe et al., Taylor and Folkman
Thrombospondin-1	Oui	Oui	Oui	Oui	Rastinejad et al., Iruela-Arispe et al.
Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)					Murphy et al., Moses et al.
TIMP-1	Non	Oui	Oui	inconnu	
TIMP-2	Oui	Oui	Oui	inconnu	
TIMP-3	inconnu	inconnu	inconnu	Oui	
Prolactin (16-kd fragment)	Oui	Oui	-	-	Clapp et al.
Angiostatin (38-kd fragment of plasminogen)	Oui	Oui	Oui	-	O'Reilly et al.
bFGF soluble receptor	Oui	-	Oui	-	Hanneken et al.
Transforming growth factor β	Oui	Oui	Oui	-	Roberts et al., Baird et al., Muller et al.
Interferon alfa	Oui	Oui	Oui	-	Sidky et al.
Placental proliferin-related protein	Oui	Oui	Oui	-	Jackson et al.

Tableau 2 : Facteurs inhibiteurs de la prolifération des cellules endothéliales. [Folkman1995]

1.4 Hémodynamique vasculaire et microenvironnement tumoral

Les anomalies d'une structure vasculaire tumorale, concernant la tortuosité, l'élongation et la dilatation, se manifestent par des propriétés hémodynamiques vasculaires et métaboliques différentes que dans un tissu normal, tels que le flux sanguin, l'oxygénation, l'alimentation tissulaire, la distribution du pH et le taux local d'oxygène. Les proportions anormales peuvent nettement souligner le degré de la malignité tumorale, la métastase et l'influence sur la réponse aux différentes modalités

thérapeutiques, tels que la radiothérapie, la chimiothérapie, la vectorisation des médicaments in situ et un autre traitement non chirurgical.

1.4.1 Flux sanguin

Le flux sanguin dans un vaisseau joue un rôle important dans la livraison des agents thérapeutiques à une tumeur [Jain1985]. L'étude bibliographique de Vaupel [Vaupel1989], sur le taux du flux sanguin à travers plusieurs types de tumeurs humaines, a montré des valeurs considérablement inférieures ou supérieures à travers le même tissu d'origine (Figure 1-16). La plupart des tumeurs contiennent deux régions perfusées différemment, une région bien perfusée qui se développe rapidement et s'infiltré dans l'environnement normal, et une région moins perfusée souvent engendrée par le développement d'une nécrose. En plus, la perfusion sanguine dans les shunts artérioveineux d'une tumeur maligne atteint 30% du sang artériel irriguant la tumeur sans qu'il y ait le moindre processus d'échange dans le réseau capillaire [Endrich1982 ; Weiss1979].

Trois paramètres peuvent changer le flux sanguin dans un réseau vasculaire tumoral, tels que : la différence de pression artério-veineuse aux bords d'un tissu, la résistance géométrique offerte par la morphologie vasculaire (longueur, diamètre, volume et nombre des vaisseaux), et la résistance visqueuse déterminée par les propriétés rhéologique du sang (augmentation du taux de fibrinogène dans le plasma, présence dans la lumière vasculaire des cellules cancéreuses et agrégation des globules rouges) [Sevick1989 ; Jain1988 ; Vaupel1975].

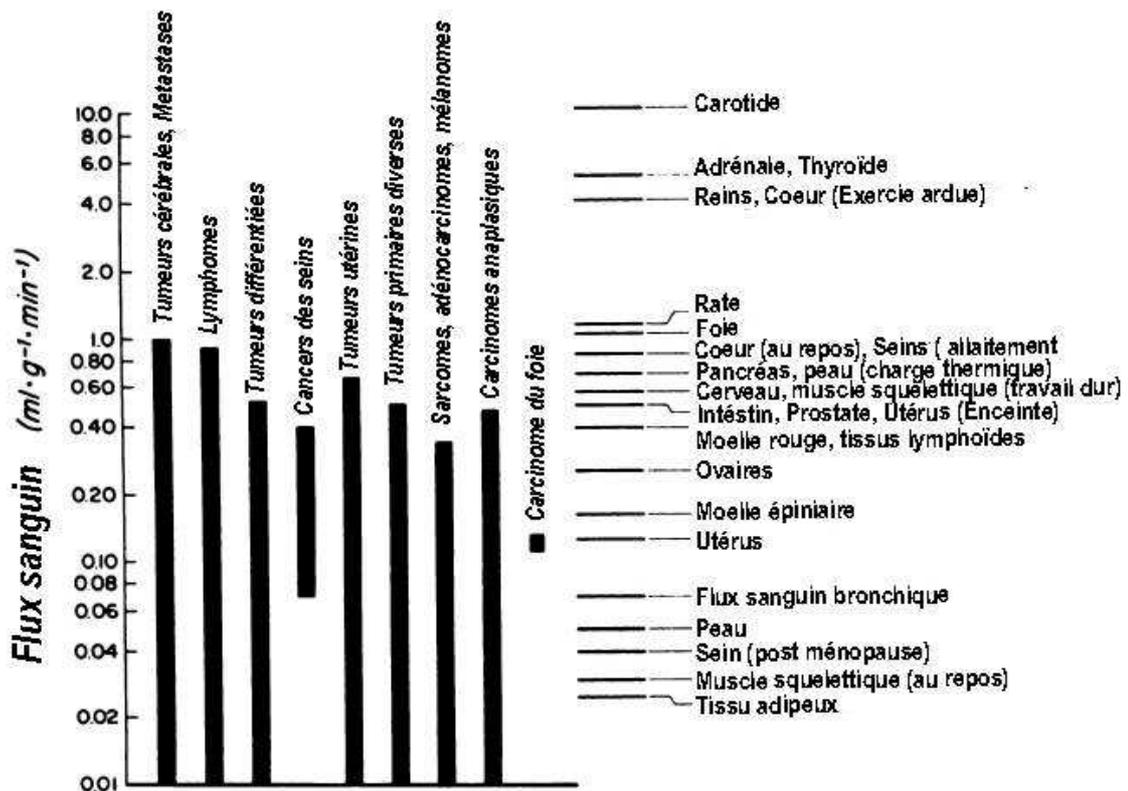


Figure 1-16 : Valeurs du flux sanguin irrégulières pour des tumeurs humaines malignes (■), et moyennes pour un tissu normal (lignes horizontales). [Vaupel1989]

1.4.2 Taux de consommation en oxygène et oxygénation d'un tissu tumoral

L'oxygène est un élément indispensable pour le métabolisme cellulaire ainsi que pour le développement des cellules normales ou cancéreuses. L'oxygénation d'un tissu est la résultante du taux d'oxygène disponible dans le sang artériel (*oxygène disponible = flux du sang nourricier × concentration artérielle en O₂*) et du taux de respiration cellulaire [Vaupel1989]. Dans un tissu normal, l'approvisionnement en oxygène est contrôlé par les besoins cellulaires. Il est accompli par la modulation du

flux sanguin et/ou par le changement du taux d'oxygène utilisé ($O_{2\text{ utilisé}} = \frac{O_{2\text{ consommé}}}{O_{2\text{ disponible}}}$) en

fonction des altérations physiologiques [Vaupel1989]. Par contre, dans un tissu tumoral où les régions sont moins perfusées (microcirculation hétérogène dans la masse tumorale), la modulation du flux sanguin ou du taux d'oxygène utilisé reste limité. Pour cette raison, le manque d'oxygénation est une caractéristique commune de la plupart des tumeurs malignes [Vaupel1989].

1.4.3 Consommation de glucose

La glycolyse ou dégradation du glucose est un mécanisme fondamental dans le métabolisme cellulaire. Elle peut se produire avec la présence de l'oxygène (aérobie), c'est le cas d'un tissu normal, ou sans sa présence (anaérobie), c'est le cas d'un tissu tumoral. Dans les deux types de métabolisme cellulaire, le glucose est toujours converti en CO₂, H₂O et molécules d'Adénosine Triphosphate (ATP) qui sont capables de fournir de l'énergie aux réactions chimiques cellulaires. Pour un métabolisme anaérobie, plus d'ions H⁺ et moins de molécules d'ATP par une mole de glucose (2 moles ATP/mole de glucose) sont produits. En revanche, pour un métabolisme aérobie, plus de molécules d'ATP par une mole de glucose (36 moles ATP/mole de glucose) sont produits [Pfeiffer2001]. L'inefficacité énergétique du métabolisme anaérobie est compensée par l'augmentation du nombre de transporteur du glucose, afin de maintenir un niveau énergétique suffisant aux besoins de la prolifération des cellules tumorales [Medina2002].

1.4.4 pH tumoral

Le pH dans un tissu dépend de la concentration des ions H⁺ qui se forment lors du processus de glycolyse intracellulaire. Dans le cas où le fonctionnement tissulaire est normal, les ions H⁺ sont transportés à l'extérieur des cellules pour qu'ils atteignent, à travers le liquide interstitiel, les vaisseaux sanguins. Donc, une accumulation en ion H⁺ dans le milieu tissulaire en principe n'existe pas, et le pH du milieu reste neutre. Par contre dans le cas d'un fonctionnement anormal tissulaire, cas tumoral par exemple, un taux de glycolyse élevée coïncide avec un mauvais drainage vasculaire des ions H⁺ expulsés par les cellules. Par conséquent, les ions H⁺ s'accumulent dans le milieu extracellulaire du tissu et la valeur du pH se déplace vers l'acidité (Figure 1-17), particulièrement dans les tumeurs volumineuses et/ou leur perfusion sanguine est faible [Kallinowski1989].

La conséquence de l'acidose dans le milieu extracellulaire tumoral surproduit la sécrétion du VEGF [Shi2001] ainsi que l'invasion tumorale et les métastases en augmentant l'activité des protéases qui se traduisent par la destruction de la matrice extracellulaire [Turner1979 ; Schlappack1991].

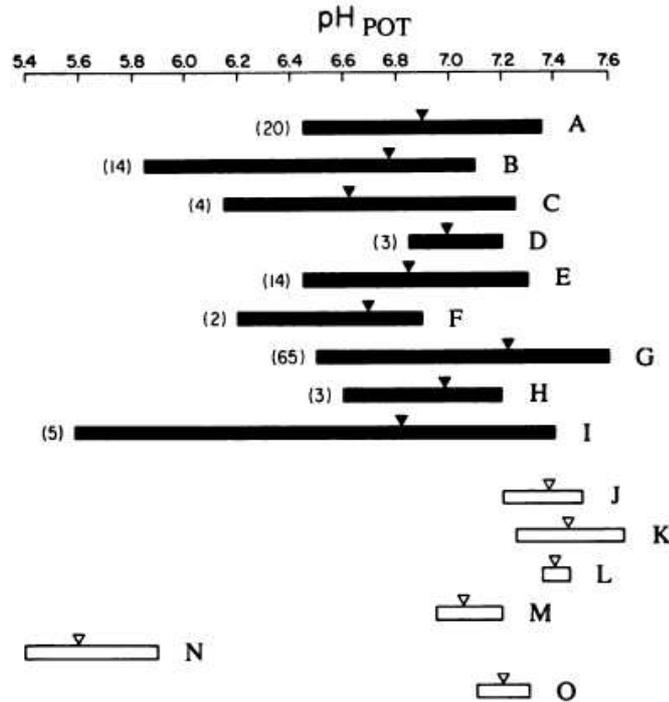


Figure 1-17 : Valeurs du pH mesurées, à l'aide des électrodes sensibles (pH_{pot}), dans des tumeurs humaines (■) et dans des tissus normaux (□). Les flèches correspondent aux valeurs moyennes du pH ; les nombres entre parenthèses sont les nombres des tumeurs étudiées. A, glioblastomes ; B, astrocytomes ; C, méningiomes ; D, métastases du cerveau ; E, mélanomes malignes ; F, sarcomes ; G, carcinomes mammaires ; H, adénocarcinomes ; I, carcinomes spinocellulaires, J, muscle squelettique au repos ; K, peau (à 37°C) ; L, sang artériel ; cerveau ; N, peau (surface) ; O, érythrocyte. [Vaupel1989]

1.5 Embolisation artérielle par cathéter

Pour démontrer l'intérêt de cette thèse, on va tout d'abord traiter brièvement dans cette section un des processus de traitement tumoral ou embolisation artérielle sur lequel va ensuite s'articuler notre travail.

L'embolisation artérielle par cathéter ou TAE (transarterial embolization) est une procédure de radiologie interventionnelle consistant à injecter, sous fluoroscopie, des différents agents d'occlusion vasculaire ou emboles pour traiter des hémorragies causées par des néoplasies inopérables [Goldstein1975], de saignement post-opératoire incontrôlable [Greenwood1987], des malformations artérioveineuse [White2000 ; Yakes1997] ou induire la dévascularisation de certaines tumeurs [Vinuela1992 ; Novak1990]. Une des tumeurs qui a retenu notre attention est le fibrome utérin. C'est la tumeur bénigne la plus fréquente du pelvis chez la femme touchant une femme sur trois [Buttram1981 ; Stewart2001 ; Vollenhoven1990]. Les fibromes sont responsables d'une

symptomatologie variée dominée par les ménorragies (règles très abondantes et/ou prolongées), les douleurs pelviennes et le syndrome de compression des organes de voisinage. Les fibromes peuvent également parfois être responsables d'infertilité [Buttram1981].

Le traitement médical des fibromes utérins peut prendre plusieurs aspects, tels que le traitement chirurgical conservateur (myomectomie) ou non conservateur (hystérectomie) [Iverson1996 ; Stewart2001], et actuellement un regain d'intérêt par le professeur Jean-Jacques Merland, membre de l'équipe de radiologie de l'Hôpital Lariboisière, qui a utilisé l'embolisation des artères utérines aux particules de PolyVinyle d'Alcool (PVA) comme traitement palliatif et efficace des hémorragies obstétricales tout préservant le potentiel de fertilité chez la femme [Frates1994 ; Pelage1998 ; Pelage1999a ; Ravina1995a].

Chapitre.2

Mesure de faibles variations du signal image en **IRM**

Sommaire :

2. CHAPITRE 35

2.1 Description du phénomène physique de Résonance Magnétique Nucléaire..... 38

2.1.1 Principe physique..... 39

2.1.2 Séquences IRM 43

2.1.2.1 Séquence (SPGR) 44

2.1.2.2 Séquence Spin Echo (SE) et Fast Spin Echo (FSE)..... 46

2.1.2.3 Séquence Balanced steady state-state free precession (Balanced SSFP)..... 48

2.1.3 Produits de contraste 49

2.1.3.1 Effet de l’agent de contraste sur les temps de relaxation..... 49

2.1.3.2 Catégories d’agent de contraste et taux ou vitesse de relaxation 50

2.1.3.3 Effet de l’agent de contraste sur le signal image 52

2.1.4 Antennes 55

2.1.4.1 Antennes volumique..... 58

2.1.4.2 Antennes de surface..... 58

2.2 Sensibilité des antennes de surface en fonction de la profondeur et d’une direction transversale 59

2.2.1 Sensibilité des antennes de surface en fonction de la profondeur 59

2.2.1.1 Matériels et Méthodes 59

2.2.1.2 Résultats et discussion 61

2.2.2 Sensibilité des antennes de surface en fonction d’une direction transversale 63

2.2.2.1 Matériels et méthodes..... 63

2.2.2.2 Résultats et discussion 64

2.3 Sources des défauts d’intensité 67

2.3.1 Imageur 67

2.3.2 Séquence IRM..... 68

2.3.3 Objet..... 68

2.3.4 Corrections des défauts d’intensité en IRM 69

2.3.4.1 Méthodes de pré-traitement 69

2.3.4.2 Méthodes de post-traitement 70

2.3.5 Méthodologie de mesure et de correction 72

2.3.5.1 Position du problème..... 72

2.3.5.2 Principe de la méthode de correction 73

2.3.5.3 Matériels et méthodes..... 73

2.3.5.4 Résultats et discussion 81

2.4 Conclusion 87

L'idée générale sous-jacente de ce chapitre est que la détectabilité des informations sur l'image est en compétition avec les défauts d'uniformité du signal des images. Une faible variation d'intensité spatiale peut traduire aussi bien des variations propres de l'objet exploré que des artefacts qui peuvent se produire au niveau du capteur. Les défauts d'intensité dans l'image (variations locales de la brillance dues par exemple à un effet de susceptibilité, affaiblissement du signal dans certaines régions lié à la répartition du champ radiofréquence (RF)) ont donc des origines différentes. En particulier des imperfections des champs radiofréquence émis et reçus par l'antenne, la nature de l'objet et sa position par rapport à l'antenne, un mauvais choix des paramètres de la séquence *IRM* ou d'une défaillance de la calibration automatique de l'antenne peuvent être éventuellement à l'origine de ces défauts.

Nous présentons dans ce deuxième chapitre la problématique globale que pose la quantification d'informations dans des images obtenues par imagerie par résonance magnétique (*IRM*), l'objectif étant d'apporter une contribution à la méthodologie de quantification précise du signal provenant des échantillons.

Dans le paragraphe 2.1, nous rappelons brièvement quelques points de repère sur l'*IRM*, nous décrivons les séquences (2.1.2) que nous avons utilisées dans cette thèse et l'effet d'un agent de contraste (2.1.3) sur le signal de résonance magnétique nucléaire (*RMN*). Nous rappelons les caractéristiques des antennes volumiques et surfaciques (2.1.4) car leur choix a un impact important sur les résultats (2.2), puis nous évoquons de nombreux facteurs qui peuvent détériorer la précision et la fiabilité de l'analyse quantitative des images (2.3). Parmi ceux-ci, les défauts d'intensité nous paraissent être l'un des facteurs d'erreur les plus importants lors de la quantification des faibles variations du signal *IRM*. Après avoir examiné la bibliographie, nous classons les méthodes de corrections et de compensation des défauts d'intensité selon deux catégories, pré- ou post-traitement (2.3.4).

Ces deux types d'approche sont issus de deux communautés scientifiques différentes. Les approches de types prétraitement sont essentiellement le fait de physiciens. Ce sont des méthodes ciblées, fondées sur l'identification et la modélisation des sources physiques qui perturbent le signal. Elles nécessitent pour la plupart l'utilisation de protocoles spécifiques, longs donc souvent peu applicables en routine clinique. Ce sont soit des méthodes d'estimation de signal sur fantôme soit des méthodes fondées sur

l'expression du signal qui, toutes deux, tiennent compte de la distribution des champs radiofréquence.

Les méthodes de post-traitement, représentent, de leur côté, la grande majorité des travaux sur le sujet, elles sont dues à la communauté des traiteurs d'images. Cette pléthore de méthodes s'explique par les besoins de traitements d'images *a posteriori*, comme les segmentations. Ces méthodes étant fondées sur une modélisation des effets et non des causes de défauts d'intensité, la référence auquel le résultat doit être comparé n'est pas connue. Il en résulte une certaine difficulté pour apprécier la pertinence de ces méthodes.

Nous avons choisi de proposer ici une démarche méthodologique ciblée. Celle-ci peut permettre une quantification précise du signal mesuré sur les images *IRM* d'échantillons. Cette correction est décrite plus loin au paragraphe 2.3.5. Elle comporte deux étapes : un prétraitement pour constituer une image de référence, avec un choix particulier d'antenne, de séquence, de calibration, de fantômes ayant la même densité de noyaux résonnants répartis dans l'antenne ; puis un traitement des valeurs extraites lors d'autres acquisitions, avec "moyennage" du signal image des échantillons selon leur position, et qui tient compte de la réponse à l'emplacement de la région analysée afin de réduire les défauts d'intensité.

2.1 Description du phénomène physique de Résonance Magnétique Nucléaire

La *RMN* est une technique en développement depuis une cinquantaine d'années. Le phénomène physique, connu depuis la fin des années 1930 (I Rabi premier prix Nobel pour la RMN) a été conceptualisé sous sa forme actuelle en 1946 par les expériences de F. Bloch [Bloch1946] et E. M. Purcell [Purcell1946]. Le prix Nobel de physique leur a été décerné en 1952. Durant 30 ans, entre l'année de cette découverte et les premiers diagnostics médicaux, la *RMN* a été principalement utilisée pour les analyses chimiques non-destructives. Ce n'est qu'à partir de 1971 que l'intérêt d'utiliser le phénomène *RMN* en investigation médicale a eu lieu suite aux études de Damadian

pour déterminer la différence des temps de relaxations T_1 et T_2 des tissus sains et tumoraux [Damadian1971]. Les travaux de P.C. Lauterbur ont introduit en 1973 l'usage des gradients pour localiser les noyaux à l'origine des signaux à l'intérieur de l'objet étudié pour en donner des images. Simultanément, P. Mansfield a montré la possibilité de convertir très rapidement ces signaux en une image exploitable. Ils ont obtenu le prix Nobel de Médecine en 2003. En 1975, A. Kumar et R. R. Ernst ont introduit l'IRM avec l'encodage de phase et de fréquence comme application directe de la transformation de Fourier. Dès cette époque, la localisation du signal issu de la RMN du proton de l'eau tissulaire et de la graisse est devenue une modalité d'imagerie clinique non-invasive, souvent de première intention.

2.1.1 Principe physique

La RMN est un processus sélectif qui rend compte des états d'énergie des noyaux doués de magnétisme lorsqu'ils sont soumis à l'application de deux champs magnétiques l'un statique (B_0) et l'autre radiofréquence (B_1).

En imagerie, le signal détecté peut être associé à l'existence du moment magnétique de protons ou noyaux d'hydrogène (^1H), noyaux les plus abondants dans les tissus vivants. Ces particules chargées, que l'on représente comme animées d'un mouvement de rotation sur elles-mêmes, possèdent deux moments qui sont liés et alignés sur leur axe de rotation : un moment cinétique de "spin" représenté par le vecteur \vec{S} et un moment magnétique élémentaire qui est proportionnel au vecteur de spin $\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{S}$ où γ est le rapport gyromagnétique des noyaux considérés. Le noyau peut être alors assimilé à un dipôle magnétique microscopique. L'ensemble des dipôles d'un échantillon tissulaire donne lieu à un moment magnétique macroscopique $\vec{M} = \sum \vec{\mu}_i$ ou aimantation d'origine nucléaire de l'échantillon.

En l'absence de champ magnétique externe, sous l'effet de l'agitation thermique, les vecteurs $\vec{\mu}_i$ sont orientés dans des sens aléatoires et leur résultante \vec{M} est alors nulle. En présence d'un champ magnétique statique B_0 , les moments magnétiques des protons dont le nombre de spin vaut 1/2, prennent deux orientations possibles : soit "parallèle" à B_0 , soit "antiparallèle" ce qui donne deux niveaux d'énergie différemment peuplés. La différence de population entre ces deux niveaux est responsable de l'apparition de l'aimantation macroscopique orientée selon le sens du champ B_0 appliqué, soit M_z , dont la valeur d'équilibre est noté M_0 .

Vu de façon semi-classique, chaque moment magnétique $\vec{\mu}$ est soumis dans B_0 à un couple de moment donné par la relation (2-1), lui imposant un mouvement de précession autour la direction de B_0 (**direction Oz** du repère du laboratoire) (Figure 2-1).

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{\mu} \wedge \vec{B}_0 \quad (2-1)$$

Le rapport gyromagnétique du noyau de l'espèce considérée (proton d'hydrogène, vaut $\gamma = 2\pi \times 42.6 \cdot 10^6$ rad/s/tesla).

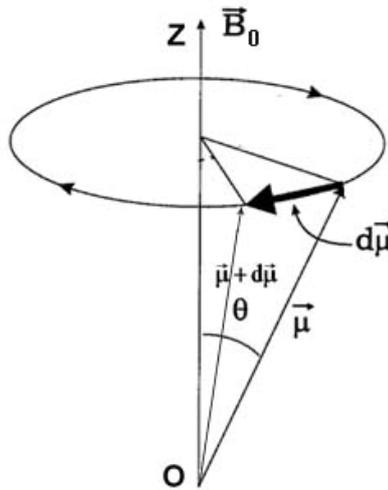


Figure 2-1 : Mouvement de précession d'un moment magnétique ($\vec{\mu}$) situé dans un champ magnétique \vec{B}_0 . Les deux vecteurs $\vec{\mu}$ et \vec{B}_0 forment un angle θ . D'après [Haacke1999 a]

La précession de $\vec{\mu}$ est exprimée sous forme d'une pulsation de vitesse angulaire ω_0 dite de Larmor qui est proportionnelle à l'intensité de B_0 via γ , soit :

$$\omega_0 = \gamma B_0 = 2\pi\nu_0 \quad (2-2)$$

Afin de détecter \vec{M} , l'aimantation d'un ensemble de protons peut être perturbée par un champ RF d'amplitude B_1 , perpendiculaire à B_0 . \vec{B}_1 est créé par l'application d'un courant sinusoïdal, à la fréquence de résonance de l'hydrogène, dans une bobine d'axe perpendiculaire à \vec{B}_0 . \vec{M} bascule d'un angle α par rapport à la direction de \vec{B}_0 . L'angle ainsi effectué est proportionnel à la durée (t_p) de cette impulsion et à l'amplitude (B_1): $\alpha = \gamma B_1 t_p$. \vec{M} tourne simultanément autour de \vec{B}_1 à la fréquence ν_1 ($2\pi\nu_1 = \omega_1 = \gamma B_1$) et crée une composante transversale \vec{M}_{xy} . Après l'impulsion RF , \vec{M} revient vers la position d'équilibre (alignement avec B_0) tout en effectuant un mouvement de précession à la fréquence de Larmor. Les amplitudes des composantes

longitudinale M_z et transversale M_{xy} , évoluent selon les constantes de temps de relaxation longitudinale, T_1 , et transversale, T_2 qui caractérisent également leur retour à l'équilibre. T_1 et T_2 dépendent de la structure moléculaire ainsi que l'état solide ou liquide de la matière [Bottomley1984 ; Schuhmacher1987 ; Imran1999].

Pour un basculement initial de 90° on pourra écrire :

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad (2-3)$$

$$M_{xy}(t) = M_0(e^{-t/T_2}) \quad (2-4)$$

La constante de temps T_1 est le temps de relaxation spin-milieu et la constante de temps T_2 est le temps de relaxation spin-spin.

\vec{M} décrit un mouvement complexe autour de \vec{B}_0 à la fréquence de Larmor (Figure 2-2). L'extrémité de la projection de \vec{M} dans le plan xOy (\vec{M}_{xy}) décrit une spirale et, au cours de ce mouvement elle va induire un signal, appelée "signal de précession libre" ou "Free induction Decay" (FID), recueilli par une antenne de réception dont l'axe magnétique est perpendiculaire à la direction de B_0 .

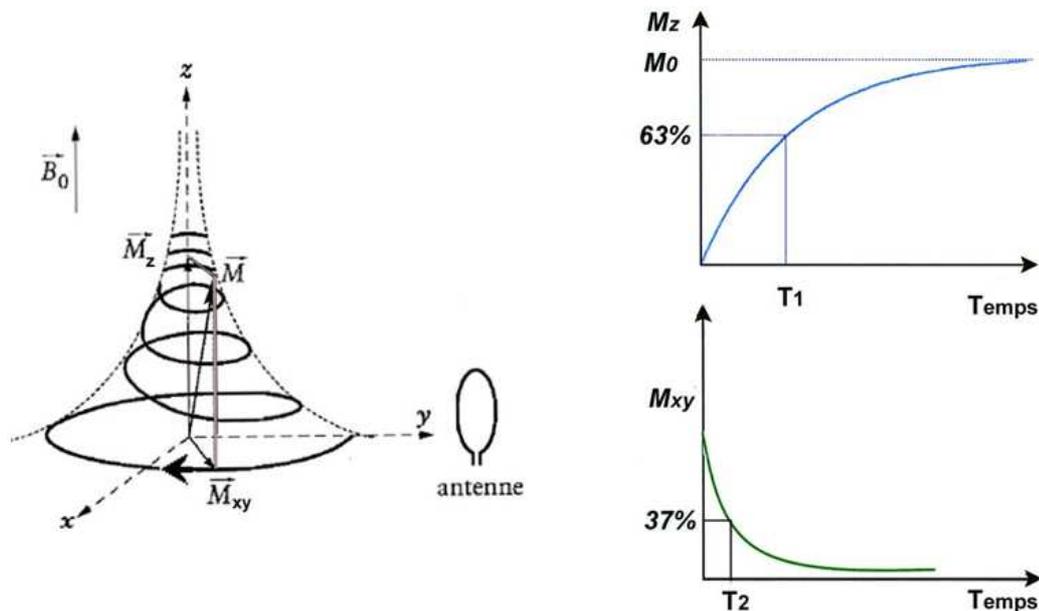


Figure 2-2 : Mouvement de précession de M autour de \vec{B}_0 lors de son retour à l'état de l'équilibre après une impulsion RF de 90° . Les projections de cette précession, en repousse ou en réduction dans les plans longitudinal et transversal, sont caractérisées par les temps constants T_1 et T_2 .

L'analyse du signal permet de déterminer les paramètres fondamentaux : la fréquence, la quantité ρ de noyaux d'hydrogène par unité de volume de l'échantillon et les temps de relaxation T_1 et T_2 (ou T_2^*). T_2^* est un paramètre plus court que le "vrai" paramètre T_2 de l'échantillon, il décrit la décroissance du signal IRM sous l'influence

des non uniformités de B_0 , ce qui aboutit à une dispersion des fréquences de résonance au sein de cet échantillon et affaiblit donc le signal.

Afin de pouvoir construire des images, il faut mettre en place un codage spatial du signal. On peut créer un gradient de la composante selon Oz du champ magnétique soit \vec{G} de sorte que la valeur de cette composante selon Oz du champ magnétique dépende linéairement de la position spatiale $\vec{r} : \vec{G} = \vec{V} \cdot B_z(\vec{r})$. Ce gradient de champ se superpose au champ magnétique principal B_0 , et l'on a :

$$B_z(\vec{r}) = B_0 + \vec{r} \cdot \vec{G} \quad (2-5)$$

La fréquence de résonance dépend alors de sa position selon \vec{r} :

$$\omega(\vec{r}) = \gamma(B_0 + \vec{r} \cdot \vec{G}) \quad (2-6)$$

En appliquant un gradient de champ magnétique pendant l'impulsion RF , on peut alors exciter sélectivement une coupe dans un volume, ce gradient de sélection de coupe sera noté G_{SS} . Seuls les spins dont la fréquence correspond à celle de l'impulsion RF vont être excités. Cette coupe est perpendiculaire à la direction du gradient, et son épaisseur Δ proportionnelle à la largeur spectrale de l'impulsion RF , $\Delta\omega_l : \Delta\omega_l = \gamma G \Delta$.

A l'intérieur d'une coupe, les spins peuvent être séparés si l'on crée une variation spatiale linéaire de la fréquence de résonance en présence d'un gradient de champ magnétique dirigé parallèlement au plan de la coupe (relation 2-5). Si ce gradient est présent lors de la lecture du signal, les différentes fréquences peuvent être décomposées par analyse de Fourier. On obtient alors la projection de la distribution des spins contenus dans la coupe selon la direction du gradient de lecture. Un gradient de phase (G_\emptyset) appliqué dans la direction orthogonale à celle du gradient de lecture conduit, également par une seconde analyse de Fourier du signal, à distinguer les spins selon leur position selon cette nouvelle direction à condition de répéter la séquence pour chaque nouvelle valeur du gradient de phase.

L'image de la coupe est ainsi reconstruite en deux dimensions. Les données enregistrées à l'exécution de chaque séquence (donc à chaque pas de codage par la phase) ne sont pas nécessairement traitées immédiatement, en cours d'acquisition. Leur enregistrement complet permet de définir l'espace réciproque de l'image (espace k) qui est celui de l'expérience, et qui correspond à celui de l'image par transformation de Fourier bidimensionnelle.

2.1.2 Séquences IRM

Une séquence *IRM* est faite d'une succession d'impulsions *RF* et de gradients d'encodages. Le choix des types de séquences dans notre travail est fondé sur la nature des informations recherchées et sur les caractéristiques de chacune : le choix de la matrice image, la rapidité d'exécution qui joue en général sur la pondération T_1 , T_2 ou en densité de protons ρ . Nous avons choisi des séquences courantes pour étudier à quelles conditions elles pourraient être utilisables pour le suivi des agents d'embolisation. A cet égard, nous avons utilisé une ou deux variantes de chaque famille principale de séquences, écho de spin (*spin echo* : SE) et écho de gradient (*gradient recalled echo* : GRE), afin d'avoir une idée large de leur comportement pour notre problématique.

Les variantes que nous avons utilisées dans cette thèse concernent une séquence rapide comme le *spoiled gradient echo* (SPGR) et une séquence le *Fast spin echo* (FSE), une séquence ultrarapide comme le *fast imaging employing steady state acquisition* (Fiesta).

Avant chaque déclenchement des séquences, l'imageur *IRM* accomplit à chaque fois une calibration de plusieurs paramètres en fonction de la charge placée dans l'antenne. Celle-ci optimise la qualité de l'image. Cette procédure concerne la calibration de l'amplitude B_1 du champ *RF* en ajustant le gain de l'amplificateur de transmission (ou *transmitter gain*: TG) pour obtenir l'angle de bascule désiré avec précision. Elle concerne aussi l'ajustement des gains de l'amplificateur de réception (ou *receiver gain* : R) analogique (R_1) et numérique (R_2) pour que le signal reçu ne sature pas le convertisseur analogique-numérique dans la chaîne de réception.

D'autre part, une adaptation d'impédance est nécessaire entre la ligne de transmission et le préamplificateur *RF* d'une part et d'autre part entre la ligne de transmission et le résonateur servant d'antenne afin de compenser l'altération induite par le patient dans l'antenne. La dernière étape concerne l'ajustement de la fréquence centrale (*frequency center* : AX), dont la valeur peut aussi changer d'un patient à un autre de quelques dizaines de Hz, pour que l'imageur soit adapté à la fréquence de résonance des protons.

Nous présentons brièvement les caractéristiques et les avantages de ces trois types de séquences.

2.1.2.1 Séquence (SPGR¹)

Dans les séquences utilisant l'écho de gradient, et contrairement à la séquence d'écho de spins, la remise en phase (appelé aussi rephasage) des spins est obtenu par un changement de sens du gradient de lecture, et non par une deuxième impulsion RF . Des angles de bascule inférieurs à 90° sont appliqués simultanément avec le gradient de sélection de coupe, G_{SS} . Ensuite le gradient de phase est appliqué en même temps que le gradient de lecture G_R . L'écho est produit à la suite du changement de sens du gradient de lecture (Figure 2-3), qui, au moment de l'écho, compense le déphasage provoqué initialement par le gradient G_ϕ , d'où le nom *d'écho de gradient*. Le codage de phase introduit par l'application du gradient de phase persiste tout au long de l'acquisition du signal d'écho, acquisition qui s'effectue donc en présence d'un gradient de lecture constant. Les temps de répétition entre les impulsions RF peuvent être très courts, descendant jusqu'à 2,5 ms.

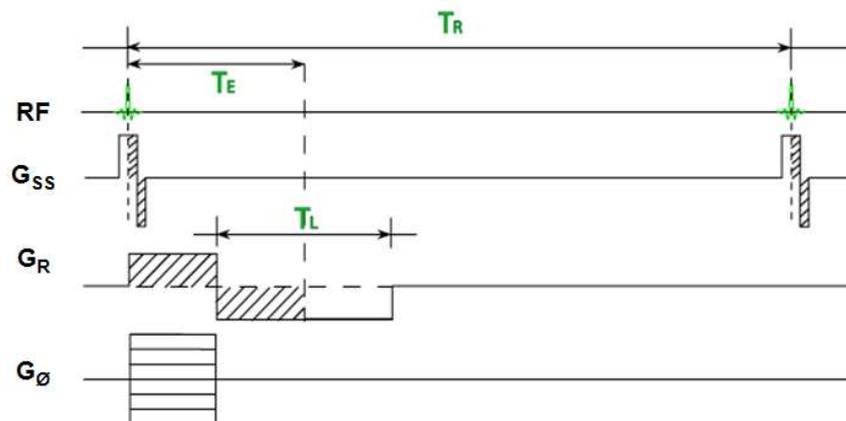


Figure 2-3 : Chronogramme d'une séquence GRE (Gradient Recalled Echo) représentant l'impulsion α , le gradient de lecture bipolaire G_R , les gradients de coupe G_{SS} et de phase G_ϕ . Les paramètres TR et TE sont indiqués, ainsi que la formation du signal d'écho de gradient (GRE). La durée T_L d'application du second lobe du gradient de lecture est généralement un peu plus élevée que la durée d'acquisition du signal.

¹ SPGR : Nom propre au constructeur General Electric (GE)

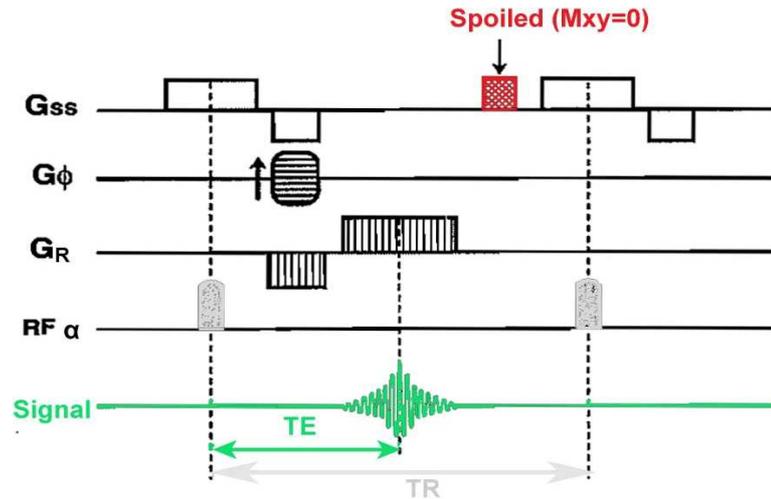


Figure 2-4 : Chronogramme de la séquence SPGR. G_{ss} , G_{ϕ} et G_R sont respectivement les gradients de sélection de coupe, de phase et de lecture. Les impulsions RF sont de type α . La séquence SPGR comporte un gradient spoiler appliqué en fin du cycle après la lecture du signal pour déphaser toute aimantation transversale persistante.

La séquence SPGR comporte un gradient bipolaire qui provoque également un *écho de gradient* (Figure 2-4). La différence entre les séquences SPGR et d'écho de gradient (GE) classique se caractérise par un temps de répétition TR généralement inférieur à T_2^* . Des aimantations transversales résiduelles (proportionnelles à $e^{-(TR/T_2^*)}$) pouvant persister d'un cycle à l'autre peuvent perturber l'écho de gradient proprement dit. Le fait de détruire l'aimantation transversale résiduelle, par un gradient déphaseur ou "spoiler" appliqué à la fin de chaque séquence élémentaire et après la lecture du signal (Figure 2-4), permet de raccourcir la durée de la séquence et indirectement d'obtenir une bonne pondération en T_1 . La réalisation de cette séquence en mode 3D permet de faire l'imagerie volumétrique en des temps relativement courts. Cette technique permet d'obtenir des coupes fines jointives jusqu'à 0,7 mm.

L'expression de l'amplitude maximale du signal d'écho S mesuré pour une acquisition sans gradient de phase avec cette séquence peut être donnée par la relation :

$$S = M_0 e^{-TE/T_2^*} \sin \alpha \left(\frac{1 - e^{-TR/T_1}}{1 - \cos \alpha e^{-TR/T_1}} \right) \quad (2-7)$$

L'expression indiquée montre que cette amplitude peut être rendue maximale par un choix de l'impulsion à l'angle de Ernst après sa dérivation de (2-7) et qui vaut :

$$\alpha_{\text{optimal}} = \arccos(e^{-TR/T_1}) \quad (2-8)$$

2.1.2.2 Séquence Spin Echo (SE) et Fast Spin Echo (FSE)

Une séquence *SE* est constituée de deux impulsions *RF* successives d'angles α_1 et α_2 . Le plus souvent, en pratique, les impulsions sont respectivement de 90° et 180° . Une première impulsion de 90° bascule \vec{M} dans le plan transversal (Oxy). La dispersion des aimantations qui a lieu sous l'effet du manque d'uniformité du champ statique se compense à la suite de la seconde impulsion à 180° , reformant ainsi un deuxième signal, l'écho (Figure 2-5). L'intensité du signal dépend du temps de répétition (*TR*) et du temps d'écho (*TE*) permettant une pondération de contraste en T_1 ou en T_2 .

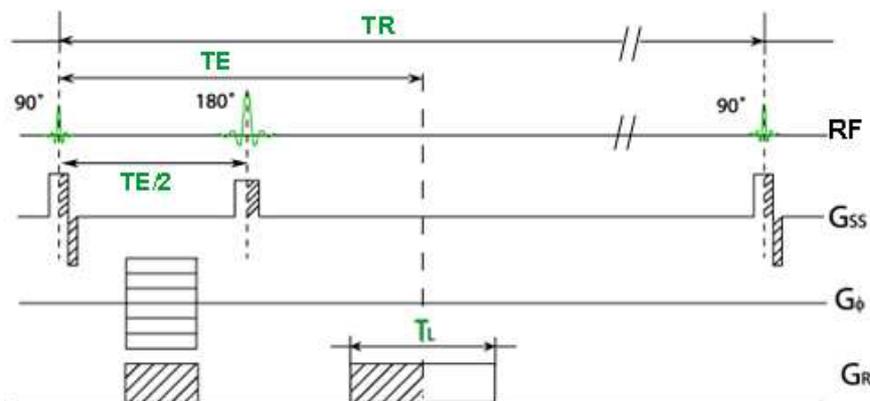


Figure 2-5 : Chronologie des impulsions *RF* et de gradient et paramètres de la séquence d'écho de spins. Le temps (*TE*) correspond au temps d'écho et le temps de répétition (*TR*) est l'intervalle séparant deux impulsions de 90° . Les gradients de champ magnétique, appliqués dans les trois directions, G_{SS} , G_ϕ et G_R sont utilisés respectivement pour la sélection de la coupe, le codage de phase et de fréquence (ou de lecture).

La séquence *FSE* est une version accélérée de la séquence *écho de spins* (*SE*) datant de 1991 [Melki1991] et ordonnée de la séquence plus ancienne *RARE*. Les chronogrammes respectifs (impulsion *RF* et gradients) sont représentés par la Figure 2-6. La séquence *FSE* rapide génère dans un seul intervalle du temps *TR* une série d'impulsions de refocalisation de 180° pour produire des échos successifs ou "train d'écho" ou "echo train length" (ETL). Chaque écho, dans un même *TR*, bénéficie d'un codage de phase spécifique conduisant à la réalisation d'une ligne supplémentaire du plan de Fourier. Les échos successifs sont décalés par "un espace de temps" ou "echo spacing : ES". Les avantages de cette technique se manifestent par la réduction du temps d'acquisition (inversement proportionnelle à ETL).

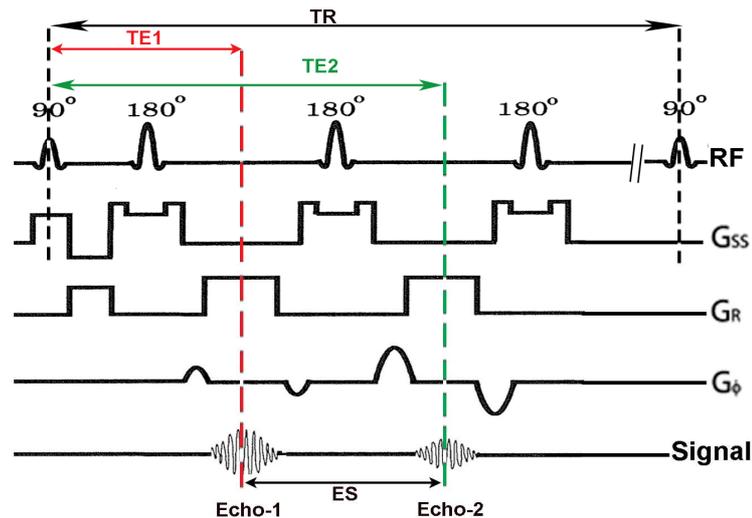


Figure 2-6 : Chronogramme d'une séquence FSE utilisant d'impulsions de refocalisation à 180° au cours d'une seule durée TR et également plusieurs valeurs du gradient phase G_ϕ au cours de cette même durée. [Melki1991].

Dans toute séquence de type Spin-Echo, on peut obtenir un contraste en T_1 si le temps d'écho TE est court avec un temps de répétition TR court et un contraste en T_2 si le temps d'écho TE est long avec un temps de répétition très long. On peut donc également obtenir un contraste en T_1 avec la séquence FSE si la valeur de TR reste relativement faible afin de limiter la récupération de l'aimantation selon la direction du champ statique et si on maintient des valeurs faibles de TE tout en augmentant la cadence des impulsions de 180° .

Les premiers échos obtenus (échos précoces) sont peu affectés par la décroissance T_2 , que se soit selon la direction du gradient de lecture ou selon celle du gradient de phase. Ils occuperont la partie centrale de l'espace réciproque. La reconstruction à partir de ces données uniquement donnera une image imparfaitement nette mais pondérée en T_1 . Par contre, avec une valeur de TR plus élevée qui autorise une meilleure relaxation T_1 , on pourra utiliser des échos plus tardifs, échos dont l'amplitude est pondérée en T_2 . Aux valeurs faibles des gradients de lecture et de phase les signaux occuperont la partie centrale de l'espace réciproque et on aura une image, imparfaitement nette, mais pondérée en T_2 .

En allant recueillir des données avec des valeurs de gradient de phase et de lecture plus importantes que celles mentionnées ci-dessus (donc en complétant le remplissage de l'espace réciproque) on peut améliorer la netteté des images dans les deux situations mentionnées ci-dessus sans trop affecter la pondération. C'est en effet envisageable étant donné, qu'en raison de l'affaiblissement de ces signaux, le poids des données aux

fréquences spatiales élevées est relativement plus faible que le poids de celles qui sont aux basses fréquences spatiales.

2.1.2.3 Séquence *Balanced steady state-state free precession (Balanced SSFP)*

Cette séquence a plusieurs noms selon les constructeurs : *TrueFISP* (Siemens), *Fiesta* (GE) et *Balanced-FFE* (Philips). Elle appartient à la famille des *échos de gradients* qui utilisent un *gradient rephaseur* (Rewinder) en fin de cycle après lecture du signal, au contraire du *gradient spoiler* en *SPGR*. Le gradient rephaseur consiste à appliquer un deuxième gradient de codage de phase de même amplitude mais de polarité opposée, dont le rôle est de compenser le déphasage des spins induit par le premier gradient de codage en phase (Figure 2-7). Celui-ci va renforcer l'aimantation transversale résiduelle. En fait les deux gradients G_{SS} et G_R appliqués pendant TR présentent une deuxième polarité afin de compenser le déphasage transversal des spins (Figure 2-7). En régime permanent le vecteur d'aimantation transversale est reformé à la fin de chaque séquence élémentaire, toutes les TR secondes.

Donc pour de très court TR (3–5 ms) par rapport à T_1 et T_2 , le signal obtenu est composé de deux échos de gradients superposés produits, l'un par l'aimantation longitudinale (résiduelle + repousse pondérée en T_1) et l'autre par l'aimantation transversale créée par le régime permanent. Le rapport signal sur bruit en est amélioré, mais la pondération de l'image est plus complexe, il est possible de montrer que dans certaines situations, cette pondération dépend principalement du rapport T_2/T_1 [Haacke1999 b].

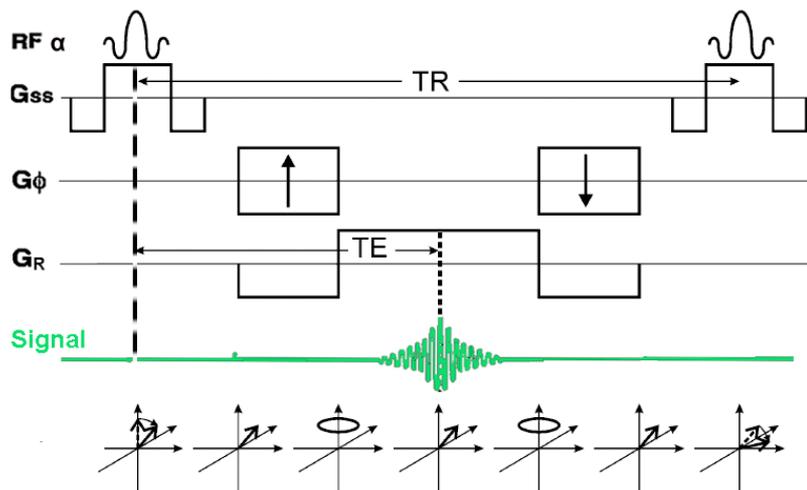


Figure 2-7 : Représentation du chronogramme de la séquence *Fiesta* et de l'évolution de l'aimantation dans un TR . Ensemble des gradients (codage de phase, sélection de coupe et de lecture) équilibré (gradients appliqués de façon symétrique par rapport à la date de l'écho) de façon symétrique pour avoir un vecteur d'aimantation unique non-déphasé à la fin de TR . D'après [Scheffler2003]

Dans le cas de la Figure 2-7 où la séquence de base présentée correspond à une technique SSFP en régime cohérent, les solutions les plus fréquemment abordées concernent les situations où TR est très court devant T_1 et devant T_2 (ce qui est normal, puisque l'on opère en imagerie rapide). En outre on peut faire en sorte que, pour la plupart des tissus et moyennant des choix particuliers de l'angle de basculement, il est possible d'obtenir un signal optimisé en ce qui concerne l'amplitude, laquelle est, de façon approchée, proportionnelle à $1/2M_0(T_2/T_1)^{1/2}$ [Haacke1999 b]. Soit,

$$S = \frac{1}{2} M_0 \sqrt{T_2/T_1} \quad (2-9)$$

A partir de cette relation on peut donc obtenir des cas de pondération intéressants : selon la densité de noyaux, mais surtout, et ceci apparaît bien dans le résultat approché indiqué, selon les différentes valeurs relatives prises par T_2 et T_1 . Cette séquence, dont l'étude complète est longue et complexe, est donc capable de donner de contrastes en T_2/T_1 ce qui en fait une séquence assez particulière.

Enfin, ce qui est intéressant également avec cette séquence, est que l'on peut jouer sur le rapport T_2/T_1 d'un tissu donné en y incorporant des agents de contraste.

2.1.3 Produits de contraste

Quand le contraste entre les tissus n'est pas suffisant, on peut l'améliorer par l'ajout d'un agent de contraste extrinsèque et gagner indirectement en sensibilité et précision lors de la discrimination des tissus entre eux. En clinique, de nombreux diagnostics en tirent bénéfice : angiographie, caractérisation des sténoses et des tumeurs, malformations vasculaire, etc... .

2.1.3.1 Effet de l'agent de contraste sur les temps de relaxation

En *IRM*, les agents de contraste possèdent des propriétés magnétiques qui permettent d'accélérer la relaxation des protons situés dans leur proximité. Les temps de relaxation protonique sont réduits, les vitesses de relaxation $1/T_1$ ou $1/T_2$ sont augmentées. Cela a une influence positive ou négative sur l'amplitude du signal en provenance des tissus où se trouve un produit de contraste. Cet effet se traduit par un rehaussement ou un affaiblissement du signal image correspondant à ces tissus par rapport aux tissus voisins qui contiennent moins ou très peu de produit.

La vitesse de relaxation observée ($1/T_{\text{observé}}$) est la somme des vitesses de relaxation intrinsèque propres aux tissus ($1/T_{\text{intrinsèque}}$) et celles extrinsèque propres au produit de contraste ($1/T_{\text{produit de contraste}}$).

$$\frac{1}{T_{\text{observé}}} = \frac{1}{T_{\text{intrinsèque}}} + \frac{1}{T_{\text{produit de contraste}}} \quad (2-10)$$

Aux concentrations $[c]$ (mesurées par exemple en mmol.l^{-1}) utilisées *in vivo*, la variation de la vitesse de relaxation (en s^{-1}) du produit de contraste en fonction de la concentration, pour un champ et une température donnés, est linéaire. Toujours dans les conditions de concentration employée *in vivo*, cette relation est fait intervenir les relaxivités r_1 et r_2 (en $\text{l.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$) qui sont propres à l'agent de contraste.

$$\frac{1}{T_{1 \text{ produit de contraste}}} = r_1 \cdot c \quad (2-11)$$

$$\frac{1}{T_{2 \text{ produit de contraste}}} = r_2 \cdot c \quad (2-12)$$

2.1.3.2 Catégories d'agent de contraste et taux ou vitesse de relaxation

La plupart des matériaux acquièrent, en présence d'un champ magnétique externe, un moment magnétique par unité de volume ou aimantation \vec{M} définie de la façon suivante : $\vec{M} = \chi \vec{H}$ où χ est la susceptibilité magnétique du milieu, grandeur sans dimension, et \vec{H} vecteur excitation magnétique d'un milieu dans lequel règne un champ magnétique \vec{B} . Le vecteur excitation magnétique \vec{H} a la même dimension que l'aimantation \vec{M} qui s'exprime en Ampère/mètre.

En fonction de la valeur de χ , on peut distinguer deux grandes catégories de produits de contraste utilisés cliniquement: les agents paramagnétiques et superparamagnétiques (*superparamagnetic iron oxide* : SPIO). Ces deux agents, à faibles doses, ont des effets différents sur le signal IRM.

Les agents paramagnétiques qui présentent une magnétisation dans la même direction que celle du champ magnétique appliqué possèdent donc une susceptibilité magnétique positive ($\chi > 0$) et petite. Ils créent des champs magnétiques locaux qui fluctuent sous l'effet des mouvements moléculaires et qui vont ainsi accélérer la relaxation des protons. La plupart de ces agents sont formés à partir d'ions de

Gadolinium (Gd^{3+}) associés à un produit chimique, un *Chélate*. La chélation permet de réduire considérablement la toxicité de ces ions sans neutraliser leur efficacité, et parfois, dans certains cas, sans la modifier. Les relaxivités (r_1 et r_2) des agents de contraste paramagnétique sont dans une même gamme de valeur. Elles diminuent T_1 et T_2 en même temps. Comme dans les tissus T_1 est largement supérieur à T_2 , l'effet T_1 est prépondérant sur l'effet T_2 . La diminution de T_1 va améliorer la vitesse de récupération de l'aimantation selon la direction du champ statique, l'amplitude du signal *IRM* dans les régions où se trouve le produit de contraste va se trouver renforcée, on obtient des séquences pondérées en T_1 . Pour cette raison, les agents paramagnétiques sont dits agents de contraste positif ou agents du rehaussement T_1 , sauf à très forte concentration où T_2 est également tellement court que l'on ne recueille plus aucun signal [Kirsh1991].

Les produits paramagnétiques existent sous deux structures chimiques différentes, l'une ionique comme le Dotarem[®] (nom abrégé : Gd-DOTA, nom générique : Gadoterate, fournisseur : Guerbet, France) et le Magnevist[®] (nom abrégé : Gd-DTPA, nom générique : Gadopentetate dimeglumine, fournisseur : Schering AG, Allemagne) et l'autre non ionique comme l'Omniscan[®] (nom abrégé : Gd-DTPA-BMA, nom générique : Gadoterate, fournisseur : Nycomed, Norvège) et le ProHance[®] (nom abrégé : Gd-HP-DO3A, nom générique : Gadoteridol, fournisseur : Bracco SpA, Italie) [Elster2001].

Les agents superparamagnétiques possèdent une susceptibilité magnétique positive de valeur très supérieure à celle des agents paramagnétiques. Ces agents sont composés de nanoparticules d'oxyde de Fer ou de structures cristallines similaires (taille de la magnétite (Fe_3O_4) de l'ordre de 8 nm et celle des ferrites (Fe_2O_3) de 3 à 10 nm). La destruction de l'uniformité du champ statique à l'échelle très locale fait que la valeur de relaxivité r_2 de ces agents est largement supérieure à celle de r_1 , on dira que l'effet T_2 est prépondérant sur l'effet T_1 . Ils induisent alors une diminution du signal par leur forte susceptibilité magnétique. Pour cette raison, les agents *SPIO* sont dits agents de contraste négatif ce qui correspond à une relaxivité élevée. Une augmentation du signal est cependant possible à très faible concentration du fait d'une forte relaxivité r_1 [Chambon1993].

Les agents *SPIO* approuvés pour l'utilisation clinique sont l'Endorem[®]/Feridex[®] (nom abrégé : AMI-25, nom générique : Ferumoxides et fournisseur : Guerbet, France) et le Resovist[®] (nom abrégé : SHU 555, nom générique : Ferucarbotran et fournisseur : Schering AG, Allemagne). Le noyau de l'Endorem[®] est entouré par un revêtement de Dextran (Polysaccharide) assurant sa stabilité colloïdale. L'Endorem[®] a une taille environ de 30 à 150 nm.

2.1.3.3 Effet de l'agent de contraste sur le signal image

L'utilisation d'un agent de contraste est essentielle dans notre travail pour rendre les microparticules d'occlusion vasculaire visible sous *IRM*. A cet égard, il peut être intéressant de déterminer expérimentalement le signal image des solutions de *SPIO* à plusieurs pourcentages volumiques pour voir son accroissement et son déclin. L'agent de contraste choisi pour cette étude est l'Endorem[®].

Nous avons réalisé la dilution d'une gamme croissante d'Endorem[®] dans du sérum physiologique ($S\phi$). Pour la gamme la plus étendue possible en utilisant 5,754 ml d'Endorem[®], nous avons réparti ce volume dans 24 flacons (Annexe D). Les flacons ont été disposés en 3 étapes dans une boîte en plastique remplie par l'eau qui à son tour est placée sur le support amagnétique de la façon représentée par la Figure 2-8. Chacune des trois étapes comportent huit flacons pour un pourcentage volumique croissant d'Endorem[®], et un flacon témoin de 4 ml de sérum physiologique $S\phi$ intact situé au centre.

Trois acquisitions d'*IRM* avec la séquence *FSE-XL T₁* (section 2.3.5.3) ont été alors réalisées pour imager les 24 flacons. Les paramètres d'acquisition et de calibration de séquence sont les mêmes pour toutes les acquisitions. Le signal mesuré, pour chaque dose d'Endorem[®], est soumis à la méthodologie de correction représentée par l'organigramme de la Figure 4-4 au chapitre.4.

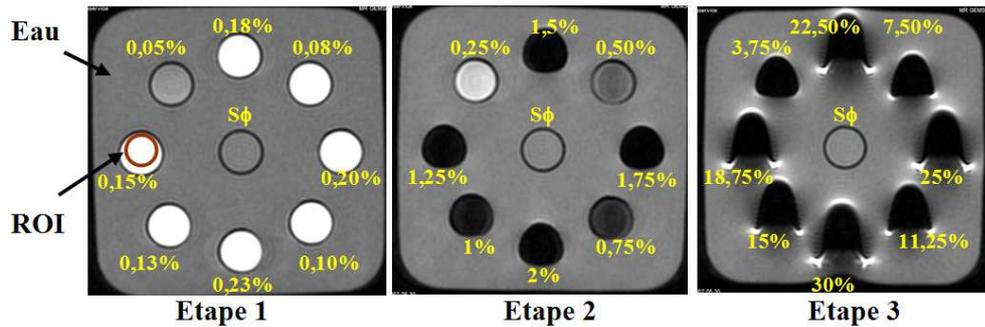


Figure 2-8 : Images RM T_1 de trois gammes de solution d'Endorem[®] dilué dans du sérum physiologique. Les petits cercles sont les flacons contenant des solutions d'Endorem[®] aux pourcentages indiqués sur la figure. Les trous noirs de forme plus ou moins allongée dans la direction du gradient de lecture sont dus à un artefact de susceptibilité créé en principe par les édifices SPIO, ce qui a été déjà justifié par Beuf [Beuf1996]. Séquence 2D FSE-XL : TR/TE : 500/15 ms, matrice : 128×128 pixels, FOV : 18×18 cm, ETL : 4, BW : 15,63 kHz et Nex : 6. Le nombre de pixel dans toutes les régions d'intérêt "ROI" de formes circulaires est constant dans toutes nos mesures du signal à l'intérieur des parties les moins perturbées de flacons images, soit 15 pixels par flacon.

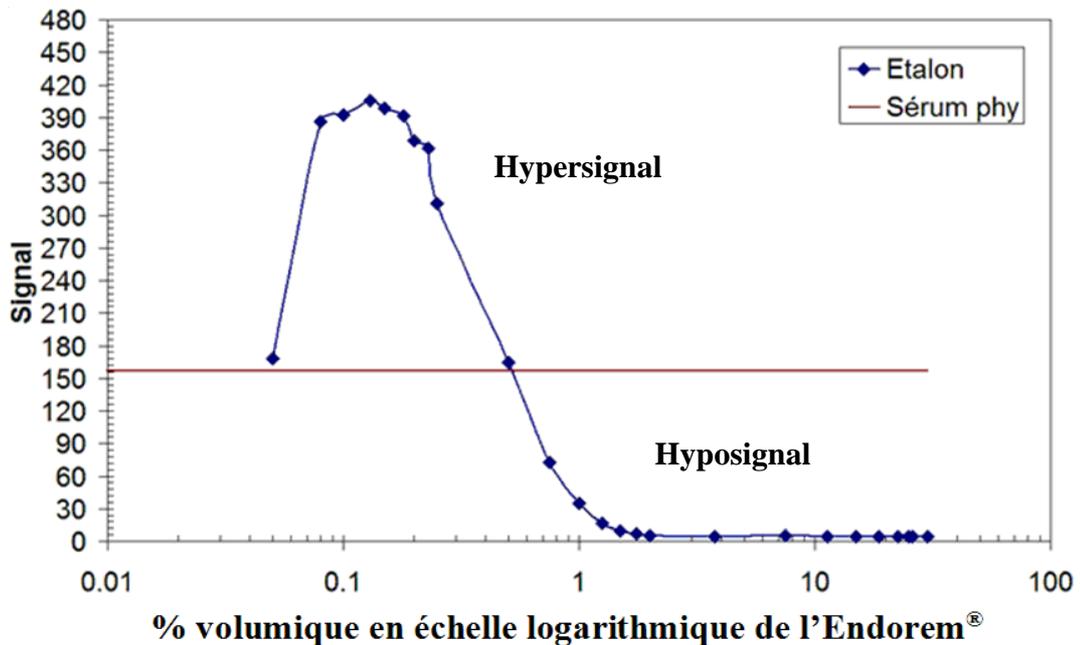


Figure 2-9 : Amplitude du signal image T_1 des solutions d'Endorem[®] à plusieurs pourcentages volumiques. Le trait horizontal correspond au signal du sérum physiologique puisque le point représentant ne peut pas être représenté en échelle semi log. [Chapitre.4]

La Figure 2-9 représente le signal image des solutions contenant l'Endorem[®] à plusieurs doses. Il est comparé avec la valeur moyenne des amplitudes du signal image du sérum physiologique intact.

A faible pourcentage volumique d'Endorem[®] (de 0,05 à 0,5%), l'agent de contraste se répartit partout dans le sérum physiologique. Le signal de la solution est augmenté par rapport à celui du sérum physiologique $S\phi$, on observe un rehaussement du signal ou un hypersignal.

A fort pourcentage volumique (de 0,75 à 30%), la quantité d'agent de contraste dispersée dans le sérum physiologique $S\phi$ augmente. Le temps de relaxation T_1 peut éventuellement continuer à raccourcir (d'après la relation 2-11). Le signal de la solution est diminué par rapport à celui du sérum physiologique $S\phi$, on observe des diminutions du signal, cas d'un hyposignal.

Au-delà de 0,75%, le signal de la solution est toujours inférieur à celui du sérum physiologique. Ceci ne représente aucun changement d'amplitude lorsque la dose d'Endorem augmente.

Cet agent superparamagnétique peut être proposé, comme agent de marquage à des doses au-delà de 0,5%, dans mon travail pour les raisons suivantes :

a) Contraste négatif entre agent d'occlusion et tissu

Les tissus qui relèvent de l'embolisation n'ont pas tous le même signal *IRM*. L'objectif est de pouvoir marquer les microparticules d'occlusion vasculaire par un agent de contraste visible à l'*IRM* qui permettrait de les différencier à la fois des structures vasculaires dans lesquelles elles se trouvent et des tissus environnants (chapitre.3). De plus, il serait souhaitable de pouvoir effectuer cette distinction avec l'ensemble des séquences d'utilisation habituelle. Un signal de niveau constant leur conférant une signalétique propre est préférable pour l'ensemble des séquences. Cette hypothèse a été vérifiée par l'étude de Chapot [Chapot2000] concernant le marquage d'hydrogel acrylique² en hyposignal. Un tel marquage semble plus simple à obtenir que le marquage en hypersignal en utilisant des agents *SPIO* à forte concentration par « effet T_1 » (Figure 2-9).

b) Taille des particules

La même étude [Chapot2000] a aussi démontré l'intérêt des produits de contraste formés de gros édifices dans le marquage des agents d'embolisation. Ces édifices restent prisonniers de l'hydrogel acrylique dont la structure est microporeuse. Une telle grosse taille, peut être obtenue avec le *SPIO* (30 à 3500 nm).

c) Toxicité

La toxicité à long terme des agents d'occlusion avec l'agent de contraste intégré à l'intérieur doit être prise en compte puisqu'il s'agit d'implants qui restent dans

² Hydrogel acrylique : Matériel constituant certaines particules d'occlusion.

l'organisme. L'agent de contraste peut être relargué tardivement. Son maintien prolongé dans l'organisme peut entraîner un risque de séparation de certains chélates et d'ions et donc de toxicité propre des deux (cas des agents de contraste en Gadolinium). L'utilisation de *SPIO* conduit à une faible toxicité en cas de rupture du revêtement de dextran. Les ions du Fer libérés sont assez bien métabolisés par l'organisme [Pouliquen1991].

Pour ces raisons, on pourra détecter les emboles grâce à l'affaiblissement de leur signal image. A partir des graphes dans la Figure 2-9, il s'agira donc de déterminer la dose optimale à leur associer.

2.1.4 Antennes

Le contrôle du rapport signal sur bruit (S/B) est une donnée fondamentale pour l'imagerie rapide et l'imagerie à haute résolution.

L'amplitude du signal est proportionnelle au volume du voxel $dV(\vec{a})$, et à la résultante de ses moments magnétiques. L'expression de l'amplitude du signal, (en Volt), est :

$$dS = \omega_0 |M_{xy}(\vec{a})| |\beta(\vec{a})| dV(\vec{a}) \quad (2-13)$$

Avec, $M_{xy}(\vec{a})$: magnétisation transversale (en A/m) à une position \vec{a} et $\beta(\vec{a})$: sensibilité de l'antenne au point \vec{a} (en T/A) qui est égale à $\beta = B_1 / I$ (B_1 est le champ magnétique de radiofréquence généré par un courant I dans l'antenne).

En haute résolution, $dV(\vec{a})$ devient petit ce qui engendre un signal faible. Le signal dépend aussi de la situation de la magnétisation dans le voxel à l'équilibre. Par exemple si le temps de répétition est court par rapport au temps de relaxation spin-milieu, la magnétisation ne revient pas complètement à l'équilibre entre deux excitations successives d'une séquence *GRE*. Par conséquent, la magnétisation disponible à l'excitation le long de l'axe z peut s'en trouver affaiblie de manière plus ou moins significative.

Le bruit B (en Volt) dans le système *IRM* provient essentiellement des pertes équivalentes aux pertes ohmiques dans le résonateur (antenne) et du bruit apporté par le préamplificateur *RF* (en général assez faible).

$$B = (4\kappa_B TR\delta f)^{1/2} \quad (2-14)$$

Où, κ_B : constante de Boltzmann, T : température de l'antenne en fonctionnement (en K), δf : bande passante du récepteur (en s^{-1}), R : résistance traduisant l'ensemble des pertes énergétiques dans le circuit de l'antenne et dans le patient (pertes magnétiques et pertes diélectriques et toute autre perte éventuelle).

Le rapport S/B dans le domaine temporel peut être établi à partir de la relation 2-15 ; il dépend donc de plusieurs facteurs parmi lesquels on remarque que les propriétés de l'antenne sont considérables, en particulier, on constate en faisant le rapport des amplitudes indiquées que l'efficacité de l'antenne est représentée par le rapport $\frac{B_1}{I\sqrt{R}}$, grandeur qui peut dépendre légèrement de la nature de l'échantillon (en général très peu pour les patients de même taille) mais qui dépend de l'emplacement du voxel considéré par la dépendance spatiale de B_1 . Le choix de l'antenne est donc essentiel dans notre travail pour ce qui est du rapport S/B . C'est également un élément indicateur de la qualité de l'image permettant de prendre en compte la répartition spatiale de l'intensité du signal.

On aura donc pour rapport signal sur bruit dans le domaine du temps :

$$\frac{S}{B} = \frac{\omega_0 |M_{xy}(\vec{a})| |\beta(\vec{a})| dV(\vec{a})}{(4\kappa_B TR\delta f)^{1/2}} \quad (2-15)$$

Grandeur qui, en raison du paramètre \vec{a} , peut donc dépendre de l'emplacement occupé par le volume dV .

La relation (2-15) compare dans le domaine du temps, l'amplitude du signal d'un voxel avec le bruit de l'ensemble de l'échantillon.

Le rapport signal sur bruit dans une image *2D* tient compte de la reconstruction par transformation de Fourier et du nombre N_{ex} de répétitions des expériences par accumulation. Il est relié au rapport S/B du domaine temporel par :

$\left(\frac{S}{B}\right)_{image} = \left(\frac{S}{B}\right) \cdot \sqrt{N_R \cdot N_\Phi \cdot Nex}$ où N_R est le nombre de pixels comptés le long de la direction du gradient de lecture et N_Φ le nombre de pas de codage de phase. Le format de l'image 2D est $N_R \cdot N_\Phi$ tandis que le volume dV peut être déterminé connaissant l'épaisseur de coupe Δ et les deux côtés du champ de vue. On obtient :

$$\left(\frac{S}{B}\right)_{image} = \frac{\omega_0 |M_{xy}(\vec{a})| |\beta(\vec{a})| dV(\vec{a})}{(4\kappa_B TR \delta f)^{1/2}} \sqrt{N_R \cdot N_\Phi \cdot Nex} \quad (2-16)$$

Ce résultat peut éventuellement être corrigé en tenant compte du facteur de bruit du préamplificateur radiofréquence qui apporte généralement une faible atténuation. Noter que l'obtention de cette formule qui convient très bien au cas d'un signal de précession libre ne tient pas compte de l'atténuation du signal lié au délai conduisant à la formation de l'écho en IRM. L'ordre de grandeur reste bon et la correction est relativement aisée pour chaque type de séquence.

On notera également que la relation entre le rapport signal sur bruit dans le domaine du temps et dans le domaine de l'image correspond à une reconstruction en amplitude du signal image. Le bruit dans le domaine du temps supposé gaussien reste gaussien dans l'image. Dans le cas où l'on détermine l'image par le module du signal, le bruit est « redressé » et devient « ricien », ce qui modifie non seulement ses propriétés mais aussi son amplitude. On peut toutefois considérer que l'ordre de grandeur du rapport signal sur bruit est, en première approximation celui qui est donné par les relations établies. Enfin, comme nous serons conduits à étudier également des contrastes entre différentes régions de l'image, il est utile de rappeler la notion de contraste sur bruit entre deux régions (ou tissus), souvent employée en IRM :

$$\frac{C_{AB}}{B_{image}} = \frac{S_A - S_B}{B_{image}} \quad (2-17)$$

Où le signal de la région A est notée S_A et celui de la région B est notée S_B . Cette grandeur caractérise alors la capacité du système d'imagerie à distinguer les régions A et B en présence de bruit et sa valeur se répercute sur le pouvoir de résolution du dispositif utilisant une séquence donnée lorsqu'il observe A et B.

Il peut être intéressant de comparer de ce point de vue les deux catégories d'antennes employées en IRM, volumique et surfacique.

2.1.4.1 Antennes volumique

L'intérêt des antennes volumiques (en selle ou en cage par exemple) est qu'elles produisent un champ radiofréquence assez uniforme, mais cette homogénéité reste modeste (de l'ordre de 10%) par rapport à celle du champ statique (de l'ordre de quelques parties par million). Par conséquent, leur réponse possède les mêmes propriétés. Les bobines en cage peuvent être utilisées en quadrature de façon à renforcer leur sensibilité.

2.1.4.2 Antennes de surface

Ces antennes peuvent être utilisées en émission et réception, ou uniquement en réception comme tout type d'antenne.

Elles existent en deux types : antennes en "quadrature de phase" et antennes en "réseau phasé" ou "phased array coil" (antenne : cardiaque, carotide, abdominale, ...). Le premier type d'antenne est constitué d'un bobinage capable de détecter les deux composantes orthogonales (en quadrature) d'un signal *RMN*. Ces antennes apportent un gain de l'ordre de 40% du rapport *S/B* à la réception. Le deuxième type d'antenne permet d'utiliser le bon rapport *S/B* de plusieurs antennes de petits diamètres (qui ne permettent d'imager qu'un faible volume) avec l'exploration d'un grand champ de vue.

L'intérêt des antennes de surface se résume au fait que l'on peut avoir une très bonne proximité avec une partie de l'échantillon et par conséquent un bon rapport *S/B* dans cette région proche. Par contre ceci se paie par une très mauvaise uniformité du champ radiofréquence et par conséquent limite les applications quantitatives qui doivent être conduites avec prudence.

La détection des microparticules marquées, en haute résolution, par une *IRM* clinique opérant à 1,5T, est l'enjeu principal de cette thèse. Cette question peut être abordée en comparant la sensibilité spatiale de plusieurs antennes sur un fantôme homogène.

2.2 Sensibilité des antennes de surface en fonction de la profondeur et d'une direction transversale

Notre choix s'est orienté d'une part vers une antenne surfacique de petit champ de vue, et d'autre part vers une antenne de champ de vue moyen, selon l'information recherchée. Les microparticules marquées par *SPIO*, dont la détectabilité par *IRM* sera soulignée dans le chapitre.3, sont destinées aux fibromes utérins, *in vivo*. Il est alors plus confortable de positionner contre la région abdominale une antenne surfacique de dimensions moyennes, comme l'antenne cardiaque.

Avant d'envisager l'application clinique de ces microparticules, nous étudions leur détectabilité *in vitro* et *ex vivo*. Leur présence dans un milieu simple peut grever le bénéfice d'une antenne de petite dimension.

La zone de sensibilité de deux antennes surfaciques différentes, en profondeur et en largeur, est caractérisée sur un fantôme homogène, pour déterminer la limite de réception des informations.

2.2.1 Sensibilité des antennes de surface en fonction de la profondeur

2.2.1.1 Matériels et Méthodes

a) Antennes

L'antenne cardiaque est une antenne bilatérale (21 cm de longueur avec 27 cm de largeur). Elle comporte un élément postérieur placé sous le dos du patient et un autre antérieur placé sur le thorax. Chaque élément est composé de deux bobines ou deux canaux, constituant ainsi quatre canaux. La conception de cette antenne permet de recevoir en profondeur du signal au-delà de 3,5 cm et couvrir un champ de vue de 26 à 28 cm.

L'antenne carotide (Machnet, PACC-GS15) est aussi bilatérale. Elle comporte deux éléments : un à droite et un à gauche, elle mesure 8,5 cm de longueur et 11,5 cm de largeur. Chaque élément est composé de deux bobines constituant ainsi quatre canaux. Cette antenne est conçue pour recevoir du signal jusqu'à une profondeur de 3,5 cm et couvrir un champ de vue de 12 cm.

b) *Fantôme*

Le fantôme utilisé est une sphère de 17 cm de diamètre contenant du sulfate de cuivre (CuSO_4), permettant de comparer la réception de chaque antenne en fonction de la profondeur d'exploration.

Afin de déterminer la sensibilité de l'antenne cardiaque, nous l'avons placée de deux manières :

- 1) les éléments postérieur puis antérieur sont étudiés séparément l'un après l'autre.
- 2) les deux éléments antérieurs et postérieurs sont mis simultanément sur les deux côtés du fantôme.

On procède de la même manière avec l'antenne carotide, pour les éléments à droite et à gauche.

Dans les deux cas, une séquence d'écho de gradient est appliquée avec des coupes axiales en gardant à chaque fois les mêmes paramètres d'acquisition, les mêmes gains de transmission de la *RF* et de réception du signal. La stabilité de la température du fantôme est vérifiée par un afficheur adhésif. Pendant les manipulations, la température était constante, soit la température de la pièce, 24°C.

c) *Séquence IRM*

La séquence *3D SPGR* a été choisie pour la pondération T_1 , la haute résolution et la finesse des coupes, jusqu'à 0,7 mm. Le champ de vue choisi est de $14 \times 14 \text{ cm}^2$, qui convient aussi bien pour les acquisitions *in vivo* que celles *in vitro*. Nous utilisons une faible définition ($128 \times 128 \times 40$), en x, y et z afin de réduire le temps d'acquisition. Le Tableau 2-1 illustre les paramètres de cette séquence.

3D SPGR/oblique					Antennes : cardiaque et carotide						
TR (ms)	TE (ms)	α	FOV (cm)	Matrice	Epaisseur coupes (mm)	Nombre coupes	BW (kHz)	Phase FOV	options	Nex	
30	6	45°	14	160 ²	4	28	15,63	1	No phase wrap	2	
Temps d'acquisition : 5'11''											

Tableau 2-1 : Paramètres de la séquence *3D SPGR* appliquée pour l'imagerie d'un fantôme lors de l'étude de la sensibilité d'une paire d'antennes surfaciques.

d) Mesures

Les mesures du signal et du bruit sur les images du fantôme sont réalisées sur une station de travail AW4.3 (Advantage Windows AW 4.3 ; GE Helathcare), permettant d'importer et de relire les données *IRM* en format DICOM.

Les mesures sont faites en deux temps. Le premier consiste à observer un seul élément de la paire d'antennes, le second à observer les deux éléments de la paire d'antennes en même temps. Les mesures sont effectuées selon les étapes suivantes :

1. Choix d'une coupe correspondant au centre de l'antenne et du fantôme parmi les 28 coupes obtenues par la séquence *3D SPGR*.
2. Zoom de l'image.
3. Positionnement d'une série de régions d'intérêts (ROI) de forme carrée et de dimension $5 \times 5 \text{ mm}^2$.

Dans un premier temps, à un des éléments de la paire d'antennes, les *ROI* sont placées verticalement sur l'image, de la région où le signal est le plus intense jusqu'à 13 cm de profondeur (Figure 2-10 a et b).

Dans un second temps, les *ROI* sont placées sur l'image en regard des deux éléments de la paire d'antennes, c'est-à-dire entre les régions où le signal est le plus intense (Figure 2-11 a, b, c et d).

Enfin, le *S/B* est déterminé par le rapport entre le signal mesuré sur l'image du fantôme et l'écart type obtenu en fond d'image.

2.2.1.2 Résultats et discussion

D'après la Figure 2-10, le signal image correspondant à un seul élément de la paire d'antennes s'atténue en fonction de la profondeur. Jusqu'à une profondeur de 1 cm, le signal sur bruit image avec l'antenne carotide est deux fois supérieur à celui reçu par l'antenne cardiaque. Au-delà de 4,5 cm, le rapport signal sur bruit image avec l'antenne cardiaque devient supérieur à celui pour l'antenne carotide, il est de 46% à 9 cm de profondeur. Ces résultats soulignent la diminution progressive de *S/B* quand on s'éloigne de l'antenne, diminution plus rapide pour l'antenne carotide.

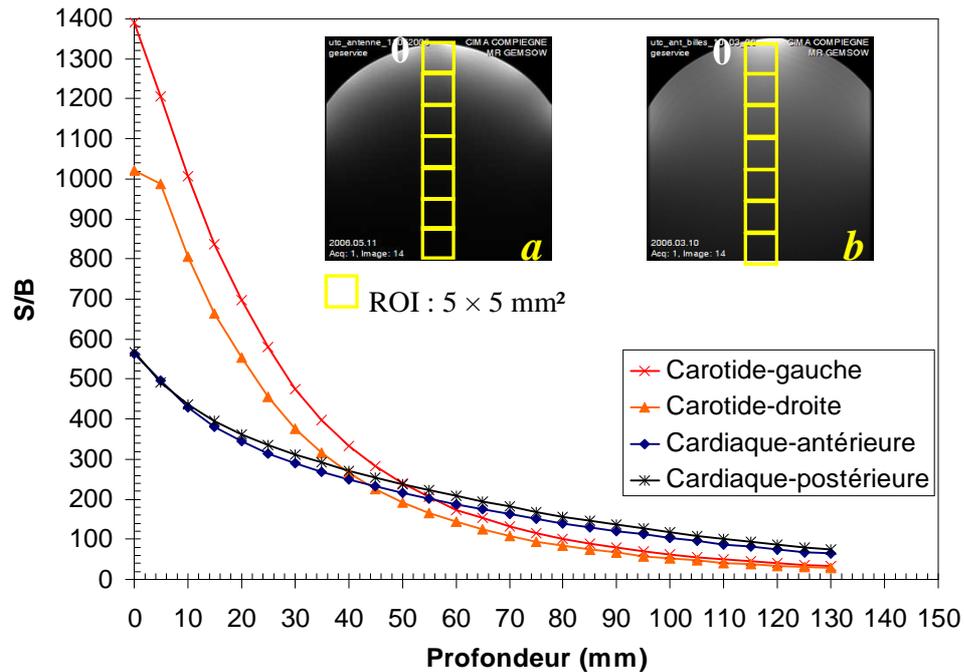


Figure 2-10 : S/B mesuré en fonction de la profondeur sur des images IRM, d'un fantôme sphère, acquises respectivement par un seul élément de la paire d'antennes surfaciques : carotide et cardiaque. (a) et (b) : images IRM T_1 axiales correspondant aux acquisitions respectives par un seul élément de chaque antenne : droite, pour l'antenne carotide, et antérieure, pour l'antenne cardiaque. Les carrés jaunes sur les images représentent les ROI de dimension $5 \times 5 \text{ mm}^2$ dont l'origine 0 correspond, sur l'image, à l'endroit où l'élément de l'antenne était positionné sur le fantôme.

La Figure 2-11 montre l'atténuation du signal sur bruit en fonction de la distance à chaque élément de la paire d'antennes, placé l'un en face de l'autre, droite et gauche ou antérieur et postérieur sur la sphère. Cette atténuation s'avère forte et symétrique avec l'antenne carotide, en revanche, elle est faible et asymétrique avec celles de l'antenne cardiaque.

Il nous paraît que la sensibilité de l'antenne carotide est bonne pour explorer les régions superficielles (jusqu'à une profondeur environ de 4,5 cm) tandis qu'elle est mauvaise en profondeur (au-delà de 4,5 cm). Par contre, la bonne sensibilité de l'antenne cardiaque en profondeur ($> 4,5 \text{ cm}$) confirme son utilisation pour les explorations éloignées.

Avec l'antenne carotide, il est possible d'augmenter la résolution sans avoir une décroissance notable du signal sur bruit. Ceci est compensé par la proximité de l'antenne de la région émettrice et également par son petit volume. En revanche, l'augmentation de la résolution avec l'antenne cardiaque détériore la qualité de l'image.

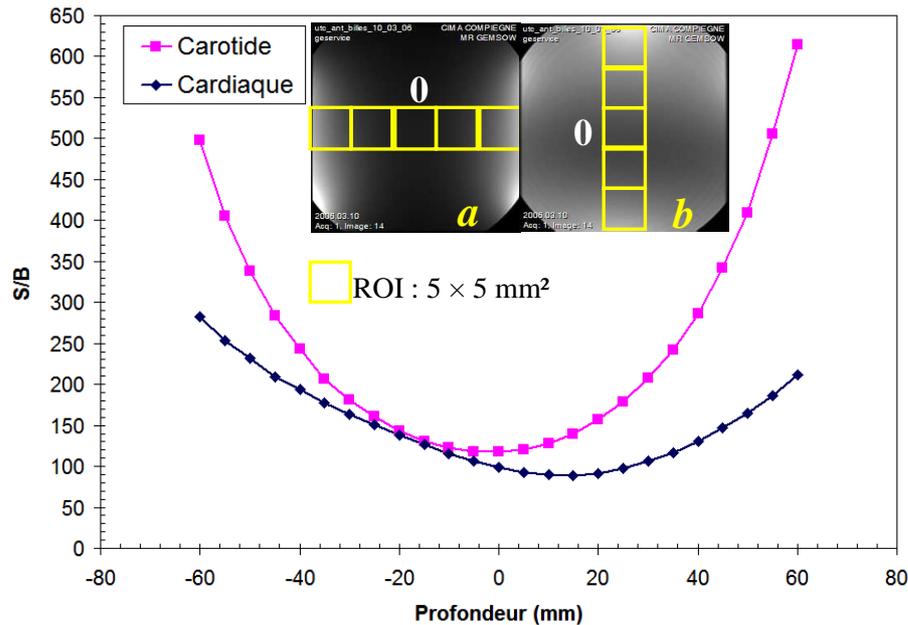


Figure 2-11 : Rapport S/B mesuré en fonction de la profondeur sur des images IRM, du fantôme sphère, acquises respectivement par les deux éléments d'une paire d'antennes surfaciques : carotide et cardiaque. (a), (b) : images IRM T_1 axiales du fantôme correspondant aux acquisitions respectives par les deux éléments droite-gauche et antérieur-postérieur des antennes carotide et cardiaque. Les carrés jaunes représentent les ROI (dimension : $5 \times 5 \text{ mm}^2$) dont l'origine 0 correspond, sur l'image, au centre du fantôme.

2.2.2 Sensibilité des antennes de surface en fonction d'une direction transversale

Nous avons montré dans le paragraphe précédent (2.2.1) la variation du signal sur bruit en fonction de la profondeur. La sensibilité de l'antenne change aussi transversalement pour une profondeur déterminée. Cette partie décrit la non uniformité de la sensibilité du signal, de chaque antenne, dans un tel cas.

2.2.2.1 Matériels et méthodes

Le fantôme sphère est de nouveau utilisé pour étudier transversalement la sensibilité des antennes. Les deux éléments des antennes carotide (Figure 2-12 a, b et c) et cardiaque (Figure 2-12 d, e et f) sont placés sur les côtés droite-gauche et en antérieur-postérieur du fantôme. Le signal est déterminé par des ROI uniformes ($5 \times 5 \text{ mm}^2$) placées parallèlement aux régions des images correspondant aux éléments de chaque antenne et à deux profondeurs différentes, 2 et 8,5 cm. Le point zéro correspond au centre d'une série de ROI équivalent à celui du fantôme et également de chaque antenne.

L'estimation du rapport S/B est réalisée de la même manière précédente au paragraphe 2.2.1.1.

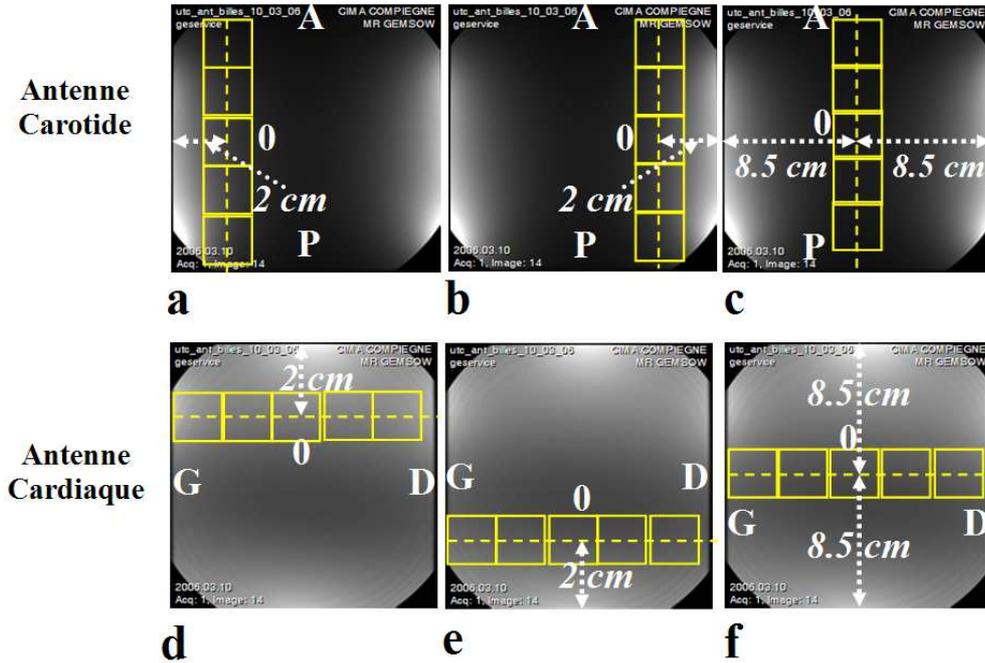


Figure 2-12 : Mesure du rapport S/B , en fonction de la largeur d'une direction transversale et à deux profondeurs, par des ROI (carrés jaunes). Celles-ci sont mises parallèlement aux régions des images T1 du fantôme sphère correspondant aux éléments d'une paire d'antennes surfaciques : carotide et cardiaque. (a), (b) et (c) : images axiales correspondant aux acquisitions par les deux éléments droite (D) et gauche (G) de l'antenne carotide. (d), (e) et (f) : images axiales correspondant aux acquisitions par les deux éléments antérieur (A) et postérieur (P) de l'antenne cardiaque. Le 0 correspondant au centre d'une série de ROI est équivalent à celui du fantôme et également à chaque antenne.

2.2.2.2 Résultats et discussion

a) Antenne carotide

A 2 cm de profondeur (Figure 2-13), le rapport S/B image varie peu sur une largeur de 4 cm autour du centre de l'antenne, sa variation est de l'ordre de 6% et 21%. Au-delà de cette largeur, la sensibilité de l'antenne devient non-uniforme. Comme le point zéro correspond au centre de l'antenne, il sépare sa largeur en deux parties : antérieure et postérieure (vue axiale, Figure 2-12 a, b). Nous trouvons que le rapport S/B augmente de 52% dans la région de l'image correspondant de la partie postérieure (au-delà de 0 à 2 cm), par contre il diminue de 47% dans la région de l'image correspondant de la partie antérieure (au-delà de 0 à -2 cm).

A 8,5 cm de profondeur (Figure 2-13), le S/B a une variation faible, 14% de diminution par rapport au signal central du fantôme, sur une largeur de 4 cm autour du

centre de l'antenne. Au-delà de cette largeur, la diminution du rapport S/B chute à 50%, elle se traduit par une région foncée sur l'image (Figure 2-12 c).

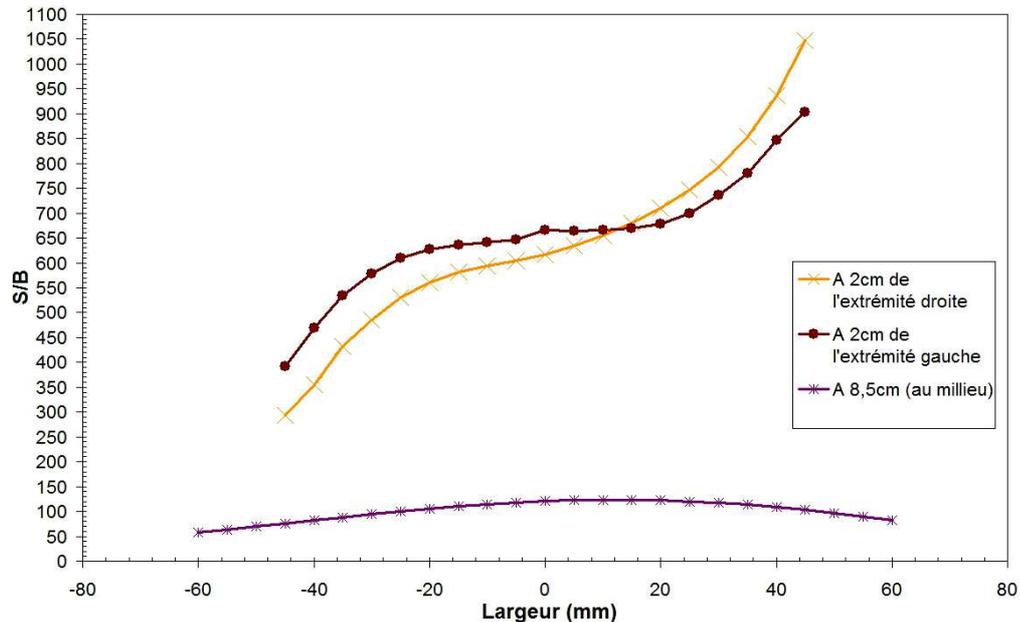


Figure 2-13 : Variation du rapport S/B en fonction de la largeur d'une direction transversale de l'antenne carotide à deux profondeurs : 2 et 8,5 cm.

b) Antenne cardiaque

A 2 cm de profondeur, le rapport S/B image présente une faible variation sur une largeur de 8,4 cm autour du centre de l'antenne, correspondant d'une diminution de 25 à 30% par rapport au rapport S/B central.

En comparant la sensibilité en largeur des deux antennes à la même profondeur, nous trouvons qu'avec l'antenne cardiaque le rapport S/B image varie faiblement sur une largeur de deux fois supérieure à celle de l'antenne carotide. Cependant, l'amplitude du S/B image avec l'antenne cardiaque est trois fois inférieure à celle observée avec l'antenne carotide.

A 8,5 cm de profondeur, la variation du rapport S/B transversalement n'excède pas 10% du rapport S/B central sur une largeur de 8 cm. Le rapport S/B est également uniforme sur une largeur deux fois plus grande que celle de l'antenne carotide. Il est quasiment le même pour les deux antennes sur une largeur de 4 cm, mais ce n'est pas le cas sur une largeur au-delà de 4 cm.

L'écart en amplitude du rapport S/B image avec l'antenne cardiaque entre les deux profondeurs est de l'ordre de 36 à 50%.

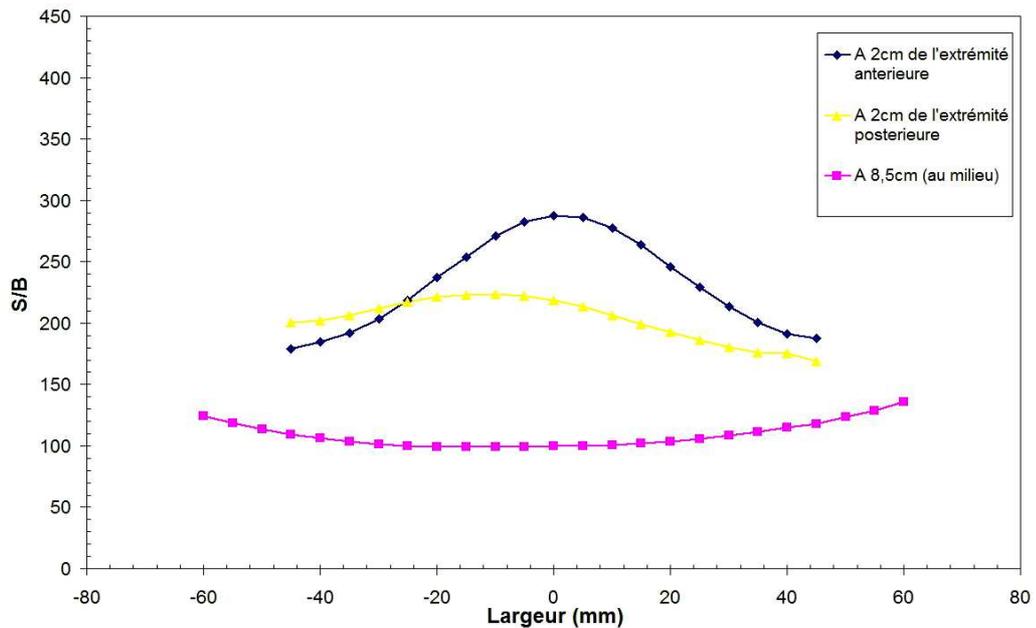


Figure 2-14 : Variation du rapport S/B en fonction de la largeur d'une direction transversale de l'antenne cardiaque à deux profondeurs : 2 et 8,5 cm.

Cette étude donne la sensibilité des deux antennes en profondeur et en largeur. Elle va s'avérer utile pour les mesures des chapitres suivants, pour le contraste et des quantifications fiables du milieu

Pour l'antenne carotide, la sensibilité peut être considérée constante sur une largeur de 4 cm, où la détection est uniforme, et décroissante au-delà, la détection y est non uniforme. Par ailleurs, elle est totalement non uniforme en profondeur. Le rapport S/B s'atténue exponentiellement de 58% à une profondeur de 2,5 cm, mais son amplitude est toujours supérieure à celle de l'antenne cardiaque donnant une sensibilité significative.

Pour l'antenne cardiaque, la sensibilité peut être considérée constante sur une largeur de 8 cm même à une profondeur supérieure à 2 cm. Le rapport S/B image observé avec cette antenne s'atténue moins vite en profondeur que celui de l'antenne carotide. Son amplitude est moins significative par rapport à celle obtenue par l'autre antenne à 2,5 cm de profondeur. Cependant, au-delà de 4,5 cm de profondeur, l'amplitude du rapport S/B image avec l'antenne cardiaque est supérieure de 46% à celle de l'antenne carotide (à 9 cm de profondeur).

Chaque antenne a donc sa propre utilisation. Avec l'antenne carotide, nous pouvons augmenter la résolution sans trop détériorer le rapport S/B image en tenant compte des limites de sensibilité définies dans l'étude. En revanche, avec l'antenne cardiaque nous pouvons profiter de l'uniformité de sensibilité transversale et en profondeur.

2.3 Sources des défauts d'intensité

Le défaut d'intensité est désigné par les variations spatiales d'intensité à basses fréquences. Nous passons en revue leurs principales causes provenant des éléments de la chaîne d'acquisition *IRM* (Figure 2-15) : imageur, séquence et objet.

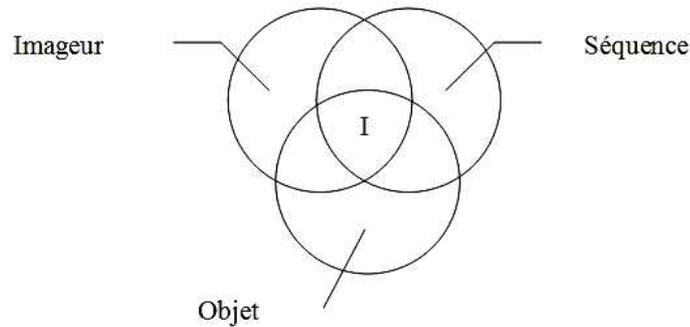


Figure 2-15 : Illustration de l'artéfact de défaut d'intensité, situé en I, suivant l'influence de trois éléments constituant une acquisition IRM : l'imageur, la séquence et l'objet imagé. [Milles2002]

2.3.1 Imageur

Les limitations de défaut d'intensité liées au matériel employé dans l'imageur proviennent du type d'antenne, de sa sensibilité et de la chaîne *RF*.

- *Type de l'antenne :*

Dans une zone de réception homogène, deux signaux identiques émis par les protons de deux volumes élémentaires induisent au niveau de l'antenne une même différence de potentiel. Les voxels d'une image ont alors le même niveau de gris. Au contraire, dans une zone inhomogène, ces deux volumes induisent une différence de potentiel différente qui s'avère sur les images par des voxels de niveau de gris différent. C'est le cas le plus fréquent avec les antennes de surface.

- *Chaîne radiofréquence :*

La non-linéarité du gain de transmission peut exposer certaines régions du volume imagé à plus d'énergie de radiofréquence qu'une autre [Simmons1994]. Les angles de bascule ne sont alors plus calibrés de la même manière ainsi que l'amplitude du champ B_1 de la *RF*. Par conséquent, le signal dS des protons en précession dans un volume élémentaire $dV(\vec{a})$ qui est proportionnel à B_1 selon l'Equation 2-13 n'est plus uniforme [Haacke1999 c].

Cette expression du signal est aussi connue par le principe de réciprocité. L'équation mettant en évidence la relation entre B_1 et l'angle de bascule α est montré dans le paragraphe 2.1.1.

Selon Wicks [Wicks1993], la bande passante des convertisseurs dans la chaîne de la radiofréquence a une influence sur l'homogénéité d'intensité. Une insuffisance de la bande passante des convertisseurs aboutit à une variation d'intensité à l'intérieur d'une coupe de l'ordre de 21% pour une troncature de la bande passante de 10%.

Il faut souligner que la sensibilité de l'antenne dépend aussi de l'objet à explorer (mise en discussion dans la section 2.3.3).

2.3.2 Séquence IRM

Le défaut d'intensité peut être visible sur des images acquises avec une séquence écho de spin [Simmons1994 ; Barker1998], mais aussi en écho de gradient [Mihara1998 ; Reeder1998].

En écho de spin, les paramètres TR et ETL peuvent provoquer des défauts d'intensité sur l'image [Simmons1994]. Un basculement rapide des gradients engendre de courants Foucault dans les objets imagés, en particulier lors de TR court. L'augmentation du nombre d'échos, quant à lui, induit une baisse de qualité de refocalisation due probablement à une inexactitude légère au niveau des impulsions de 180° .

En écho de gradient, la séquence est composée d'une impulsion d'angle inférieur à 90° dont l'exactitude dépend de l'uniformité du champ B_1 émis.

2.3.3 Objet

La substance dont est formé l'objet à explorer a aussi une influence sur la variation de la répartition de la RF et sur l'intensité du signal.

Une substance avec une constante diélectrique³ (ε) élevée présente un effet significatif sur la non uniformité de RF dans le milieu, bien que le champ B_1 soit uniforme [Tofts1994]. Cet effet est considérable dans les fantômes contenant de l'eau dont $\varepsilon = 80 \text{ Fm}^{-1}$. La valeur élevée de ε aboutit à une résonance diélectrique (onde RF stationnaire ou radiofrequency standing wave) dont l'effet augmente l'intensité du B_1 au

³ Constante diélectrique, ε : Décrit le pouvoir de polarisation du milieu (ou mouvement des charges liées) sous l'effet d'un champ électrique.

centre de l'objet, cependant que l'angle de bascule α ainsi que le signal deviennent important. Par ailleurs, la longueur d'onde de RF est réduite par un facteur de $\sqrt{\varepsilon}$ par rapport à sa valeur dans le vide (à 1,5T, la longueur d'onde de RF est de 0,52m) [Hoult2000]. L'augmentation de la fréquence de résonance (augmentation du champ B_0) intensifie l'effet de résonance diélectrique aboutissant à une non uniformité du signal importante. La distribution de l'intensité du signal est donc focalisée avec un effet de « dôme » au centre de l'image du fantôme (ou de la tête), et faible sur les bords [Vaughan2001].

La conductivité électrique⁴ σ (en $s.m^{-1}$) du milieu a aussi un effet sur la non-uniformité du signal, qui se traduit par un effet écran ou effet de pénétration dû à des boucles de courant induites par le champ de RF aboutissant à une atténuation du B_1 [Simmons1994]. Cet effet est inversement proportionnel à la racine carré de σ , il empêche la pénétration profonde de RF dans le milieu à une intensité élevée de B_0 .

Les deux effets de résonance électrique et d'écran induits dans les tissus biologiques, présentant une structure isolante, une diversité de conductivités et de permittivités, sont faibles pour un champ B_0 inférieur à 3T [Simmons1992]. Par contre, ils sont considérables pour un champ B_0 supérieur à 4T.

2.3.4 Corrections des défauts d'intensité en IRM

Les méthodes de corrections proposées dans la littérature jusqu'à présent se répartissent en deux groupes principaux, les méthodes de pré-traitement et de post-traitement.

2.3.4.1 Méthodes de pré-traitement

Elles ont été les premières envisagées pour la correction explicite du défaut d'intensité.

[Axel1987] a proposé une méthode dans laquelle l'image de l'objet est normalisée par celle d'un fantôme homogène. Une autre méthode, proposée par [Brey1988], consiste à acquérir deux images, l'une à l'aide de l'antenne de surface, l'autre avec l'antenne corps entier. Ces deux images sont ensuite lissées par un filtre médian afin d'atténuer le bruit, puis l'image de l'antenne de surface est divisée par celle de l'antenne

⁴ Conductivité électrique, σ : Aptitude d'un matériau à laisser les charges électriques se déplacer librement.

corps entier pour obtenir une estimation de la non uniformité de l'antenne de surface. Cette approche est surtout utilisée pour les antennes de surface. L'autre antenne est supposée beaucoup plus homogène, mais donnant des images de qualité moindre, de part de la résolution par exemple.

D'autres méthodes de correction sont fondées sur l'étude des expressions du signal obtenues aussi bien pour des séquences de type écho de spins [Clare2001] que pour des séquences de type écho de gradient [Mihra1998 ; Thulborn1998 ; Deihmann2002]. Le signal obtenu est fonction de l'angle de bascule α et de la sensibilité de l'antenne suivant la séquence utilisée. Cet angle est lui-même proportionnel à l'amplitude du champ B_1 . La méthode consiste à obtenir une carte de l'angle de bascule et à corriger l'image de départ à l'aide de cette carte. Cette distribution s'obtient à l'aide de deux acquisitions réalisées avec, respectivement, un angle α puis $2.\alpha$. L'image corrigée s'obtient en divisant l'image de départ par le reste de l'équation qui prend en compte la distribution α . L'image finale est donc indépendante de la sensibilité de l'antenne et de l'intensité du champ B_1 .

2.3.4.2 Méthodes de post-traitement

Les méthodes de post-traitement sont fondées sur des hypothèses faites sur les caractéristiques des artefacts et proposent des solutions logicielles intégrant ces hypothèses. Les algorithmes se fondent sur la répartition spatiale des niveaux de gris, d'autres sur la densité de probabilité de gris et enfin certaines exploitent les particularités de la décomposition des données dans le domaine de Fourier et en ondelettes.

Les références bibliographiques dans ce paragraphe concernent des méthodes de post-traitement appliquées sur des images *IRM*.

a) Niveaux de gris

Ces algorithmes peuvent être classés selon trois groupes : certains cherchent à ajuster une surface paramétrique sur l'image afin d'approximer le biais, d'autres se fondent sur des méthodes statistiques et la dernière famille d'algorithmes utilise des filtrages.

- *Approximation par des surfaces*

Cette méthode ajuste une surface pour modéliser les variations d'intensité. La correction va se faire en divisant l'image de départ par l'image de cette surface. Les

fonctions de base utilisées pour modéliser cette surface sont des splines [Dawant1993 ; Lai1999] ou des fonctions polynomiales [Tincher1993 ; Meyer1995 ; Styner2000] dont la forme est déterminée par des points de contrôle. Ces fonctions sont intéressantes car elles présentent les mêmes caractéristiques que les variations d'intensité, c'est-à-dire des variations lentes.

- *Méthodes statistiques*

Ces méthodes corrigent l'image et la segmentent. La démarche de segmentation tient en compte des défauts d'intensité qui sont modélisées par une distribution paramétrique. L'ensemble des méthodes proposées vise à déterminer les paramètres de la distribution par des méthodes d'estimation : "Expectation-Maximization" (EM) [Wells1996 ; Pham1999 ; Zhang2001] et "Fuzzy C Means" (FCM) [Pham1999 ; Ahmed1999].

- *Filtrages spatiaux*

La correction des défauts d'intensité par un filtrage spatial peut prendre différentes formes : filtrage passe-bas avec des filtres moyenneurs [Axel1987 ; Koivula1997 ; Zhou2001], médians [Harris1994 ; Narayana1995] et gaussiens [Vokurka1999] ou filtrage homomorphique [Johnston1996 ; Brinkmann1998].

- b) *Densité de probabilité de niveaux de gris*

Cette méthode considère la densité de probabilité (histogramme) d'une image ou d'un volume comme point de départ. Les défauts d'intensité la modifient de manière sensible. La correction consiste à appliquer des transformations sur l'histogramme afin de retrouver celui de l'image idéale (image corrigée) [Sled1998 ; Likar2000].

- c) *Espaces transformés*

- *Domaine de Fourier*

Les méthodes de correction des défauts d'intensité se déroulent dans le domaine de Fourier. Elles sont donc duales aux méthodes de filtrage spatial évoquées au paragraphe, filtrages spatiaux. Elles consistent à appliquer un filtrage passe-bas gaussien [Wald1995 ; Cohen2000] sur l'image de départ afin de retrouver l'image des défauts d'intensité. L'idée sous-jacente est que le spectre basse fréquence des défauts d'intensité peut être dissocié de celui de l'objet de l'image.

- *Domaine ondelettes*

Une approche mutli-échelle fondée sur la transformée en ondelettes a été présentée par [Han2001]. Elle est utilisée pour corriger le profil de sensibilité de l'antenne. Il est peut être utile de rappeler que la transformée en ondelettes par ondelettes discrètes permet de décomposer une image en deux sous espaces orthogonaux : l'espace des approximations et l'espace des détails.

2.3.5 Méthodologie de mesure et de correction

2.3.5.1 Position du problème

Nous avons déterminé dans le paragraphe 2.2 le profil de sensibilité de deux antennes surfaciques, cardiaque et carotide, transversalement ainsi qu'en profondeur. Les images *IRM* obtenues pour un fantôme homogène subissent une variation de l'intensité du signal dans les deux directions du champ de vue, Supérieure/Inférieure (*S/I*) et Droite/Gauche (*D/G*). Cette variation du signal est aussi influencée par la séquence *IRM* utilisée, l'objet et le champ B_1 comme évoqué dans les paragraphes 2.3. Pour cette raison, la variation d'intensité induite perturbe la précision et la reproductibilité des analyses quantitatives sur les images *IRM*. Nous avons ensuite passé en revue dans le paragraphe 2.3.4 aux méthodes " pré et post-traitement " envisagées pour la correction des défauts d'intensité. La plupart des méthodes " post-traitement ", basées sur une modélisation des effets de non uniformité, sont destinées pour effectuer une segmentation efficace des organes.

Ces méthodes de correction peuvent être utilisées dans notre cas, mais elles restent aveugles aux causes sous-jacentes. Nous avons essayé de trouver des solutions de pré-traitement prenant en compte les sources des non uniformités. Ceci évite de sélectionner un algorithme parmi de nombreux autres ou de comparer les performances des méthodes de correction entre elles.

La méthode de pré-traitement proposée consiste à choisir une antenne volumique dont le profil de sensibilité en émission et réception est constant sur tout le volume exploré (mais ce n'est pas exactement le cas en réalité). Ensuite, nous avons sélectionné une séquence *IRM* de la famille d'écho de spins très peu sensible aux défauts d'intensité. La variation du signal qui peut engendrer le choix de l'ensemble, antenne et séquence est prise en considération. Nous avons donc quantifié cette variation sur un

fantôme placé dans plusieurs positions, et dont les propriétés physiques n'affectent pas la distribution de la *RF*. Cette quantification va permettre de trouver la meilleure configuration et position du fantôme ainsi, la méthode de correction qui peut éliminer ces variations et accentuer encore plus la performance de l'antenne et de la séquence choisies. La pertinence de la méthode de correction proposée est déterminée en comparant les pourcentages de non uniformité du signal avant et après son application.

2.3.5.2 Principe de la méthode de correction

Notre méthode de correction est inspirée du principe de fonctionnement des filtres spatiaux comme le moyeneur utilisé dans le post-traitement. Son opération fondamentale vise à atténuer ou supprimer les petites aspérités dans une image. Brinkmann [Brinkmann1996] et Zhou [Zhou2001] ont considéré que les défauts d'intensité ne contiennent pas seulement des composantes basses fréquences mais aussi haute fréquence. Donc, son principe de fonctionnement a un intérêt pour éliminer les défauts d'intensité à haute fréquence *a priori* qui ne sont pas prises en compte dans les autres méthodes. Ce filtre a démontré des résultats positifs pour la correction des images du cerveau par rapport à d'autres méthodes de post-traitement [Brinkmann1996 ; Zhou2001].

Le principe de la méthode de correction proposée est d'obtenir plusieurs images à partir d'un même objet homogène (fantôme) dans les quatre directions (Supérieure "*S*", Inférieure "*I*", Gauche "*G*" et Droite "*D*"). Ces images sont prises dans certaines conditions de pré-traitement décrites plus loin dans le paragraphe 2.3.5.3. L'intensité mesurée d'un objet sur une image pour une position donnée est moyenné avec les intensités mesurées du même objet dans d'autres positions. C'est un lissage des variations spatiales d'intensité sur l'image dans toutes les directions. Ceci permet de s'affranchir en grande partie des défauts d'intensité.

2.3.5.3 Matériels et méthodes

Nous décrivons ici la méthode de pré-traitement, le fantôme et son contenu, le choix de l'antenne, le positionnement correct du fantôme dans l'*IRM*, le support du fantôme et sa configuration, les paramètres de la séquence et ceux de calibration de l'imageur. Nous présentons aussi la méthode de correction conçue et son évaluation.

L'ensemble est récapitulé par l'organigramme de la Figure 2-19.

a) Fantôme

Le fantôme utilisé pour réaliser cette étude est une matrice de quatre ou huit flacons en verre de 15 ml, contenant 10 ml de liquide, un neuvième flacon est placé au centre comme référence (Figure 2-16).

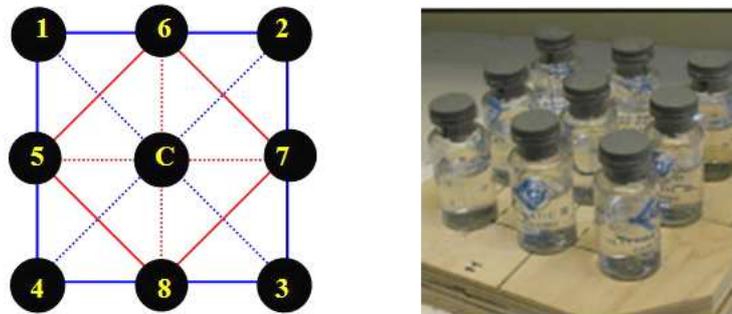


Figure 2-16. Schéma d'un fantôme, avec sa photo en face, composé de huit flacons en verre et un neuvième placé au centre qui sert comme référence.

Les deux liquides testés sont le sérum physiologique $S\phi$ avec 0,9% de Chlorure de Sodium et l'huile organique⁵ (huile de tournesol). Le sérum physiologique $S\phi$ est largement utilisé dans les chapitres 3 et 4. Le fantôme contenant du sérum physiologique peut servir de référence pour les études ultérieures. Un autre avantage dépend de sa conductivité qui peut supprimer l'effet de résonance diélectrique induit, par exemple, par l'eau distillée [Kangarlu1999], par contre l'inconvénient est sa faible viscosité, proche de celle de l'eau. Tofts [Tofts2003] mentionne le problème de mouvements résiduels de ce type (eau, sérum physiologique $S\phi$...) avec les vibrations provoquées par les gradients. Ces mouvements provoquent une perte artificielle et variable de la magnétisation transversale pour les séquences en $SE T_2$ ou de diffusion. En plus d'avoir utilisé un fantôme à base de sérum physiologique $S\phi$, nous avons aussi utilisé l'huile organique afin d'avoir un fantôme avec une constante diélectrique faible ($\epsilon = 2-3 \text{ Fm}^{-1}$) [Tofts1994], un liquide visqueux et qui peut être utilisé pour vérifier la variation de la répartition de RF .

b) Choix de l'antenne

L'antenne volumique choisie est une antenne « cage d'oiseau » de diamètre 30 cm et de longueur 40 cm. C'est une antenne utilisée en émission et réception et formée d'une bobine unique (1 seul canal). Sa conception permet d'atteindre un champ B_1 et un

⁵Huile organique : Liquide gras d'origine végétale.

rapport signal sur bruit S/B uniforme [Hayes1985]. Ne s'agissant pas d'obtenir une haute résolution spatiale, il est ici inutile d'utiliser une antenne de surface.

c) Mise en place du fantôme sur un support tournant amagnétique

Nous avons fabriqué un support tournant amagnétique en bois, pour poser les quatre ou huit flacons du fantôme. L'ensemble est porté par un autre support fixe en polystyrène épousant la forme de l'antenne et permettant de positionner le support en bois et les flacons exactement au centre de l'antenne et du tunnel (Figure 2-17). Ainsi, les incertitudes sur les mesures du rapport signal sur bruit S/B sont limitées à la non uniformité du champ radiofréquence RF émises et reçues.

Le support en bois est muni d'un axe en bois afin de pouvoir tourner la matrice dans les différentes directions. Cette rotation permet réaliser la correction des défauts d'intensité en moyennant les mesures d'un même flacon dans la même position pour les différentes directions. Cet axe correspond aussi au centre de l'antenne.

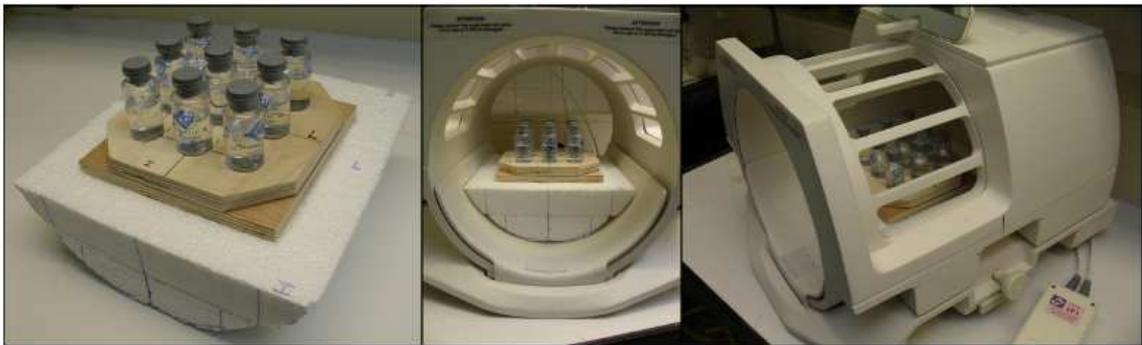


Figure 2-17 : Support tournant amagnétique composé de deux parties : une partie fixe en polystyrène pour centrer les échantillons au centre de l'antenne et du tunnel de l'IRM, l'autre tournante en bois. Les figures au milieu et à gauche illustrent les deux parties du support avec les flacons dans et hors l'antenne cage d'oiseau (Quad Head).

d) Répartition des flacons du fantôme

Etant donné que le signal mesuré varie en fonction de la distance entre la région à explorer et l'antenne, nous répartissons les flacons sur le support d'une façon symétrique par rapport au centre de l'antenne, selon des formes géométriques, carré, losange ou cercle. C'est une façon simple pour déterminer la répartition des variations faibles d'intensité dans l'image. Donc, nous choisissons la répartition matricielle pour les flacons selon quatre configurations possibles sur le support (Tableau 2-2 ; Figure 2-18).

Chaque groupe de quatre flacons forme une matrice carrée, les flacons sont répartis sur deux matrices : “ Carré-1 ” et “ Carré-2 ” à 45°. Un flacon **C** est commun aux deux matrices (Figure 2-18), il est au centre de l’antenne et du tunnel.

	Configurations			
	I	II	III	IV
Nombre de matrice	2	1	2	1
Nombre de flacons	8	4	8	4
Forme et caractéristique de la matrice	Carré-1–Carré-2 flacons équidistants du centre	Carré-1 ou Carré-2 flacons équidistants du centre	Carré-1–Carré-2 flacons non équidistants du centre	Carré-1 ou Carré-2 flacons non équidistants du centre

Tableau 2-2 : Les quatre configurations des flacons sur le support amagnétique tournant.

1. La configuration **I** comporte huit flacons répartis en même temps sur deux matrices “ Carré-1–Carré-2 ”. Ces flacons sont équidistants du centre “ C ”, avec un rayon de 5,6 cm.
2. La configuration **II** comporte quatre flacons, soit une seule matrice “ Carré-1 ” ou “ Carré-2 ” alternativement. Ces quatre flacons sont aussi équidistants du centre **C**

La première matrice “ Carré-1 ” est ensuite permutée dans la deuxième position à 45° “ Carré-2 ” pour obtenir la seconde disposition. Cette configuration nous permet de mesurer une possible perturbation du signal en fonction la proximité de ses voisins dans la configuration **I** à huit flacons.

Nous représentons les deux matrices sur l’image de deux manières : Lorsqu’une des deux matrices comporte les flacons, elle est figurée par un carré complet tandis que la deuxième matrice dépourvue des flacons est figurée par un carré pointillé.

3. La configuration **III** est constituée de huit flacons répartis en même temps sur deux matrices “ Carré-1–Carré-2 ”. Ces flacons ne sont pas équidistants du centre. Les flacons sur la matrice “ Carré-2 ” sont plus proches du centre, soit à 4 cm, que les autres positionnés sur la matrice “ Carré-1 ”, soit à 5,6 cm du centre **C**. L’intérêt étant de voir si un faible changement de distance par rapport au centre a une influence sur le signal.

4. La configuration **IV**, “Carré-1” ou “Carré-2”, à quatre flacons a un intérêt identique à la configuration **II** (perturbation par les voisins), mais en ajoutant la problématique de la distance au centre selon la configuration **III**.

Le support d’une ou de deux matrices de flacons est soumis à une rotation de 90° pour atteindre une des directions données afin de réaliser la méthode de correction (section 2.3.5.2). A cet effet, nous avons fait sortir le fantôme de l’imageur à chaque fois en respectant sa même position sur le support en polystyrène et dans l’antenne cage d’oiseau.

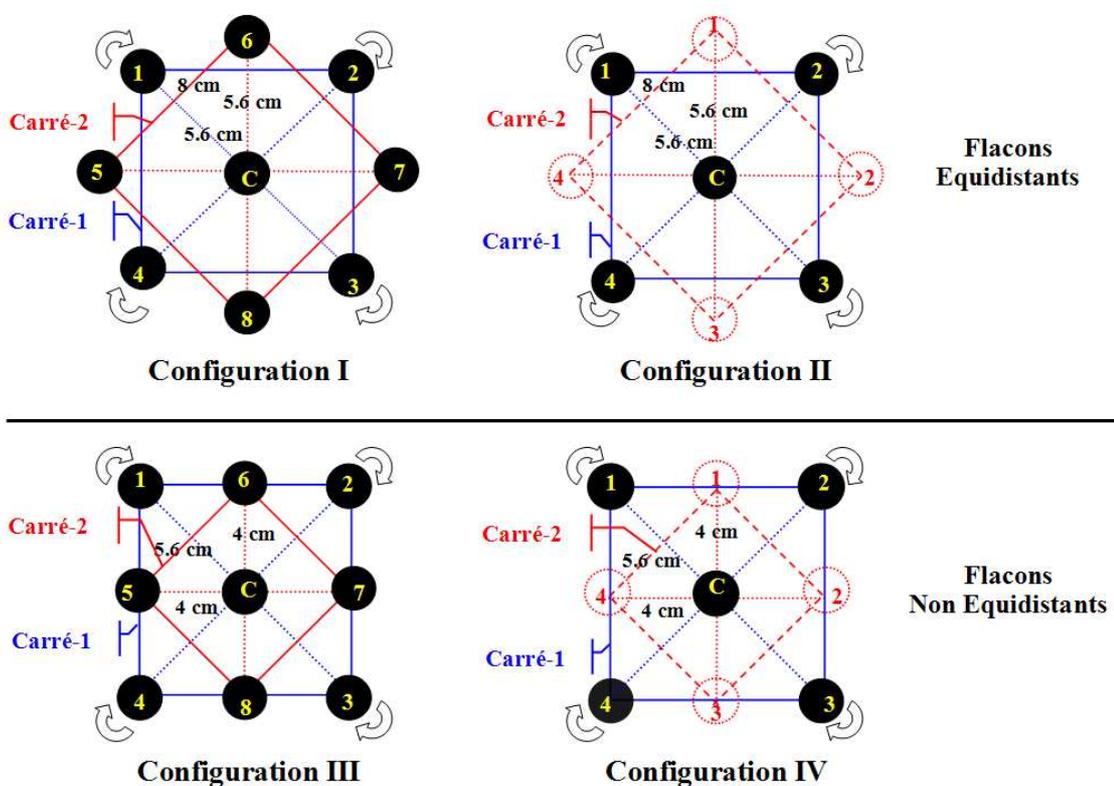


Figure 2-18 : Répartition des flacons du fantôme selon quatre configurations. Configurations I et II : huit et quatre flacons équidistants à 5,6 cm du centre C et répartis respectivement sur deux matrices : en même temps, soit “Carré-1–Carré-2”, et alternativement, soit “Carré-1” ou “Carré-2” à 45° . Configurations III et IV : huit et quatre flacons répartis respectivement sur deux matrices de la même manière que les deux configurations précédentes, mais ils ne sont pas équidistants du centre C, soit à 5,6 et 4 cm. Au centre C, un neuvième flacon est commun aux deux matrices. Les matrices “Carré-1” ou “Carré-2” à 45° dépourvues de flacons dans les configurations II et IV sont illustrées sur les images par des carrés pointillés.

e) Séquence IRM

La séquence IRM appliquée sur les quatre configurations de fantôme est une FSE T_1 identique pour chaque direction. Le choix de cette séquence peut éliminer les artefacts dus à la susceptibilité magnétique, au décalage chimique et à la non uniformité

du champ magnétique de la machine. Les paramètres propres à cette séquence (*TR* et *ETL*) sont choisis de manière à ce qu'ils ne présentent pas d'influence sur l'homogénéité de l'image (Tableau 2-3). A cet égard, nous avons choisi une valeur moyenne de *TR*, 500 ms et un nombre *ETL* de, 4 assez bas. Par ailleurs, nous avons réduit le bruit ainsi que le temps d'acquisition en augmentant le volume du voxel ($1,4 \times 1,4 \times 6 \text{ mm}^3$) et en choisissant un *Nex* de 6. La pondération T_1 est choisie afin d'éviter le problème de la perte artificielle de magnétisation transversale induite par la faible viscosité du sérum physiologique (section 2.3.5.3 a).

2D FSE-X1 /oblique, Coronal					Antenne : cage d'oiseau				
TR (ms)	TE (ms)	ETL	FOV (cm)	Matrice	Epaisseur coupes (mm)	Nombre coupes	BW (kHz)	Phase FOV	Nex
500	15	4	18	128²	5	6	15,63	1	6
Temps d'acquisition : 1'38''									

Tableau 2-3 : Paramètres de la séquence FSE-XL appliqués sur un fantôme de huit ou quatre flacons contenant de l'huile ou du sérum physiologique $S\phi$.

f) Calibration

Pour imager le fantôme dans ces quatre directions pour chaque configuration, il faut le faire sortir à chaque fois du tunnel pour effectuer la rotation de support en bois. Cette opération est réalisée sans décentrer l'ensemble des flacons et du support. Ensuite, pour chaque configuration du fantôme une séquence *FSE* est lancée. Il y a à chaque fois des nouvelles valeurs du "Prescan" obtenues automatiquement (R1, R2, TG et AX) pour le même objet. Pour éviter le changement de ces valeurs, nous avons pris la première configuration à 8 flacons comme référence des valeurs de calibration. Une fois ces valeurs obtenues, elles sont conservées pour les quatre configurations ainsi qu'après chaque "Prescan".

Les valeurs d'étalonnage de séquence du "Prescan" obtenues sur un fantôme d'huile, ou de sérum physiologique, sont maintenues identiques pour toutes les configurations.

g) Evaluation de la répartition des flacons

Nous déterminons ici laquelle des quatre configurations matricielles des flacons donne la meilleure homogénéité du signal sur les images *IRM*.

Pour chaque matrice dans chaque configuration, nous avons mesuré le signal d'un flacon sur l'image pour une direction donnée et moyenné avec les signaux mesurés des autres flacons dans la même matrice. Dans les quatre configurations, les valeurs des signaux moyennés des flacons de la matrice "carré-1" sont comparées avec les

moyennes des signaux de l'autre matrice "carré-2" dans les quatre directions. Par ailleurs, nous avons mesuré le signal au centre "C" des matrices "carré-1" et "carré-2" pour chaque direction dans les quatre configurations. Ces valeurs moyennées obtenues sont comparées avec cette valeur au centre. Enfin, nous déterminons l'écart en pourcentage entre les valeurs moyennées des deux matrices pour les quatre directions avec le signal du centre. La configuration présentant le plus faible écart sera considérée comme la meilleure parmi les quatre et sera choisie pour l'application de la méthode de correction.

h) Evaluation de la méthodologie de correction

Après exécution de la méthode de correction proposée dans la section 2.3.5.2, nous avons évalué la pertinence en appliquant la quantification des défauts d'intensité selon Wicks [Wicks1993]. Elle consiste à déterminer le pourcentage de non uniformité intra-coupe (G_{intra}) définie par :

$$G_{intra} = \frac{\sigma}{\mu} \times 100 \tag{2-18}$$

Où σ correspond à l'écart-type des intensités dans l'image et μ leur moyenne.

La correction de non uniformité réalisée par le moyennage des mesures $\sigma_{(i,n)}$ et $\mu_{(i,n)}$, de chaque flacon de position n ($n = 0$ à 8), pour les différentes directions i ($i = 1$ à 4), est effectuée sur les quatre configurations. L'évaluation de la méthode de correction n'est accomplie que sur deux configurations **I** et **III** parce que, on le verra plus loin, l'influence des flacons voisins reste modérée et que huit flacons mesurés en même temps représentent un gain de temps notable dans les procédures du chapitre.4.

On a déterminé le pourcentage de non uniformité, selon la définition de Wicks, une fois avant la correction $G_{fant.(i,n)}$ et après correction $G_{corr.(n)}$ d'un flacon de position n . Les résultats sont représentés graphiquement. Enfin, nous avons calculé $G_{moy.}$, la moyenne de pourcentage de non uniformité corrigée $G_{corr.(n)}$ pour tous les flacons sur le support afin d'en analyser la dispersion ou l'écart moyen.

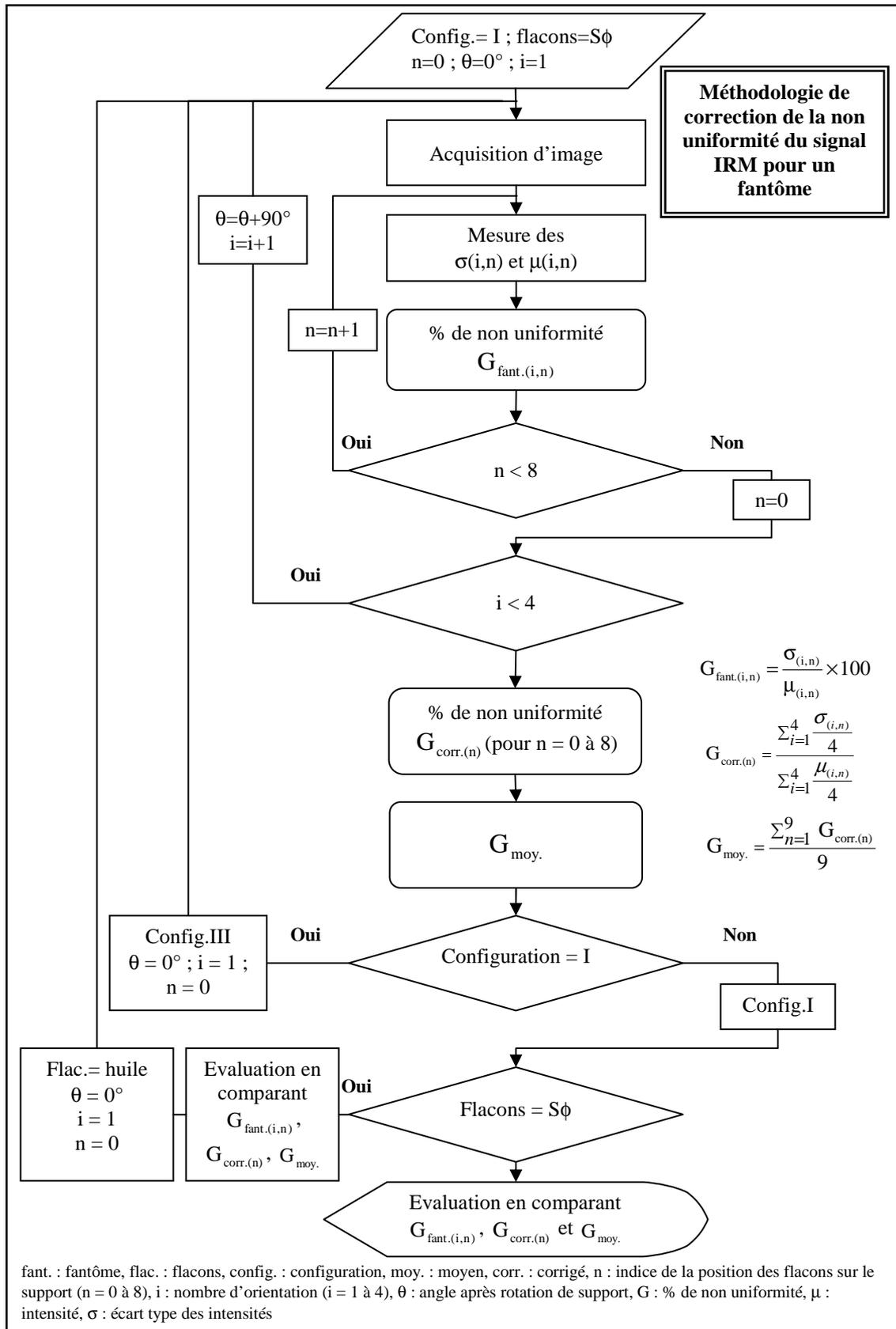


Figure 2-19 : Organigramme représentant les étapes suivies, les conditions d'acquisition et la méthodologie de correction dans les quatre directions pour compenser la non uniformité du signal IRM sur un fantôme homogène de sérum physiologique ou d'huile. Evaluation graphique de non uniformité avant et après correction par le pourcentage de non uniformité.

2.3.5.4 Résultats et discussion

Les résultats concernent dans un premier temps la moyenne des signaux pour les matrices de flacons de chacune des quatre configurations. La variation d'intensité moyenne la plus faible devrait correspondre à la configuration la meilleure. Dans un second temps, les résultats se rapportent à l'évaluation de la méthode de correction (Figure 2-19) appliquée sur la configuration la meilleure.

a) Répartition des flacons du fantôme

Les Figure 2-20 et Figure 2-21 illustrent les images *IRM T₁* des flacons contenant du sérum physiologique et de l'huile pour les quatre configurations. Pour chaque configuration, on donne une représentation graphique des signaux moyennés pour chaque matrice de flacons "Carré-1" et "Carré-2" à 45° dans les quatre directions. On cherche à mettre en évidence une influence sur le signal d'un faible changement de distance par rapport au centre ou en fonction de la proximité des voisins. Le Tableau 2-4 montre l'écart en pourcentage entre les valeurs moyennées des deux matrices, les écarts entre elles et le signal au centre dans chacune des quatre directions.

- *Fantôme de sérum physiologique*

En comparant l'écart en pourcentage entre la configuration **I** et **II** (flacons équidistants du centre, Figure 2-20 a et c) pour le sérum physiologique, on observe que celui-ci est moins important que lorsqu'il n'y a que quatre flacons sur le support (Figure 2-20 b et d ; Tableau 2-4). Cela indique qu'avec huit flacons sur le support, il y a une interaction entre eux conduisant à un affaiblissement du signal.

Contenus	Directions	Configurations			
		I 8 flacons équidistants	II 4 flacons équidistants	III 8 flacons non équidistants	IV 4 flacons non équidistants
Sérum physiologique	1	2,19%	0,7%	3,69%	0,84%
	2	1,56%	0,97%	2,63%	1,12%
	3	1,75%	0,76%	2,86%	1,32%
	4	2%	0,63%	2,66%	1,05%
Huile	1	1,02%	1,45%	1,06%	1,6%
	2	0,15%	0,87%	0,62%	1,46%
	3	0,03%	0,56%	0,55%	1,1%
	4	0,37%	1%	0,72%	1,01%

Tableau 2-4 : Ecart en pourcentage entre les valeurs moyennées de la matrice "Carré-1" par rapport à celle "Carré-2" à 45° selon les quatre configurations et directions pour un fantôme de sérum physiologique et d'huile.

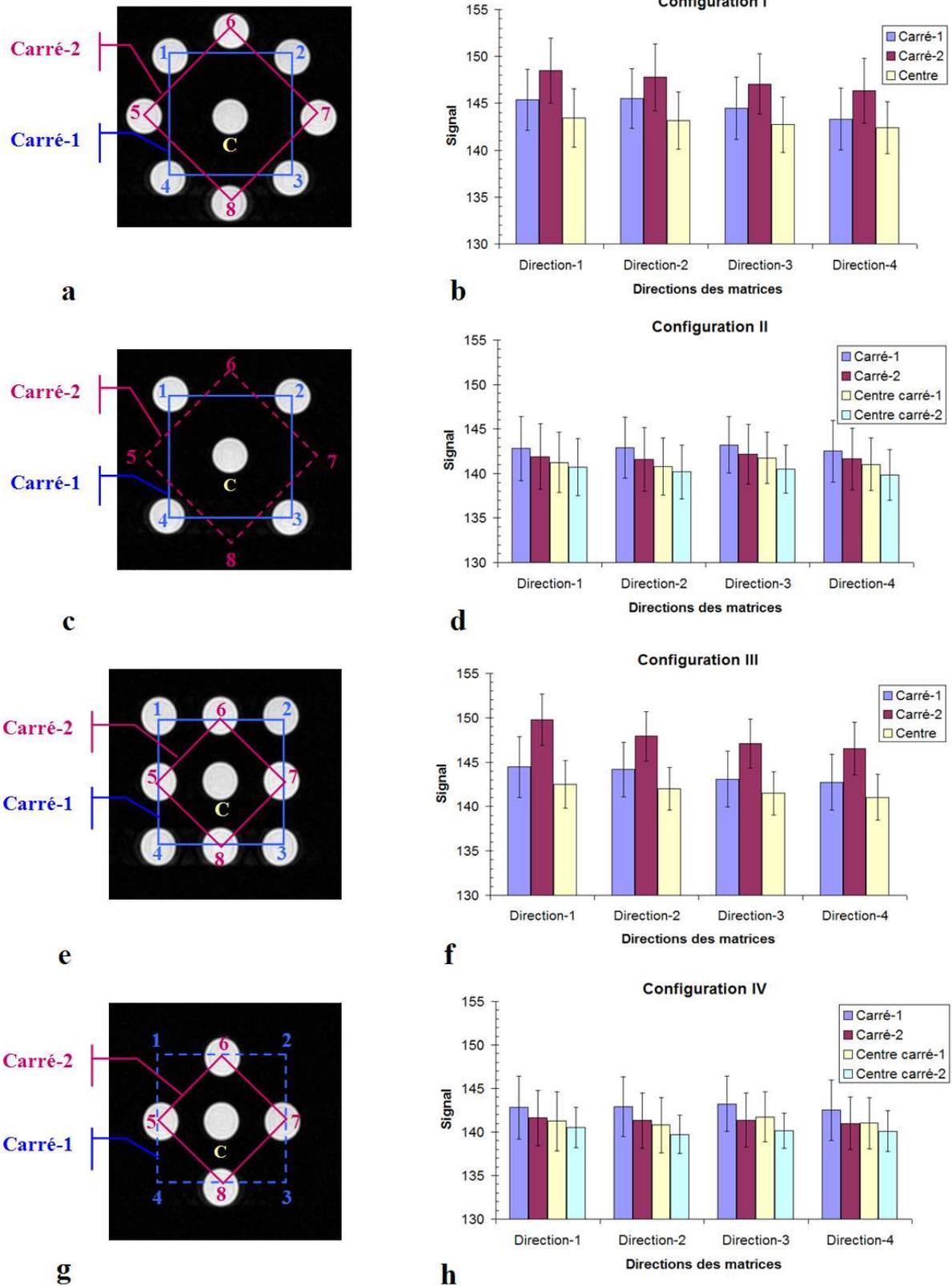


Figure 2-20 : Images IRM T_1 , d'un fantôme sérum physiologique, obtenues avec la séquence FSE-XL. (a) et (c) : images des matrices à huit "carré-1-carré-2" et quatre flacons "carré-1" ou "carré-2" à 45° équidistants du centre. (e) et (g) : images des matrices à huit "carré-1-carré-2" et quatre flacons "carré-1" ou "carré-2" non équidistants du centre. Les matrices carrées en pointillées dans les configurations II et IV sont dépourvues de flacons. (b), (d), (f) et (h) : moyenne des signaux des flacons dans la même matrice et dans les quatre directions de chacune des quatre configurations.

En faisant la même comparaison pour les configurations **III** et **IV** (flacons non équidistants du centre, Figure 2-20 e et g), on observe encore une fois des écarts moindres entre les valeurs moyennées lorsqu'il y a quatre flacons au lieu de huit (Figure 2-20 f et h ; Tableau 2-4).

C'est avec la position dans laquelle les flacons sont équidistants du centre de la matrice que ces écarts sont les moins importants. Toutefois, même si c'est avec quatre flacons en positions équidistantes que l'écart est le moindre, l'écart avec la configuration **I** à huit flacons reste faible. Compte tenu de cette faible différence, et de l'intérêt de mesurer un nombre important de flacons à la fois pour la rapidité des procédures, la répartition équidistante de huit flacons par rapport au centre sera celle que nous retiendrons.

- *Fantôme d'huile*

On observe des écarts moins importants qu'avec le sérum physiologique $S\phi$. En comparant l'écart en pourcentage entre la configuration **I** et **II** (flacons équidistants du centre, Figure 2-21, a et c), on observe que l'écart est moins important lorsqu'il n'y a que huit flacons sur le support (Figure 2-21 b et d ; Tableau 2-4). Cela est différent des résultats obtenus avec le fantôme de sérum physiologique.

Pour la même comparaison entre la configuration **III** et **IV** (flacons non équidistants du centre, Figure 2-21 e et g), on observe encore une fois plus des écarts moindres entre les valeurs moyennées lorsqu'il y a huit flacons au lieu de quatre (Figure 2-21 f et h ; Tableau 2-4).

On déduit qu'il y a une tendance générale à une diminution des écarts entre les valeurs moyennées du signal lorsqu'il y a huit flacons au lieu de quatre. Toutefois, c'est dans la configuration où les flacons sont équidistants du centre que ces écarts sont les moins importants.

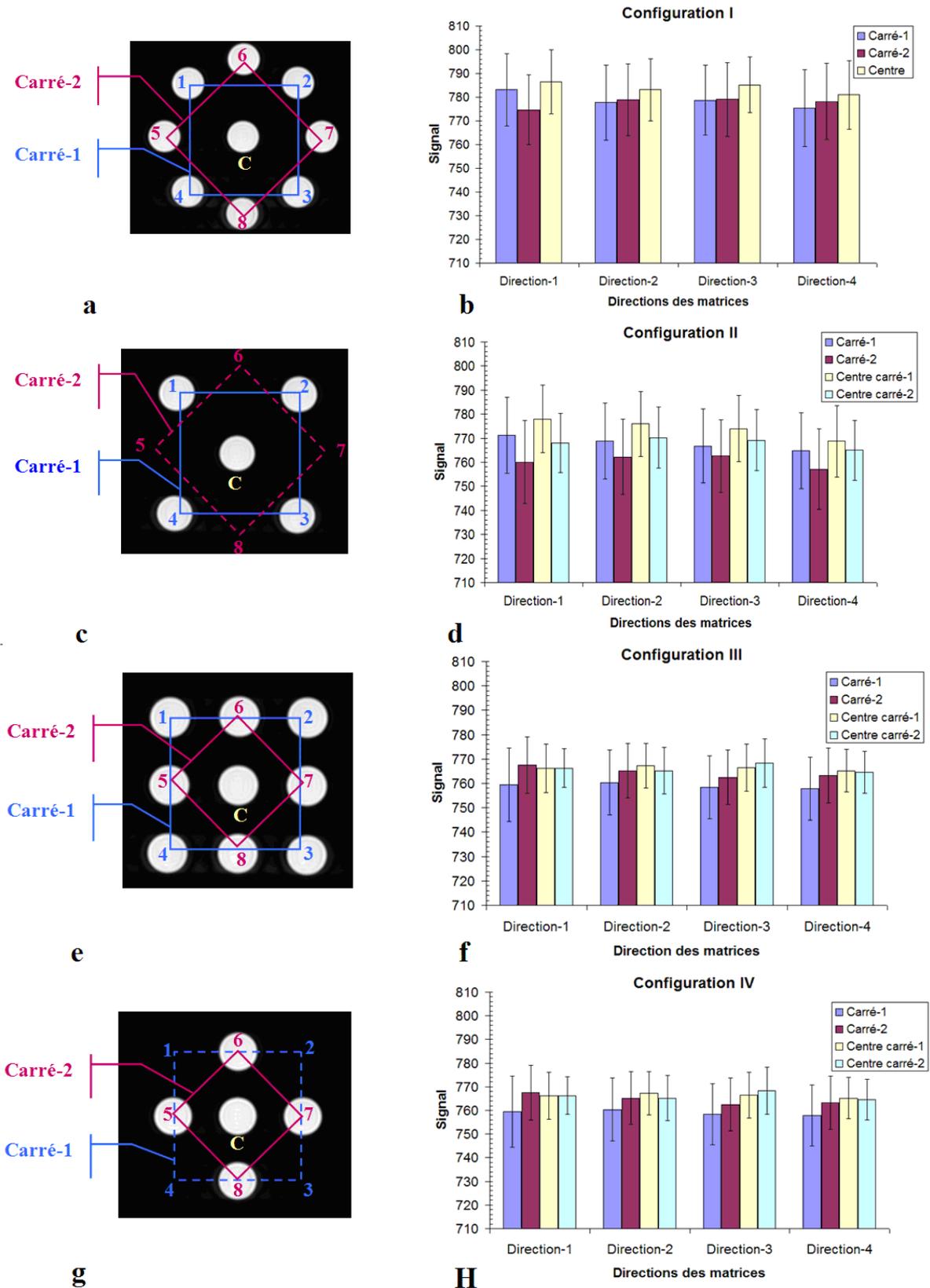


Figure 2-21 : Images IRM T_1 , d'un fantôme d'huile, obtenues avec la séquence FSE-XL. (a) et (c) : images des matrices à huit "carré-1-carré-2" et quatre "carré-1" ou "carré-2" flacons équidistants du centre. (e) et (g) images des matrices à huit "carré-1-carré-2" et quatre "carré-1" ou "carré-2" flacons non équidistants du centre. Les matrices carrées en pointillées dans les configurations II et IV sont dépourvues de flacons. (b), (d), (f) et (h) : moyenne des signaux des flacons dans la même matrice et dans les quatre directions de chacune des quatre configurations.

Les résultats différents observés pour l'huile et le sérum physiologique ne peuvent s'expliquer que par la différence de nature des produits. L'huile a une constante diélectrique faible et une viscosité plus importante. Ces caractéristiques perturbent moins la RF transmise dans le milieu et limitent les effets du mouvement résiduel lors du mouvement du fantôme. Par conséquent, le signal n'est pas trop perturbé avec la proximité des flacons ou lorsqu'ils sont à équidistance du centre.

Le faible écart du signal entre les flacons du fantôme d'huile par rapport à celui de sérum physiologique met en évidence l'influence du milieu sur la non uniformité de la radiofréquence. Avec le fantôme d'huile, le faible écart ne dépend donc que de la non uniformité B_1 transmis et de la position de flacons sur le support. Pour cela, les résultats sur le fantôme d'huile en fonction de la proximité des deux matrices de flacons sont plus fiables que ceux observés sur le fantôme de sérum physiologique. Dans la littérature, les gros fantômes contenant de l'huile sont largement utilisés pour déterminer la non uniformité de l'antenne tête [Tofts1994].

Il apparaît sur les graphiques (Figure 2-20 ; Figure 2-21) une différence entre les intensités du signal du flacon au centre dans une direction donnée et celles du signal du flacon au centre dans les autres directions pour chacune des quatre configurations. Cette différence est indépendante de l'influence de la séquence choisie et des paramètres de « Prescan ». Elle est plutôt dépendante de la répartition des flacons sur le support.

b) Méthodologie de correction

La Figure 2-22 représente le pourcentage de non uniformité des intensités, sur chaque flacon des deux matrices « Carré-1 » et « Carré-2 » à 45° de configuration équidistante et non équidistante du centre, selon les quatre directions, avant et après moyennage.

Avant moyennage, la variation du pourcentage de non uniformité $G_{\text{fant.(i,n)}}$ sur le fantôme de sérum physiologique ou d'huile est importante. Par contre, elle est réduite après moyennage des intensités ($G_{\text{corr.(n)}}$) selon l'organigramme de la Figure 2-19 (Figure 2-22 ; courbes vertes).

Nous observons encore une fois que le pourcentage de non uniformité, après correction et pour les flacons équidistants du centre, est plus faible que celui obtenu avant correction. Nous remarquons aussi que l'écart absolu moyen du pourcentage de non uniformité est plus faible pour les matrices équidistantes que pour les matrices non

équidistances (Figure 2-23). En plus, il est moins avéré sur le fantôme d'huile (courbe verte ; Figure 2-23, b), par contre, il est significatif pour les matrices non équidistantes (courbe rouge ; Figure 2-23, a et b).

La différence entre l'écart absolu moyen du pourcentage de non uniformité des matrices équidistantes par rapport à celui des matrices non équidistantes est de 30% pour le sérum physiologique et de 51% pour l'huile. Cela veut dire qu'il y a moins de dispersion pour la configuration **I** que pour la configuration **III**.

Donc, la répartition en équidistance des flacons au centre de la matrice nous semble acceptable pour la continuité de notre travail.

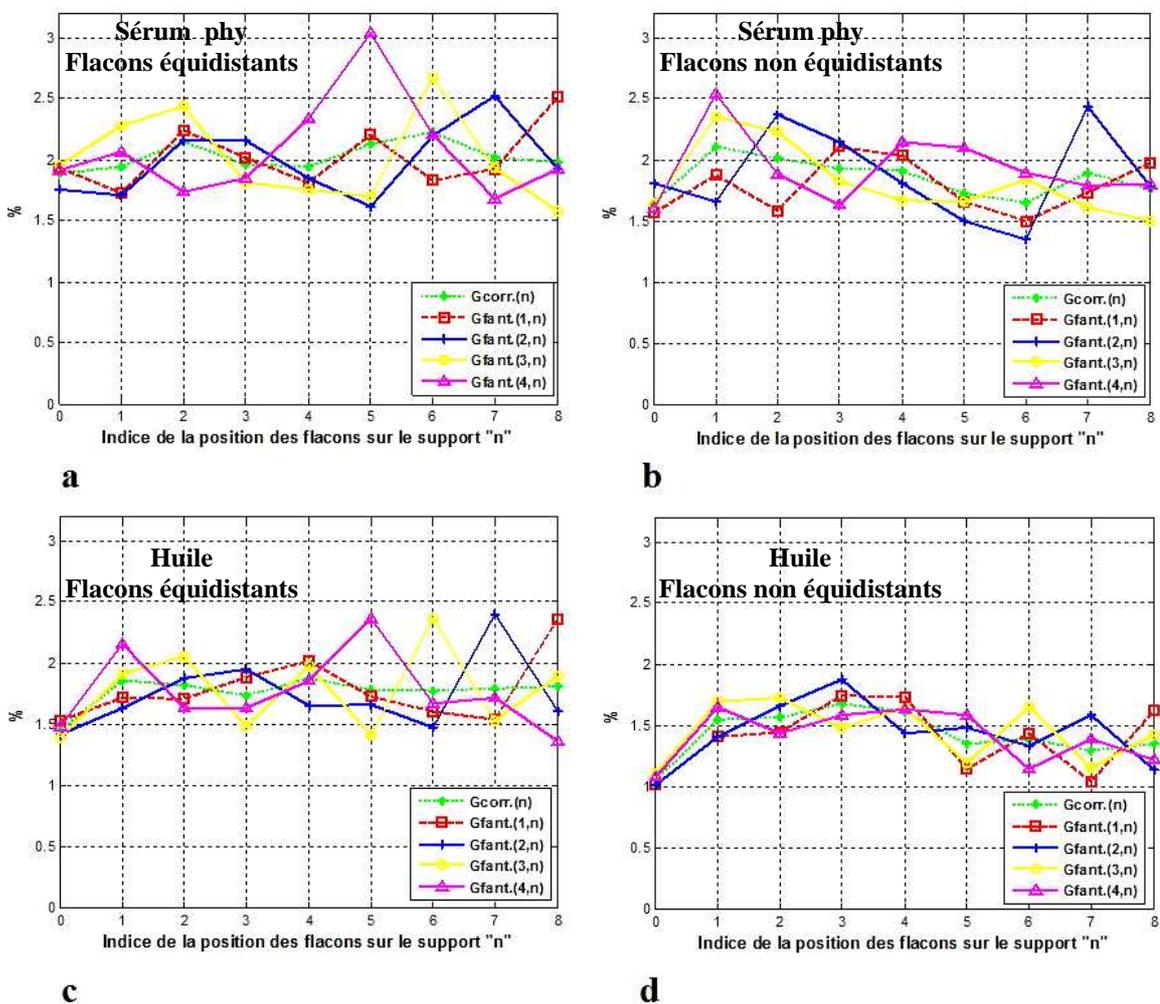


Figure 2-22 : Pourcentage de non uniformité du signal mesuré sur chaque flacon ($n = 0$ à 8) du fantôme sérum physiologique ou huile avant ($G_{\text{fant}(i,n)}$, couleurs : rouge, bleu, jaune et rose) et après correction ($G_{\text{corr}(n)}$, couleur verte) dans les quatre directions ($i = 1$ à 4). (a) et (b) (respectivement (c) et (d)), graphiques correspondant au fantôme du sérum physiologique (respectivement d'huile) avec des flacons équidistants et non équidistants du centre. Le point 0 correspond pourcentage de non uniformité du signal correspondant au flacon commun aux deux matrices.

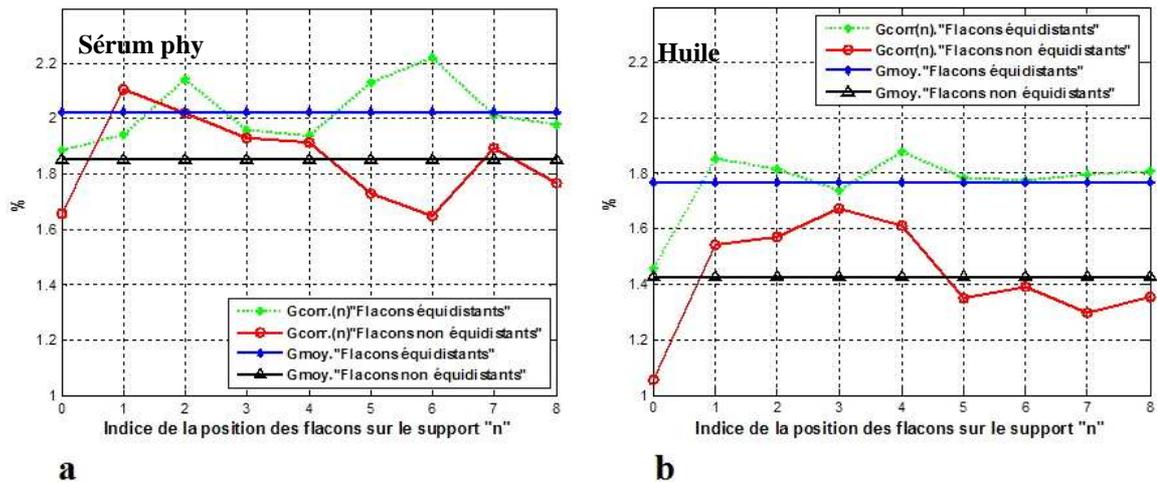


Figure 2-23 : Représentation graphique de l'écart du pourcentage de non uniformité après correction $G_{corr.(n)}$ par rapport à leur moyenne $G_{moy.}$ pour chaque élément du fantôme sérum physiologique (a) et huile (b). Le point 0 correspond au pourcentage de non uniformité sur le flacon commun aux deux matrices.

2.4 Conclusion

Le défaut d'intensité en IRM est un problème complexe qui dépend de plusieurs facteurs. Le principal facteur est la sensibilité spatiale de l'antenne.

L'étude de la sensibilité spatiale des deux antennes surfaciques carotide et cardiaque en profondeur et en largeur a mis en évidence le défaut d'intensité sur les images IRM. Pour l'antenne carotide, la sensibilité est constante sur une largeur de 4 cm et totalement non uniforme en profondeur avec une atténuation exponentielle de 58% à 2,5 cm. Pour l'antenne cardiaque, au contraire, la sensibilité est constante sur une largeur de 8 cm et s'atténue moins vite en profondeur que celle de l'antenne carotide. Son intensité est moins importante que celle obtenue par l'autre antenne à 4,5 cm de profondeur. Cependant, au-delà de 4,5 cm de profondeur, l'intensité du signal reçu par l'antenne cardiaque est supérieure de 46% à celle de l'antenne carotide.

Plusieurs approches ont été proposées pour corriger la variation des intensités du signal sur les images IRM. L'algorithme proposé dans notre étude a deux phases : la première est un prétraitement qui optimise les conditions d'acquisition de la machine (TR , Nex , épaisseur de la coupe, les gains d'émission et de réception de l'antenne, le choix de l'antenne et de la séquence), de la position et de la répartition des éléments de l'objet

sur le support. La deuxième est un traitement par moyennage de l'intensité mesurée d'un objet sur une image pour une position donnée avec les intensités mesurées du même objet dans d'autres positions ou directions. La méthode proposée est simple. Elle est appliquée sur un fantôme homogène composé de plusieurs éléments. L'utilisation du fantôme est fondamentale dans notre méthodologie de correction ainsi que dans les chapitres suivants pour plusieurs raisons : il sert à calibrer l'antenne, à étudier les défauts d'intensité et à déduire un facteur de correction en fonction de la position, même après moyennage. Ce facteur sera utilisé dans la compensation des quantifications des échantillons dans le chapitre.4.

L'étude réalisée sur le fantôme concernant la répartition matricielle pour les flacons sur le support, a abouti à des conditions optimales permettant de déterminer le contenu des flacons en mesurant un signal non perturbé. D'après les résultats obtenus après correction des défauts d'intensité, la dispersion du pourcentage de non uniformité par rapport à la moyenne a diminué pour la configuration **I** de 30% sur le fantôme sérum physiologique et de 51% sur le fantôme d'huile par rapport aux autres configurations. La configuration **I** comportant huit flacons équidistants du centre avec un rayon de 5,6 cm, est donc la meilleure avec une antenne cage d'oiseau.

Ces résultats donnent des indications utiles pour quantifier les faibles variations en *IRM* caractérisant l'échantillon sans avoir une erreur induite sur nos mesures par la non uniformité du champ radiofréquence *RF*.

Chapitre.3

Déteçtabilité des matériels d'embolisation

Sommaire :

3. CHAPITRE	89
3.1 Les types d'agents d'occlusion vasculaire principaux	93
3.1.1 Propriétés physicochimiques des microparticules :.....	95
3.1.2 Intérêts de la visualisation des microparticules sous IRM	96
3.2 Déteçtabilité de microsphères en gélatine de Tris-acryl	97
3.2.1 Premiers essais de déteçtabilité : modèles ex vivo et in vitro	97
3.2.2 Optimisation de la déteçtabilité des Microsphères de Tris-acryl	103
3.2.2.1 Premier facteur : choix de la séquence et de l'antenne.....	104
3.2.2.2 Deuxième facteur : optimisation selon le type d'agent de contraste.....	104
3.2.2.3 Troisième facteur : optimisation des acquisitions.....	112
3.2.2.4 Quatrième facteur : Effet de l'intensité du champ B ₀ sur le SPIO.....	118
3.2.2.5 Résultats	119
3.2.2.6 Discussion	121
3.3 Déteçtabilité des Hépasphères™	122
3.3.1 Matériels et méthodes	123
3.3.1.1 Préparation-1 : expansion initiale des Hépasphères™ dans du sérum physiologique puis	
addition d'un agent de contraste.....	124
3.3.1.2 Préparation-2 : expansion des Hépasphères™ dans une solution de sérum physiologique	
contenant préalablement un agent de contraste	124
3.3.1.3 Préparation-3 : préparation-2 avec pré-marquage léger des Hépasphères®	125
3.3.1.4 Préparation-4 : préparation-2 avec pré-marquage fort des Hépasphères®	126
3.3.1.5 Rinçage.....	126
3.3.1.6 Préparation des boîtes de Pétri.....	127
3.3.1.7 Séquences IRM.....	128
3.3.2 Résultats et discussions.....	128
3.3.2.1 Préparation-1 : expansion initiale des Hépasphères™ dans du sérum physiologique puis	
addition d'un agent de contraste.....	128
3.3.2.2 Préparation-2 : expansion des Hépasphères™ dans une solution de sérum physiologique	
contenant préalablement un agent de contraste	129
3.3.2.3 Préparation-3 : préparation-2 avec pré-marquage léger des Hépasphères®	130
3.3.2.4 Préparation-4 : préparation-2 avec pré-marquage fort des Hépasphères®	132
3.3.2.5 Conclusion.....	133
3.4 Déteçtabilité des billes d'alginate	134
3.4.1 Généralités et structure.....	135
3.4.2 Matériels et méthodes	136
3.4.3 Protocole expérimental	137
3.4.3.1 Etape-1 : préparation d'une solution d'alginate avec le marqueur	137
3.4.3.2 Etape-2 : extrusion et polymérisation de la solution d'alginate marquée	138
3.4.3.3 Préparation du support.....	139
3.4.3.4 Séquence IRM	139
3.4.4 Résultats.....	139
3.4.4.1 Encapsulation du Dotarem®	139
3.4.4.2 Encapsulation de l'Endorem®	140
3.4.5 Discussions	141
3.5 Déteçtabilité de différents types de gouttelettes d'émulsion eau-huile	142
3.5.1 Introduction.....	142
3.5.2 Généralités et structure.....	143
3.5.3 Matériels et Méthodes.....	151
3.5.3.1 Emulsion simple : eau dans l'huile.....	151

3.5.3.2	Emulsion double : eau dans l'huile dans l'eau	152
3.5.3.3	Préparation du support et images microscopiques.....	153
3.5.3.4	Imagerie par RM	154
3.5.4	Résultats.....	154
3.5.5	Discussion.....	155
3.6	Conclusion	158

Dans le premier chapitre, nous avons présenté la physiologie, l'angiogénèse et l'architecture vasculaire tumorale (1.2). Nous avons décrit brièvement les fibromes utérins et le traitement alternatif à l'hystérectomie par embolisation artérielle (1.5). L'envoi des agents d'occlusion vasculaire, emboles ou microparticules, actuellement invisibles par les différentes modalités d'imagerie médicale, vers un organe, un tissu ou une cellule malade doit tenir compte d'un certain nombre de contraintes : certitude d'atteindre le tissu ciblé, distribution des microparticules à l'intérieur et à l'extérieur de la tumeur, densité dans un vaisseau, et, enfin, tenue des microparticules dans le temps.

Dans le cadre de ce chapitre, nous décrivons les enjeux actuels des microparticules et de leurs applications médicales (3.1). Actuellement, les agents d'occlusion vasculaire sont acheminés dans un fluide (composé du sérum physiologique et de l'agent de contraste opaque aux rayons X en flux par les voies vasculaires vers la cible).

L'*IRM* ne s'intéresse que rarement au matériel d'embolisation dont la visualisation directe n'est pas pratiquement possible. Un marquage des agents d'occlusion injectables à l'aide de produits de contraste pour *IRM* doit permettre une visualisation directe de ces produits pendant l'intervention sous contrôle *IRM* en temps réel ou pour un contrôle *a posteriori* sans faire intervenir la scopie par rayons X. En particulier, le repérage sous *IRM* de la position des microparticules dans le réseau vasculaire irriguant une masse tumorale est un enjeu important.

Nous montrons, dans un premier objectif, l'intérêt de leur visualisation par *IRM* (3.1) qui sera souligné par des essais expérimentaux, *in vitro*, de détectabilité des microsphères de Tris-acryl (Embosphère[®]) marquées par un *SPIO*¹ (3.2). Leur application clinique et leurs caractéristiques de géométrie, de composition et de structure ont attiré notre attention ainsi que celle de l'équipe médicale du *CR2I* (Centre de Recherche en Imagerie Interventionnelle). Nous avons établi un protocole afin de montrer, pour la première fois, la possibilité de les repérer *in situ* par *IRM* 1,5T. L'enjeu est avant tout de trouver la bonne séquence avec des paramètres optimaux (TR, TE, FOV, épaisseur de coupe, $N_x \times N_y$, ...) et une antenne adaptée afin d'obtenir le meilleur signal possible. De plus, il est nécessaire de déterminer la faisabilité de détection de ces microsphères en condition *in vivo* qui impose le contrôle du temps d'acquisition (celui-

¹ *SPIO* : Superparamagnetic Iron Oxyde.

ci doit être aussi court que possible). Le paramètre temps est donc une contrainte supplémentaire sur les compromis effectués dans l'optimisation du signal. Des essais de détectabilité ont également été réalisés sur un imageur *IRM* de 3T.

Nous présentons, dans un second objectif, un développement de matériels d'occlusion et éventuellement de vecteurs de drogues destinés à être détectables en *IRM*. Ce travail est l'élargissement du premier objectif avec des perspectives plus étendues, mais se situe en amont clinique. Il consiste à marquer des agents d'occlusion non dégradables ou dégradables de forme sphérique. Nous avons acquis par ce travail un premier savoir faire en matière de marquage par les *SPIO* d'un type de microsphères (HépasphèreTM) non dégradable (3.3) qui se présentent, à l'état initial, sous forme de poudre. Puis, nous avons constitué un second savoir faire en matière de marquage de microparticules réalisées par nos soins concernant, premièrement, le marquage de microbilles d'alginate avec des *SPIO* et du Gadolinium (3.4), puis, le marquage avec des *SPIO* d'émulsions dont l'intérêt est multiple (3.5). On peut régler la taille des gouttelettes et ainsi étudier les limites de détectabilité par un imageur *RM*; on peut aussi les utiliser pour l'embolisation artérielle, ce sont en effet des vecteurs inertes vis-à-vis de tout agent thérapeutique.

La maîtrise de ces techniques nous permet aussi de contrôler la concentration en agent de contraste incorporé dans ces nouvelles microparticules qui aura une influence directe sur le signal détecté.

3.1 Les types d'agents d'occlusion vasculaire principaux

Les agents d'occlusion vasculaire (Tableau 3-1) représentent tous les produits aboutissant mécaniquement ou biologiquement à une occlusion du vaisseau dans lequel ils sont placés [Chapot2000]. Ils sont nombreux et leur choix dépend de l'application clinique envisagée. Pour une occlusion vasculaire temporaire (recanalisation possible surtout avec les artères nourricières du trauma²), les particules les plus recherchées sont constituées d'une matière gélatineuse résorbable [Douglas1994] (Annexe A, Tableau A-1, Gelfoam[®]). Ce type de particule peut seulement atteindre les artères larges. Par

² Trauma : Blessure ou lésion produite sur une portion limitée de l'organisme.

conséquent, la pression sanguine en amont de l'artère saignant diminue, une thrombose locale est alors formée [Douglas1994].

Dans le cadre du traitement tumoral, une occlusion vasculaire temporaire ou permanente est possible à condition que les microparticules utilisées pour réaliser l'occlusion atteignent ou dépassent les artérioles. A cet effet, des microparticules fines (Annexe A, Tableau A-2 et Tableau A-3) et des agents colloïdaux³ (Annexe A, Tableau A-1, Lipodol[®]) sont utilisés avec ou sans des agents anticancéreux (chimioembolisation) pour produire une nécrose tumorale. D'ailleurs, l'occlusion permanente est préférée pour le traitement des varicocèles⁴ et des malformations artérioveineuses. Celle-ci est accomplie par des microparticules non résorbables.

Les emboles peuvent exister en plusieurs calibres granulométriques et avec des formes géométriques différentes, irrégulières ou sphériques. Ces caractéristiques permettent à l'embole d'atteindre plusieurs niveaux dans l'arborescence artérielle. Par exemple, les spires « coils » peuvent obstruer les artères moyennes et petites, tandis que les agents liquidiens « Lipiodol[®], Ethanol⁵ » et les petites particules « Microsphères, PVA » peuvent boucher les artérioles ou les capillaires. Donc, la forme et le calibre de l'embole interviennent dans la précision de la région ciblée. Lorsque les microparticules sont sphériques, de calibre approprié à la lumière vasculaire, elles se positionnent le moins bien sous forme d'agrégat dans le vaisseau. Leur distribution intravasculaire devrait être homogène [Derdeyn1997 ; Andrews2003] et leur présence constatée uniquement dans le tissu cible. Ces caractéristiques permettent d'avoir une occlusion optimale et un traitement efficace. Leur effet peut être renforcé par d'autres propriétés physiques et chimiques propres au matériau de l'embole. Les propriétés physiques et leur constance dans le temps concernent la souplesse et la porosité, et les propriétés chimiques se rapportant au matériau, la nature du polymère et sa biocompatibilité avec les cellules [Laurent1996 ; Khankan2004 ; De Luis2008]. En particulier, ces propriétés existant en microsphères Embosphère[®] et Héphasphère[®] sont soulignées dans l'Annexe A (Tableau A-3). Ces microsphères possédant les caractéristiques requises pour une occlusion permanente, elles ont été largement utilisées dans cette thèse.

³ Colloïde : C'est une substance sous forme de liquide ou de gel qui contient en suspension des particules suffisamment petite pour que le mélange soit homogène.

⁴ Varicocèle : Dilatation des veines de testicules.

⁵ Ethanol : Cet alcool, se révèle être un agent sclérosant en dénaturant les protéines dans le sang et en participant à la formation de thrombose vasculaire.

Agents d'occlusion	Caractéristiques	Produits commercialisés
Particules	Sphériques	Microsphères (Embosphères [®]) Microsphères expansibles (Héphasphère [®])
	Non sphériques	PVA : Ultra Ivalon [®] , Trufill [®] , Contour [®] Gélatine : Gelita [®]
	Altérant la paroi vasculaire	Colles cyanoacryliques : Histoacryl [®]
Fluides	Polymère en solution	Endovasix [®]
	Agent sclérosant	Ethibloc [®] , Aetoxiscérol [®] , Alcool
	Huile iodée	Lipiodol [®]
Implants expansibles	Spires	Coils en Platine : GDC [®] , DCS [®] Coils en Tungstène : MDS [®]
	Ballons	Latex : Goldvalve [®]

Tableau 3-1 : Agents d'occlusion vasculaire concernant les particules, les systèmes mécaniques et les fluides. [Chapot2000]

3.1.1 Propriétés physicochimiques des microparticules :

La majorité des microparticules utilisées dans l'embolisation sont des systèmes colloïdaux hydrophiles. Elles peuvent être constituées d'un matériau capable de retenir les molécules actives (molécules anticancéreuses) par séquestration ou adsorption⁶. Dans notre cas, nous les utilisons pour contenir un produit de contraste. Celui-ci peut modifier le signal de la particule, ce qui permet sa distinction du signal intermédiaire au milieu environnant. Les matériaux enrobant utilisés sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou encore des lipides.

On peut distinguer (Figure 3-1) :

- Les systèmes matriciels (microsphères) : dans ce cas, la particule est constituée d'un réseau polymérique ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve dispersée ou dissoute l'espèce qu'on souhaite encapsuler.
- Les systèmes réservoirs (microcapsules) : dans ce cas, la particule est constituée d'un cœur liquide (plus ou moins visqueux) ou solide contenant l'espèce encapsulée, entouré d'une écorce solide de matériau enrobant.

⁶ Adsorption : Phénomène par lequel des solides ou des solutions retiennent à leur surface des molécules, des ions en phase gazeuse ou liquide. Il a son origine dans les forces d'attraction intermoléculaires, de nature et d'intensité variées, qui sont responsables de la cohésion des phases condensées, liquides ou solides.

Dans les deux cas, la molécule active encapsulée peut aussi être adsorbée à la surface de la matrice (chapitre.4).

Les matériaux (polymères et lipides) utilisés pour obtenir ces structures sont nombreux et variés [Labarre2001 ; Khankan2004 ; De Baere1995 ; Chretien2004].

Nous pouvons distinguer :

- les polymères d'origine naturelle : gélatine, alginate de sodium, chitosane, amidon
- les polymères cellulosiques : ethylcellulose, hydroxypropylcellulose...
- les polymères de synthèse : copolymères acryliques et métacryliques, polyoléfines, copolymères (acrylo-)vinyliques, polycaprolactone, polymères d'acides lactiques et glycoliques
- les huiles, lipides et cires minérales : huile d'oeillette, corps gras solides, glycérides, cires (d'abeille, de carnauba...), cires minérales

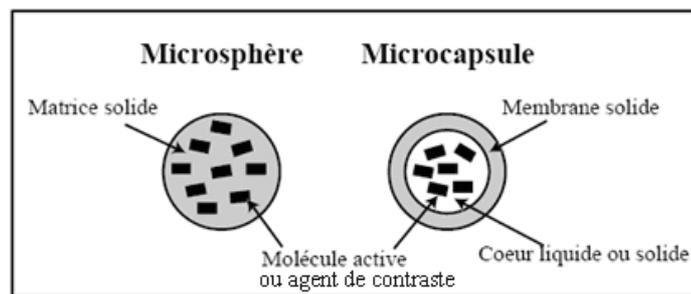


Figure 3-1 : Représentation schématique de microparticules d'embolisation, microsphère et microcapsule. D'après [Guery2006]

3.1.2 Intérêts de la visualisation des microparticules sous IRM

La technique d'embolisation (que ce soit pour un fibrome utérin ou un carcinome hépatocellulaire) se fait aujourd'hui sous fluoroscopie. Celle-ci permet de voir d'une façon temporaire la vascularisation, l'agent radio-opaque étant ensuite emporté dans la circulation systémique. Cependant, lorsqu'une artériole est embolisée, le flux s'arrête et le produit radio-opaque ne peut plus circuler ni en amont ni en aval de l'embole. Ceci a pour conséquence directe de rendre invisible cette branche d'artériole et donc partiellement inconnue, l'anatomie du réseau vasculaire, ce qui peut entraîner des erreurs d'embolisation de quelques centimètres. En plus, la durée d'exposition du patient aux radiations X durant la procédure d'embolisation est une considération à prendre en compte. Elle est significative lors de l'embolisation des fibromes utérins où

les irradiations peuvent provoquer l'infertilité des ovaires chez les jeunes femmes [Lupattelli2004].

C'est là qu'apparaît un avantage de la visualisation des microparticules par *IRM* dans le réseau vasculaire durant et après embolisation. Elle aide à éviter l'irradiation du patient aux rayons X. Elle permet aussi d'évaluer si la distribution des microparticules dans ou hors la tumeur est homogène et si les microparticules ont parfaitement atteint leur cible. Par ailleurs, la détectabilité des microparticules permet de déterminer leur position (distale ou proximale) et leur densité dans le réseau vasculaire du volume tumoral, ce qui a une importance pour la délivrance d'une dose suffisante de principe actif (chimioembolisation des tumeurs hypervasculaires). En plus, la visibilité par *IRM* de microparticules permet d'apprécier après embolisation la tenue de cette dernière dans le temps. Le vaisseau embolisé à une certaine position peut être débouché par des pulsations artérielles provoquant le déplacement de microparticules plus en aval [Dion1986], ou sous l'influence du drainage veineux.

3.2 Détectabilité de microsphères en gélatine de Tris-acryl

3.2.1 Premiers essais de détectabilité : modèles ex vivo et in vitro

Des microsphères ont été fournies par la société Biosphere Medical, S.A. (Roissy, France). Elles sont de deux types, soit des microsphères chargées par des *SPIO*, soit des microsphères non chargées (Embosphère®) nommées microsphères de contrôle. Les deux types de microsphères sont constitués d'un réseau polymérique en Tris-acryl, ils sont obtenus par polymérisation dans une solution aqueuse d'un monomère hydrophile avec un agent réticulant⁷. Pour les microsphères chargées par les *SPIO*, les particules d'oxyde de Fer superparamagnétique sont complexées avec une solution monomère hydrophile avant sa réticulation sous forme de gel. Le carboxydextran recouvrant les particules d'oxyde de Fer place les *SPIO* en suspension colloïdale⁸ dans le milieu. Les microsphères marquées par le *SPIO* sont chargées par 670 mg de Fe/l de la solution de monomère. La dispersion de l'agent de contraste dans les microsphères est homogène. A cet effet, les microsphères de Tris-acryl ont une couleur orange. Par contre, les

⁷ Agent réticulant : Agent qui peut coupler de chaînes de polymères entre elles.

⁸ Colloïdale: Dispersion ou mélange dans un solvant liquide d'un soluté formé de particule dont la taille est supérieure à celle des molécules.

microsphères de contrôle sont transparentes et incolores [Laurent1996 ; Beaujeux1996]. La présence de particules *SPIO* dans les microsphères est stable, elle est garantie par le fabricant après stérilisation de celles-ci à 120°C pendant 20 minutes.

Les deux types de microsphères (de contrôle et marquées) sont préparés selon quatre calibres : 100–300, 300–500, 500–700, 700–900 µm dont nous avons étudié la déteçtabilité sous *IRM* [Jassar2008 a et b].

LABELLED MICROSPHERES ASSESSMENT USING 1.5T SCANNER FOR EMBOLIZATION FOLLOW UP

Hassan Jassar, François Langevin

Université de Technologie de Compiègne – Centre d'Imagerie Médicale Avancée, 60471 Compiègne, France
{hassan.jassar, Francois.langevin}@utc.fr

ABSTRACT

Controlled fibroids and tumors embolization with magnetic resonance imaging (MRI) remain challenging due to the absence of effective detection with another imaging modality. The objectives of this paper were to assess by 1.5T MRI the detectability of superparamagnetic iron oxide (SPIO) labelled microspheres (LB*MSs) with the help of three models. Four size ranges of LB*MSs were firstly injected into 8 *ex vivo* sheep kidneys or were secondly embedded in a hydrogel of a Petri dish as different grouping. The feasibility of *in vivo* assessment was thirdly determined in *in vitro* model according to LB*MSs size, coils, FOV, and sequence. LB*MSs appeared as black spots in MRI sheep Kidney images, different grouping of LB*MSs appeared as a single black spot in MRI images of Petri dishes, and a positive visualization in *in vivo* conditions. Our models demonstrate the efficiency of LB*MSs assessment, *in vitro* and *in vivo* conditions, with MRI according to different sizes. **Index Terms:** Magnetic resonance imaging, sequences, coils, spheres, tumors.

INTRODUCTION

Embolization is the process of cutting off the blood flow to a tumor, or in essence, starving it of oxygen and the nutrients it needs to exist, grows and metastasize [1].

Controlled embolization with MRI is an important innovation for fibroids and solid tumor treatment. Currently, angiography only allows the visualisation of blood flow inside the vessels, but particles used in the embolization procedure remain invisible and induced cm range errors [1]. As a result, it is still a challenge to verify if these particles are located at the right places inside vessels.

Magnetic resonance (MR) detectable LB*MSs, with super-SPIO, would allow a better control of emboli introduction after embolization. Moreover, detectable particles will help doctors evaluate the success of an embolization procedure by appreciating the particles' location inside or outside the tumor, homogeneous or heterogeneous distribution in/around it and their optimal density per tumor volume.

The purpose of this works is to evaluate with MRI the visualization of LB*MSs according to their MR signal, contrast, appearance, shape, size and number. In addition, MR sequence parameters and coil have studied whether they have any affect on MR LB*MSs detectability. Three models—one *ex vivo* and two *in*

vitro—were developed for this purpose. Renal sheep vasculature was used as an *ex vivo* model for embolization with either four ranges of Embosphere microspheres (EMs) or LB*MSs (100-300, 300-500, 500-700 and 700-900 μm). With MR imaging, this model provides a visualisation of the different renal regions covered by the different LB*MSs sizes, as well as their distribution inside the renal arterial vasculature. The first *in vitro* model evaluated the way in which LB*MSs appear in MRI images, based on their size and grouping in a Petri dish. The second *in vitro* model was designed to predict the *in vivo* feasibility to detect LB*MSs used as a vascular fibroid emboli.

MATERIALS AND METHODS

Trisacryl Microspheres Labelled by SPIO:

Hydrophilic Trisacryl co-polymer microspheres (MSs) coated with porcine gelatine was loaded with homogenously distributed SPIO (Dextran-Magnetite) particles, in order to exhibit a MR signal different from that of non loaded MSs and that of the biological medium [2]. Non-resorbable Trisacryl MSs, which have a spherical shape, allow accurate grading and optimal geometric distal vessel occlusion [3]. They are precisely calibrated, micro-porous beads, inert, translucent and they have demonstrated biocompatibility [4]. The suppleness of these MSs prevents their aggregation of catheters [5].

Two groups of Trisacryl MSs were used in the study. Each group contained four granulometric ranges: 100-300, 300-500, 500-700, and 700-900 μm . One of the groups included calibrated embosphere microsphere (EM)–Embosphere-Biosphere Medical SA—used as a control; the other contained a prototype of calibrated MS loaded with a contrast agent (Dextran-Magnetite) to make MSs MR detectable.

Renal Embolization Protocol

Renal vessels are represented as a network of arteries and veins. Hierarchy in vessels, diameters and blood flow makes the kidney a suitable model for embolization procedures. The particles' specific gravity, small size, and smooth, round surface allow these microspheres to reach more distally, to vessels with diameter approximating their own. This produces a more complete and permanent occlusion [6].

Four sheep were selected by a radiologist according to their weight, and each received one of the four granulometric ranges of

LB*MSs in one kidney and a comparable size of EMs in the other. Embolization was performed in the Center of Research in Interventional Radiology (CR2I) and the French National Institute for Agriculter Research (INRA, Joy-en-Josas, France). The following day, the animals were sacrificed. Each pair of kidneys was removed and conserved in a container with a 10% formaldehyde solution. The containers were labelled according to the size of the MS used in the embolization (100-300, 300-500, 500-700 and 700-900 μm , respectively).

Hardware

All imaging was performed using a superconducting 1.5 Tesla MR system (General Electric Medical System-EXCITE™ 11.0) in the CIMA laboratory at the Compiègne University of Technology (UTC-France). Four-element phased array coils were used as radiofrequency receivers (MACHNET-PACC-GS15 and CARDIAC). These coils were chosen for their favorable signal-to-noise ratio and their usefulness in determining the feasibility of *in vivo* LB*MS detection with MRI.

MR Sequences and Parameters

Ex vivo imaging

The imaging of each renal container was performed six weeks after the sheep were sacrificed. Three-dimensional Fourier transform spoiled-gradient echo (3DFT SPGR) and two-dimensional Fourier transform Fast spin echo (2DFT FSE-XL) sequences were implemented separately for exploring the embolized kidney.

3DFT SPGR is T_1 -weighted (T_1w) and 2DFT FSE is T_2 -weighted (T_2w). Both weightings were used to determine which one would be the most suitable for the detection of LB*MSs. All images were acquired in the coronal and sagittal plane, with a field of view (FOV) of 100×100 mm. The MACHNET coil was centered on the different renal containers in order to obtain maximum signal intensity.

The T_1w 3DFT SPGR sequence was acquired using a matrix size of 256×256 , a repetition time (TR) of 30 ms and an echo time (TE) of 9 ms. A total of 28 slices with 1 mm thickness were acquired for an acquisition time of 4.09 minutes.

Sagittal T_2w 2DFT FSE-XL images was acquired using a matrix size of 256×256 , a TR of 3000 ms and a TE of 120 msec. The voxel size was $0.4 \times 0.4 \times 2.0$ mm³. The number of slices was 13 with no intersection gap. The number of excitations (Nex) was 3 and the echo train length (ETL) was 16. The total acquisition time for this sequence was 2.30 minutes.

In vitro imaging

3DFT SPGR, 2DFT FSE and 3DFT Fiesta sequences were implemented for *in vitro* Petri dish imaging. 3DFT Fiesta is T_2/T_1 -weighted (T_2/T_1w).

The 3DFT-Fiesta sequence was acquired using a short TR value (7 msec), a minimum TE (3 msec) and an axial image with 52 slices of 2 mm thickness. Two FOVs were used: 100×100 mm or 140×140 mm, depending on the experiences explained in following paragraphs. The flip angle was 45° , the matrix size was 256×256 and the Nex was 0.5. Slice zero fill processing (Zip), which interpolates new slice locations in a 3D volume, was used to increase through plane resolution and to reduce partial volume artefact. The total acquisition time for this sequence was 31''.

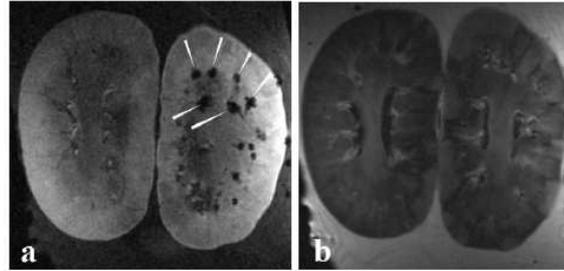


Figure 1 : a) T_1w *ex vivo* images of sheep kidneys. Black spots appear in the medulla zone of the left kidney due to LB*MS (white arrows) with a 700-900 μm of size, whereas EMs are not seen in the left kidney. b) T_2w image. LB*MSs and EMs don't appear on right and left renal image.

Petri Dish Preparation and Imaging

The first *in vitro* study was designed to determine the difference between the apparent diameter in MRI and the real diameter of the MSs, as well as to check the individualization of each MS in a cluster. We created four matrices of consisting of different LB*MS configurations (singlet, doublet, triplet and cluster) in each quarter of a Petri dish of diameter ≈ 85 mm. Different sizes of MSs (100-300, 300-500, 500-700 and 700-900 μm , respectively) were used in each quarter. The preparation of the Petri dish, was started with a layer of a transparent gel (Biomérieux, ref41466) in order to support each matrix of LB*MS. To form the matrix, a few ml of LB*MS suspended in a physiological serum was filled in a syringe and then dropped on the gel layer under microscope control (Ellix® 5.2.2). All LB*MS matrices were then covered by a new gel layer. As a result, the matrices of LB*MS remained fixed between the two protective layers of gel. This preparation was performed in the CR2I laboratory, where microscopic images of the Petri dish were taken. MRI acquisition of the Petri dish was done in the CIMA laboratory, using T_1w and T_2w sequences previously described for the *ex vivo* model, but with fewer slices and a shorter acquisition time.

Petri Dish Imaging with In-vivo Conditions

The purpose of this study was to verify the feasibility of LB*MS detection with MRI in *in vivo* conditions. This study used one Petri dish with diameter ≈ 50 mm was prepared similarly to the dishes used in the first *in vitro* study. (500-700 μm) LB*MS range, which is preferred to achieve fibroid devascularisation [7], was embedded in a hydrogel of a Petri dish as different distributions. To simulate *in vivo* conditions, the Petri dish was placed in the centre of a cylindrical bucket (diameter ≈ 16 cm) in order to provide distance between the coil and the microspheres. A CARDIAC coil was used to obtain larger FOV (140×140 mm), similar in size to an *in vivo* application. These results were then compared to images obtained by placing the MACHNET coil directly on the Petri dish (FOV 100×100 mm). The T_2/T_1w 3DFT Fiesta sequence previously described was followed for both approaches.

Image Analysis

Quantitative analysis of all MRI images was done in the CIMA laboratory using an Advantage Windows (4.1- GE) workstation.

To assess the detection and distribution homogeneity of MSs

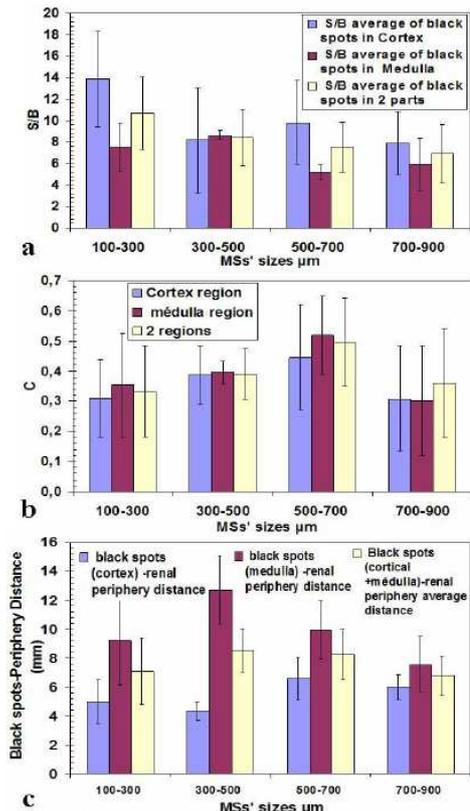


Figure 2 : a) Black spot signal to noise ratio and average values for all MS's sizes presented in renal cortex and medulla. b) Black spot-parenchyma contrast and average values for all MS's sizes presented in renal cortex and medulla. c) Black spot-renal periphery distance and average values for all MS's sizes presented in renal cortex and medulla.

in the *ex vivo* study, the SNR, contrast and distances of the LB^*MS , which appeared as black spots in T_{1w} -renal images, were measured. Signal intensities (SIs) were determined with a standard region-of-interest (ROI) measurement in the cortex and medulla regions of the kidneys. Contrast between the black spots and the renal parenchyma was calculated as $(SI_{\text{parenchyma}} - SI_{\text{spot}}) / SI_{\text{parenchyma}}$ to assess the appearance of LB^*MS in the medium. Distance between the black spots and the renal periphery was determined for each size of MS. As a result, the depth reached by the MSs inside the renal vessels evaluates their distribution since the size of the MSs corresponds to the diameter of the vessels.

The Petri dish study, in first *in vitro* model, compared the dimensions of the LB^*MS in the T_{1w} and the microscopic images. In the T_{1w} Petri dish images, the dimensions of the black spots (diameter for circular spots, length and width for irregularly shaped spots) were determined. These values were compared to the dimensions measured in the microscopic images using the graphical software available on the PC at CR2I. Excel software was used to calculate the correlation between the microscopic and T_{1w} images.

In the *in vivo* simulation study, the feasibility of LB^*MS

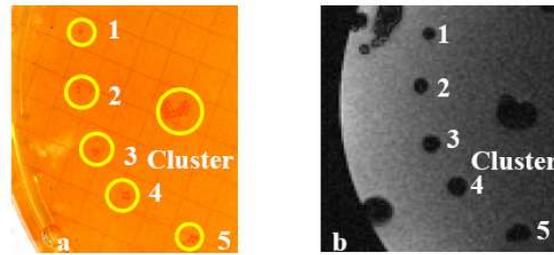


Figure 3 : Microscopic and MR images of a quadrant of a Petri dish corresponding to a one size of LB^*MS (500-700 μm). a) Microscopic image, a matrix of LB^*MS grouped as a singlet, doublet, triplet and cluster (yellow round). b) T_{1w} image of a quadrant of the Petri dish. Black spots are in correspondence to different LB^*MS configurations.

detection with MRI was estimated by comparing the T_2/T_{1w} images obtained with the MACHNET and CARDIAC coils.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present paper we have proposed three models that make it possible to 1) estimate the detection and the distribution of the LB^*MS through an *Ex vivo* analysis, 2) evaluate the appearance and the magnification of the LB^*MS obtained in the MR images (*in vitro* analysis) and 3) verify the possibility of MR detection of LB^*MS via *in vivo* approach.

Ex vivo

Fig. 1 displays the images acquired from the kidneys of the sheep used in this study. The T_{1w} images (3DFT SPGR) represent the LB^*MS as black spots (Fig.1a-right), whereas in T_{2w} images (2DFT FSE) the LB^*MS remain invisible (Fig.1b-right). However, control MSs do not appear in either T_{1w} or T_{2w} images (Fig.1a and b-left). This demonstrates that the 3DFT SPGR sequence is suitable for MRI of the LB^*MS with *SPIO*.

The use of the 3DFT acquisition gives a significant advantage for clinical applications. As it uses very thin slices with no slice gaps (contiguous slices), it ensures that no MSs are missed during the scan. Slices can also be reformatted on a workstation to produce images in any orientation. Furthermore, 3DFT scanning is important when a high resolution is required.

The effect of the LB^*MS size on the SNR measurement in the cortex and medulla regions shows a decrease in the SNR value as the MS size increases (Fig. 2a). However, the contrast measurement in the two regions shows an increase in the contrast value between the black spots and the parenchyma as the MS size increases (Fig. 2b). As a result, in T_1 -weighted images the microspheres appear as dark spots.

The result of the distance measured between the black spots and the renal periphery shows a decrease in the distance value as the MS size increases (Fig. 2c). This is a result of a decline in vessel diameter that is widespread at the periphery.

In vitro

The difference between the apparent and real diameters of the MSs (shown in the MRI and microscopic images, respectively) as well as the individualization of each microsphere in a multiple MSs, is shown in (Fig. 3a and b). For the individual MSs of all sizes, the shape of the black spots is essentially circular. However

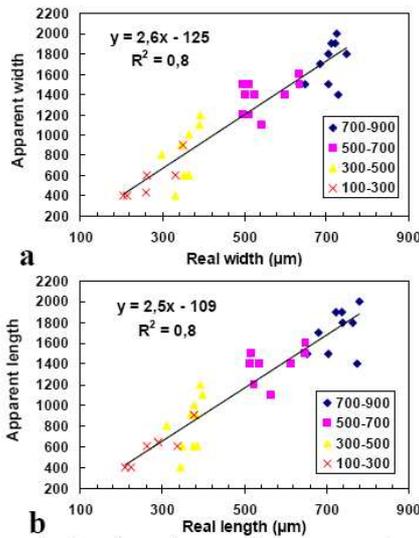


Figure 4 : Correlation between the apparent and real width (a) and length (b) of singlet LB*MS for all sizes.

MS grouping	Magnification		R ²	
	Length	Width	Length	Width
Doublet MS	1.3	1.6	0.7	0.5
Triplet MS	1.4	1.6	0.8	0.7

Table 1 : Length and width Values of Black spots obtained from MSs in Doublet and Triplet Grouping. The relationship between the apparent and real dimension of MS in two groups is depicted by R².

in the case of multiple MSs, each cluster of MSs appears as a single ellipse in the MRI images. Since one black spot was always obtained regardless of the number of MSs in each group, this implies the impossibility of discriminating in T₁w images the number of LB*MS in a group.

MR magnification of single LB*MS diameters was 2.5 for all MS sizes (Fig. 4a, b). The magnification factor decreases in the case of doublet, triplet and cluster MSs, as shown in Table 1.

The correlation coefficient (R²) between the real and apparent dimension of LB*MS equals (0.5 - 0.8). These values exhibit a significant linear relationship for single and multiple MSs. This linearity in the magnification is attributed to the effect of the superparamagnetic particles on the surrounding environment by disturbing the local magnetic field that the protons experience [8].

From this study, the factor of magnification determined according to the size and number of MSs provides an important guideline for spatial resolution optimization. This optimization avoids the partial volume effects by matching the size of the pixel/voxel to the real size of the MS. As a consequence, pixel size can be calculated by multiplying the magnified factor to the real size of MS.

In-vivo simulation

The results of the patient simulation for the MRI LB*MS assessment using a small and large coil are shown in Fig. 5. The

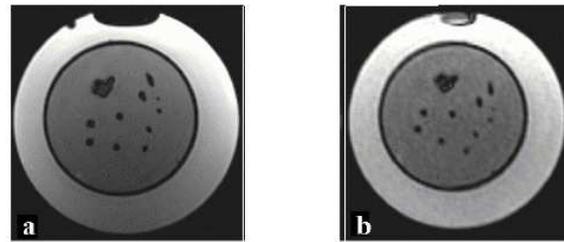


Figure 5 : Ultra fast imaging of Petri dishes which contain LB*MS (500-700 µm) in: singlet, doublet, triplet and cluster configuration. a) MR image is obtained by Kneepa coil according to a 10 cm of Field of view and 31 sec of acquisition time. Kneepa coil is placed directly to the Petri dish. b) MR image is obtained by cardiac coil according to a 14 cm of Field of view and 31 sec of acquisition time. Cardiac coil is placed distantly from the Petri dish.

image obtained by the CARDIAC coil (FOV 14 cm) in Fig. 5b represents the black spots clearly, similar to the result in the image obtained by the MACHNET coil (FOV 10 cm) in Fig. 5a. This proves the feasibility of in vivo detection of the LB*MS with MRI. The 3DFT Fiesta sequence permits an increase in signal intensity and a reduction in acquisition time. This reduction can minimize the motion artefact (respiratory).

CONCLUSION

LB*MS can be detected with MRI to provide an accurate embolization of fibroids and solid tumors. Spatial resolution is optimized according to the magnification factor of LB*MS in MR images. LB*MS detection in in vivo conditions with ultra fast MR sequence is acceptable and will be useful in human application.

REFERENCES

- [1] Laurent A et al. Partition of calibrated tris-acryl gelatin microspheres in the arterial vasculature of embolized nasopharyngeal angiofibromas and paragangliomas. J Vasc Interv Radiol 16:507-513, 2005.
- [2] Laurent A, Labarre D. Hydrophilic polymer biomaterial having a specific magnetic resonance imaging signal and process for the preparation of said biomaterial. US2003077225, 24-04-2003.
- [3] Domas L et al. Morphological analysis and shape index of embolization particles. Innov Tech Biol Med, 14: 436-448, 1993. (in French)
- [4] Laurent A et al. Trisacryl gelatine microspheres for therapeutic embolization, I: development and in vitro evaluation. AJNR Am J Neuroradiol, 17: 533-540, 1996.
- [5] Beaujeux R et al. Trisacryl Gelatin Microspheres for Therapeutic Embolization, II: Preliminary Clinical Evaluation in Tumors and Arteriovenous Malformations. AJNR Am J Neuroradiol 17:541-548, March 1996.
- [6] Dion J E et al. Dextran microsphere embolization: Experimental and clinical experience with radiologic-pathologic correlation. Radiology, 160:717-721, 1986.
- [7] Pelage J. P et al. Limited Uterine Artery Embolization with Trisacryl Gelatin Microspheres for uterin Fibroids. J Vasc Interv Radiol 14:15-20, 2003.
- [8] Boxerman et al. 1995. Kennan et al. Quantitative MRI of brain, page 370, 1994.

3.2.2 Optimisation de la détectabilité des Microsphères de Tris-acryl

Nous avons prouvé dans la section (3.2.1, results and discussion : *ex vivo*) qu'il serait possible de visualiser les microsphères marquées *MSMR* sous *IRM*. Elles sont représentées sur les images *IRM* par des trous noirs de diamètres différents qui dépendent à la fois de la taille et du nombre de ces microsphères, mais aussi de la concentration du produit de contraste à l'intérieur (3.2.1, results and discussion : *in vitro*).

A priori, on ne peut affirmer que les trous-images ont un signal propre ou ne représentent que du bruit de fond. Ne sachant en observer expérimentalement les effets microscopiques, nous choisissons arbitrairement de considérer les trous-images comme des régions dont l'intensité est faible, mais déterministe, produite par les microsphères marquées par *SPIO*. L'intensité mesurée résulte de l'effet occultant du *SPIO* sur les microsphères qui le fixent, un peu comme des nuages pouvant masquer le soleil sans provoquer une nuit noire. On mesure à l'aide de régions d'intérêt le faible signal à l'intérieur des ces trous-images, en supposant que celui n'est pas un simple bruit.

La séquence *IRM* et la pondération de l'image ont aussi une influence directe sur la détectabilité des microsphères marquées par *SPIO*. A cet égard, les tests effectués montrent que ces microsphères sont visibles dans les images *RM* sous forme de trous noirs en utilisant la séquence *3D SPGR T₁*, par contre elles sont invisibles en utilisant la séquence *2D FSE T₂*. En effet, en pondération *T₂*, le parenchyme rénal et les trous noirs ont des intensités faibles, par conséquent, le contraste trou-parenchyme rénal est quasiment nul.

La détectabilité en routine clinique des *MSMR in vivo* n'est pas encore réalisée, elles n'ont pas encore l'autorisation de mise sur le marché (AMM). Il s'agit ici d'une étude préalable pour vérifier la faisabilité de leur visualisation sous *IRM* dans des conditions *in vivo*. Celles-ci peuvent avoir une influence sur le signal de ces microsphères. Il est donc nécessaire d'optimiser plusieurs facteurs (le choix de la séquence et de l'antenne, la distance entre les *MSMR* et l'antenne, le nombre et le calibre des microsphères, le type et la concentration de l'agent de contraste dans les microsphères) pour obtenir leur visualisation systématique par *IRM*.

3.2.2.1 *Premier facteur : choix de la séquence et de l'antenne*

Il concerne le choix de la séquence et de l'antenne pour la déteçtabilité des *MSMR*. Dans la section (3.2.1, Petri dish imaging with *in vivo* imaging), nous avons démontré la visualisation de *MSMR* dans des conditions *in vivo* par l'utilisation de la séquence d'écho de gradient ultra rapide « *3D Fiesta* » dont le temps d'acquisition est de 31 s. Le faible temps d'acquisition permet dans le cas d'une application clinique de s'affranchir des artéfacts dus aux mouvements respiratoires ainsi que de demander au patient de rester en apnée durant l'examen. Par ailleurs, cette séquence se caractérise par un signal remarquable par rapport à d'autres séquences (chapitre.2, 2.1.2.3).

L'antenne utilisée durant ces acquisitions est une antenne cardiaque de taille moyenne. Celle-ci a démontré dans le chapitre.2 (section 2.2) une déteçtion optimale de signal *RMN* au-delà de 4,5 cm en profondeur. A cet égard, cette antenne peut répondre au besoin clinique pour la déteçtabilité des *MSMR* dans le cas de l'embolisation vasculaire de fibrome utérin. Par ailleurs, sa dimension moyenne rend sa position sur le patient confortable.

3.2.2.2 *Deuxième facteur : optimisation selon le type d'agent de contraste*

Nous étudions ici quels agents de contraste *SPIO* possèdent le meilleur effet sur le signal une fois incorporés dans les microsphères de Tris-acryl. Dans la stratégie que nous avons choisie, l'optimisation est réalisée dans les conditions *in vitro* et *in vivo* (non clinique) avec une utilisation de champs de vue de 10 et 14 cm et des antennes différentes, carotide et cardiaque.

Nous avons appliqué dans cette étude deux séquences *IRM*, *3D SPGR* et *3D Fiesta*, avec lesquelles la déteçtabilité de *MSMR* est possible. De cette façon, nous pouvons comparer l'effet des deux séquences sur l'amplitude du signal image des microsphères marquées avec deux agents *SPIO* différents.

a) Matériels et méthodes

La procédure du marquage des microsphères de Tris-acryl par des agents de contraste de type *SPIO* et la préparation de leur support ont été faites par l'équipe du *CR2I*. En revanche, nous avons réalisé l'étude de la déteçtabilité.

- *Préparation des microsphères incluses en boîte de Pétri*

Matériels :

Une boîte de Pétri de diamètre 5 cm et d'épaisseur de 1,2 à 1,5 cm contient un milieu aqueux avec 10% de gélatine.

Nous utilisons deux échantillons de microsphères marquées chacune avec un agent de contraste différent :

- Type 1 : MSMR-Endorem[®] (MSMR-E), 500–700µm (ref 2E600, lot FM03.032.0.2E)
- Type 2 : MSMR-Resovist[®] (MSMR-R), 500–700µm (ref 2R600, lot FM03.032.0.2R)

Le Tableau 3-2 illustre la différence entre les propriétés des deux agents de contraste.

Un seul calibre de microsphères de Tris-acryl est utilisé dans cette étude, le 500–700 µm, car c'est celui préféré en clinique par les radiologues. Dans le cas de fibromes, il permet d'emboliser sélectivement les artères utérines sans atteindre les artères ovariennes [Pelage1999].

		Endorem [®]	Resovist [®]	
Nom générique du composant		Ferumoxides	Ferucarbotran	
Nom abrégé		Ami-25	SHU 555A	
Fabricant		Guerbet S.A.	Schering AG	
Noyau		(Fe ₂ O ₃) _m (FeO) _n	Fe ₂ O ₃ + Fe ₃ O ₄	
Effet de contraste		T ₂ , rehaussement négative	T ₂ et T ₁ , rehaussement négative	
Relaxivités (mmol⁻¹.l.sec⁻¹)	Agent de contraste dans l'eau à 37°C	1,5T	r ₁ = 4,7 (4,4–5,0) r ₂ = 41 (39–43)	r ₁ = 8,7 (8,2–9,2) r ₂ = 61 (54–68)
		3T	r ₁ = 4,1 (3,8–4,4) r ₂ = 93 (87–99)	r ₁ = 4,6 (4,3–4,9) r ₂ = 143 (132–154)
	Agent de contraste dans le plasma à 37°C	1,5T	r ₁ = 4,5 (4,2–4,8) r ₂ = 33 (31–35)	r ₁ = 7,4 (7,0–7,8) r ₂ = 95 (86–104)
		3T	r ₁ = 2,7 (2,5–2,9) r ₂ = 45 (42–48)	r ₁ = 3,3 (3,1–3,5) r ₂ = 160 (140–180)
	Agent de contraste dans le sang à 37°C ; B ₀ : 1,5T		r ₁ = 7,0 (6,6–7,4) r ₂ = 66 (61–71)	r ₁ = 8,0 (7,5–8,5) r ₂ = 77 (71–83)
	Osmolalité		340 mosm/kg H ₂ O	333 mosm/kg H ₂ O
[Fe]		11,2 mg Fe/ml	0,5 mol Fe/l	
Taille		80 à 150 nm	Diamètre hydrodynamique : 62 nm	
Substance de revêtement des particules SPIO		Dextran	Carboxydextran	

Tableau 3-2 : Propriétés de chacun des deux agents de contraste, Endorem[®] et Resovist[®]. D'après [Wang2001] et [Rohrer2004]

Préparation du milieu

- 20 ml d'eau distillée sont portés à ébullition.
- 2 mg de poudre de gélatine (Gelatin Type A from Porc Skin, [9000-70-8] EEC N° 232-554-6, Sigma, ref G-2500, 500g, lot 56H0130) sont pesés.
- la gélatine est ajoutée progressivement à l'eau distillée chaude sous agitation manuelle (gélatine 10% g/g).
- deux boîtes de Pétri sont remplies à moitié de la gélatine.
- la gélatine est laissée à refroidir pendant 1 heure.

Répartition des MSMR

- les MSMR sont déposées sur la gélatine selon six organisations ressemblant à celles qui existent dans un réseau vasculaire (Tableau 3-3) : singlet, doublet, triplet, quadruplet, amas ou file indienne.
- on place sur une boîte les MSMR de type 1, et sur l'autre les MSMR de type 2.
- on prépare 20 ml de gélatine 10% comme décrit précédemment.
- une deuxième couche de gélatine est coulée sur la première couche et sur les MSMR.

Le chargement de la solution de Tris-acryl est fait avec la même concentration pour les deux agents de contraste : 60 mg/ml solution, ce qui équivaut à 672 mg Fer/l solution. Le Fer a été dosé après fabrication et stérilisation des microsphères (c'est-à-dire celles qui sont dans les boîtes). La concentration de Fer dans les microsphères est à peu près égale pour les deux agents de contraste : 279 mg/l de microsphères pour Resovist[®], 270 mg/l pour Endorem[®]. Pour rappel, les microsphères sont composées à 90% d'eau en poids, ce qui permet d'espérer voir un signal *IRM* proton propre à ces édifices.

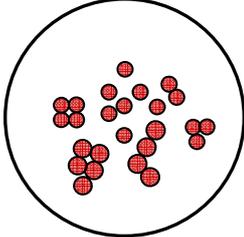
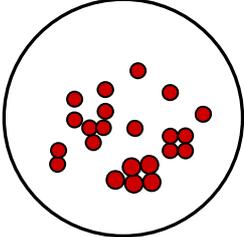
Boîte 1 Microsphères marquées avec l'Endorem®	Boîte 2 Microsphères marquées avec le Resovist®
	

Tableau 3-3 : Représentation graphique, à partir d'une photographie, de la répartition des microsphères marquées avec l'Endorem® et le Resovist® dans les boîtes de Pétri de diamètre 5 cm et d'épaisseur 1,5 cm. [CR21]

- *Imagerie IRM*

Acquisition *in vitro* :

L'IRM des deux boîtes de Pétri est effectuée par un imageur à 1,5 teslas. Toutes les images IRM obtenues par l'intermédiaire de l'antenne carotide sont dans le plan coronal.

La séquence 3D SPGR utilisée a un TR/TE : 30/7 ms, un angle α : 45°, un FOV : 100 × 100 mm², une matrice : 160 × 160, une bande passante BW : 1,63 kHz et Nex : 1. Les coupes obtenues dont l'épaisseur est de 1 mm sont adjacentes. 40 images sont acquises des deux boîtes placées l'une au dessus l'autre. La procédure entière est accomplie en 3'35''.

La séquence 3D Fiesta se caractérise par TR : 5,08 ms, deux valeurs de TE différentes : 1,67 ms (min) et 2,8 ms (minfull), un angle 45° (> 30°), un FOV 100 × 100 mm², une matrice : 160 × 160, une BW : 31,25 kHz et un Nex : 1. 40 coupes glissantes (Zip 2) sont obtenues dont l'épaisseur de chacune est 2 mm. La durée totale de l'acquisition est d'environ 19'' ou 24''.

Simulation d'une situation correspondant à un cas *in vivo* :

Les mêmes séquences avec les mêmes paramètres que ceux utilisés *in vitro* sont appliquées dans la simulation d'une situation géométrique correspondant à un cas *in vivo*. Cette fois-ci, le FOV est de dimension 140 × 140 mm² et l'antenne utilisée est une antenne cardiaque (réseau phasé, 4 canaux). Les deux éléments antérieur et postérieur de l'antenne sont diamétralement opposés sur un récipient cylindrique. Les boîtes de Pétri sont mises dans une autre boîte plus grande remplie par l'eau pour mieux charger l'antenne cardiaque. L'ensemble est placé au milieu du récipient cylindrique dont le diamètre est de 16 cm.

Quantification du rapport signal sur bruit et du contraste gélatine-trous sur les images RM des deux types de microsphères marquées

Nous mesurons à l'aide des régions d'intérêt le faible signal à l'intérieur des trous-images. Nous calculons la moyenne des signaux des trous qu'on arrive à visualiser dans les images RM. L'écart-type du bruit est mesuré au fond de chacune des deux images RM des boîtes de Pétri correspondant aux MSMR-Endorem® et aux MSMR-Resovist®. En faisant le rapport des valeurs du signal sur la valeur de l'écart-type du bruit, nous déterminons le rapport S/B.

Le contraste gélatine-trous est déterminé par cette expression :

Contraste(gélatine / trou) = $\frac{\mu_{\text{gélatine}} - \mu_{\text{trou}}}{\mu_{\text{gélatine}} + \mu_{\text{trou}}}$. $\mu_{\text{gélatine}}$ et μ_{trou} sont les moyennes des intensités correspondant à la gélatine et aux trous-images pour des MSMR-Endorem® ou des MSMR-Resovist®.

b) Résultats

Les images T_1 de la Figure 3-2 représentent les MSMR par des trous noirs quelque soit le type du produit de contraste à l'intérieur. Comme déjà démontré dans la publication [Jassar2008 a], on n'observe pas un trou image par microsphère. Les deux types de SPIO ont un effet identique sur la forme des trous. On constate, à l'œil nu, que la forme peut être circulaire ou elliptique pour les microsphères en singlet, doublet, triplet et quadruplet, mais elle est déformée dans le cas où les microsphères sont en amas ou file indienne. La même observation a déjà été démontrée dans la publication ci-dessus avec un diamètre des trous image 2,5 fois supérieur à celui des microsphères isolées et 1,6 fois supérieur au diamètre des microsphères en doublet, triplet et quadruplet.

Le nombre de trous qui apparaît sur les images T_1 obtenues par l'antenne carotide et cardiaque est le même, il est indépendant du type de microsphères et des conditions de l'acquisition.

Le contraste $C = \frac{\mu_{\text{gélatine}} - \mu_{\text{trou}}}{\mu_{\text{gélatine}} + \mu_{\text{trou}}}$ entre la gélatine et les trous correspondant aux

MSMR-E et MSMR-R détectées par la séquence 3D SPGR et l'antenne carotide (Figure 3-2, a et b) est égal à 0,48 et 0,54. Celles qui sont détectées par la même séquence mais

en utilisant l'antenne cardiaque (Figure 3-2, c et d) possèdent un contraste gélatine-trous équivalent à 0,42 et 0,47.

Les rapports S/B correspondant aux $MSMR-E$ et $MSMR-R$ détectées par l'antenne carotide sont égaux à 10 et 9 respectivement. Ils sont égaux à 6 et 5 pour celles qui sont détectées par l'antenne cardiaque.

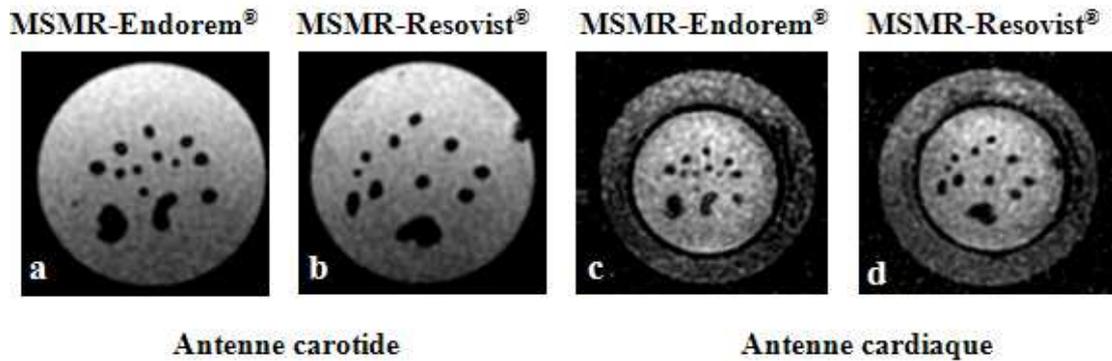


Figure 3-2 : Images T_1 des boîtes de Pétri obtenues par la séquence 3D SPGR. L'anneau périphérique observé autour des boîtes de Pétri dans les images c et d correspond à un cylindre d'eau dans lequel ces boîtes ont été plongées pour mieux charger l'antenne cardiaque. La non uniformité du signal de la gélatine est liée à la position des boîtes de Pétri par rapport à chacune des deux antennes surfaciques.

Les images T_2/T_1 de la Figure 3-3 représentent également les deux types de microsphères par des trous noirs. Ces images dans lesquelles sont effectuées les mesures du rapport S/B et du contraste sont obtenues par la séquence 3D Fiesta dont TE est « min » (1,67 ms) et l'angle α est 45° . Le rapport S/B des trous correspondant aux $MSMR-E$ détectées par l'antenne carotide est environ 66 (Figure 3-3, a). Il est égal à 47 pour les $MSMR-R$ détectées par la même antenne (Figure 3-3, b). Le contraste gélatine-trous pour les deux types de microsphères est égal à 0,10 et 0,32.

Cet ensemble de mesure n'a pas été effectué sur les images T_2/T_1 obtenues avec l'antenne cardiaque à cause des artefacts qui apparaissent clairement sur l'image correspondant aux $MSMR-E$ (Figure 3-3, c).

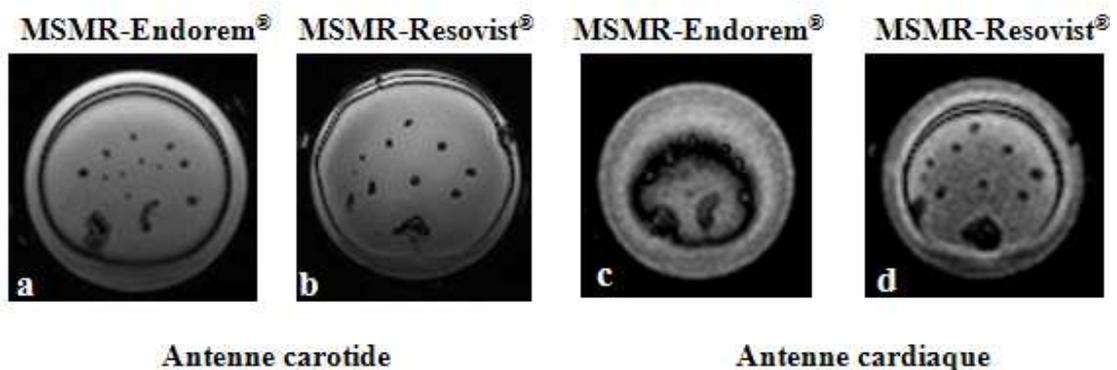


Figure 3-3 : Images T_2/T_1 des boîtes de Pétri obtenues par la séquence 3D Fiesta de TE 1.67 ms « min » et d'un angle α 45° .

Les mesures du rapport S/B et du contraste gélatine-trous accomplies sur les images obtenues avec l'antenne carotide et la séquence 3D *Fiesta* (Figure 3-4) de TE minfull (2,8 ms) et d'angle α° 45°, montrent aussi une différence entre les valeurs mesurées des deux types de microsphères. Pour les *MSMR-E*, le rapport S/B et le contraste obtenus ont les valeurs de 59 et 0,17 (Figure 3-4, a). En revanche, ils ont les valeurs d'environ 47 et 0,57 pour les *MSMR-R* (Figure 3-4, b). Ces mesures ne sont pas effectuées dans les images obtenues avec l'antenne cardiaque à cause des artéfacts (Figure 3-4, c).

Le Tableau 3-4 récapitule les résultats du rapport S/B et du contraste gélatine-trous obtenus sur les images *IRM* des boîtes de Pétri. Elles correspondent aux *MSMR-E* et aux *MSMR-R* détectées par des séquences et antennes multiples.

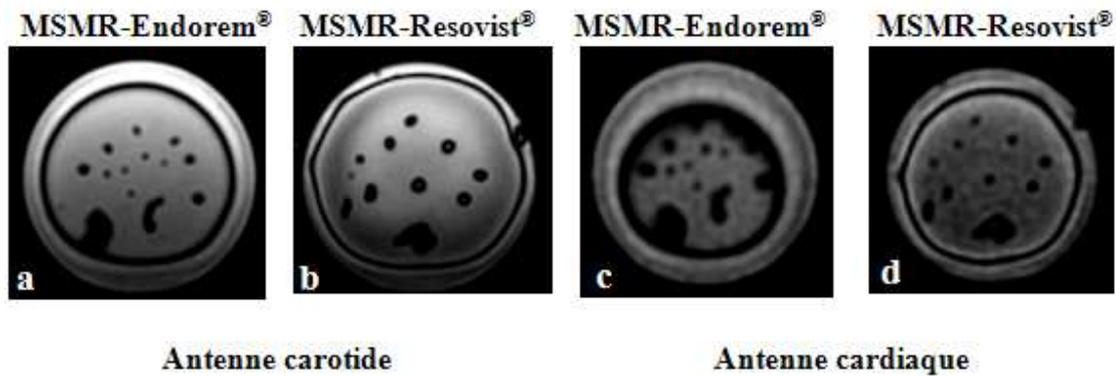


Figure 3-4 : Images T_2/T_1 des boîtes de Pétri obtenues par le 3D *Fiesta* de TE 2,8 ms "minfull" et d'un angle α 45°.

Condition d'acquisition	Séquence	S/B		Contraste gélatine-trous	
		MSMR-E	MSMR-R	MSMR-E	MSMR-R
In vitro	3D SPGR	10	9	0,48	0,54
	3D <i>Fiesta</i> TE : min, α : 45°	66	47	0,1	0,32
	3D <i>Fiesta</i> TE : minfull, α : 45°	59	47	0,17	0,57
Approche in vivo	3D SPGR	6	5	0,42	0,47

Tableau 3-4 : Valeurs du rapport S/B et du contraste gélatine-trous correspondant aux *MSMR-E* et aux *MSMR-R*. Ces microsphères sont détectées par deux séquences, 3D SPGR et 3D *Fiesta* dans deux conditions d'acquisition différentes, in vitro et in vivo.

c) Discussion

Les techniques d'*IRM* améliorées par *SPIO*, y compris les séquences *FSE* et *FGRE*, sont largement utilisées dans la détection non invasive des tumeurs hépatiques

[Kim2002 ; Fretz1990]. Par contre, ces techniques sont encore peu utilisées pour détecter des agents *SPIO* de types différents emprisonnés dans des microréservoirs d'hydrogel, comme le Tris-acryl.

Le contraste entre la gélatine et les microsphères marquées est un moyen efficace pour déterminer la performance de la séquence par rapport au type du *SPIO* utilisé. La valeur de contraste peut être corrélée à la limite de déteçtabilité des microsphères. Lorsque le contraste est important, il peut être exploité pour diminuer le seuil des microsphères déteçtées selon la taille.

Quelque soit la séquence *IRM* utilisée *3D SPGR* ou *3D Fiesta* ou les conditions d'acquisition *in vivo* ou *in vitro*, le *S/B* des *MSMR-E* est toujours supérieur à celui des *MSMR-R*. Le contraste $C = \frac{\mu_{\text{gélatine}} - \mu_{\text{trou}}}{\mu_{\text{gélatine}} + \mu_{\text{trou}}}$ gélatine-trous est donc, au contraire, plus important pour les *MSMR-Resovist*[®], ce qui est vérifié Tableau 3-4. Avec la séquence *Fiesta* de *TE* "min", on remarque que la valeur du contraste gélatine/*MSMR-R* est de 68% supérieure à celle de l'autre type de microsphère, et soit 70% avec la séquence *3D Fiesta* de *TE* "minfull", mais cet écart est moins significatif avec la séquence *SPGR*, soit 11%.

Les meilleures valeurs du contraste gélatine-trous obtenues pour les *MSMR-R* par rapport à celles pour les *MSMR-E* indiquent que les particules de *Resovist*[®] sont plus efficaces que celles de l'*Endorem*[®] en rehaussement du contraste. Ainsi, les particules de *Resovist*[®] seraient plus exploitables que celles de l'*Endorem*[®] pour qu'elles soient incorporées dans les microsphères de Tris-acryl.

D'après le Tableau 3-4, on observe que les valeurs du contraste gélatine-trous pour les deux types de microsphères marquées changent en fonction de la séquence utilisée.

La valeur du contraste gélatine/*MSMR-E* avec la séquence *3D Fiesta* de *TE* "minfull" est inférieure à celle avec la séquence *3D SPGR*, elle est de 64%. Elle est de 80% entre les deux séquences *Fiesta* de *TE* "min" et *SPGR*.

Cet écart entre les valeurs du contraste est moins significatif pour les gélatine/*MSMR-R* que pour les gélatine/*MSMR-E*. La valeur du contraste gélatine/*MSMR-R* avec la séquence *3D Fiesta* de *TE* "min" est inférieure à celle avec la séquence *3D SPGR*, soit

41%. En revanche, cette valeur avec la séquence *3D Fiesta de TE* "minfull" est supérieure à celle avec la séquence *3D SPGR*, soit 5%.

On déduit que la séquence *3D SPGR* utilisée dans la déteçtabilité de microsphères marquées avec des *SPIO* est plus performante que celle *3D Fiesta*.

D'après les images des boîtes de Pétri, on remarque que leur qualité change d'une séquence à une autre. Avec la séquence *3D SPGR*, les images T_1 sont de bonne qualité (Figure 3-2). Il est possible de déterminer facilement sur ces images la dimension des trous quelque soit le type de microsphères et l'antenne exploitée pendant l'acquisition. En revanche, avec la séquence *3D Fiesta*, la qualité des images est détériorée par des artéfacts. Ceux-ci sont considérables sur les images de *MSMR-E* obtenues avec l'antenne cardiaque. Les trous sur ces images ne sont pas assez visibles, une petite amélioration de la qualité des images est atteinte en changeant *TE*, du "min" (1,67 ms) au "minfull" (2,8 ms).

3.2.2.3 Troisième facteur : optimisation des acquisitions

Les images pondérées en T_1 ont démontré un bon contraste entre les *MSMR*, la gélatine et le parenchyme rénal sans avoir des artéfacts (sections 3.2.1 et 3.2.2.2). Elles sont obtenues en un temps d'acquisition un peu long, avec la séquence *3D SPGR-T₁*. Une acquisition rapide avec une séquence pondérée en T_1 est alors un enjeu pour les perspectives de la déteçtabilité de microsphères en amont clinique.

L'optimisation des acquisitions dans cette section se fait en deux étapes : la première étape consiste à raccourcir le temps d'acquisition de la séquence *SPGR* jusqu'à 2'44'' (Tableau 3-5) sans détériorer la qualité de l'image. La deuxième étape consiste à utiliser d'autres séquences *IRM* de pondération équivalente à celles *3D SPGR*, mais avec des paramètres différents. A cet égard, nous avons choisi une séquence par famille de spin écho et d'écho de gradient. La séquences principale *3D SPGR* avec leurs équivalentes en pondération sont appliquées sur des reins de porc, les images obtenues sont mises en comparaison entre elles afin d'évaluer leur qualité. Les séquences équivalentes en pondération T_1 à la séquence *SPGR* sont, *2D FSE* et *2D IR Prep FGRE* (inversion recovery preparation fast gradient echo). La détermination de paramètres optimaux de ces séquences sera détaillée dans matériels et méthodes.

La séquence "2D IR Prep FGRE" est utilisée avec un temps d'inversion (TI) pour éliminer la magnétisation longitudinale de l'un des deux tissus et pour obtenir un

contraste fiable en T_1 . Elle n'utilise qu'une seule inversion pour l'ensemble de la séquence (TI n'est pas répété à chaque TR) et son temps, de l'ordre de 15 s, reste court [Abd-almajeed2005].

Le calibre des *MSMR* choisi dans cette étude est inférieur à celui utilisé pour l'embolisation vasculaire des fibromes utérins. Il permet alors aux microsphères d'atteindre en plus les petits vaisseaux en aval, ainsi il met l'imageur à 1,5T en défi avec la détectabilité de ce genre de microparticules.

a) Matériels et méthodes

- *Reins de porcs*

Deux reins de porc, droit et gauche, ont été embolisés à l'institut national de la Recherche Agronomique (INRIA) (Figure 3-5). Ensuite, l'animal a été sacrifié pour prélever ces deux reins qui ont ensuite subi une inclusion directe dans un pot en plastique (H : 9 × Φ : 11 cm) contenant de la gélatine porcine à 5% (N° 232-554-6 [900-70-80]-G-2500, Lot 56H0130) mélangé avec le formol à 10% (1 04003 5000 – Merck) pour conserver le contenu.

Un seul calibre de *MSMR* est utilisé dans la procédure d'embolisation, 100–300 μm pour deux quantités différentes : 0.1 ml de *MSMR* dilué dans 5 ml d'un produit opaque aux rayons X a été utilisé pour le rein gauche, en revanche 0,05 ml de *MSMR* dilué dans le même volume du produit de contraste a été utilisé pour le rein droit. Ce type de microsphère est marqué seulement par le Resovist®.



Figure 3-5 : Photographie des reins de porc contenant des *MSMR* de calibre 100–300 μm . Les reins gauche et droite ont été embolisés avec 0,1 ml et 0,05 ml de *MSMR*, respectivement. [CR2I-INRIA]

- *Séquences IRM*

Le Tableau 3-5 représente les trois séquences *IRM* utilisées dans cette étude d'optimisation des acquisitions sur un modèle *ex vivo*, comme les reins de porcs. Nous respectons les paramètres satisfaisant les conditions d'acquisition *in vivo*, comme un

FOV de dimension 12 ou 14 cm et une antenne cardiaque. Toutes les images correspondant à ces séquences sont obtenues dans le plan de coupe coronal.

Les démarches d'optimisation des acquisitions avec la séquence *2D IR Prep FGRE* consistent à diminuer le temps de répétition *TR* afin de raccourcir le temps d'acquisition sans trop détériorer le signal image. Ceci pourrait être compensé par un champ de vue et un volume dont les dimensions et l'épaisseur satisfont les paramètres d'acquisition dans des conditions *in vivo*, c'est-à-dire un *FOV* large et un volume d'épaisseur important.

Les démarches d'optimisation des acquisitions avec la séquence *2D IR Prep FGRE* consistent à modifier la bande passante, l'angle α et introduire le temps d'inversion *TI* qui sont les paramètres de contrôle du signal pour cette séquence. Nous déterminons les rapports signal sur bruit *S/B* dans les trous et dans le parenchyme rénal en fonction de chaque paramètre modifié. L'écart maximal entre les signaux mesurés pour le parenchyme rénal et les trous détermine les paramètres optimaux pour cette séquence.

Nous nous contentons par les tests de la séquence *2D FSE* sans modifier les paramètres d'acquisitions aboutissant à une pondération T_1 . En effet, cette séquence est plus rapide que celle *3D SPGR*.

La qualité des images pour deux pondérations équivalentes est évaluée selon la netteté de l'image sans avoir des artefacts, la détectabilité des microsphères de taille 100 μm dans la région corticale périphérique de reins où les vaisseaux sont fins et le contraste parenchyme rénal-trous.

Paramètres											
Séquences	TR/TE (ms)	TI (ms)	ETL	α°	BW (kHz)	FOV (cm)	Epaisseur de coupes (mm)	Nombre de coupes	Matrice	Nex	Temps
3D SPGR coronal	25/5 (minfull)			45°	15,63	14	1	36	160 ²	1	2'44''
	30/5 (minfull)			45°	15,63	12	1	36	160 ²	1	3'16''
2D FGRE-IR- Prep coronal	6/1,6 (min)	531, 631, 831, 931, 1031, 2031, 4031, 5031, 67031		10°, 20°, 30°, 40°	15,63	12	6	8	160 ²	1	8'' ...1'
	4,5/1,5 (min)	2398		20°	15,63	14	5	8	160 ²	1	37''
2D FSE coronal	44/10		12		31,25	14	5	8	192 ²	1	37''

Tableau 3-5 : Paramètres des séquences IRM utilisées dans les acquisitions ex vivo et satisfaisant les conditions d'acquisition in vivo.

b) Résultats et discussion

Le Tableau 3-6 permet de comparer les images $RM T_1$ des reins de porc acquises avant et après optimisation des paramètres de la séquence $3D SPGR$. L'optimisation des paramètres d'acquisition concerne : la diminution du temps de répétition TR de 30 ms jusqu'à 25 ms, l'augmentation de la taille du champ de vue du 12 cm jusqu'à 14 cm pour une matrice de 160×160 pixels et un volume exploré d'une épaisseur 36 mm, et l'acquisition avec une antenne cardiaque. Avec cette modification des paramètres qui nous a permis de raccourcir le temps d'acquisition de 3min16s jusqu'à 2min44sec, nous arrivons quand même à distinguer quasiment les mêmes trous dans les mêmes images des reins avant que les paramètres de la séquence soient optimisés.

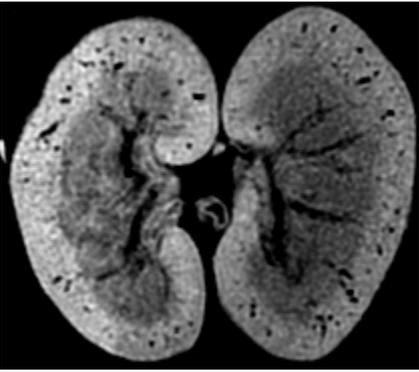
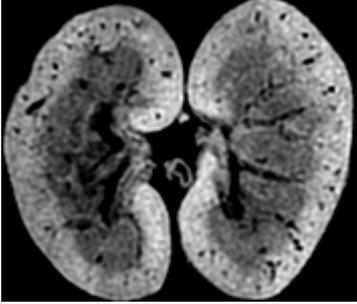
Séquence 3D SPGR T_1	
Avant optimisation FOV : 12 cm, temps : 3min16s	Après optimisation FOV : 14 cm, temps 2min44s
	

Tableau 3-6 : Images $RM T_1$ des reins de porc obtenues avec la séquence $3D SPGR$ avant (à gauche) et après (à droite) optimisation des paramètres d'acquisition : à gauche, le temps d'acquisition est 3min16s. A droite, il est 2min44s.

La Figure 3-6 illustre la variation du rapport S/B déterminé en fonction du temps d'inversion TI et de l'angle de bascule α dans les images RM du parenchyme rénal acquises avec la séquence $2D IR\text{-}prep FGRE T_1$. Ce rapport n'a pas été déterminé pour les trous qui sont un peu visible dans les images RM (Tableau 3-7). Nous remarquons que le rapport S/B est maximal pour un angle α de 40° et un temps TI de 931, 1031 et 5031 ms.

En utilisant la séquence $2D FSE XL T_1$, les trous et l'anatomie rénale sont complètement invisibles (Tableau 3-7).

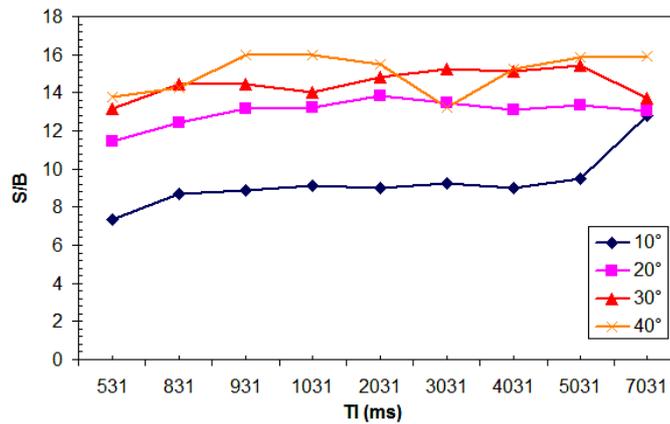


Figure 3-6 : Représentation du S/B du parenchyme rénal en fonction de l'angle de bascule et le temps d'inversion TI d'une séquence IR-prep FGRE.

Séquences IRM		
3D SPGR	2D FSE	2D IR-prep FGRE
160 ² , α : 45°, BW : 15,63 kHz, temps d'acquisition : 2min44s	192 ² , temps d'acquisition : 37s	160 ² , TI : 1031 ms, α : 40°, BW : 15,63 kHz; temps d'acquisition : 12s

Tableau 3-7 : Images des reins de porc pondérées en T_1 et obtenues avec 3 séquences 3D SPGR, 2D FSE et 2D IR-prep FGRE. Les trous correspondant aux MSMR apparaissent clairement sur les images acquises avec la séquence 3D SPGR et faiblement sur celles obtenues avec le 2D IR-prep FGRE.

Le fait que les modes d'acquisitions ne sont pas les mêmes entre le FSE, IR-prep FGE T_1 d'un côté (2D) et le SPGR d'autre côté (3D), il est alors difficile de comparer les images acquises. Le signal dépend du volume en mode 3D et de l'épaisseur de la coupe en mode 2D. En 3D, on n'utilise plus le gradient de sélection de coupe comme en 2D, par conséquent, tout le volume est excité par la radiofréquence, et le signal reçu sera plus important qu'en 2D. Pour l'instant, la séquence 3D SPGR T_1 a démontré une bonne performance pour les acquisitions *ex vivo* avec un contraste acceptable entre le parenchyme rénal et les MSMR et elle conduit à des images de bonne qualité. Il reste encore le problème du temps d'acquisition pour cette séquence. Cependant, nous avons pu atteindre un temps de 2min44sec avec un imageur opérant à 1,5T en conservant

toujours un bon rapport S/B . Il est possible de réduire ce temps d'acquisition sans perdre du signal en passant à une machine à 3T.

3.2.2.4 Quatrième facteur : Effet de l'intensité du champ B_0 sur le SPIO

L'intensité B_0 de l'imageur a aussi un effet sur l'amélioration du contraste entre le milieu et les trous correspondant aux *MSMR*. Si on augmente la valeur du champ magnétique, on améliore le rapport signal sur bruit de façon pratiquement proportionnelle, et les temps de relaxation T_1 augmentent.

A cet égard, pour des acquisitions des *MSMR* dans des boîtes de Pétri avec un imageur à 3T, nous étudions le contraste gélatine-trous pour deux groupes de microsphères en Tris-acryl contenant respectivement deux produits de contraste (3.2.2.2), comme les *MSMR-E* et les *MSMR-R*. Ainsi, des acquisitions par le même imageur sont réalisées ensuite sur les reins de porc pour évaluer le nouveau contraste parenchyme rénal-trous.

L'effet de la valeur du champ B_0 sur l'augmentation du rapport signal sur bruit est alors déterminé par comparaison des mesures sur des images obtenues sur une *IRM* à 3T avec celles sur une *IRM* à 1,5T, pour les mêmes séquences d'acquisitions.

Cette étude concerne des acquisitions *in vitro*, ce qui demande l'utilisation de l'antenne surfacique carotide.

a) Matériels et Méthodes

- *Boîtes de Pétri*

Les boîtes de Pétri mentionnées dans la section (3.2.2.2) sont de nouveau utilisées dans cette étude. Il s'agit des microsphères de type 1 «*MSMR-Endorem*[®]» et type 2 «*MSMR-Resovist*[®]» de calibre 500–700 μm .

- *Reins de porc*

Les reins de porc évoqués dans la section (3.2.2.3) sont de nouveau utilisés dans cette section. Il s'agit des *MSMR* de taille 100–300 μm .

- *Séquence IRM*

L'*IRM* à 3T utilisée dans cette étude est de type «*GE Signa HDx 3.0T*». L'antenne carotide compatible avec cet imageur est de 8 canaux en réseau phasé.

Acquisition sur des boîtes de Pétri :

Nous appliquons la séquence 3D SPGR dont les paramètres sont représentés par le Tableau 3-8.

3D SPGR T ₁ – oblique/axial							Antenne : carotide			
TR (ms)	TE (ms)	α°	FOV (cm)	Matrice	Epaisseur de coupes (mm)	Nombre coupes	BW (kHz)	phaseFOV ⁹	Nex	
30	5	45°	10	160 ²	1	40	15,63	1	1	
Temps d'acquisition : 3min35s										

Tableau 3-8 : Paramètres de la séquence 3D SPGR utilisées avec des imageurs à 1,5 et 3T sur des boîtes de Pétri pour la détectabilité des MSMR in vitro.

Acquisition sur des reins de porc

La séquence 3D SPGR est utilisée sur les imageurs à 1,5 et 3T pour l'imagerie des reins de porc. Les paramètres de cette séquence sont représentés par le Tableau 3-9. La définition numérique a été augmentée afin de mieux détecter les MSMR, ce qui a imposé un temps d'acquisition un peu long.

Séquence	Paramètre									
	TR/TE (ms)	α°	BW (kHz)	FOV (cm)	Ep. de coupes (mm)	N° de coupes	Matrice	Nex	phaseFOV	Temps
3D SPGR	30/5	45°	15,63	14	0,7	46	256 ²	1	0,75	4'52''
	30/12	45°	15,6	14	0,7	46	512 ²	1	0,75	10'18''

Tableau 3-9 : Paramètres de la séquence 3D SPGR utilisés avec des imageurs à 1,5 et 3 T sur des reins de porcs pour la détectabilité des MSMR.

3.2.2.5 Résultats

a) Acquisition sur des boîtes de Pétri

Le Tableau 3-10 illustrent les images pondérées en T₁ de deux types de MSMR acquises sur deux imageurs à 1,5T et 3T.

Nous représentons par le Tableau 3-11 les mesures du rapport S/B et du contraste

$$C = \frac{\mu_{g\acute{e}latine} - \mu_{trou}}{\mu_{g\acute{e}latine} + \mu_{trou}}$$

gélatine-trous correspondant aux MSMR-E et aux MSMR-R.

⁹ phaseFOV : Réduction de la dimension du champ de vue d'un pourcentage qu'on peut choisir suivant la direction de codage en phase

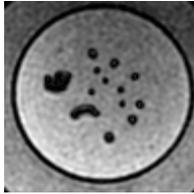
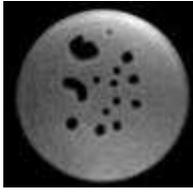
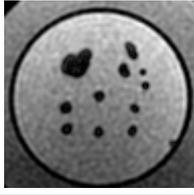
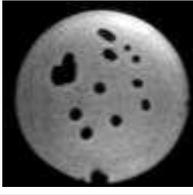
Condition Acquisition	Type de microsphère	B_0	
		1,5T	3T
<i>In vitro</i>	MSMR-Endorem		
	MSMR-Resovist		

Tableau 3-10 : Images T_1 des microsphères de types : (a) MSMR-Endorem[®] et (b) MSMR-Resovist[®]. Elles sont obtenues avec la séquence 3D SPGR sur deux imageurs à 1,5 et 3T dans des conditions *in vitro* (antenne carotide).

Condition d'acquisition	B_0	Signal sur bruit des trous et Contraste gélatine-trous			
		S/B MSMR-E	C gel/MSMR-E	S/B MSMR-R	C MSMR-R/gel
<i>In vitro</i> (antenne carotide)	1,5T	9	0,54	8	0,58
	3T	17	0,48	15	0,63

Tableau 3-11 : Valeurs de S/B des trous et de contraste gélatine-trous pour des microsphères marquées avec l'Endorem[®] (MSMR-E) et des microsphères marquées avec le Resovist[®] (MSMR-R). Ces valeurs correspondent aux images acquises avec le 3D SPGR, sur deux imageurs à 1,5T et 3T, *in vitro* avec l'antenne carotide.

b) Acquisitions sur des reins de porc

Le Tableau 3-12 représente les images pondérées en T_1 des reins de porcs qui sont respectivement acquises sur deux imageurs à 1,5T et 3T, avec la séquence 3D SPGR pour deux définitions numériques différentes, 256² et 512².

Etant donné que le nombre des microsphères dans l'arborescence vasculaire rénale est important, nous ne faisons pas des mesures de S/B ni de contraste parenchyme rénal-trous. Des mesures proches sont démontrées dans la publication ci-dessus sur des reins de brebis, uniquement sur un imageur à 1,5T. En revanche, nous nous contentons par la représentation qualitative des images des reins obtenues avec la séquence 3D SPGR de pondération T_1 et sur des imageurs cliniques opérant à 1,5 et 3 teslas.

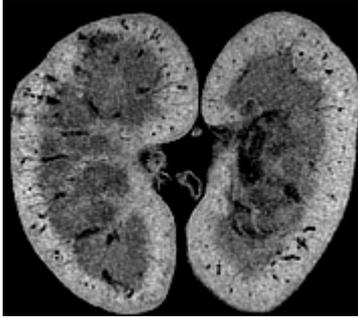
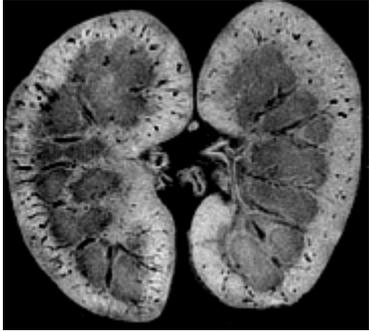
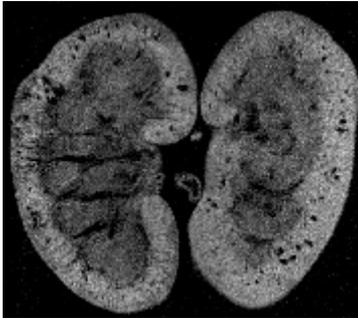
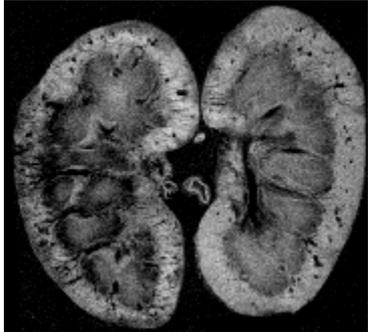
Séquence et paramètre	B_0	
	1,5T	3T
<p>3D SPGR Matrice: 256×256, épaisseur de coupes : 1 mm, FOV: 10 cm</p>		
<p>3D SPGR Matrice: 512×512, épaisseur de coupes : 0,7 mm, FOV: 14 cm</p>		

Tableau 3-12 : Images des reins de porc *ex vivo* acquises par la séquence 3D SPGR T_1 sur deux imageurs à 1,5T (à gauche) et 3T (à droite). A 1,5T : épaisseur de coupes 1 mm et FOV : 10 cm. A 3T : épaisseur de coupes 0,7 mm et FOV : 14 cm.

3.2.2.6 Discussion

D'après le Tableau 3-11, on remarque que le passage d'un imageur de 1,5T à un autre plus intense de 3T a légèrement diminué le contraste gélatine-trous, sauf pour l'acquisition des microsphères marquées par le Resovist[®]. Cependant, le rapport S/B est nettement rehaussé et la résolution spatiale doit s'en trouver améliorée.

Au contraire des résultats *in vitro*, l'influence de l'augmentation de B_0 sur les reins de porc préserve, voire accentue un bon contraste parenchyme rénal-trous. Nous observons davantage de trous visibles dans la zone corticale des reins (périphérie), où le diamètre des vaisseaux est faible, par rapport à la région médullaire (centrale), où ils sont larges. L'augmentation de la résolution spatiale n'a pas trop affecté le contraste parenchyme rénal-trous avec des acquisitions réalisées sur un imageur à 3T. Avec le haut champ B_0 , le parenchyme rénal et l'arborescence vasculaire sont plus visibles que dans un champ de 1,5T. En plus, les microsphères sont plus détectables.

3.3 Détectabilité des HépasphèresTM

Les HépasphèresTM ou SAP-MS « Superabsorbant Polymer Microspheres » sont des agents d'occlusion vasculaire permanents, de forme sphérique [Hori1996], développées par Dr. Shinichi Hori en 1996 et fabriquées par Biosphère MedicalTM. Ces particules non biodégradables et non toxiques sont constituées d'acrylate de sodium et d'un copolymère¹⁰ d'alcool vinylique. Les HépasphèresTM existent, à l'origine « état sec », sous forme de grain de poudre de calibre bien défini [Osuga2002]. Elles gonflent en quelques minutes par absorption du liquide dans lequel elles baignent [Osuga2002]. Ceci peut être un agent de contraste ionique, ioxaglate de melgumine et de sodium, et un sérum humain aboutissant à des HépasphèresTM de diamètre deux à quatre fois leur taille originale à l'état sec de 50 jusqu'à 200 µm, respectivement [Khankan2004]. La propriété d'expansion permet aussi à ces particules de transporter des substances actives destinées à la chimio-embolisation. Il est rapporté que les HépasphèresTM gonflées sont souples, déformables, et larguées facilement par la majorité des cathéters actuellement disponibles. Les HépasphèresTM sont destinées à emboliser les carcinomes hépatocellulaires et les malformations artérioveineuses sans aucun signe d'ischémie sur les cellules normales [De Luis2008].

L'objectif de cette section est de rendre les HépasphèresTM visibles sous *IRM* en les chargeant par l'Endorem[®]. Cela nécessite de déterminer la dose d'Endorem[®] qu'il faut mélanger à la poudre pour obtenir un résultat comparable à celui obtenu pour la détection des microsphères en Tris-acryl marquées (section 3.2). D'après la courbe étalon de l'Endorem[®] dans le chapitre.2 (2.1.3.3), il est évident que ce marqueur a tendance à produire un hyposignal ou un hypersignal selon la dose choisie. Par ailleurs, il faut trouver la bonne façon de marquer les microparticules d'HépasphèreTM. De plus, les HépasphèresTM détiennent le marquage *CE* et l'Endorem[®] l'autorisation de Mise sur le Marché (AMM) toutefois un vide juridique empêche, aujourd'hui, leur utilisation conjointe. Le fait de prouver la détectabilité des HépasphèresTM par *IRM* ainsi que pour d'autres raisons détaillées ultérieurement, permettra donc de donner des arguments en faveur de leur future utilisation clinique.

¹⁰ Copolymère : Groupement de deux types de monomère (petite molécule d'un seul type) dans la même macromolécule.

3.3.1 Matériels et méthodes

Il existe trois calibres d'HépasphèresTM disponibles sur le marché à l'état sec, 50–100, 100–150 et 150–200 μm . Ils correspondent respectivement à 200–400, 400–600 et 600–800 μm à l'état gonflé dans du sérum physiologique à 0,9%. Deux calibres sont uniquement marqués parmi cette gamme de taille, 200–400 et 600–800 μm , en raison de rupture de stock du deuxième calibre chez le fournisseur « Biosphère MedicalTM ». Le marquage des HépasphèresTM par un agent de contraste visible à l'IRM peut être réalisé selon quatre préparations différentes, (1) expansion initiale des HépasphèresTM dans du sérum physiologique à 0,9% sera suivie de l'addition d'un agent de contraste, (2) expansion directe des HépasphèresTM dans du sérum physiologique mélangé avec de l'agent de contraste à des doses différentes. Etant limité en quantité d'HépasphèresTM, nous voulons réaliser, par les deux nouvelles préparations de marquage des HépasphèresTM avec l'Endorem[®] (3) et (4), deux gammes de dose croissante et décroissante en utilisant uniquement 2 flacons d'HépasphèresTM. Pour ce faire, nous allons préparer au début des microparticules avec de l'Endorem[®] concentré ou dilué dans du sérum physiologique. 2h après, les microparticules seront réparties au fur et à mesure dans des flacons contenant une solution d'Endorem[®] concentrée ou diluée (croissante et décroissante).

Les préparations (3) et (4) permettront d'étudier à la fois le comportement des microparticules plongées dans de l'agent de contraste et, si la réalisation de la gamme est un succès, de déterminer le dosage optimal afin de mieux charger les HépasphèresTM.

Les microparticules ne se préparent pas exactement comme il est prévu par Biosphère MedicalTM, en effet, l'Endorem[®] étant non ionique, les microparticules ont la tendance à dépasser plus que quatre fois la taille initiale avec du sérum physiologique. Par contre, le sérum physiologique utilisé dans la dilution de l'Endorem[®] impose aux HépasphèresTM de gonfler jusqu'à quatre fois leur taille. Donc, la taille des HépasphèresTM marquées avec l'Endorem[®] est pratiquement celle des HépasphèresTM chargées avec du sérum physiologique. Les HépasphèresTM ont la couleur rouille de l'Endorem[®].

3.3.1.1 Préparation-1 : expansion initiale des Hépasphères™ dans du sérum physiologique puis addition d'un agent de contraste

Elle consiste à injecter 10 ml de sérum physiologique (0,9%), à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille, au sein d'un flacon neuf sous vide contenant de la poudre d'Hépasphère™ de taille 50–100 (réf: V305HS) et 150–200 µm (réf: V705HS), respectivement. Les Hépasphères™ vont gonfler pour atteindre une taille quatre fois supérieur à leur taille initiale, 200–400 µm et 600–800 µm, et un volume mesuré dans un flacon gradué d'environ 3 à 4 ml.

200 µl d'Endorem® (97ETI053, Guerbet) sera versé dans le flacon contenant les microparticules gonflées. Une petite agitation du flacon puis une attente de 2h est imposée afin de laisser le temps aux microparticules d'absorber le maximum d'agent de contraste.

3.3.1.2 Préparation-2 : expansion des Hépasphères™ dans une solution de sérum physiologique contenant préalablement un agent de contraste

Elle consiste à diluer 50, 100 et 350 µl d'Endorem® dans 2,5 ml du sérum physiologique, soit 1,96, 3,84 et 12,28%, respectivement. 500 µl d'Endorem® de dosage 25% est dilué en plus avec 1,5 ml du sérum physiologique, soit 75%. Quatre volumes différents correspondant à 4 charges en sérum physiologique sont obtenus 2, 2,55, 2,6 et 2,85 ml. Les charges sont injectées, par la même façon que précédemment, au sein de 4 flacons contenant de la poudre d'Hépasphères™ de taille 50–100 µm (Figure 3-7), respectivement. Une petite agitation des quatre flacons puis une attente de 2h est accomplie afin de laisser le temps aux microparticules d'absorber le maximum d'agent de contraste.

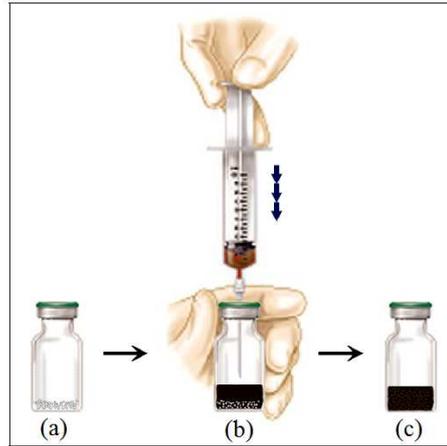


Figure 3-7 : Marquage des Hépasphères™ avec l'Endorem®. (a) flacon sous vide de la poudre d'Hépasphère™, (b) injection de la charge correspondant au sérum physiologique et l'Endorem® au sein du flacon, (c) Hépasphère™ marquées avec l'Endorem®.

3.3.1.3 Préparation-3 : préparation-2 avec pré-marquage léger des Hépasphères®

Cette préparation consiste à marquer, au début, les Hépasphères™ de calibre 600–800 µm avec une faible dose d'agent de contraste. Ces microparticules seront marquées de nouveau avec une gamme de dose croissante d'agent de contraste afin de déterminer la possibilité pour que les microparticules soient chargées, en plus, d'Endorem®. A cet égard, on utilise en tout neuf flacons pour réaliser cette étude. Le premier (flacon 1) est celui contenant les Hépasphères™ sous forme de poudre. Les microparticules sont chargées avec 0,02 ml d'Endorem® + 1,98 ml de sérum physiologique. Après 2h d'attente, on ajoute 7 ml de sérum physiologique pour obtenir un volume total de 9 ml correspondant aux microparticules marquées pour être ensuite partagées entre 9 flacons contenant les doses du Tableau 3-13. Les 9 flacons contiennent alors 3 ml : 1ml du flacon 1 + la solution d'Endorem® dilué correspondant au Tableau 3-13.

Numéro flacon	Sφ (ml)	Endorem® (ml)	% Endorem®
1	1,98	0,02	1%
2	1,96	0,04	2%
3	1,94	0,06	3%
4	1,92	0,08	4%
5	1,90	0,10	5%
6	1,80	0,20	10%
7	1,70	0,30	15%
8	1,60	0,40	20%
9	1,50	0,50	25%

Tableau 3-13 : Gamme d'Endorem® de dose croissante pour le marquage des Hépasphères™.

3.3.1.4 Préparation-4 : préparation-2 avec pré-marquage fort des Hépasphères®

Cette préparation consiste à marquer, dans un premier temps, les Hépasphères™ de calibre 600–800 µm avec une forte dose d'agent de contraste. Ces microparticules seront réparties en 9 doses décroissantes d'agent de contraste afin d'étudier la diffusion de l'Endorem®. A cet égard, on utilise en tout 9 flacons pour réaliser cette étude. Le premier flacon (flacon 9) est celui contenant les Hépasphères™ en poudre. Les microparticules sont chargées avec 0,5 ml d'Endorem® + 1,5 ml de sérum physiologique. Après une attente de 2h, on obtient 3,2 ml de microparticules marquées auxquelles on n'ajoute pas de sérum physiologique pour être sûr de garder la dose maximale en Endorem® dans les Hépasphères™. On répartit ensuite le 3,2 ml des microparticules marquées entre huit flacons, soit 0,4 ml de microparticules par flacon, et on ajoute une quantité de sérum physiologique pure de plus en plus importante dans chaque flacon (Tableau 3-14), afin de faire diminuer la dose totale d'agent de contraste. Ainsi les 9 flacons ne contiennent pas la même quantité de liquide au final, mais la dose d'Endorem® (par rapport aux 0,4 ml d'origine + la dose de sérum physiologique) est bien décroissante.

Numéro flacon	Sφ (ml)	% Endorem®
9	(n/a)	100%
8	0,10	80%
7	0,26	60%
6	0,6	40%
5	1,6	20%
4	2,1	16%
3	2,93	12%
2	4,6	8%
1	9,6	4%

Tableau 3-14 : Gamme d'Hépaqphères™ avec Endorem® à dose décroissante.

3.3.1.5 Rinçage

Suite au marquage des microparticules, chaque préparation est ensuite placée dans une colonne en verre avec du verre fritté [(porosité : 20 µm)-Flex 1.0 × 30 cm- Réf : 420401-1030] (Figure 3-8). Les microparticules sont rincées par gravité dans cette colonne : on ajoute 10 ml du sérum physiologique aux microparticules, on agite quelques secondes et l'on attend 15 minutes le temps que le sérum physiologique ait quitté entièrement la colonne. On répète cette opération en tout quatre fois.

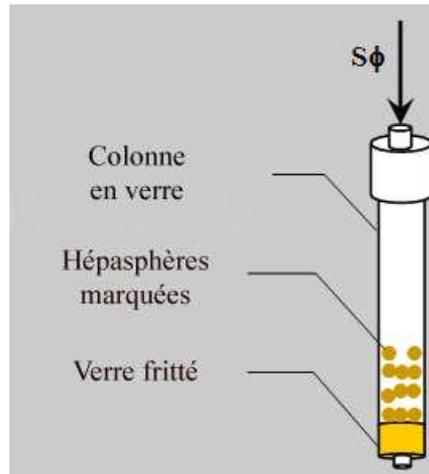


Figure 3-8 : Représentation schématique du modèle de rinçage des Hépasphères™ marquées avec l'Endorem® en utilisant le sérum physiologique et la colonne en verre avec du verre fritté.

3.3.1.6 Préparation des boîtes de Pétri

Afin de pouvoir passer les Hépasphères™ dans l'IRM et de mesurer ensuite leur signal, celles-ci sont gélifiées dans des boîtes de Pétri. Pour ce faire, la gélatine en Agar Agar 2% [Bactero Agar – ref : 214010] est liquéfiée en la chauffant au bain marie à 100°C. On remplit alors la boîte de Pétri de 5 cm de diamètre jusqu'à mi-niveau. Une fois la gélatine refroidie et durcie, les microparticules sont ensuite placées sur la surface en singlet, doublet, triplet et amas. Une nouvelle couche de gélatine est versée en même temps avec 1 ml de formol (pour prévenir le développement des bactéries) à 4% sur l'ensemble, microparticules et première couche, pour remplir complètement la boîte d'épaisseur 1,5 cm. Une fois la gélatine dure, la boîte est prête pour être mise dans l'IRM.

Pour les préparations (3) et (4), les microparticules sont réparties sur deux boîtes de Pétri étant donné le nombre important de la gamme des doses d'Endorem® utilisée pour marquer les Hépasphères™. A cet égard, le cadran de chaque boîte est divisé en autant de parts qu'il existe de doses d'Endorem®, en gamme croissante ou décroissante (neuf valeurs). Dix microparticules sont ensuite placées dans la partie qui leur est propre, en les séparant de quelques millimètres (Figure 3-9).

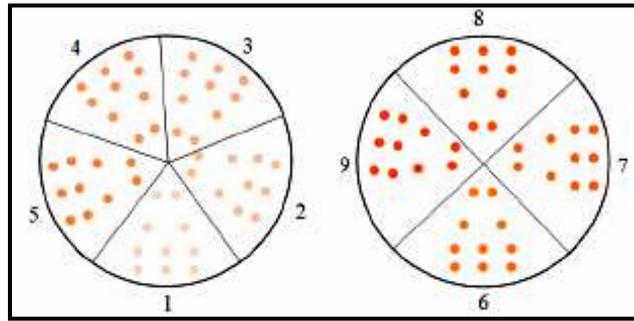


Figure 3-9 : Répartition des microparticules de la gamme à dose d'Endorem® croissante (image de gauche à droite) ou décroissante (image de droite à gauche). Les taches oranges autant marquées (droite) correspondent aux microparticules de la gamme à dose importante d'Endorem®, et celles moins marquées (gauche) correspondent aux microparticules de la gamme à dose faible. Les numéros de 1 à 9 sont des indices de référence pour chaque pourcentage du marqueur dans les flacons.

3.3.1.7 Séquences IRM

La séquence utilisée dans la détection des microparticules est une séquence 3D SPGR pondérée en T_1 . Elle a comme paramètres : TR/TE : 30/5 ou 35/5 ms, angle : 45°, BW : 15,63 kHz, FOV : 14 cm, épaisseur : 0,7 ou 1 mm, matrice : 128² ou 160², nombre de coupes : 28, Nex : 4, phaseFOV : 0,75 ou 1. Le temps d'acquisition varie à chaque fois avec le temps TR et la taille de la matrice choisie. L'antenne cardiaque est uniquement utilisée dans cette étude, les coupes sont obtenues dans un plan coronal.

3.3.2 Résultats et discussions

3.3.2.1 Préparation-1 : expansion initiale des Héphasphères™ dans du sérum physiologique puis addition d'un agent de contraste

Le gonflement des Héphasphères™ avec du sérum physiologique puis le marquage avec l'Endorem®, crée des agrégations des microparticules entre elles (Figure 3-10). Dans cette préparation-1, ceci limite les perspectives d'exploitation des Héphasphères™ en clinique, en raison d'occlusion en bout de cathéter. Nous passons en revue les résultats d'autres préparations.

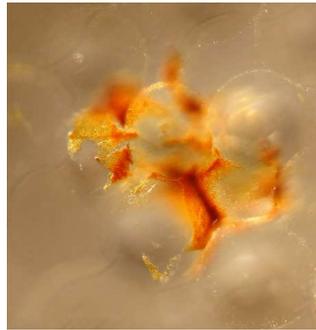
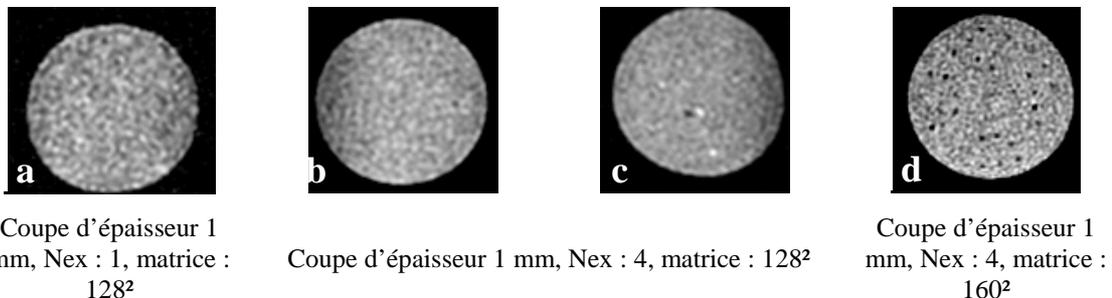


Figure 3-10 : Photo microscopique des microparticules Hépasphères™ (200–400 μm) marquées avec l'Endorem® (couleur rouille) et en agrégation.

3.3.2.2 Préparation-2 : expansion des Hépasphères™ dans une solution de sérum physiologique contenant préalablement un agent de contraste

La Figure 3-11 illustre les images pondérées en T_1 des boîtes de Pétri contenant des microparticules d'Hépasphères™ marquées par des doses multiples d'Endorem®. Les microparticules moins chargées en Endorem® (1,96% et 3,84%) sont invisibles sur les deux premières images a et b, elles apparaissent en quelques taches blanches sur la troisième image c dans lesquelles la dose a peu augmenté (12,28%) pour conduire à un hypersignal (chapitre.2 ; 2.1.3.3). En revanche, des trous noirs sont obtenus sur la dernière image d et qui correspondent aux microparticules plus chargées en Endorem®, soit 25%. Le pourcentage de l'Endorem® pour lequel nous avons obtenu des microparticules en hypersignal ne correspond pas exactement à celui obtenu sur la courbe étalon de ce marqueur (chapitre.2, 2.1.3.3). Nous considérons alors les deux pourcentages d'Endorem® dans les Hépasphères™ et sur la courbe étalon en équivalence pour obtenir un tel hypersignal. En revanche, nous trouvons une correspondance entre les deux pourcentages d'Endorem® en cas d'un hyposignal obtenu.



Coupe d'épaisseur 1 mm, Nex : 1, matrice : 128²

Coupe d'épaisseur 1 mm, Nex : 4, matrice : 128²

Coupe d'épaisseur 1 mm, Nex : 4, matrice : 160²

Figure 3-11 : Images IRM T_1 acquise avec le 3D SPGR de 4 boîtes de Pétri contenant des Hépasphères™ (200–400 μm) marquées à 4 doses différentes en Endorem®, soit (a) 1,96%, (b) 3,84%, (c) 12,28% et (d) 25%.

3.3.2.3 Préparation-3 : préparation-2 avec pré-marquage léger des Hépasphères[®]

Les trous noirs obtenus sur l'image a (à droite) de la Figure 3-12 ci-dessous correspondent aux Hépasphères[™] plongées dans une solution sérum physiologique-Endorem[®] à forte dose en marqueur. Ils sont représentés dans la Figure 3-12 b en inverse vidéo, où ils apparaissent donc sous forme des taches blanches. L'utilisation de l'inverse vidéo permet de mieux distinguer les microparticules moins chargées en Endorem[®] de la gélatine.

Pour une forte dose en marqueur, on arrive à voir quelques microparticules dans les quadrants 8 et 9 de la boîte de Pétri, qui correspondent aux pourcentages 80%-20% et 75%-25% en sérum physiologique-Endorem[®]. Par contre, les microparticules dans les quadrants 6 et 7, qui correspondent aux pourcentages 90%-10% et 85%-15% en sérum physiologique-Endorem[®] sont invisibles pour trois raisons possibles :

- Les microparticules ne sont pas marquées à l'Endorem[®] à cause de la pénétration insuffisante de marqueur.
- Avec ces deux gammes de dose en marqueur, il est possible que l'Endorem[®] ait pénétré en plus dans les microparticules et ait modifié leur signal de telle sorte qu'il soit devenu équivalent à celui de l'eau. Ce même cas a déjà été observé sur la courbe étalon dans le chapitre.2 (section 2.1.3.3) pour une certaine dose d'Endorem[®] qui peut être équivalente, dans ce cas, à celle existant au sein des microparticules.
- Les microparticules ne sont pas dans le même plan de coupe. Ce n'est pas le cas, car les microparticules n'apparaissent pas sur d'autres coupes.

Pour la gamme en pourcentage sérum physiologique-Endorem[®], de 99%-1% à 95%-5%, les microparticules apparaissent sur les images *IRM* en taches blanches. Au-delà de cette gamme, de 90%-10% à 75%-25%, les microparticules se présentent en trous noirs.

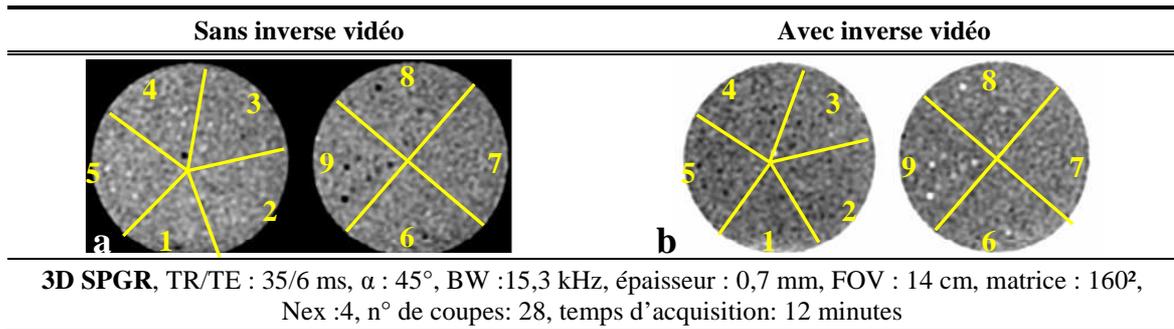


Figure 3-12 : Images IRM pondérées en T_1 des boîtes de Pétri contenant les Hépasphères™ (600–800 μm) marquées par la gamme à dose croissante en Endorem®. (a) Images T_1 sur lesquelles les microparticules apparaissent en taches blanches (moins chargées en Endorem®) ou en trous noirs (plus chargées en Endorem®), (b) Images T_1 avec inverse vidéo sur lesquelles la couleur des taches est inversée par rapport aux images dans (a). Les numéros de 1 à 9 sont des indices de référence pour chaque pourcentage d'Endorem® dans les flacons (Tableau 3-13).

Le graphe (à gauche) dans la Figure 3-13 représentant la variation du rapport signal sur bruit en fonction du pourcentage sérum physiologique-Endorem®, indique un hypersignal presque stable du dosage 99%-1% jusqu'au dosage 95%-5%. Par contre, il y a un hyposignal se manifeste au-delà de 95%-5%. Cette atténuation atteint un maximum lorsque le pourcentage en Endorem® est important, cas du dosage 75%-25%.

Le graphe (à droite) représente la variation du contraste gélatine-trous en fonction de la gamme de pourcentage sérum physiologique-Endorem® et indique un contraste assez faible pour le dosage 99%-1% jusqu'au dosage 95%-5%, puis les taches blanches apparaissent. Et au-delà du dosage 95%-5%, les microparticules apparaissent en trous noirs qui se traduisent par un contraste gélatine-trous assez important.

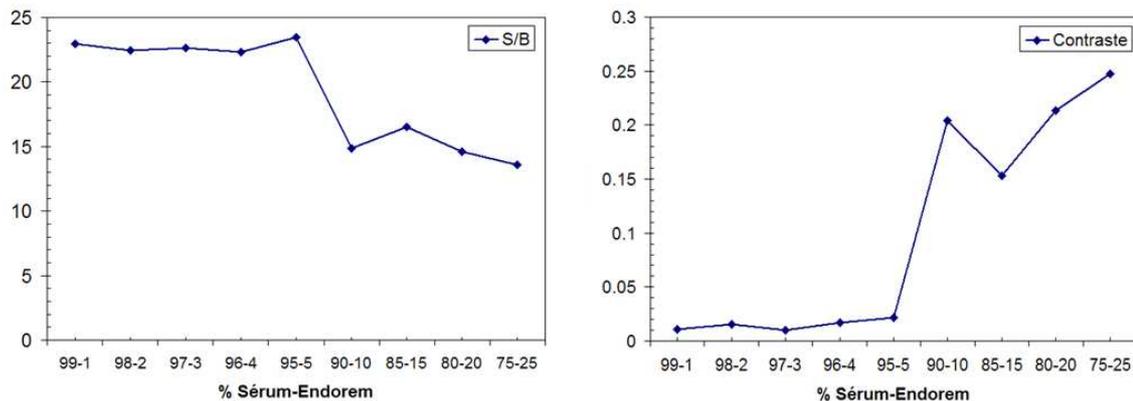


Figure 3-13 : Signal des trous et contraste gélatine-trous en fonction de pourcentage d'Endorem® croissant dans la solution sérum physiologique-Endorem® dans laquelle les Hépasphères™ ont été plongées.

Donc, lorsque les microparticules sont peu marquées en Endorem®, elles présentent en taches blanches sur les images IRM. Par contre, lorsque les microparticules sont les plus marquées, elles apparaissent en trous noirs (voir chapitre.2

Figure 2–8 et chapitre.4 section 4.1.3.3). Le pré-marquage faible des Hépasphères™ à l'Endorem® absorbent de plus de marqueur au fur et à mesure que sa proportion augmente.

Comme quelques microparticules sont visibles au pourcentage de 25% en Endorem® (Figure 3-12, secteur 9), nous leur avons donc dédié uniquement une boîte de Pétri dans laquelle les Hépasphères™ sont réparties sur les quatre quadrants, à raison de dix microparticules par quadrant. La Figure 3-14 montre un nombre important de trous observable dans chaque quadrant, ce qui confirme la pénétration progressive du marqueur dans les microparticules.

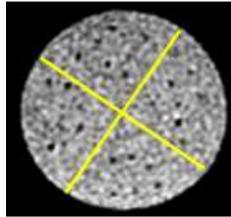


Figure 3-14 : Image IRM T_1 obtenue par le 3D SPGR d'une boîte de Pétri divisée en 4 quadrant dans lesquels sont réparties les Hépasphères™, soit 10 microparticules par quadrant. Elles correspondent à la gamme de pourcentage sérum physiologique -Endorem, 75%-25%

3.3.2.4 Préparation–4 : préparation-2 avec pré-marquage fort des Hépasphères®

La plupart des microparticules déjà marquées avec une forte concentration sérum physiologique-Endorem® (100% Endorem®, Tableau 3-14) et diluées progressivement avec du sérum physiologique sont présentées en trous noirs sur les images IRM- T_1 (Figure 3-15). On observe un rapport S/B des trous-images et du contraste gélatine-trous très faibles (Figure 3-16), quelque soit la dilution ce qui conforte l'idée, que dans ce cas même à des dilutions fortes l'Endorem® provoque l'extinction maximale des Hépasphères®. Donc, la visualisation des microparticules est toujours proposée à partir de la forte dose en Endorem® utilisée lors de leur marquage initial. On pourra alors dire que le marqueur ne diffuse pas à partir de ces microparticules.

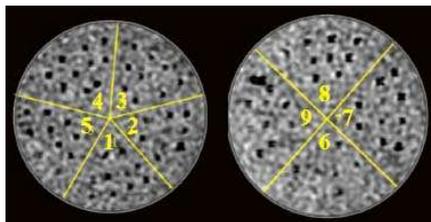


Figure 3-15 : Images IRM T_1 , obtenues avec une séquence 3D-SPGR, sur des boîtes de Pétri contenant les Hépasphères™ marquées par la gamme à dose variable en Endorem®. Le secteur 9 correspond aux microparticules marquées par la plus forte dose et qui diminue au fur et à mesure dans les autres secteurs.

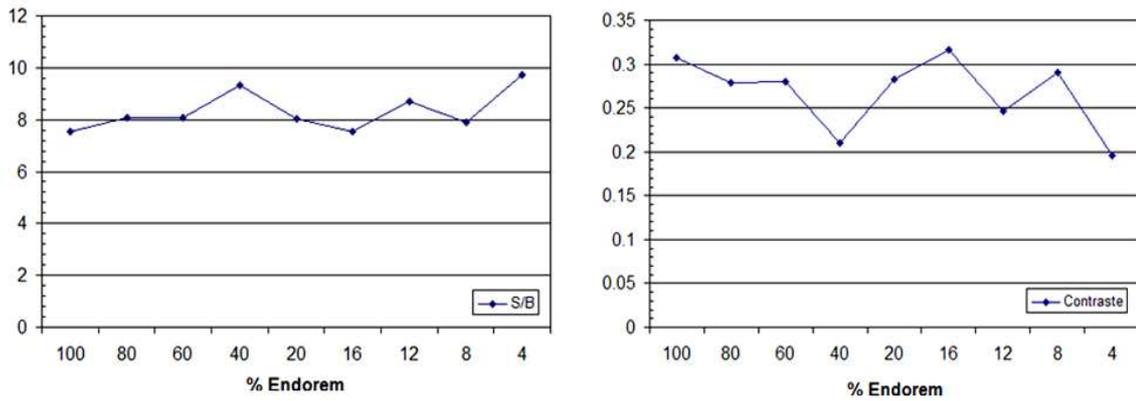


Figure 3-16 : Signal des trous et contraste gélatine-trous en fonction de pourcentage d'Endorem® décroissant dans la solution sérum physiologique-Endorem® dans laquelle les Hépasphères™ ont été plongées. Les dosages d'Endorem® 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 16%, 12%, 8% et 4% correspondent respectivement aux numéros des secteurs 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 et 1 dans la Figure 3-15 .

3.3.2.5 Conclusion

Le marquage des Hépasphères™ après leur gonflement avec du sérum physiologique était une mauvaise méthode de préparation en raison des agrégations obtenues comme on le constate sur la photographie microscopique dans la Figure 3-10.

On a pu observer une augmentation de signal lorsque les microparticules étaient préparées à faible dose puis plongées dans des solutions de plus en plus concentrées. Mais dans le cas d'une forte dose, aucune variation n'est notée.

Nous savons que les Hépasphères™ en usage clinique sont susceptibles d'être chargées avec un agent de contraste ionique comme l'ioxaglate de melgumine et de sodium, et en présence d'un agent non ionique comme l'Endorem® dilué avec le sérum physiologique, elles se chargent également. Il est possible que le caractère ionique du sérum physiologique joue en faveur de l'Endorem®, de la façon suivante : lorsque la microparticule est peu chargée, elle a tendance à capter l'Endorem®.

Néanmoins, même si la variation de signal est effective pour la gamme de dose croissante, le résultat n'est pas très probant : en effet, les microparticules sont chargées de façon hétérogène, et cette gamme, nous renseigne plus sur le comportement des Hépasphères™, que sur le dosage optimal tel que nous l'aurions souhaité (voir aussi chapitre.4 section 4.1.3.1).

Pour plus de rigueur, nous aurions dû préparer plusieurs échantillons d'Hépasphères™ avec pour chacun une dose différente d'Endorem®, ce qui était impossible car nous ne disposions pas d'une quantité suffisante de préparation d'Hépasphère™ et d'Endorem®. Nous nous contentons donc de la préparation et de son

résultat évoqués dans les sections 3.3.1.2 et 3.3.2.2, respectivement. La quantité optimale d'Endorem[®] avec laquelle les Hépasphères[™] sont bien détectées sous *IRM* est de 500 µl, équivalent à un pourcentage de 25% dans 1,5 ml de sérum physiologique, soit 75%. Le protocole de marquage des Hépasphères[™] par une quantité optimale d'Endorem[®] est récapitulé par le Tableau 3-15.

Etape	#	Action	Matériel	Notes
Marquage des Hépasphères [™]	1	Prélever 1,5 ml de sérum physiologique	Sérum physiologique à 0,9% Micropipette	
	2	Prélever 500 µl d'Endorm [®]	Endorem [®] (réf : 97ETI053, 8 ml, Guerbet) Micropipette	Volume des microparticules après gonflement atteint 3 ml (600-800 µm) et 4-5 ml (200-400 µm)
	3	Mélanger les deux solutions par agitation	Flacon	
	4	Prélever le mélange final dans une seringue	Seringue 10 ml	
	5	Faire une perfusion du mélange dans le flacon à vide contenant la poudre	Seringue 10 ml Flacon Hépasphère [™]	Homogénéité du marqueur dans les microparticules est moyenne, le marqueur reste sur la périphérie des microparticules
	6	Laisser la poudre Hépasphère [™] et le marqueur dilué par le sérum physiologique ensemble pour 2 heures	Microsphères Agent de contraste	

Tableau 3-15 : Protocole de marquage des Hépasphères[™] par une quantité optimale d'Endorem[®] permettant leur visualisation sous *IRM*.

3.4 Déteabilité des billes d'alginate

L'alginate de sodium est un polymère non toxique, biodégradable et biocompatible. Il peut être utilisé dans la formation de microcapsules sphériques utilisées dans des applications cliniques, comme le transport d'agents actifs pour la chimio-embolisation [Chretien2005], l'embolisation artérielle [Li2002], l'immobilisation de cellules microbiennes viables et des cellules animale [Martinsen1989], ou l'encapsulation de cellules utilisées comme biocatalyseur [Martinsen1989].

Nous avons adapté l'utilisation des billes d'alginate au marquage de microsphères. A cet égard, nous avons marqué ces billes, de taille d'environ 500 µm, par deux produits d'agent de contraste à base de Gadolinium (Dotarem[®], Guerbet S.A) et à base de *SPIO* (Endorem[®]). La réalisation de ce travail nécessite la conception d'un protocole de marquage des billes d'alginate. Comme pour le processus de marquage des

Hépasphères™ et il faut trouver la bonne façon d'incorporer le marqueur dans les billes d'alginate. D'un autre côté, il faut déterminer la dose optimale des deux marqueurs pour obtenir, uniquement avec le *SPIO*, le même résultat que lors de la détection des microparticules de Tris-acryl et des Hépasphères™ marquées.

3.4.1 Généralités et structure

L'alginate est un polysaccharide, comme le sucre et la cellulose. Il est composé de plusieurs monomères qui sont liés ensemble par des chaînes de rigidité variable qui dépend de leurs types.

L'alginate est formé à partir de deux sucres l'acide D-mannuronique (M) et l'acide L-guluronique (G) (Figure 3-17). L'enchaînement linéaire de ces deux monomères forme l'acide alginique qui est considéré dans ce cas comme un copolymère. Il est possible que l'acide alginique soit encore constitué d'un enchaînement de blocs de deux types : fragments homogènes d'acide mannuronique (M-M-M-) ou d'acide guluronique (G-G-G-). Les fragments mixtes correspondent aux zones de fragilité dans la macromolécule. Au contraire, les blocs homogènes d'acide mannuronique ou guluronique constituent des zones à structure pseudocristalline et sont plus résistants à l'hydrolyse.

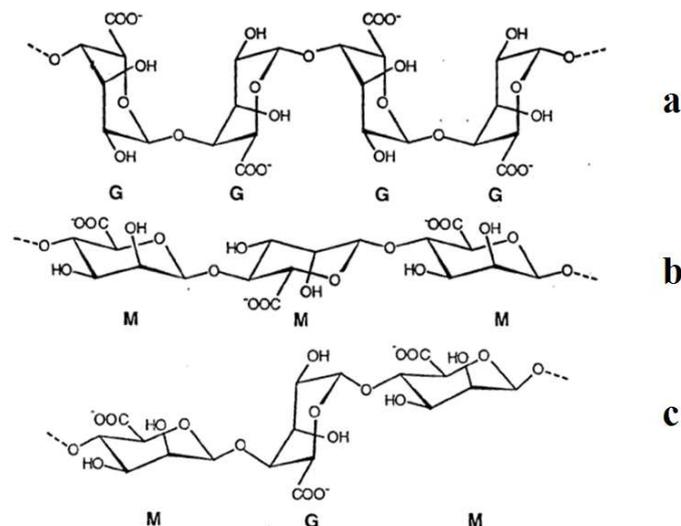


Figure 3-17 : 3 types de blocs dans l'alginate. (a) bloc guluronique "G", (b) bloc mannuronique "M" et (d) bloc mannuronique et guluronique mixte "MG".

La gélification de l'alginate se fait par l'addition des ions bivalents, comme les ions calcium (Ca^{2+}). Ceux-ci créent des liaisons intermoléculaires entre les groupes

carboxyliques de deux molécules d'alginate (Figure 3-18) pour obtenir une structure ressemblant à « une boîte à œufs ».

Les propriétés du gel varient suivant la composition en blocs mannuroniques ou guluroniques de l'alginate. Les alginates riches en blocs guluroniques (G-blocs) conduisent à des gels rigides et cassants, tandis que les alginates riches en blocs mannuroniques (M-blocs) conduisent à des gels de texture souple. Les propriétés du gel dépendent aussi de la structure consécutive des chaînes polymériques et de leur taille moléculaire. A cet égard, une résistance mécanique grande, une rétraction faible et une porosité importante d'une capsule d'alginate sont des propriétés corrélées à la proportion en acide guluronique et à la longueur des blocs-G [Martinsen1989]. Elles dépendent aussi de la concentration en CaCl_2 avec laquelle la structure des capsules d'alginate est dense et la taille des pores est petite [Tanaka1984]. Tous les gels d'alginate sont thermo-irréversibles¹¹. Ils ne peuvent être fluidifiés que par échange d'ions. Les zones de jonction au sein du gel d'alginate représentent la partie solide parmi lesquelles les molécules d'eau sont physiquement piégées dans sa matrice (réseau de réticulation). Ces molécules sont toujours en mouvement libre.

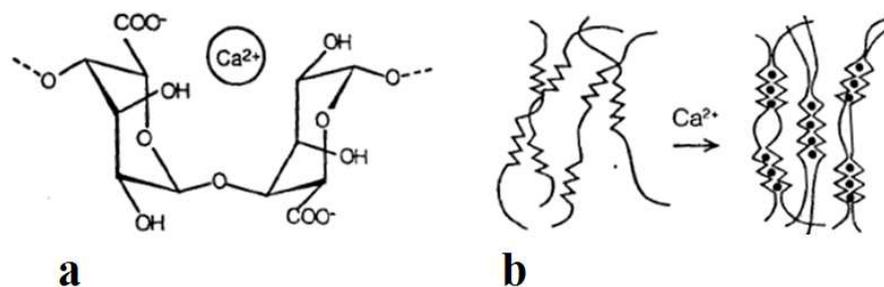


Figure 3-18 : (a) Représentation du bloc guluronique (G-bloc) et son site carboxylique sur lequel l'ion de calcium va se fixer. (b) modèle "boîte à œufs" concernant la réticulation entre les molécules d'alginate par les ions Ca^{2+} . [Huguet1994]

3.4.2 Matériels et méthodes

La seule méthode de production des billes d'alginate dans notre laboratoire repose sur le principe de la gélification de polymère par extrusion (également appelée méthode à la goutte) dans une solution contenant l'agent gélifiant (Figure 3-19). Une solution d'alginate de sodium, contenant le marqueur à encapsuler, est extrudée goutte à goutte, à travers une aiguille, dans une solution de CaCl_2 qui provoque la gélification et donc la production de billes d'alginate de calcium.

¹¹ Thermo-irréversible : Evolution de l'état d'un système sous l'influence de la chaleur sans qu'il retrouve nécessairement son état antérieur.

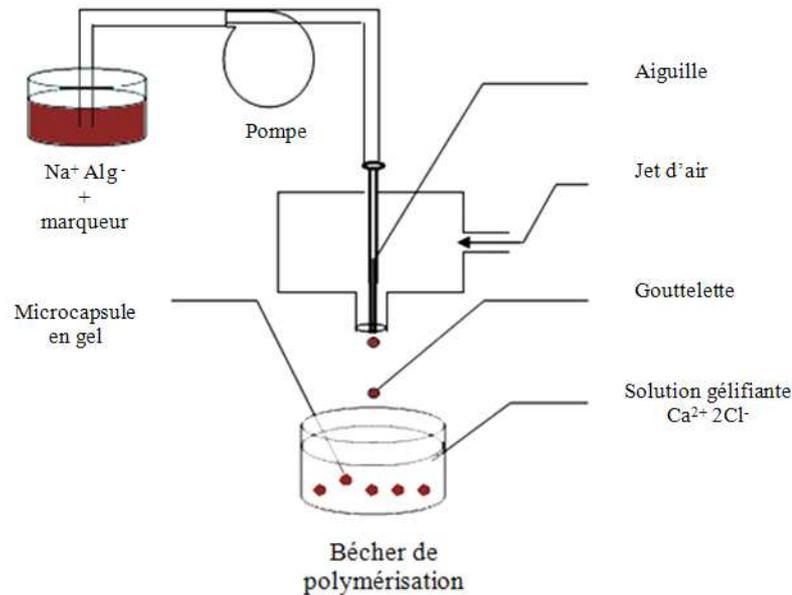


Figure 3-19 : Schéma de la production de billes d'alginate de calcium par extrusion.

3.4.3 Protocole expérimental

La fabrication des billes d'alginate marquées par un agent de contraste s'articule sur deux étapes. La méthode de préparation est souvent utilisée dans le laboratoire UMR 6600 pour encapsuler des cellules. Les propriétés élastiques de ces billes ainsi que leur biocompatibilité ont été donc validées pour des quantités de produits équivalentes à celles citées dans le Tableau 3-16. Nous avons optimisé ces quantités lors de notre travail pour diminuer le temps de préparation et économiser les produits, notamment le marqueur. Le calibre des billes qui peut être obtenu par la méthode d'extrusion se situe entre 500 μm et 2 mm. Les billes sont homogènes pour chaque taille dans cette gamme. Une tentative de fabrication de billes de taille inférieure à 500 μm forme des résidus qui perturbent leur homogénéité en taille. A cet effet, nous avons fabriqué des billes d'alginate de taille d'environ 500 μm et qui correspondent à celle choisie dans l'occlusion des vaisseaux de fibrome utérin.

3.4.3.1 Etape -1 : préparation d'une solution d'alginate avec le marqueur

Cette étape consiste à préparer une solution d'alginate avec un agent de contraste, le Dotarem[®] ou Endorem[®]. 0,2g de la poudre d'alginate (NaAlg, Réf : SIGMA A0682-100G) est versé, sous agitation, sur un milieu aqueux de 10 ml de sérum physiologique stérile (0,9g/100ml, bouteille de 500 ml achetée en pharmacie) avec les 5 doses de marqueur citées dans le (Tableau 3-16), respectivement. Le temps d'agitation par un

agitateur magnétique (VWR) dure environ 2 heures afin de dissoudre totalement l'alginate. Le pH du milieu a été vérifié avant et après le mélange du marqueur avec le sérum physiologique (agitation d'environ 5 min), il est stable à environ 8. La solution finale contenant 2% d'alginate avec l'une des cinq doses du marqueur, D₁, D₂, D₅, D₁₀ ou D₂₀, est prête pour passer à l'étape-2 de polymérisation.

Substance	Dose				
	D ₁	D ₂	D ₅	D ₁₀	D ₂₀
Poudre d'alginate (g)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sϕ (ml)	9,99	9,98	9,95	9,9	9,8
Marqueur (μl)	10	20	50	100	200
<i>[marqueur]</i> <i>μl/ml</i>	<i>D₁:1μl/ml</i>	<i>D₂:2μl/ml</i>	<i>D₅:5μl/ml</i>	<i>D₁₀:10μl/ml</i>	<i>D₂₀:20μl/ml</i>

Tableau 3-16 : Solution d'alginate composée de la poudre d'alginate et du sérum physiologique avec 5 doses différentes de marqueur D₁, D₂, D₅, D₁₀ et D₂₀, respectivement.

3.4.3.2 Etape-2 : extrusion et polymérisation de la solution d'alginate marquée

La solution d'alginate obtenue dans l'étape-1 avec le marqueur à encapsuler est tirée par une pompe péristaltique (vitesse d'indice 5,65) jusqu'à une buse équipée d'une aiguille popper[®] (fabriquée aux USA) d'indice 24, de diamètre externe de 0,55 mm et de celui interne de 0,3 mm (Figure 3-19). Un volume de 10 ml de cette solution est ensuite extrudé, sous forme de gouttelettes, par pression d'air comprimé (débit d'air a pour indice 55 pour obtenir le calibre 500–600 μ m) dans 80 ml de CaCl₂ (8,5g de poudre dans 500 ml du sérum physiologique équivalent à 2%, Réf : Sigma C-7902) en agitation avec le sérum physiologique. Les billes formées sont laissées sous agitation orbitale pendant quinze minutes après extrusion de toute la solution, de façon à permettre la gélification de l'intérieur de la bille. Les billes sont ensuite lavées deux fois avec 80 ml de sérum physiologique et stockées dans la même quantité et dans le même liquide de rinçage pour garder un équilibre ionique avec le milieu où elles se trouvent. Le temps qu'il faut passer pour fabriquer des billes d'alginate marquées par une certaine dose de marqueur et par la méthode d'extrusion est d'environ trois heures. Bien que dans ces conditions de préparation la taille des billes soit égale à 500 μ m, elles ont une taille finale d'environ 700 μ m en raison du changement de viscosité de la solution d'alginate due à la présence du marqueur.

Le protocole expérimental de la fabrication de billes d'alginate marquées est passé en revue dans l'annexe B.

3.4.3.3 Préparation du support

Le support est composé de boîtes de Pétri remplies par de gélose. Les billes d'alginate marquées sont mises entre deux couches de gélose selon la façon évoquée dans la section 3.3.1.6.

3.4.3.4 Séquence IRM

La séquence utilisée dans les acquisitions *IRM* des billes d'alginate est la séquence *3D SPGR* pondérée en T_1 de paramètres TR/TE : 30/4 ms, angle : 45°, FOV : 14×14 cm², matrice : 160², épaisseur : 1 mm, n° de coupes : 44, BW : 15,63 kHz, phaseFOV : 0,75 et Nex : 1. Le temps d'acquisition de cette séquence est 2min56s. L'antenne choisie lors des acquisitions est l'antenne cardiaque, les images sont obtenues dans le plan de coupe coronal.

3.4.4 Résultats

3.4.4.1 Encapsulation du Dotarem®

Quelque soit la quantité du Dotarem® dans les billes d'alginate, elles n'apparaissent pas sur les images d'*IRM* pondérées en T_1 ou en autres pondérations T_2 et ρ . Bien que les billes ne soient pas dépolymérisées, le marqueur a diffusé vers l'extérieur. On constate un hypersignal sur l'image *RM* en pondération T_1 du sérum physiologique dans lequel les billes d'alginate ont été conservées par rapport au signal image du sérum physiologique de contrôle (Figure 3-20).

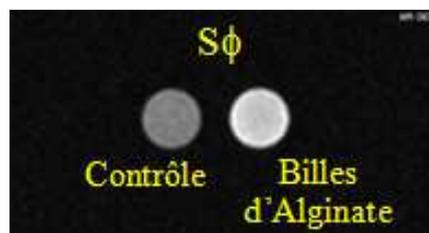


Figure 3-20 : Image T_1 du sérum physiologique de contrôle à gauche et du sérum physiologique dans lequel les billes d'alginate marquées avec le Dotarem® ont été conservées à droite.

3.4.4.2 Encapsulation de l'Endorem®

Les différentes doses d'Endorem® encapsulées dans les billes d'alginate apparaissent sur les images *IRM-T₁* en taches blanches ou en trous noirs (Tableau 3-17) selon la concentration de la solution de départ.

Nous avons bien vérifié par une observation visuelle que c'est bien l'emplacement des billes dans chaque boîte de Pétri qui donne un hyposignal ou hypersignal par rapport au signal de la gélose. Les taches blanches sont visibles sur les images des boîtes de Pétri contenant des billes marquées par les doses D_1 « 1µl/ml », D_2 « 2 µl/ml », et D_5 « 5µl/ml ». Les trous noirs commencent à être visibles sur les images *IRM* au-delà de la dose D_5 , comme avec la dose D_{10} de 10 µl/ml. Avec la dose D_{20} « 20 µl/ml », les trous noirs correspondant aux billes en singlet, doublet, triplet et amas sont plus visibles que ceux correspondant aux billes marquées à la dose D_{10} .

D'après le graphe dans la Figure 3-21, le rapport *S/B* de billes d'alginate augmente légèrement entre les deux doses D_1 et D_2 puis diminue entre D_2 et D_{20} . En revanche, le contraste gélose-trous augmente simultanément avec l'augmentation de la dose d'Endorem® dans les billes qui se traduit par le changement des taches blanches en des trous noirs.

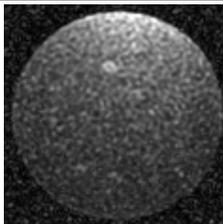
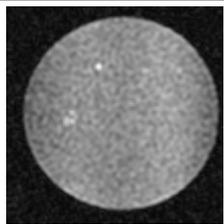
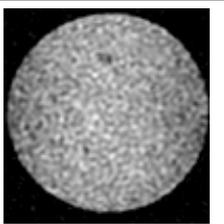
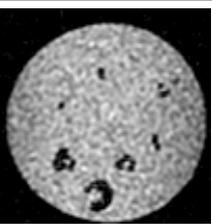
Dose				
D_1	D_2	D_5	D_{10}	D_{20}
				

Tableau 3-17 : Images *IRM-T₁* des boîtes de Pétri contenant des billes d'alginate marquées à des doses différentes d'Endorem® D_1 (1µl/ml), D_2 (2 µl/ml), D_5 (5 µl/ml), D_{10} (10 µl/ml) et D_{20} (20 µl/ml), respectivement. Les images dans les colonnes D_1 et D_2 sont de FOV 12 cm et les autres sont de FOV 14 cm.

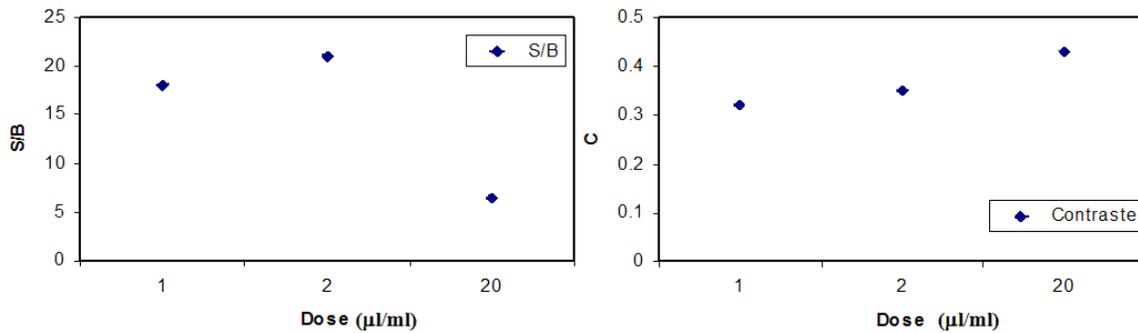


Figure 3-21 : Graphes du rapport S/B de billes d'alginate et du contraste gélose-trous à des doses d'Endorem[®] 1 µl/ml, 2 µl/ml et 20 µl/ml, respectivement.

3.4.5 Discussions

L'encapsulation du Dotarem[®] dans les billes d'alginate n'est pas concluant. Le Dotarem[®] (Gd-DOTA) est un agent de contraste paramagnétique associé avec un produit organique (chélate) pour réduire sa toxicité. Ce marqueur se comporte comme un agent de contraste de rehaussement positif (en séquence pondérée en T_1). Les billes d'alginate marquées par le Dotarem[®] sont invisibles par l'IRM pour la raison suivante :

- La taille du Dotarem[®] est d'environ 1 nm, il est possible que cette taille soit inférieure à la taille des pores de billes d'alginate, les molécules ont alors diffusé des billes vers la solution de sérum physiologique à l'extérieur comme on le constate sur l'image RM dans la Figure 3-20.

L'Endorem[®] est semble-t-il retenu par les billes d'alginate. Il a montré une stabilité dans les billes après leur préparation avec le marqueur comme on le constate sur la photographie de billes colorées dans la Figure 3-22. Par conséquent, les billes contenant de l'Endorem[®] à une dose de 20 µl/ml et à des doses basses de 1 µl/ml et 2 µl/ml sont visibles en IRM. La détectabilité des billes d'alginate en des trous noirs dans les images RM T_1 , à des doses d'Endorem[®] élevées, est souhaitable pour des raisons citées au chapitre.2 (section 2.1.3.3).

La taille d'Endorem[®] est entre 30 et 150 nm, elle est donc 30 ou 15 fois supérieure à celle du Dotarem[®]. L'Endorem[®] a alors plus de la chance que le Dotarem[®] d'être piégé entre les réticules matriciels du polymère (chaînes polymériques d'alginate) ou par les pores de la bille d'alginate.

Les billes d'alginate que nous avons marquées appartiennent à la famille des microparticules pouvant servir l'embolisation instantanée.



Figure 3-22 : photographie de billes d'alginate marquées à une dose de 20 μ l d'Endorem[®] par 1 ml de solution d'alginate.

3.5 DéTECTABILITÉ DE DIFFÉRENTS TYPES DE GOUTTELETTES D'ÉMULSION EAU-HUILE

3.5.1 Introduction

Les gouttelettes d'émulsion d'agents anticancéreux-l'huile iodée ou "Lipiodol[®] Ultra-Fluide" (Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France) sont fréquemment utilisées dans l'embolisation de réseaux vasculaires tumoraux hépatique, elles sont visibles globalement dans un arbre vasculaire grâce à l'iode, un produit opaque aux rayons X, qu'elles contiennent. La mise en présence d'huile iodée avec un liquide produit des gouttelettes d'émulsion jouant le rôle de microréservoirs pouvant servir à la vectorisation de médicament.

Quelques soient les avantages et les inconvénients rencontrés lors de l'utilisation clinique de gouttelettes d'émulsion, leur marquage par un produit de contraste visible à l'IRM présente un certain intérêt pour les interventionnistes. La détectabilité des matériels d'embolisation par IRM est également un enjeu. Nous pouvons régler la taille des gouttelettes et ainsi étudier les limites de faisabilité des tests en matière de détectabilité avec un imageur 1,5T. Par ailleurs, on souhaite savoir si des traitements anti-tumoraux pourraient utiliser ces gouttelettes pour transporter des anticorps anti-angiogénèses (anti-VEGF) (chapitre.4), car la nature des composants principaux de gouttelettes d'émulsions (huile et eau) est neutre chimiquement avec les agents anti-angiogénèses transportés vers la tumeur.

3.5.2 Généralités et structure

Une émulsion est une dispersion colloïdale de deux liquides non miscibles l'un dans l'autre tels que l'eau et l'huile, à laquelle on ajoute généralement un agent de surface (tensioactif ou surfactant) pour que le mélange atteigne la stabilité thermodynamique. Le processus de dispersion consiste à cisail¹² l'une des phases dans l'autre d'une manière à former de gouttes (micelles) dont la taille peut varier de 0,1 μm à environ 100 μm .

Nous rappelons brièvement que les molécules d'une substance chimique possèdent deux propriétés différentes, polaires et apolaires. Une molécule polaire est une molécule dont les barycentres de charges positive et négative ne coïncident pas, telle que la molécule de l'eau (H_2O).

La molécule de tensioactif a la particularité de comporter deux zones (groupements) distinctes, dont les affinités, d'un point de vue chimique, sont très différentes (Figure 3-23). Un groupement est susceptible d'assurer une affinité pour les surfaces nettement polaires et entraînant le plus souvent la solubilité dans l'eau (caractère hydrophile), et un radical apolaire (longue chaîne carbonée ou chaîne aliphatique) ayant peu affinité de l'eau (caractère hydrophobe ou lipophile). Cette molécule, naturelle ou synthétique, possédant des caractères de solubilité totalement différente est connue par molécule amphiphile.

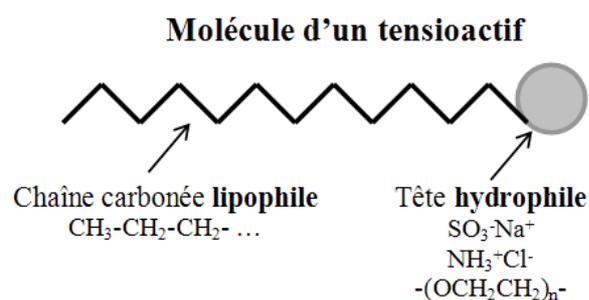


Figure 3-23 : Schématisation d'une molécule amphiphile d'un tensioactif composée d'une chaîne carbonée "lipophile" et d'une tête ionique ou non ionique "hydrophile".

Le type de tensioactif nécessaire pour produire une émulsion stable est déterminé par son système HLB (Hydrophilic-lipophilic balance) possédant une échelle arbitraire entre 1 et 20. Cette échelle traduit l'importance relative des groupements polaires et de

¹² Cisail^{er} : Action d'une force tangentielle amenant à déplacer les molécules de liquide parallèlement à elle-même. Ce mouvement met les molécules de deux phases de liquide en interaction.

la partie apolaire, conditionne les affinités relatives de la molécule pour l'eau et pour les milieux organiques. Les tensioactifs dont le nombre HLB est faible (de 0 à 10-12) ont alors un caractère lipophile (le nombre de groupes hydrophiles sur la molécule est faible). En revanche, lorsque la valeur du HLB est élevée (10-12 à 20), le nombre de groupes hydrophiles par molécule est important et les tensioactifs ont alors un caractère plutôt hydrophile.

Les tensioactifs sont classifiés selon leur structure chimique et leur mécanisme d'action (Annexe C, Tableau C-1).

La quantité du tensioactif nécessaire pour produire des micelles est déterminée par la concentration micellaire critique (CMC % mg/l). Elle est définie par la concentration du surfactant à partir de laquelle les micelles vont se former spontanément. La CMC est obtenue lorsqu'une quantité importante de tensioactif étant ajoutée à l'eau, une partie vient se placer immédiatement à la surface avec la queue hydrophobe pointant à l'extérieur de la surface. Par conséquent, l'énergie superficielle (surface \times tension de surface) diminue suivant l'élimination du contact entre les groupes hydrophobes du surfactant et les molécules de l'eau. Ce n'est qu'une fois la surface saturée, et n'offrant plus d'espace disponible à de nouvelles molécules de tensioactif pour venir s'y adsorber, que les tensioactifs vont former des structures organisées dans le liquide "micelle directe" (Figure 3-24). Ces micelles présentent des structures sphériques ou ellipsoïdales dont la surface est constituée des groupes hydrophiles de tensioactif, alors que les groupes lipophiles de ce dernier sont regroupés à l'intérieur. L'énergie superficielle dans le système diminue de nouveau lors de la formation des micelles qui vont éviter en plus le contact entre les groupes hydrophobes et l'eau. Au-delà la CMC, une addition supplémentaire du tensioactif n'a plus d'influence sur la tension superficielle, mais le nombre des micelles va augmenter (cas idéal). Les tensioactifs possèdent des concentrations micellaires critiques différentes qui varient en fonctions de leurs structures chimiques (exemple : Annexe C, Tableau C-2) [Foyeke1998].

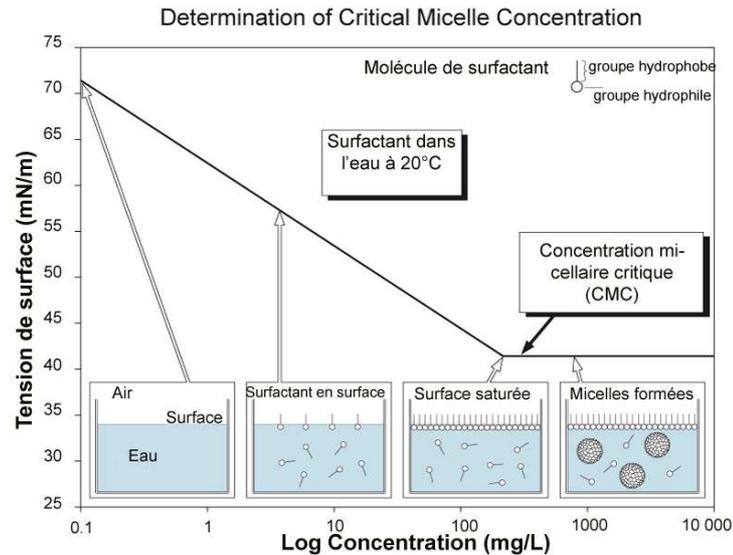


Figure 3-24 : Détermination de la concentration de formation micellaire critique selon la mesure de la tension superficielle en fonction d'une série de différentes concentrations du tensioactif. D'après [Catalogue de KRÜSS GmbH, Germany]

Deux types d'émulsions existent, les émulsions simples et les émulsions doubles. Les émulsions simples sont formées de gouttes liquides dispersées dans une phase continue (la quantité est la plus importante). Les émulsions doubles (appelées aussi multiples) sont des émulsions particulières, dans le sens où la phase dispersée est elle aussi une émulsion. Ces émulsions (simples ou doubles) sont qualifiées de "directes" ou "inverses", selon la nature aqueuse ou huileuse de la phase continue. Ces différents systèmes sont schématisés sur la Figure 3-25.

Le caractère principal d'une émulsion simple, directe ou inverse, est fixé au premier ordre par la solubilité préférentielle du tensioactif dans l'une ou l'autre des phases, en accord avec la règle empirique de Bancroft [Bancroft1913] : le recours à un tensioactif hydrosoluble permet de former préférentiellement une émulsion directe "Huile dans l'Eau : H/E" (Figure 3-25, a et c), alors qu'un tensioactif liposoluble favorise une émulsion inverse "Eau dans l'Huile : E/H" (Figure 3-25, a et d).

Au second ordre, la structure de la microémulsion dépend de la quantité des composants essentiels dans sa formation. Elle a une structure globulaire, lorsque l'eau ou l'huile est en faible quantité et une structure bi-continue, lorsque la quantité des deux composants (phase d'huile et d'eau) est similaire. Cette structure générale des microémulsions est représentée par un schéma typique, connu par le diagramme ternaire, sur la Figure 3-26. Pour la structure bi-continue (structure intermédiaire), les phases d'huile et d'eau sont continues, les molécules du tensioactif recouvrent l'interface eau-huile, et la courbure de l'interface est nulle.

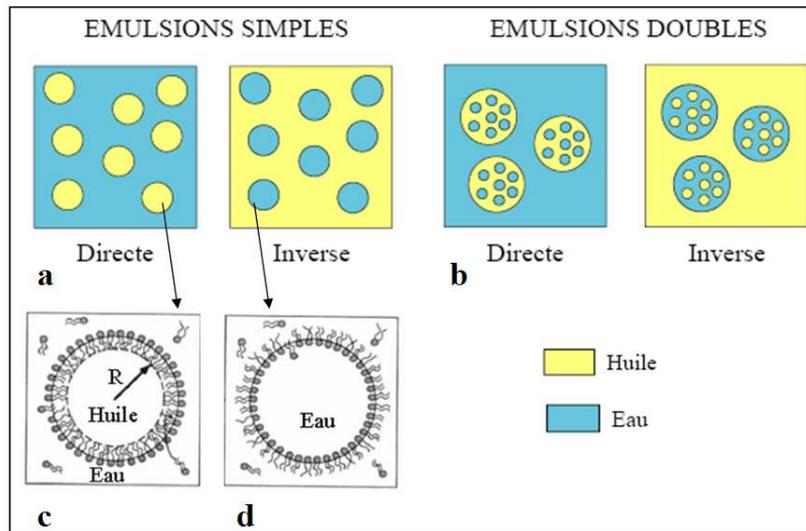


Figure 3-25 : Représentation de différents types d'émulsions, simple (a) et double (b) "directe" et inverse". D'après [Guery2006]

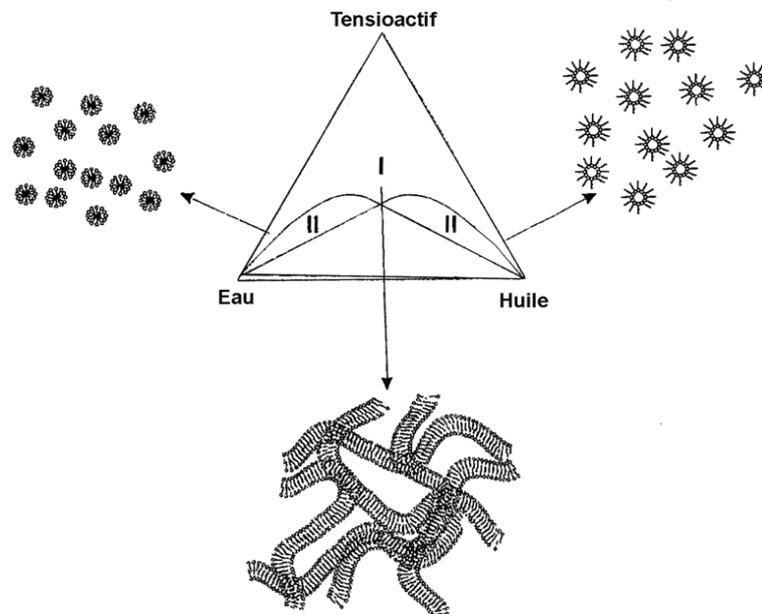


Figure 3-26 : Diagramme de phase ternaire, à une température à laquelle les propriétés hydrophiles-lipophiles du surfactant est en équilibre, d'un système typique composé de l'eau, d'un tensioactif non ionique, et de l'huile. La représentation de la structure des microémulsions de gauche à droite est la suivante : microémulsions globulaires (II) "H/E", microémulsions bicontinues (I), et microémulsions globulaires (II) "E/H". D'après [Solans1997]

La spécificité des émulsions doubles directes (usage courant) "Eau dans l'Huile dans l'Eau : E/H/E" (Figure 3-25, b gauche) vient du fait qu'elles contiennent à la fois des films interfaciaux inverses (entre deux gouttes internes) et des films directs (entre deux globules). Ainsi, généralement, les émulsions doubles directes font intervenir dans leur composition deux agents de surface : l'un hydrosoluble qui stabilise les films directs et l'autre liposoluble qui stabilise les films inverses (Figure 3-27).

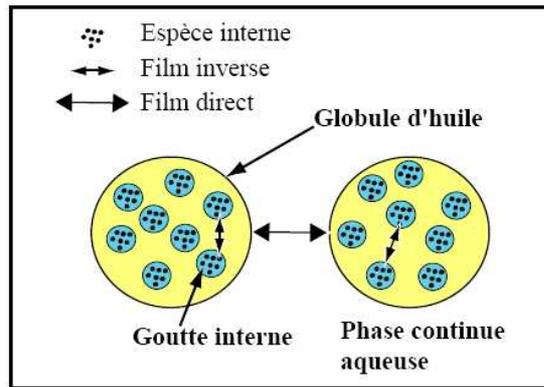


Figure 3-27 : Description d'une émulsion double directe. [Guery2006]

Les émulsions doubles comprennent donc deux interfaces délimitant des compartiments pouvant être de nature et de composition différentes. Grâce à cette structure compartimentée particulière et leur facilité d'obtention, les émulsions doubles sont rapidement apparues comme un matériau idéal en tant que microréservoir, que ce soit dans le domaine de la cosmétique, de la pharmacie, de l'embolisation artérielle [Hino2000] ou de l'industrie agroalimentaire.

Les émulsions doubles, par leur structure compartimentée et leur faible viscosité (eau à l'extérieur), rendent possible l'encapsulation d'espèces hydrophiles aussi bien qu'hydrophobes. Il est important de noter que la majorité des agents anticancéreux sont hydrophiles (solubles dans l'eau) [Higashi2000].

Par ce système d'encapsulation, le taux de relargage des médicaments est contrôlable avec ou sans rupture de film. Il est rapporté que trois mécanismes sont responsables du relargage d'une substance chimique par le système en double émulsion [Pays2000] : la coalescence, le mûrissement de composition et le flux d'eau par gradient de pression osmotique. Le premier mécanisme est réalisé avec une rupture de film, celui de deuxième et de troisième sont réalisés sans rupture de film.

La coalescence est le mécanisme qui consiste en la fusion irréversible entre une goutte interne et la surface d'un globule. Ce phénomène implique donc la rupture de film liquide (huile dans le cas des systèmes E/H/E) séparant les deux compartiments. Il conduit alors à la destruction complète des émulsions doubles et à la séparation macroscopique des deux phases non miscibles. Ce mécanisme peut être décomposé en deux étapes (Figure 3-28). La première est l'adsorption réversible des gouttes sur le globule. Cette attraction est attribuée à des interactions de Van-der-Waals entre les gouttes d'eau et la phase aqueuse externe. La seconde étape est la coalescence des

gouttes adsorbées sur la surface interne du globule. Elle se fait par ouverture, à une fréquence donnée, d'un trou dans le film d'huile.

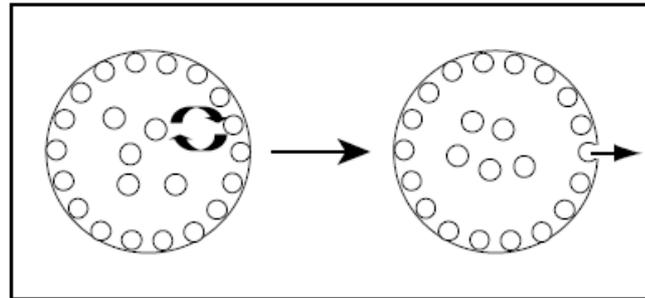


Figure 3-28 : Adsorption réversible des gouttes internes à la surface des globules suivie de la coalescence goutte-globule. [Guery2006]

Le mûrissement de composition, sans rupture de film, est un phénomène de diffusion ou de perméation¹³ de la substance chimique à travers la phase huileuse par l'intermédiaire de micelles de tensioactifs lipophiles. Ce phénomène intervient dans le cas où il existe une différence de composition entre les gouttes et globules de la première et deuxième phase dispersée, les substances dispersées étant toutes légèrement solubles dans la phase continue. L'entropie¹⁴ de mélange favorise alors l'uniformisation des compositions par diffusion des espèces solubilisées dans les gouttes internes vers la phase continue externe et vice-versa [Chiang1978 ; Matsumoto1989] (Figure 3-29). La fuite par mûrissement de composition dans les émulsions doubles s'apparente très fortement à la fuite dite « passive » des membranes phospholipides. Ce phénomène existe dans un grand nombre d'échanges cellulaires.

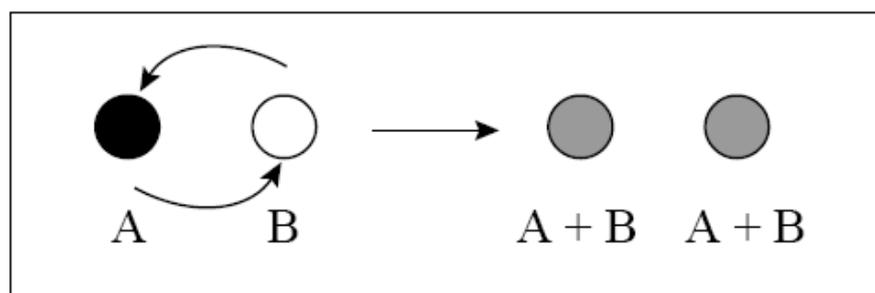


Figure 3-29 : Représentation du mûrissement de composition. [Guery2006]

Le flux d'eau par gradient de pression osmotique entre le deux phases aqueuses interne et externe apparaît lors de l'introduction d'un soluté dans la phase aqueuse interne

¹³ Perméation : Mouvement d'atomes, d'ions, ou de molécules à travers une membrane poreuse ou perméable.

¹⁴ Entropie : Grandeur physique caractérisant le désordre d'un système. Il mesure l'homogénéité d'un système considéré.

[Jager-Lezer1997]. Par conséquent, un déséquilibre osmotique est créé par rapport à la phase aqueuse. Il se traduit par un flux aqueux de la phase externe vers la phase interne dont la pression osmotique a augmenté par la présence de soluté. Ce flux provoque le gonflement des gouttes internes et alors des globules, et tend à amincir le film d'huile fin qui sépare les gouttes d'eau interne de l'interface du globule. Si la pression exercée par le gonflement devient trop forte, le film d'huile devient instable. Il y a alors rupture de la membrane d'huile et dispersion du contenu des gouttes internes dans la phase externe comme le montre la Figure 3-30.

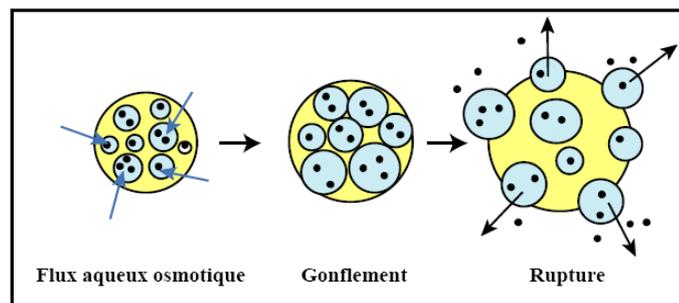


Figure 3-30 : Effet de la pression osmotique sur la déstabilisation de l'émulsion double E/H/E. D'après [Jager-Lezer1997]

Il est possible de passer d'un mécanisme à un autre en modifiant les proportions et/ou la nature chimique (molécule longue ou courte) des tensioactifs. Selon Pays [Pays2001], il est impossible d'encapsuler pour une longue durée une petite molécule neutre ou chargée en utilisant un tensioactif de petite molécule. D'ailleurs, lorsque la concentration du surfactant hydrophile est inférieure à une valeur critique, le relargage se produit préférentiellement par diffusion et/ou perméation à travers la phase huileuse. En revanche, au dessus de cette valeur critique le relargage se produit préférentiellement par coalescence. Pour les deux mécanismes, le relargage ne dépasse pas plusieurs jours. La valeur critique est de l'ordre 1 CMC pour les tensioactifs hydrophiles dont le HLB est supérieur à 30 et 100 CMC pour ceux dont le HLB est entre 10 et 30. Le gonflement des gouttes internes, par le déséquilibre osmotique engendré par l'introduction d'un soluté dans la phase interne, peut être contrôlé par la concentration de surfactant hydrophobe. La capacité de gonflement de la structure interne augmente considérablement si le tensioactif hydrophobe est plus concentré. Il semble, en effet, que la stabilité du film d'huile séparant la phase aqueuse interne de celle externe est améliorée en augmentant la concentration en tensioactif hydrophobe qui renforce lui-même le film interfacial [Jager-Lezer1997]. D'ailleurs, le déséquilibre osmotique peut être remédié par une substance insoluble dans l'huile ajoutée à la phase aqueuse

externe, à la concentration adaptée, permettant d'obtenir l'équilibre osmotique. Généralement, une espèce neutre est utilisée de faible masse moléculaire, comme par exemple le glucose, de façon à n'altérer ni la viscosité ni la force ionique de la phase aqueuse.

Cependant, malgré les avantages de ce type de microémulsion dans le domaine thérapeutique, les émulsions doubles restent un matériau thermo-dynamiquement instable dont la stabilité et la capacité d'encapsulation sur des temps longs restent faibles [Guery2006]. Les principaux processus de destruction (coalescence, mûrissement de composition) qu'elles subissent conduisent, à terme, à la perte de leur contenu et en font actuellement une matière inexploitable en tant que microréservoir [Pays2001].

En tant qu'agent de contraste, « Endorem[®] » est hydrophile, nous l'avons alors encapsulé dans des microémulsions simples E/H qui ont démontré plusieurs avantages dans le domaine de l'encapsulation, tels que l'optimisation de la vectorisation et de l'embolisation (section 3.5.1). Aussi, la structure compartimentée des émulsions doubles est apparue comme un candidat idéal pour notre application de marquage.

Bien que les deux systèmes d'émulsion soient destinés au relargage des espèces encapsulés au terme de quelques jours, le marqueur utilisé doit cependant rester à l'intérieur. Etant donné que la dimension des particules de celui-ci est grosse (30-150 nm), nous supposons qu'elle ne passe pas facilement à travers les interfaces eau-huile des émulsions, notamment en choisissant des tensioactifs de nature et de concentration bien appropriées. Il est pourtant nécessaire de maîtriser, le plus possible, la fabrication et la stabilité des gouttelettes dans le temps, qui sont un défi majeur dans la science des colloïdes. Cependant, aucun n'a pu actuellement conduire à une solution suffisamment stable ou performante, en vue de l'application visée, pour connaître un réel développement. Plusieurs paramètres sont envisagés pour obtenir des émulsions, simples (E/H) et doubles (E/H/E), stables avec le contenu et de tailles réglables. Parmi ces paramètres, on distingue : le type de formulation concernant la nature des composants choisis et leur proportion, la vitesse et le temps d'agitation l'une des phases dans l'autre (huile et eau), et la liaison entre la molécule à encapsuler et la microémulsion. Sans oublier l'optimisation de la quantité du marqueur à encapsuler dans les gouttelettes afin de modifier leur signal *IRM*. Défini comme le rapport entre la masse active sur la masse totale de la microparticule, le taux d'encapsulation peut être

élevé dans les microcapsules, de l'ordre 85% à 90%. Dans le cas des microsphères, il reste relativement faible de l'ordre de 20 à 35%.

3.5.3 Matériels et Méthodes

Plusieurs types de tensioactifs ont été testés dans le processus de fabrication des microémulsions, parmi ceux-ci la lécithine de soja et le liquide de vaisselle. Avec ces deux produits, la microémulsion obtenue est de type l'huile dans l'eau (H/E). Ce type d'émulsion nous intéresse moins parce que le marqueur ne peut pas être encapsulé dans les gouttes. Les tentatives de sa fabrication nous permettent de découvrir tous les paramètres qui ont une influence sur la taille des gouttes tels que : les proportions entre les phases (eau, huile et tensioactif), la vitesse et le temps de d'agitation. Les deux phases de liquides que nous avons utilisées dans nos tests sont l'huile de colza et l'eau distillée. Après plusieurs essais avec les gouttelettes (H/E), nous avons conçu un protocole de fabrication de microémulsion simple (E/H) et double (E/H/E) avec des produits spécifiques et non toxiques, comme l'indiquent les deux paragraphes suivants.

3.5.3.1 Emulsion simple : eau dans l'huile

Le protocole conçu pour fabriquer les gouttes des émulsions simples marquées par l'Endorem[®] est fondé sur le diagramme de phase ternaire illustré par la Figure 3-26.

2% vol./vol.¹⁵ du Sorbitan monooleate "Span 80" (Sigma-Aldrich), tensioactif non ionique de HLB 4,3 conçu pour stabiliser l'émulsion simple "E/H", est mélangé avec 78% vol./vol. de l'huile de paraffine (minérale) liquide (VWR Prolabo[®]) pendant 5 min par un agitateur magnétique (agitation mécanique). Une solution aqueuse composée de 19% vol./vol. de l'eau distillé et 1% de l'Endorem[®] est mixée avec la solution précédente à une vitesse d'agitation élevée (1250 tr/min) afin de produire des gouttes de taille d'environ 10-55 µm (Figure 3-31).

¹⁵ vol./vol. : Concentration volumique d'une substance en µl/ml ou ml/ml de solution.

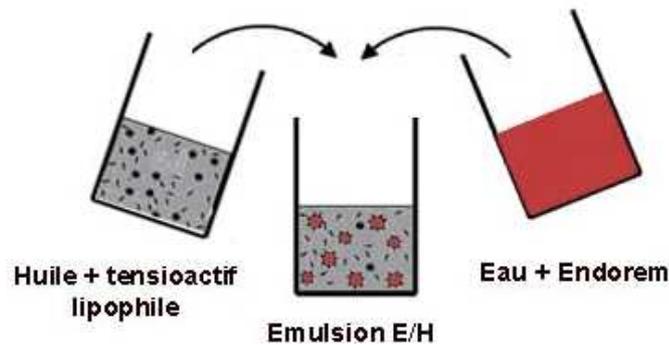


Figure 3-31 : Préparation d'une émulsion simple de l'E/H marquée par l'Endorem[®] en utilisant un tensioactif lipophile.

3.5.3.2 Emulsion double : eau dans l'huile dans l'eau

Le processus de fabrication de l'émulsion double se déroule en deux étapes. La première étape concerne la préparation des émulsions simples "E/H" de la même façon que dans la section (3.5.3.1), mais en utilisant un nouveau tensioactif, non ionique, de proportion volumique différente. 7% vol./vol. de Sorbitan sesquioleate "Span 83" (Sigma-Aldrich), de HLB 3,7, est mélangé pendant 5 min avec 80% de l'huile de Paraffine pour être ensuite mixé, à 375 tr/min et pendant 5 min, avec une solution aqueuse composée de, 12% vol./vol. de l'eau distillée et 1%, de l'Endorem[®]. La seconde étape concerne la réémulsification, à 625 tr/min dans 5 min, de 82% vol./vol. des gouttes marquées obtenues en première étape dans une solution composée de l'eau distillée (17,99% vol./vol.) et du tensioactif PolyoxyEthylyene Sorbitan monooleate "Tween 80" (0,01%), de "HLB" élevée "15", afin de produire des émulsions E/H/E marquées (taille 50-157 μm) (Figure 3-32).

Nous avons fait, avant le marquage des gouttes et globules, plusieurs préparations préliminaires avec les composants évoquées dans les sections (3.5.3.1) et (3.5.3.2) afin de régler la taille selon la vitesse et le temps d'agitation ainsi que, selon les proportions entre les phases. La taille obtenue dans les essais préliminaires peut changer en ajoutant ensuite l'agent de contraste aboutissant à la modification de la viscosité du milieu à disperser (eau et Endorem[®]). De plus, les proportions entre les phases ont été légèrement modifiées, notamment la quantité du tensioactif, afin d'augmenter la stabilité des gouttes et éviter la diffusion du produit de contraste vers l'extérieur.

Le pourcentage 1% de l'Endorem[®] que nous avons utilisé dans les gouttelettes est considéré optimal pour leur visualisation par *IRM*. Il est déterminé après plusieurs essais avec d'autres quantités qui n'ont pas démontré une influence sur leur signal *IRM*.

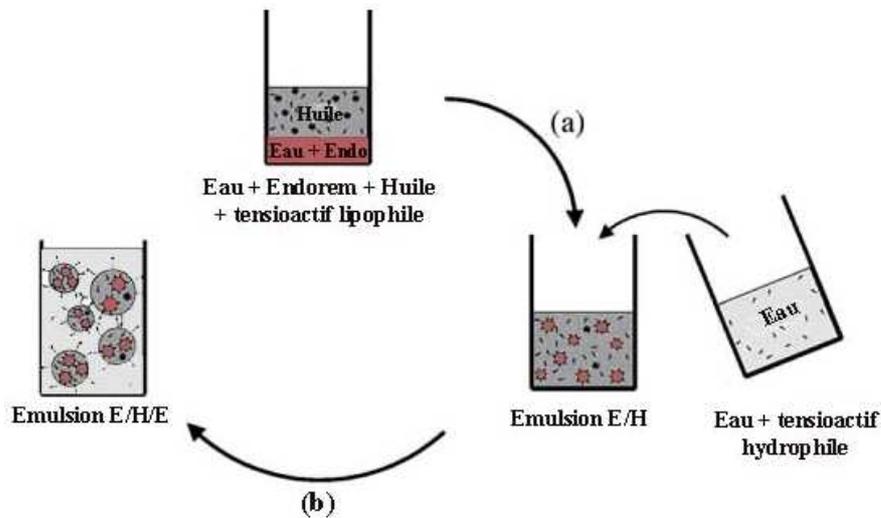


Figure 3-32 : Préparation d'une émulsion double de l'E/H/E marquée par l'Endorem[®] dans deux étapes : étape de préparation avec un tensioactif lipophile, à une forte vitesse de cisaillement, une émulsion de l'E/H contenant le marqueur Endorem[®] (a), et étape de préparation avec un tensioactif hydrophile, à une faible vitesse de cisaillement, une émulsion de l'E/H/E.

3.5.3.3 Préparation du support et images microscopiques

Les émulsions simples (E/H) et doubles (E/H/E) sont placés séparément dans des boîtes de Pétri contenant deux matières différentes, la paraffine solide et le gel d'agar agar. La première, à base d'huile, a une affinité pour les émulsions inverses (E/H), en revanche, la deuxième, à base d'eau "hydrogel", a davantage d'affinité pour les émulsions directes (E/H/E).

La paraffine solide est de la cire, elle est fondue par échauffement pour être ensuite versée dans une boîte de Pétri. Quelques μl des émulsions marquées "E/H" seront dispersés dans la paraffine liquéfiée après son refroidissement (50°C) et avant solidification. Lorsque la paraffine redevient solide, les gouttes d'émulsion sont totalement séparées et fixées par le contenant. La température de la paraffine à 50°C n'a pas montré une influence sur la stabilité des émulsions simples dont la taille et la forme sont vérifiées sous microscope avant que la paraffine devienne totalement épaisse.

La préparation du gel agar agar comme support pour les gouttes d'émulsion E/H/E, est réalisée de la même façon que dans la section (3.3.1.6), mais cette fois-ci la boîte de Pétri est totalement remplie par le gel liquéfié. Quelques μl des émulsions marquées "E/H/E" seront dispersés dans le gel liquéfié après refroidissement et avant solidification.

La stabilité des gouttes d'émulsions marquées est déterminée par des images microscopiques qui sont prises directement après leur préparation.

3.5.3.4 Imagerie par RM

L'imagerie par RM des boîtes de Pétri contenant les émulsions simples et doubles est réalisée 2 heures après leur préparation. Ce délai entre la fabrication des gouttes (ou globules) et l'acquisition par IRM accentue en plus leur stabilité. Une séquence 3D SPGR pondérée en T_1 de paramètres, TR/TE : 35/6 ms, α : 45°, épaisseur : 0,7 mm, taille de pixel : $546 \times 546 \mu\text{m}^2$, zip 512. La dimension du FOV choisie ($14 \times 14 \text{ cm}^2$) ainsi que l'antenne utilisée (antenne cardiaque) sont souvent utilisées dans cette thèse pour l'imagerie des émulsions. Ces paramètres sont destinés aux acquisitions *in vivo*.

3.5.4 Résultats

La Figure 3-33 illustre les images microscopiques et IRM des émulsions simples (A et B) et doubles (C et D) prises respectivement après quelques minutes et deux heures après leur préparation respectivement.

Sur les images microscopiques, la taille des gouttes simples ainsi que des globules doubles est d'environ, 10–55 μm et 50–157 μm , respectivement. Sur les images IRM pondérées en T_1 des boîtes de Pétri, des trous noirs sont aisément perçus par un imageur d'intensité 1,5T et la stabilité du marqueur à l'intérieur semble être obtenue [Jassar2009]. Cependant, les émulsions doubles sont moins bien représentées sur les images IRM- T_1 que les émulsions simples. Leurs tailles sont plus importantes que celles du premier type d'émulsion (simple), la quantité du marqueur mise dans les deux systèmes d'émulsions est toutefois la même. La présence des trous noirs sur les images IRM correspondant aux deux systèmes d'émulsions ressemble à celle des microsphères (Tris-acryl, HépasphèreTM et alginate) marquées par le même type d'agent de contraste et qui sont déjà évoquées dans les sections précédentes. La dose de produit de contraste choisie pour le marquage des émulsions est alors satisfaisante, elles sont détectées par une antenne et un champ de vue remplissant des conditions d'acquisition *in vivo*. Ainsi, les gouttelettes ont atteint la taille prévue et la stabilité suite à un choix favorable de plusieurs paramètres concernant les proportions entre les composants, le temps et la vitesse d'agitation, et le type du tensioactif à des « HLB » différentes.

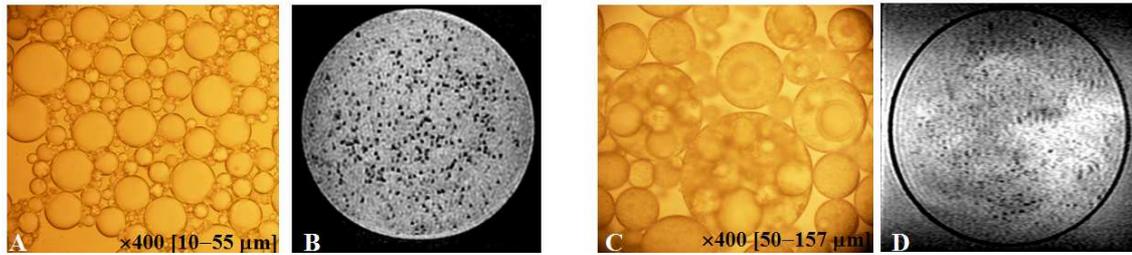


Figure 3-33 : Images microscopiques et IRM- T_1 des émulsions simples (A et B) et doubles (C et D), marquées avec l'Endorem[®]. Les diamètres respectifs de ces émulsions sont égaux à 10–55 μm et à 50–157 μm . Le diamètre des gouttes à l'intérieur des globules en émulsion double est de 13–60 μm . Les trous noirs dans les images RM correspondent aux gouttes et globules marquées avec l'Endorem[®]. Séquence 3D-SPGR : matrice : 256 \times 256, FOV : 14 \times 14 cm^2 .

3.5.5 Discussion

Les deux produits de tensioactif "Span 80" et "Span 83", appartenant à la famille des esters de sorbitan "Span", sont typiquement utilisés dans la fabrication des émulsions simples E/H. Ce choix est fondé sur plusieurs facteurs : la formation des micelles inverses au-delà la CMC se traduit par la diminution de la tension interfaciale, la haute stabilité acquise par l'interface eau-huile lors de l'augmentation de la concentration de l'un des deux tensioactifs, et l'insensibilité de l'interface à l'augmentation de la température (Span 80 [25°-50°], Span 83 [25°-37°C]) [Foyeke1998]. Ces facteurs dépendent notamment de la structure moléculaire (Annexe C, Figure C-1) ainsi que de l'hydrophobicité des surfactants (Annexe C, Tableau C-2).

L'utilisation de 2% vol./vol. de Span 80 dans la formulation de nos émulsions simples a démontré la formation des gouttes stables avec la présence de marqueur à l'intérieur. Les essais préliminaires concernant leur fabrication avec des pourcentages de Span 80 au-dessous de 2% vol./vol. n'ont pas montré une stabilité parfaite avec la présence de l'agent de contraste, mais une stabilité est atteinte sans sa présence jusqu'à 0,5% vol./vol. En revanche, en augmentant la quantité du Span 80 au-delà de 5% vol./vol., des attractions entre les gouttes sont apparues. A 2% vol./vol. de Span 80, le marqueur est toujours à l'intérieur des gouttes. Cette quantité de Span 80 peut être suffisante pour que les molécules du surfactant sur l'interface eau-huile soient proches afin d'empêcher les molécules de marqueur de passer à travers cet interface. Autrement, il est probable que les molécules de marqueur solubles dans l'eau soient adsorbées directement aux molécules de surfactant, et par conséquent le marqueur reste toujours à

l'intérieur des gouttes. L'adsorption peut être effectuée entre le revêtement du marqueur (Dextran) et le groupement hydrophile du surfactant.

Les gouttes-images microscopiques mesurées à 50 μm sont les seules dont nous pouvons détecter la présence sous *IRM*. Après plusieurs essais préliminaires de détection sous *IRM* des gouttes d'émulsion de taille petite [6–30 μm], pour une quantité du marqueur à l'intérieur similaire à celle mise dans les gouttes de taille [10–50 μm], les gouttes de taille [6–30 μm] ne sont pas visibles.

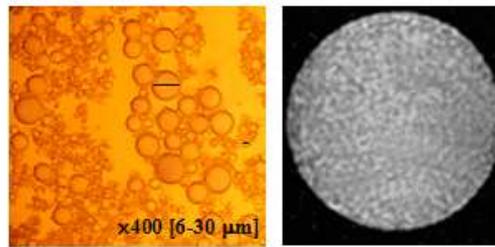


Figure 3-34 : Images microscopiques, à gauche, et *IRM-T₁*, à droite, des gouttes d'émulsion simple de taille 6-30 μm réparties séparément dans une boîte de Pétri. Ces gouttelettes sont invisibles dans les images RM. Séquence 3D-SPGR : matrice : 256 \times 256, FOV : 14 \times 14 cm^2 .

Avec une *IRM* à 1,5T, le seuil de détectabilité en termes de dimension des gouttes ne correspond pas à une dimension inférieure à 50 μm .

L'utilisation d'un surfactant lipophile, notamment le Span 83 à des concentrations importantes (7% vol./vol.), combiné à l'utilisation du Tween 80 (0,01% vol./vol.) (Surfactant hydrophile) est intéressant pour la formation de microémulsions doubles stables avec présence du produit de contraste à l'intérieur. Après plusieurs essais préliminaires avec du Span 83 à plusieurs concentrations, nous avons remarqué une rupture de film eau-huile lors de la présence du marqueur, notamment, pour les préparations contenant une quantité de Span 83 inférieure à 5% vol./vol. En augmentant la quantité de Span 83, la taille des gouttes E/H à l'intérieur des globules diminue. Elle est de l'ordre 19–255 μm après la première étape de préparation et de l'ordre 3–60 μm après la deuxième étape (E/H/E), pour une quantité de Span 83 de 7%. Au-delà de cette valeur, la taille des gouttes internes va encore diminuer (< 50 μm), et par conséquent la détection des émulsions doubles par l'*IRM* sera rendue difficile dans la mesure où le marqueur se trouve dans les micelles inverses (E/H). Ce phénomène rencontré dans nos préparations est en accord avec l'étude de Jiao [Jiao2003] sur la rhéologie et la stabilité des émulsions doubles E/H/E contenant le Span 83 et le Tween 80. Il est justifié par l'augmentation de la viscosité du milieu qui cependant aura une influence positive sur la

stabilité du système d'émulsion ; stabilité qui se traduit par la diminution de la coalescence entre les émulsions inverses et par l'augmentation de l'élasticité et de la résistance du film interne (huile).

Nous avons donc essayé d'établir un compromis, entre la vitesse d'agitation et la concentration du surfactant lipophile ajoutée dans la première étape de préparation, pour que la taille de gouttes internes soit égale à 50-60 μm . Pour cela, la vitesse d'agitation appliquée dans la première étape de préparation est choisie faible par rapport à celle trouvée dans la littérature. D'après Garti [Garti1998], la diminution de la vitesse d'agitation dans la seconde étape de préparation des émulsions doubles est nécessaire pour empêcher la rupture des gouttes internes. Sous une forte vitesse d'agitation, les gouttes sont soumises à des collisions aboutissant à la coalescence entre elles ainsi qu'entre les phases de l'eau interne et externe. Ces collisions sont dues à la création des flux à l'intérieur des gouttes sous l'effet des forces de cisaillement élevées exercées par le liquide à l'extérieur [Klahn2002]. Dans notre cas, le réglage de la taille, des gouttes et globules à 50 μm et 157 μm , nous a obligé à utiliser une vitesse d'agitation forte dans la seconde étape de préparation des émulsions doubles. Bien que la vitesse externe choisie ne soit pas conforme pas à la suggestion de Garti [Garti1998], nos émulsions doubles ont démontré une stabilité en présence de l'agent de contraste. D'ailleurs, le pourcentage du deuxième tensioactif (Hydrophile) utilisé dans la formulation de nos émulsions est dans la même gamme trouvée dans la littérature [Jiao2003, Matsumoto1976], il est inférieur ou égal à la CMC (0,01% vol./vol.). Lorsque sa quantité dans la phase continue (aqueuse) dépasse la CMC, des micelles directes vont se former et transporter le tensioactif lipophile qui se présente dans l'huile à l'extérieur (phase aqueuse). Par conséquent, la concentration de ce tensioactif (lipophile) dans le film d'huile diminue, ce qui aboutit éventuellement à sa rupture ainsi qu'à la perte des gouttes d'eau.

Le faible nombre de trous dans l'image *RM* des émulsions doubles dépend de plusieurs facteurs (Figure 3-33 d). Le premier est que l'agent de contraste, quelques instants, après sa fabrication s'échappe vers le milieu extérieur en suivant l'un des trois mécanismes déjà évoqués dans la section (3.5.2) : (la coalescence, le mûrissement de composition et le flux d'eau par gradient de pression osmotique). La deuxième concerne la température élevée de la gélatine lors de l'emplacement des globules d'émulsions doubles dans les boîtes de Pétri, ce qui entraîne la diminution de leur stabilité. Il est enfin probable que le contrôle de la taille des gouttes internes, par la vitesse d'agitation

et la concentration du tensioactif lipophile, n'est pas parfait, et par conséquent la majorité des calibres de ces gouttes à l'intérieur des globules est inférieure à 50 μm (Figure 3-33 C).

Il est probable que les deux premières causes éventuelles se produiraient simultanément étant donné que la rupture du film est possible. La Figure 3-33 D montre la diffusion d'une faible quantité de l'agent de contraste vers l'extérieur par un hypersignal (tache blanche) sur le côté droit de la boîte de Pétri.

Il est possible de ralentir la diffusion du marqueur ainsi que la destruction des émulsions doubles en utilisant des solutions déjà proposées dans la littérature:

- l'utilisation de tensioactifs de chaînes longues tels que les polymères afin de limiter la diffusion à travers l'huile et limiter les phénomènes de coalescence goutte-globule ;
- l'utilisation de deux espèces comme le glucose dans la phase de l'eau interne ainsi qu'externe, espèces présentant un faible coefficient de perméabilité à travers la membrane afin de limiter le mûrissement de composition. Cette solution ne nous semble pas applicable dans la mesure où le marqueur n'a pas cette propriété ;
- Augmentation de viscosité de la phase d'huile afin de ralentir les processus d'échange d'eau et de soluté vers le milieu continu. Cette solution peut être applicable dans notre cas en utilisant un nouveau type de l'huile ou en augmentant la concentration du tensioactif lipophile.

Les trois tensioactifs utilisés dans la préparation des émulsions simples et doubles ne sont pas toxiques, ils sont généralement utilisés dans les préparations pharmaceutiques [Jiao2003]. Ainsi, l'huile minérale, l'eau distillée et l'agent de contraste n'ont *a priori* aucun effet secondaire sur le corps humain. L'huile de Paraffine est utilisée comme un laxatif et l'Endorem[®] dans les injections intraveineuses.

3.6 Conclusion

Le repérage des agents d'occlusions vasculaires est un enjeu, pour l'imagerie interventionnelle par rayons X, et également, de façon encore plus prononcée, pour l'imagerie interventionnelle par l'IRM.

Comme l'*IRM* ne s'intéresse que rarement au matériel d'embolisation vasculaire, nous avons donc démontré dans ce chapitre, après leur marquage par des particules *SPIO*, la possibilité de leur détection par *IRM*, et ceci avec des tailles multiples d'édifices. Parmi ceux-ci, des agents d'occlusions permanents (microsphères de Tris-acryl « Embosphère[®] » et microsphère absorbantes « Hépasphères[™] ») et agents dégradables réalisées par nos soins (microsphères d'alginate, systèmes d'émulsions « simples et doubles ») ont été utilisées. Les Embosphères[®] ont pour champ d'application clinique les fibromes utérins. Par ailleurs, les Hépasphères[™], les microsphères d'alginate et les microémulsions, servant éventuellement de vecteurs, de drogues sont employés pour des champs d'applications cliniques divers, mais particulièrement pour les carcinomes du foie.

La déteçtabilité des microparticules a été réalisée sur des modèles *in vitro*, *ex vivo* et dans des conditions similaires à celles qui sont rencontrées *in vivo*. Les microparticules apparaissent sur les images *IRM* pondérées en T_1 et T_2/T_1 par des trous noirs quelque soient leur disposition et leur taille. La présence de l'agent de contraste à l'intérieur est généralement stable. Les essais concernant la détection de ces agents d'occlusions dans des conditions *in vivo* est possible avec une séquence ultra-rapide (Fiesta) et une antenne cardiaque mais nettement meilleure avec une technique *3D SPGR*. La quantité de marqueur introduite dans les différents types de microparticules varie d'une situation à une autre. Elle peut être optimisée, selon chaque cas, après plusieurs essais de déteçtabilité par *IRM* pour que leur visualisation se présente sous forme d'hyposignal (trous). Le contraste environnement-trous est rehaussé en opérant à 3T. Selon nos observations, le seuil de déteçtabilité des agents d'occlusions vasculaires avec une *IRM* à 1,5T correspond à une dimension des microparticules d'environ 50 μm .

Chapitre.4

Perspectives pour le
relargage des principes actifs

Sommaire :

4. CHAPITRE	160
4.1 Influence du drainage veineux sur le contenu des Hépasphères en SPIO	163
4.1.1 Position du problème	163
4.1.2 Matériels et méthodes	164
4.1.2.1 Matériels.....	164
4.1.2.2 Protocole de suivi	166
4.1.3 Résultats et discussion	177
4.1.3.1 Hépasphères TM	177
4.1.3.2 Liquide de perfusion.....	180
4.1.3.3 Discussion	183
4.1.4 Conclusion : confrontation du signal du liquide prélevé et celui des Hépasphères.....	191
4.2 Greffage des immunoglobulines sur les HépasphèresTM avec et sans marqueur	192
4.2.1 Objectif	193
4.2.2 Procédures de couplage IgG–Hépasphères	194
4.2.2.1 Conditions pour la réaction de couplage	195
4.2.3 Matériels et méthodes	196
4.2.4 Résultats et discussion	198
4.2.4.1 Dosage et confirmation qualitative de l’avidine couplée aux Hépasphères TM	199
4.2.4.2 Microscopie électronique à transmission.....	201
4.2.4.3 Biotinylation des anticorps	201
4.2.4.4 Stabilité dans un flux du complexe avidine-Hépasphère TM avec Endorem®	202
4.2.4.5 Dosage et confirmation qualitative du complexe Hépasphère-avidine-IgG	203
4.2.5 Conclusion	203
4.3 Caractérisation mécanique et électrique des gouttes et globules d’émulsion simple et double....	204
4.3.1 Introduction.....	205
4.3.2 Préparation d’émulsions simple et double	208
4.3.3 Caractérisation mécanique par ultrasons.....	210
4.3.3.1 Matériels et méthodes.....	210
4.3.3.2 Résultats et discussion	212
4.3.4 Caractérisation électrique.....	217
4.3.4.1 Matériels et méthodes.....	217
4.3.4.2 Résultats et discussion	219
4.4 Conclusion	228

L'embolisation d'un organe par des microparticules, un tissu ou une cellule malade aboutit à leur dévascularisation, complète ou partielle, selon le matériel utilisé. L'action des agents d'occlusion pourrait être renforcée par des molécules actives encapsulées à l'intérieur ou fixée à la surface. En particulier, ces molécules pourraient être des anticorps, des cytotoxiques, des cellules souches, etc... Dans ce cas, les microparticules auraient un rôle thérapeutique supplémentaire, local, efficace, avec des effets secondaires moins prononcés que durant les injections systémiques.

La visibilité des microparticules sous IRM étant démontrée quand elles sont chargées par des molécules actives, leur répartition spatiale par rapport aux cellules cibles pourrait être connue. On peut imaginer que le largage local des molécules actives donnerait alors une meilleure efficacité. Cependant, cette localisation peut être perturbée par le drainage veineux ainsi que les shunts artérioveineux, déjà évoqués dans le chapitre.1.

Nous nous sommes interrogés sur l'influence de ce drainage sur le contenu de microparticules. Pour que le marquage perdure au cours du temps et reste visible à l'IRM, le produit de contraste doit rester emprisonné aussi bien que possible dans l'agent d'occlusion. De même, la qualité de la fixation de l'agent actif sur le support est un facteur important.

Pour explorer les conditions d'une libération des principes actifs et des marqueurs, nous avons étudié trois mécanismes différents, qui composent les trois parties de ce chapitre. La première partie (4.1) concerne l'étude de l'influence du drainage veineux sur le contenu d'un agent d'occlusion non dégradable que nous avons chargé avec le SPIO (chapitre.3), les Hépasphères™. Celles-ci sont des vecteurs d'embolisation du foie destinées à transporter des substances cytotoxiques. Notre objectif est d'étudier la fixation d'un agent de contraste sur ce matériel d'embolisation, sans la présence de produit cytotoxique, et d'observer son éventuel relargage en appliquant des « pressions négatives ou dépression » qui simulent le drainage veineux. Nous avons conçu un modèle expérimental in vitro avec la présence des Hépasphères™ marquées dans un environnement simulant grossièrement une vascularisation tumorale et son drainage veineux. Nous avons contrôlé trois paramètres le débit, le pH et la température, dont on connaît par ailleurs le rôle dans la physiologie des tumeurs [Endrich1982, Weiss1979, et Vaupel 1989]. Leurs ordres de grandeur correspondent aux valeurs réelles rencontrées dans les carcinomes de foie [Vaupel 1989]. Le signal du liquide de drainage est

quantifié, et la méthode décrite au chapitre.2, permettant la détermination de très faibles variations de produit de contraste relargué, est utilisée. Dans un second temps (4.2), l'utilisation locale des substances anti-VEGF est explorée, d'une part car c'est une alternative à l'utilisation des substances cytotoxiques dont la manipulation est relativement dangereuse d'une part, et d'autre part à cause de l'effet paradoxal de la stimulation de la croissance vasculaire lors de l'embolisation [Jain2001, Li2004, Xiong2004, Kim2001]. On peut ajouter que, comme ce sont des produits onéreux, leur utilisation locale plutôt que systémique serait optimisée et serait ainsi un geste d'économie. L'étude de la fixation d'immunoglobuline (IgG) sur des microsphères, comme modèle d'anti-VEGF, a été réalisée en collaboration avec des biochimistes de l'UTC. Enfin, dans la troisième partie (4.3), l'étude des émulsions est abordée. Les couples eau-huile peuvent constituer des véhicules inertes pour des principes actifs, mais leur stabilité par rapport à des microparticules, moins bonnes. Nous avons donc exploré leurs propriétés mécaniques et électriques, et ensuite nous avons présenté les résultats obtenus et les perspectives thérapeutiques.

4.1 Influence du drainage veineux sur le contenu des Hépasphères en SPIO

4.1.1 Position du problème

Dans le cadre de la physiologie tumorale, nous rappelons que le drainage veineux le plus intense est représenté par la perfusion sanguine à travers des shunts artérioveineux. Elle peut atteindre 30% du flux artériel irriguant une tumeur maligne sans qu'il y ait le moindre processus d'échange dans le réseau capillaire [Endrich1982, Weiss1979, et Vaupel 1989].

Les HépasphèresTM que nous avons marquées précédemment par *SPIO* sont des microsphères non dégradables à usage clinique. Elles sont conçues pour l'embolisation artérielle hépatique ainsi que pour libérer progressivement, à proximité de la tumeur, des médicaments qu'elles sont censées à transporter.

Le couplage microsphères-SPIO comporte plusieurs inconnues : La première inconnue est la dose de *SPIO* nécessaire à la visibilité de ces microsphères en *IRM*. Elle a été déterminée au chapitre.3. La seconde est leur stabilité. Les HéphasphèresTM sont

censées larguer leur charge d'anticancéreux *in situ* par diffusion. Le relargage du contenu serait aussi forcé par l'influence du drainage veineux avant que ces agents d'occlusion n'atteignent les vaisseaux cibles et embolisent la tumeur. Quand l'embolisation est réalisée, un shunt artério-veineux peut court-circuiter la région nécrosée intra-tumorale [Tancredi1999]. Ce shunt, avec une différence de pression sanguine des côtés artériel et veineux, peut être parcouru par un flux sanguin à haute vitesse pouvant avoir une influence sur le contenu des Hépasphères™. Nous avons besoin de comprendre s'il y a libération d'agent de contraste à l'occasion de ce « drainage veineux » et de quantifier la dissociation. Il s'agit donc, suite au chapitre.3 d'évaluer une possible utilisation clinique des Hépasphères™ avec un marquage *SPIO*.

Nous avons conçu un modèle de drainage veineux pour soumettre les Hépasphères™ marquées à un environnement similaire à celui du réseau vasculaire développé après embolisation de la région cible. Nous avons pris dans ce modèle les ordres de grandeur de plusieurs facteurs physiologiques rencontrés souvent en amont, au sein et à travers une tumeur tels que le débit, la température et le pH [Vaupel1989].

4.1.2 Matériels et méthodes

Nous présentons dans un premier temps les matériels que nous avons utilisés dans le modèle du drainage veineux (4.1.2.1). Ensuite, nous parlons du protocole de suivi (4.1.2.2) pour ce modèle qui est composé de deux parties : le fonctionnement du modèle et les mesures effectuées sur les images *IRM*.

4.1.2.1 Matériels

Le modèle simulant le drainage veineux est composé de plusieurs matériels montés dans un circuit fermé : des Hépasphères™ (600–800 µm) marquées par l'Endorem®, une pompe péristaltique, un bain thermostat, et une colonne en verre (Figure 41).

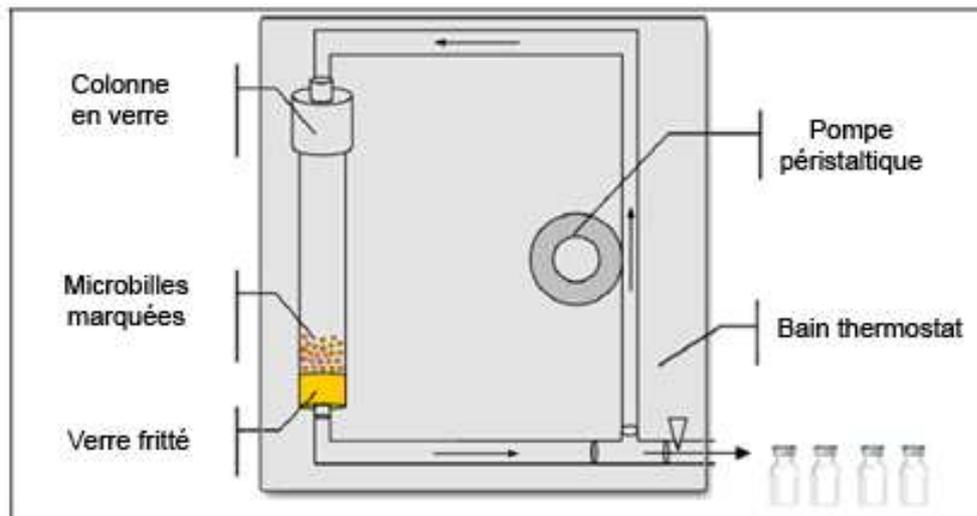


Figure 4-1 : Modèle in vitro simulant la présence des Hépasphères™ marquées à un drainage veineux. Le liquide de perfusion est recueilli dans des flacons en bas à droite.

- *Pompe péristaltique*

La pompe péristaltique est utilisée pour simuler le flux sanguin que nous remplaçons par du sérum physiologique. C'est une mini-pompe [Réf. 40578 Fisher Bioblock Scientific] permettant de délivrer des débits faibles et précis de 0,4 jusqu'à 85 ml/min. Les Hépasphères™ étant utilisées dans l'embolisation des carcinomes du foie, nous réglons le débit de la pompe pour un flux sanguin correspondant à ce type de tumeur. D'après la littérature, il est de l'ordre $0,15 \text{ ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ [Vaupel1989] soit $2,4 \text{ ml.min}^{-1}$ pour une tumeur hépatique de 16g. Nous réglons la pompe sur un débit de 10 ml.min^{-1} , surestimé quatre fois pour une tumeur hépatique de 16g, afin de tenir en compte les 30 à 42% du débit dans les shunts artérioveineux avant et après embolisation des portions tumorales bien perfusées, et de l'état fonctionnel de l'organe avant et après avoir été touché par un cancer. Cette valeur du débit supposée est au dessus de la réalité, ce qui nous donne une marge de surestimation.

Ainsi, lorsqu'un pompage de 8h aura été réalisé, ce serait en réalité l'équivalent d'environ 32h, soit 1,3 jours de drainage veineux d'un carcinome de foie que l'on aurait simulé, toutes conditions environnementales étant supposées identiques.

- *pH*

D'après la connaissance de la physiologie tumorale (chapitre.1), le pH de ce milieu se déplace vers l'acidité, particulièrement dans les tumeurs volumineuses où la perfusion sanguine est faible [Kallinowski1989]. Pour la plupart des tumeurs humaines, le pH extracellulaire varie entre 6,15 et 7,40 [Vaupel1989]. Cette gamme de

valeurs est confrontée à un pH entre 7,0 et 7,4 pour les tissus normaux. Pour un carcinome de foie, le pH extracellulaire n'est pas encore bien défini, à cause de l'imprécision des méthodes de mesures [Vaupel1989]. Pour cela, nous effectuons la simulation de notre modèle à deux pH différents, 6,0 et 7,0, pour déterminer l'influence du pH sur la dissociation de la paire HépasphèreTM-SPIO. Il suffit donc de diluer de l'acide chlorhydrique dans du sérum physiologique pour obtenir un pH de 6. La solution est ensuite utilisée dans le circuit de notre modèle.

- *Température*

Nous plongeons les composants de notre modèle entièrement dans un bain thermostat [Julabo 5 litres, Réf : ED-5A/B] à 37°C, ce qui correspond à la température du sang corporel.

Les HépasphèresTM marquées sont censées être utilisées *in vivo*, donc dans un corps à 37°C. Pour réaliser les mesures sous *IRM* à cette température, nous plongeons la boîte de Pétri, déjà préparée (chapitre.3), dans de l'eau tiède à 43°C, puis nous l'enfermons dans un système d'isolation en polystyrène (Figure 42). La séquence est lancée au moment où le thermomètre mesure une température de 37°C. De cette façon, nous nous approchons de la réalité pour tenir compte du changement de signal, notamment pour les séquences pondérées en T_1 .

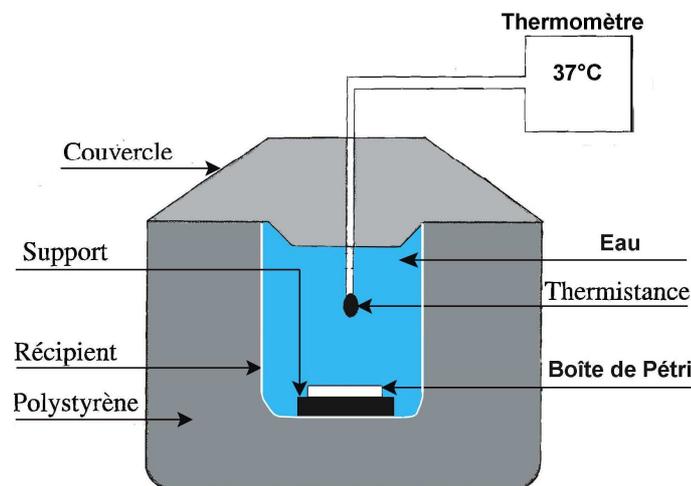


Figure 42 : Système d'isolation thermique en polystyrène pour conserver la température des HépasphèresTM d'une boîte de Pétri à 37°C.

4.1.2.2 Protocole de suivi

Ce protocole présente deux voies : la première concerne une mesure directe du signal des HépasphèresTM afin de déterminer la quantité d'Endorem[®] avant et après

pompage, la seconde est la mesure du signal du liquide de perfusion afin de déterminer la quantité d'Endorem[®] libérée des Hépasphères[™] au cours du pompage.

Notre modèle procède de la façon suivante :

Nous appliquons dans un premier temps le protocole de marquage et de rinçage des Hépasphères[™], du chapitre.3 (3.3.1.2) pour obtenir des microsphères marquées détectables à l'IRM. Nous chargeons les Hépasphères[™] avec 25% d'Endorem[®] (pourcentage volumique), un pourcentage optimal pour la visualisation des microsphères après 4 rinçages au sérum physiologique dans une colonne en verre. On récupère une petite partie de microsphères qui sera gélifiée et ensuite sera utilisée comme témoin (avant pompage).

On réalise plusieurs cycles de pompage successifs de 2 heures en prélevant une fois au cours de chaque période un échantillon pour suivre la variation de dose de *SPIO* dans le liquide perfusé et dans les microsphères aux cours du temps.

Une fois les Hépasphères[™] marquées et rincées, elles sont placées de nouveau dans la colonne en verre en amont de la pompe péristaltique (Figure 4-1). Le circuit est rempli avec 20 ml de sérum physiologique. La pompe est ensuite activée pour une durée de 2h sans interruption. A la fin de ces 2h, on prélève de la colonne une petite partie des microsphères qui sera gélifiée (voir chapitre.3, section 3.3.1.6), et en bas à droite de la colonne en verre 10 ml du liquide perfusé placés dans un flacon en verre. Le reste du liquide est jeté. Les microsphères et le liquide de perfusion sont ensuite passés à l'IRM pour identifier la quantité de produit de contraste libéré des Hépasphères[™]. Nous mesurons sur les images IRM obtenues la variation du signal des Hépasphères[™] ainsi que du liquide perfusé (échantillon). Nous recourons à la méthode de correction du chapitre.2 pour l'évaluation des signaux dans les images.

On réalise un nouveau cycle de pompage de 2h avec le reste des Hépasphères[™], mais en rajoutant de nouveau dans le circuit 20 ml de sérum physiologique. Le pompage se fait à 37°C et nous maintenons une réserve de sérum physiologique à 37°C pour que la température du nouveau cycle reste constante. On répète généralement de 4 cycles, soit 8h pour une expérience.

Puis la reproductibilité est vérifiée avec une nouvelle série de quatre cycles. Nous obtenons au total huit flacons contenant le liquide de perfusion, répartis en deux groupes : le premier correspond aux 4 flacons de la première série (série-1), et le

deuxième correspond aux 4 flacons de la seconde série (série-2). Cette étude de reproductibilité est effectuée en milieu neutre, c'est-à-dire à pH7.

On étudie également le rôle de l'acidité avec une troisième série de 4 cycles de 2h réalisée à pH6. Les mesures du signal image *IRM* des quatre flacons ainsi obtenus (série-3) sont comparées à celles des quatre flacons de la série-1.

a) Séquences IRM

On utilise pour la détection des HépasphèresTM et pour la quantification du liquide de perfusion, des séquences *IRM* distinctes.

La détection des HépasphèresTM est réalisée avec la séquence *3D SPGR* décrite au chapitre.3 (section 3.3.1.7). La technique de cette séquence permet d'obtenir un signal important d'un volume et des coupes fines jointives jusqu'à 0,7 mm. En revanche, l'imagerie du liquide de perfusion est réalisée avec la séquence *FSE-XL T₁* décrite au chapitre.2 (section 2.3.5.3) lors des acquisitions sur le fantôme.

b) Mesure du signal des HépasphèresTM

On cherche à estimer le relargage d'Endorem[®] par mesure directe sur les HépasphèresTM.

Le temps de relaxation *T₁* dépend largement de la température (2,1%/°C) [Le Roux1994 et Imran2000]. Pour une séquence *SE*, la variation relative du signal est de l'ordre de 1,15%/°C [Imran2000]. Nous prenons ce facteur en considération en mesurant le signal des HépasphèresTM avant et après échauffement. Avant échauffement, la séquence est lancée quand les boîtes de Pétri sont plongées dans un petit réservoir d'eau. Dans ce cas, les HépasphèresTM acquièrent la température de l'eau (24°C). La séquence est également lancée quand les boîtes de Pétri sont enfermées dans le fantôme d'isolation pour une mesure à 37°C (section 4.1.2.1).

La variation relative du signal des microparticules est déterminée par l'expression suivante :

$$\left| \frac{\overline{\Delta S}}{\overline{S}} \right| / \Delta T \tag{4-1}$$

Où : ΔS est la différence du signal des HépasphèresTM avant et après échauffement, $\overline{\Delta S}$ est la moyenne de la différence pour les 4 cycles de pompage, \overline{S} est la moyenne du

signal avant échauffement pour les 4 cycles de pompage et ΔT est la variation de température.

Le signal des microsphères est déterminé à l'aide des « ROI » tracées sur chaque trou. 3 paramètres sont pris en compte pour la mesure du signal :

- La taille des trous : elle est de quelques millimètres de diamètre au maximum et, par conséquent quelques pixels contribuent au signal.
- Le niveau de microsphères : lors de la fixation des microsphères dans une boîte de Pétri et donc les Hépasphères™ sont maintenues autant que possible au même niveau mais un risque existe que les microsphères se trouvent à cheval sur deux coupes, et qu'il existe un effet de volume partiel sur la mesure du signal.
- La tailles des microsphères : la taille des Hépasphères™ gonflées est comprise entre 600 et 800 μm , la quantité de marqueur à l'intérieur n'est pas alors la même selon leur volume, ce qui crée une différence de signal d'une microsphère à une autre.

Afin de contourner ces difficultés, nous mettons 10 microsphères dans chaque secteur de la boîte de Pétri et nous moyennons le signal de celles qui apparaissent sur les images *IRM*. Les trous-images sont arbitrairement considérés comme des régions dont l'intensité est faible, mais déterministe, produite par les microsphères marquées par *SPIO*.

c) Mesure du signal du liquide de perfusion : dissociation Hépasphères™-Endorem®

• *Disposition sur le support tournant amagnétique*

Les 8 échantillons de 10 ml sont disposés sur le support tournant amagnétique dans la configuration **I** considérée comme la meilleure pour la compensation des défauts d'intensité (chapitre.2, section 2.3.5.4). Chaque groupe de 4 échantillons constitue une matrice carrée, les huit échantillons sont répartis sur deux matrices d'une façon équidistante du centre de support : « Carré-1 » et « Carré-2 » à 45° (Figure 4-3). Le premier groupe de quatre échantillons correspond aux quatre cycles de pompage de la série-1 (à pH7) disposé sur la matrice « Carré-1 ». Le second groupe d'échantillons correspond aux quatre cycles de pompage de la série-2 à pH7 ou de la série-2 à pH6 disposé sur la matrice « Carré-2 » à 45°. Un flacon C de sérum physiologique est commun aux deux matrices (indice 0).

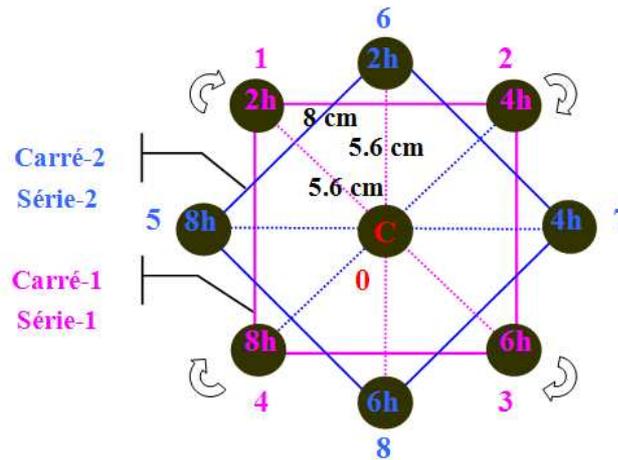


Figure 4-3 : Répartition des deux groupes de flacons, correspondant au liquide de perfusion, sur le support tournant magnétique, selon deux matrices : "Carré-1" correspondant aux quatre cycles de pompage de la série-1 (2h, 4h, 6h et 8h – couleur rose) et "Carré-2" à 45° correspondant aux quatre cycles de pompage de la série-2 (2h, 4h, 6h et 8h – couleur bleue). Les flacons sont équidistants du centre C. Les chiffres de 1 à 8 sont les indices de position des flacons sur le support par cycle de pompage de 2h. L'indice 0 correspond au sérum physiologique.

- Correction de signal IRM mesuré du liquide de perfusion

Pour la quantification précise du liquide de perfusion, nous corrigeons le signal en deux étapes. **Dans la première étape**, on effectue un pré-traitement par rapport à un fantôme homogène composé de 9 flacons (chapitre.2, section 2.3.5.2). **La seconde** est une compensation du signal entre le centre et la périphérie.

Quelque soit le contenu du fantôme d'huile ou de sérum physiologique, le résultat de la correction démontre un progrès quant à la dispersion du signal image des flacons par rapport à celui du centre (le centre est la région la plus homogène de l'antenne) (chapitre.2, section 2.3.5.4). Cependant, il est encore incomplet, la correction n'a pas pu égaliser le signal des flacons périphériques par rapport à celui du flacon central, quasiment stable dans les quatre orientations.

Pour que la méthode de correction soit complète plusieurs images tout d'abord sont acquises dans les quatre orientations (Supérieure "S", Inférieure "I", Gauche "G" et Droite "D") à partir de 9 flacons, pour un fantôme homogène, puis pour les échantillons. Le nombre et la configuration des flacons sur le support, la séquence IRM, les valeurs obtenues après la calibration automatique de l'imageur, et enfin l'antenne volumique restent identiques entre fantôme homogène et échantillons.

Dans la première étape, le signal mesuré d'un flacon sur une image pour une position donnée est moyenné avec les signaux mesurés du même objet dans une autre position pour les différentes orientations. Les acquisitions sur un fantôme d'huile sont exclues de ce chapitre. Les signaux corrigés sont : $\bar{S}_{fant.(n)}$, le signal corrigé pour le fantôme et $\bar{S}_{éch.(n)}$, le signal corrigé pour les échantillons.

$$\bar{S}_{fant.(n)} = \frac{\sum_{i=1}^4 \mu_{fant.(i,n)}}{4} \quad (4-2)$$

$$\bar{S}_{éch.(n)} = \frac{\sum_{i=1}^4 \mu_{éch.(i,n)}}{4} \quad (4-3)$$

Avec, $\mu_{fant.}$ et $\mu_{éch.}$ sont les moyennes des intensités correspondant aux flacons du fantôme et aux échantillons, i est le nombre des orientations (i = 1 à 4) et n est l'indice de la position du flacon sur le support, n = 0 à 8, 0 étant la position centrale.

Nous déterminons ensuite un facteur de correction $F_{fant.(n)}$ à partir des valeurs de $\bar{S}_{fant.(n)}$. Il permet de compenser l'écart entre le signal du flacon au centre (n = 0) et ceux de la périphérie (n = 1 à 8). L'expression du facteur de correction est :

$$F_{fant(n)} = \bar{S}_{fant(0)} / \bar{S}_{fant(n)} \quad (4-4)$$

Dans la deuxième étape, nous multiplions les valeurs corrigées de $\bar{S}_{éch.(n)}$ par les facteurs de corrections, $F_{fant.(n)}$:

$$S_{corrigé.éch.(n)} = F_{fant.(n)} \times \bar{S}_{éch.(n)} \quad (4-5)$$

La méthodologie de correction complète est récapitulée par l'organigramme de la Figure 44.

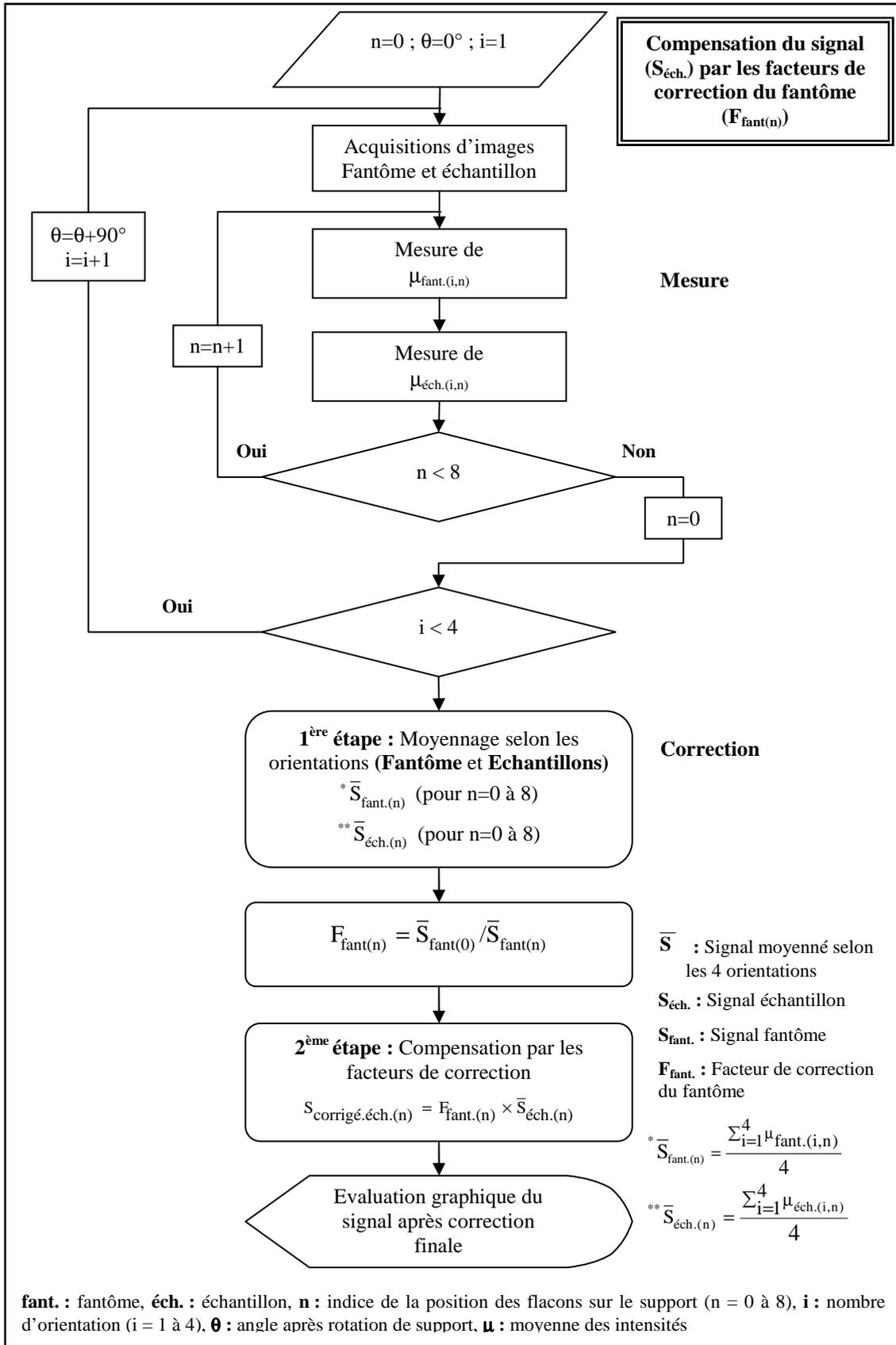


Figure 4-4 : Organigramme représentant la méthodologie de correction du signal mesuré. La première étape concerne la correction du signal, pour le fantôme et pour les échantillons, dans les quatre orientations. La deuxième étape compense les signaux des échantillons par des facteurs de correction déduits à partir des images de fantôme.

- *Quantification du produit de contraste libéré des Hépasphères à partir du signal de liquide de perfusion*

Trois paramètres sont utilisés pour une quantification précise de l'Endorem[®] dans les échantillons :

- $\bar{S}_{\text{éch.}(n)}$, le signal moyenné des échantillons ;
- $\bar{S}_{\text{fant}(n)}$, le signal moyenné du fantôme de sérum physiologique ;
- $\bar{S}_{\text{étal.}(n)}$, le signal étalon moyenné dans l'espace selon les positions de chaque flacon d'une gamme d'Endorem[®] ;

Après chaque cycle de pompage, nous quantifions le produit de contraste libéré en mesurant le signal du liquide de perfusion et en le comparant à la courbe étalon de la concentration d'Endorem[®] (chapitre.2, section 2.1.3.3). Cette courbe étalon est le résultat d'une soustraction entre le signal d'une gamme d'Endorem[®] dilué et celui du sérum physiologique. La représentation de l'amplitude de signal en « hyposignal et hypersignal » sur la courbe est donc relative au sérum physiologique. La dilution d'une gamme croissante d'Endorem[®] a été réalisée particulièrement dans du sérum physiologique car c'est le seul liquide qui peut gonfler les Hépasphères[™] (chapitre.3, section 3.3). Pour la gamme la plus étendue possible en utilisant 5,754 ml d'Endorem[®], nous avons réparti ce volume dans 24 flacons (Annexe D). Les flacons ont été disposés en 3 étapes sur le support amagnétique de la même façon que celle décrite ci-dessus, chacune comportant huit flacons pour une concentration croissante d'Endorem[®], et un flacon témoin de 4 ml du sérum physiologique situé au centre. Trois acquisitions d'IRM avec la séquence *FSE-XL T₁* (chapitre.2, section 2.3.5.3) ont été alors réalisées pour imager les trois gammes d'Endorem[®]. Les paramètres de calibration de séquence sont les mêmes pour toutes les acquisitions. Le signal mesuré, pour chaque concentration d'Endorem[®], est soumis à la méthodologie de correction représentée par l'organigramme de la Figure 44.

La courbe étalon déjà décrite au chapitre.2 est représentée ici par la Figure 45 selon deux échelles distinctes. En effet, pour des faibles concentrations que nous cherchons à détecter, il est nécessaire d'utiliser une échelle logarithmique (Figure 45 b) pour pouvoir observer le comportement du signal avec le moins d'imprécision possible.

De plus, on représente les valeurs du signal, non par rapport au sérum physiologique (valeurs > 0 et < 0, Figure 4-5 a), mais positivement comme on le lit sur les images.

Afin de quantifier l'Endorem[®] libéré des Hépasphères[™], l'étalonnage procède en 3 étapes d'acquisitions successives. Nous calculons la moyenne des valeurs du signal des flacons témoins au centre ($\bar{s}_{\text{témoin.étal.}(0)}$) moyennés selon les orientations.

$$\bar{s}_{\text{témoin.étal.}(0)} = \frac{\sum_{m=1}^3 \left(\frac{\sum_{i=1}^4 \mu_{\text{étal.}(i,0)}}{4} \right)}{3} \quad (4-6)$$

Où m est le nombre des acquisitions successives de toute la gamme d'Endorem[®].

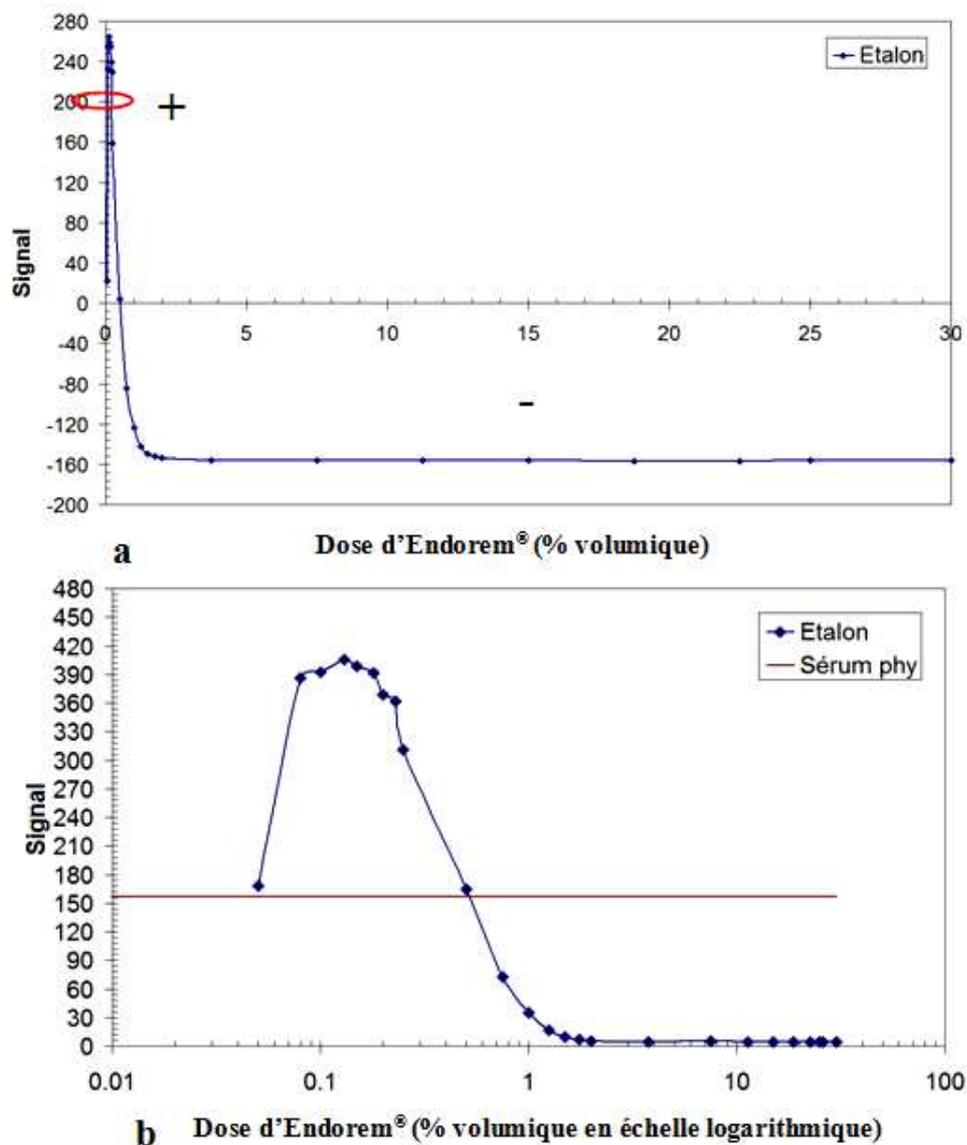


Figure 4-5 : Deux représentations pour la même courbe étalon de l'Endorem[®] : (a) Courbe étalon obtenue après soustraction du signal d'une gamme d'Endorem[®] de celui de sérum physiologique. (b) Courbe étalon sans soustraction du signal d'une gamme d'Endorem[®] en échelle logarithmique de celui du sérum physiologique. Le trait horizontal correspond au signal du sérum physiologique puisque le point représentant ne peut pas être représenté en échelle semi log.

Ensuite, on égalise les valeurs des signaux au centre de la matrice des échantillons à mesurer, $\bar{S}_{\text{témoin.éch.}(0)}$, avec ces valeurs de ceux trouvés au centre des matrices étalons, $\bar{S}_{\text{témoin.étal.}(0)}$:

$$\Delta_{\text{témoin}(0)} = (\bar{S}_{\text{témoin étal.}(0)} - \bar{S}_{\text{témoin éch.}(0)}) \quad (4-7)$$

Cette différence, $\Delta_{\text{témoin}(0)}$, est utilisée pour compenser les valeurs des signaux des échantillons périphériques corrigés une seconde fois, $S_{\text{corrigé éch.}(n)}$. Elle correspond à la 3^{ème} étape de correction.

$$S_{\text{final corrigé éch.}(n)} = \Delta_{\text{témoin}} + S_{\text{corrigé éch.}(n)} \quad (4-8)$$

Les trois étapes de correction effectuées pour la quantification de l'Endorem[®] libéré en utilisant la courbe d'étalon sont récapitulées dans l'organigramme de la Figure 4-6.

On rappelle que les signaux mesurés correspondent au liquide de perfusion, après plusieurs cycles de pompage, à une température de 37°C et un pH6 ou pH7.

Les résultats de cette étude sont représentés par le Tableau 4-2 dans le paragraphe 4.1.3.3 (Comportement comparé de relargage des microsphères de Tris-acryl et des Hépasphères[™])

d) Mesure du signal de liquide de perfusion : dissociation Tris-acryl-Endorem[®]

Le brevet d'invention concernant l'incorporation de *SPIO* dans le polymère de Tris-acryl décrit sa stabilité à long terme [Laurent2001] (chapitre.3, 3.2.1). Nous nous sommes donc servis de microsphères de Tris-acryl marquées comme témoins. Nous pouvons donc soumettre ces microsphères de Tris-acryl au modèle de drainage veineux. Nous comparons les mesures du signal du liquide de perfusion après pompage pour les microsphères de Tris-acryl avec celui des Hépasphères[™] de la série-1. Nous appliquons le même protocole de pompage et la même méthodologie de correction de mesures qui viennent d'être décrits.

Les résultats de cette étude se trouvent dans la section 4.1.3.3 (Comportement comparé de relargage des microsphères de Tris-acryl et des Hépasphères[™]).

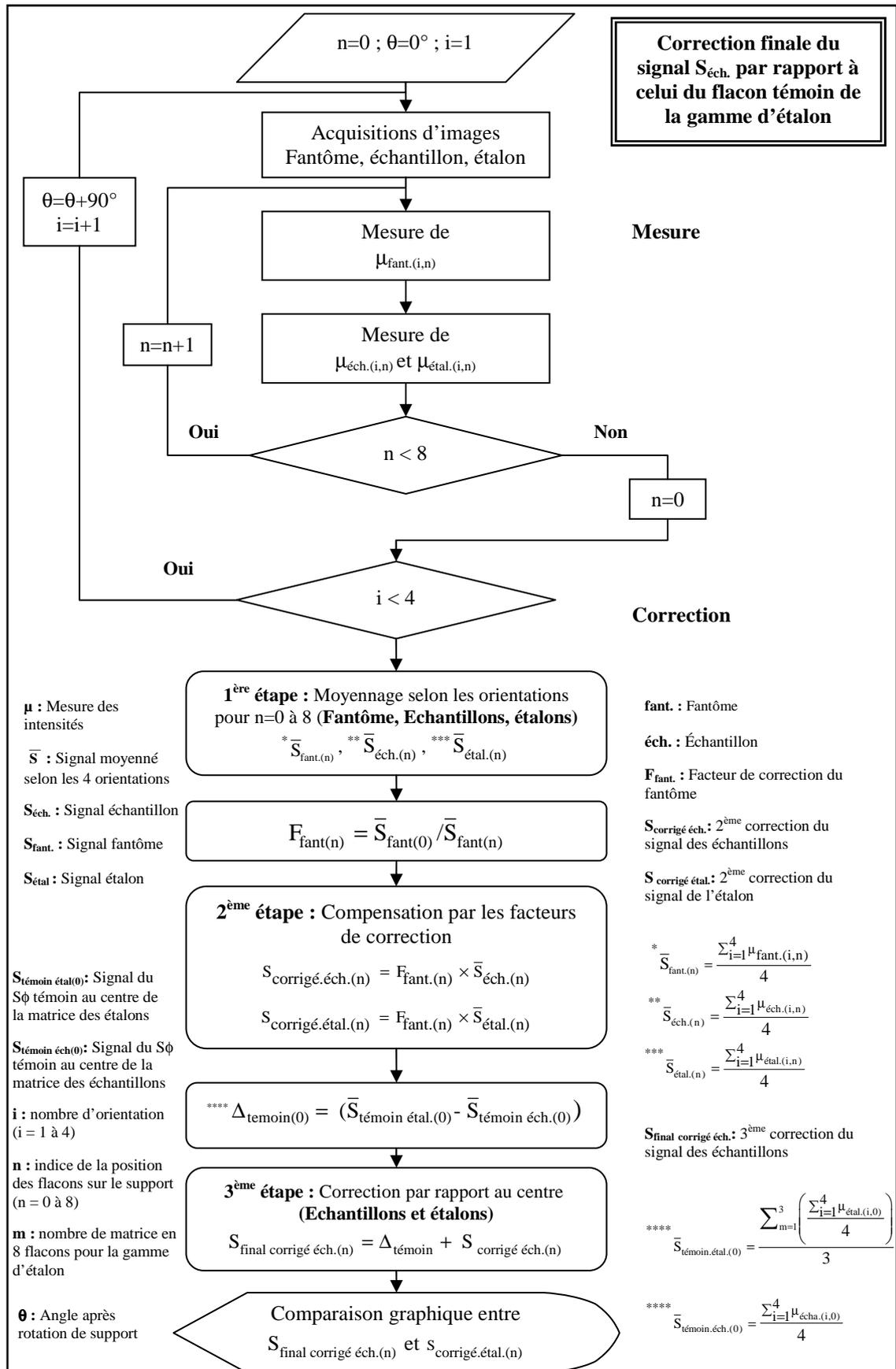


Figure 4-6 : Organigramme représentant les trois étapes de corrections de signal des échantillons pour quantifier précisément Endorem[®] libéré des Hépasphères[™] pendant les cycles de pompage.

4.1.3 Résultats et discussion

Les résultats sont regroupés et discutés dans les trois parties suivantes :

- Mesure directe du signal sur les Hépasphères™ (4.1.3.1).
- Mesure du signal du liquide de perfusion (4.1.3.2).
- Discussion des mesures sur le liquide de perfusion par rapport à la courbe étalon (4.1.3.3).

4.1.3.1 Hépasphères™

Les Hépasphères™ sont marquées par 500 µl d'Endorem®, soit une concentration volumique forte de 25%, leur signal prévisible sur la courbe étalon est donc très faible (Figure 45 b).

Après 8 heures de pompage, les Hépasphères™ sont toujours visibles sur les images *IRM* (Figure 47). On analyse ci-dessous de manière quantifiée les influences respectives du pH et de la température.

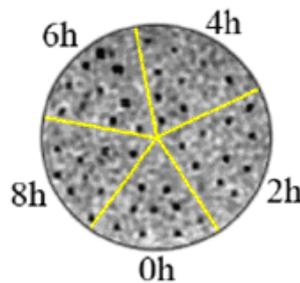


Figure 47 : Image T_1 pour des Hépasphères™ avant pompage, soit à 0 heure, et après quatre cycles de pompage, soit de 2 heures à 8 heures. Les Hépasphères™ sont réparties dans une boîte de Pétri, soit 10 microsphères par secteur.

a) Comparaison à pH6 et pH7

La Figure 48 représente le signal et le contraste gélatine-trous pour un groupe d'Hépasphère™ à pH6, et pour deux groupes à pH7, dénommés dans le texte pH7(1) et pH7(2). On note une évolution non significative du signal au cours du temps par rapport au signal avant pompage à 0h. Il y a légère tendance à la diminution de contraste gélatine-trous au bout de 8h, mais la variation du signal n'est significative contenant la constance de signal et de l'écart-type.

On relève par ces courbes la reproductibilité du signal au cours du temps.

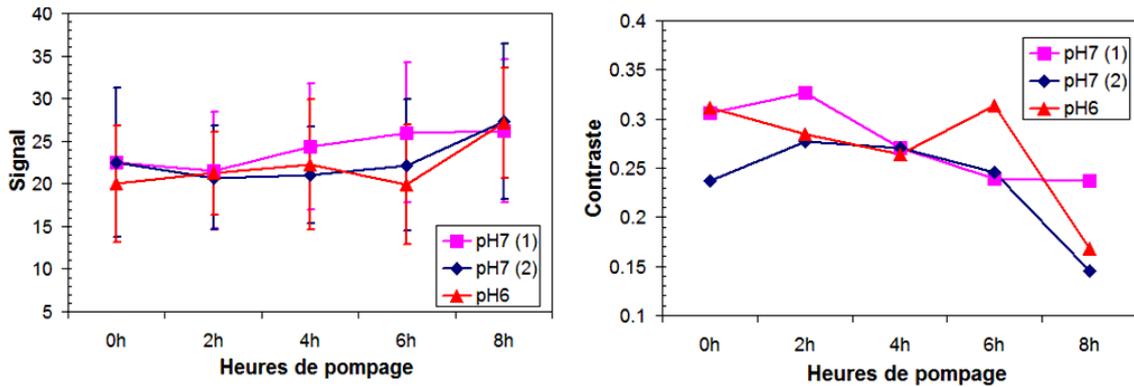


Figure 4-8 : Signal (à gauche) et Contraste gel-trous (à droite) pour des Hépasphères™ ayant subi quatre cycles de pompage à 37°C pour les pH7(1), pH7(2) et pH6.

b) Comparaison à des températures différentes

La dissociation étant réalisée à pH7, nous nous sommes intéressés à déterminer la variation relative du signal des Hépasphères™ $\Delta S/S$ en fonction de la température ΔT . La Figure 4-9 illustre les images $IRM T_1$ d'une boîte de Pétri contenant des Hépasphères™ marquées, après avoir été plongée dans l'eau à température 24°C (image à gauche) et à 37°C (image droite), température du corps humain. Les microsphères sont visibles quel que soit le nombre d'heures de pompage et la température du milieu.

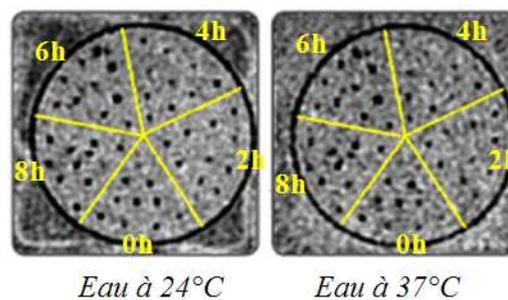


Figure 4-9 : Image T_1 des boîtes de Pétri après avoir été plongées dans l'eau à 24°C (à gauche) et 37°C (à droite). Ces boîtes contiennent des Hépasphères™ marquées avec l'Endorem® ayant subi 4 cycles de pompage à pH7.

Les allures des courbes du signal pour des Hépasphères™ plongées dans l'eau sont globalement semblables (mis à part un écart constant de $\approx 2,5$ fois l'intensité) (Figure 4-10). L'écart entre elles est lié à la variation de la température du milieu affectant le temps de relaxation T_1 de l'ensemble agent de contraste et microsphères, le signal des Hépasphères™ à 37°C est moins intense que celui des Hépasphères™ à 24°C. La variation relative moyenne du signal $\left| \frac{\Delta S}{S} \right| / \Delta T$ avant (à 24°C) et après (à 37°C) échauffement de l'eau est de l'ordre de 2%/°C (Tableau 4-1).

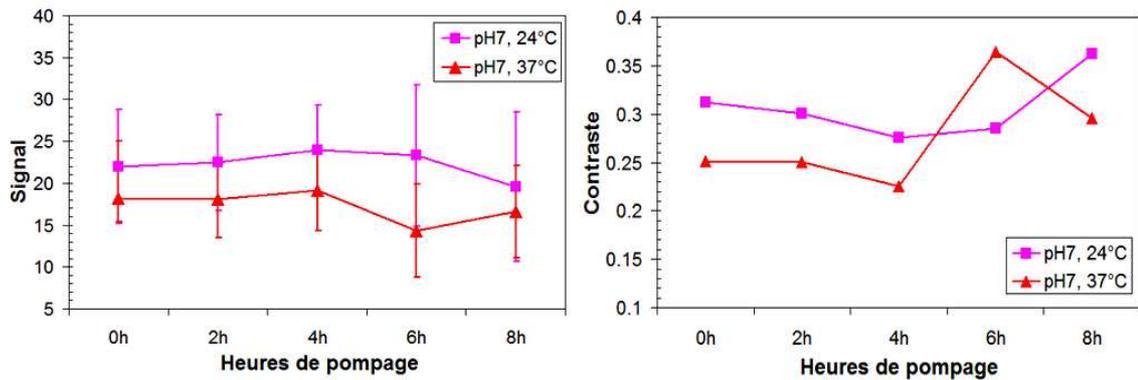


Figure 4-10 : Représentation du Signal des Hépasphères™ moyenné (à gauche) et Contraste trou-gélatine (à droite) à pH7 en fonction des heures de pompage et de la température.

Variation relative moyenne du signal			
Heures de pompage	$\bar{S}_{24^{\circ}\text{C}}$	$\bar{S}_{37^{\circ}\text{C}}$	$\left \frac{\Delta S}{\bar{S}} \right / \Delta T$
0h	22	18	1
2h	22	18	1
4h	24	19	2
6h	23	14	3
8h	19	17	1
			2%/°C
			Moyenne

Tableau 4-1 : Variation relative du signal des Hépasphères™ avant (à 24°C) et après échauffement (à 37°C) de l'eau où les boîtes de Pétri ont été plongées.

c) Stabilité du signal

L'interprétation de ces résultats signifie deux choses, soit qu'il n'y a pas de relargage, ou soit que celui-ci a été faible qui n'affecte pas le signal. Le dernier cas correspond au signal sur la courbe étalon pour une quantité d'Endorem® supérieure à 2%.

Une confirmation de ce résultat aurait été de refaire des épreuves de pompage avec des Hépasphères™ chargées avec une dose de SPIO de 1% et de 2%, c'est-à-dire proche de changement de comportement du signal sur la courbe étalon pour tenter de percevoir une variation du signal des Hépasphères™ marquées.

d) Limites de précision des mesures

Il existe plusieurs paramètres qui rendent imprécises les mesures du signal des Hépasphères™ :

- ROI sont très petites (moins de 1 mm²), et donc seuls quelques pixels émettent un signal mesurable.

- Volume partiel : bien que les Hépasphères™ soient toujours visibles sur les images *IRM*, elles peuvent appartenir complètement à un voxel ou au contraire se situer « à cheval », c'est-à-dire n'y appartenir que partiellement.
- Taille : Etant donné que les microsphères ne sont pas toutes de la même taille (600–800 µm), la quantité d'Endorem® absorbée par les microsphères n'est pas la même. En répartissant les microsphères dans les boîtes de Pétri, la discrimination entre les différents calibres est impossible. Les mesures dépendent de la distribution des tailles des microsphères qui n'est pas à priori homogène.
- Homogénéité du signal : même si la boîte de Pétri est petite (5 cm de diamètre), le signal des Hépasphères™ peut dépendre aussi du secteur de leur position.
- Hétérogénéité de la préparation : bien que les microsphères soient préparées en même temps, elles ne captent pas nécessairement la même charge d'Endorem®.
- Mauvais support : étant donné que les Hépasphères™ doivent rester dans du sérum physiologique, leur présence dans des boîtes de Pétri entre deux couches de gélatine peut entraîner une déshydratation et dégonflement suivi d'une perte d'Endorem®.

Comme les Hépasphères™ sont chargées avec une dose très importante de *SPIO*, les mesures du signal image-trous correspondent à un résultat peu concluant sur la libération du marqueur. Les mesures du signal image du liquide de perfusion nous semblent plus précises pour la quantification des traces de *SPIO* éventuellement libéré en repérant les valeurs obtenues sur la courbe étalon.

4.1.3.2 Liquide de perfusion

a) Première et deuxième étape de correction pour un pH6 et un pH7

La Figure 4-11 a et la Figure 4-11 b représentent l'intensité du signal image du liquide de perfusion, en fonction du temps à pH6 et pH7, après application de la première et deuxième étape de correction.

- Signal à pH7

Le signal est supérieur à celui du sérum physiologique aux deux premiers cycles de pompage, il diminue de 22% entre 2h et 6h de pompage, puis devient stable (Figure 4-11 a). Le contraste liquide de perfusion-sérum physiologique est élevé, soit 15% à 2h et 6% à 4h, et quasiment nul à 6h et 8h de pompage.

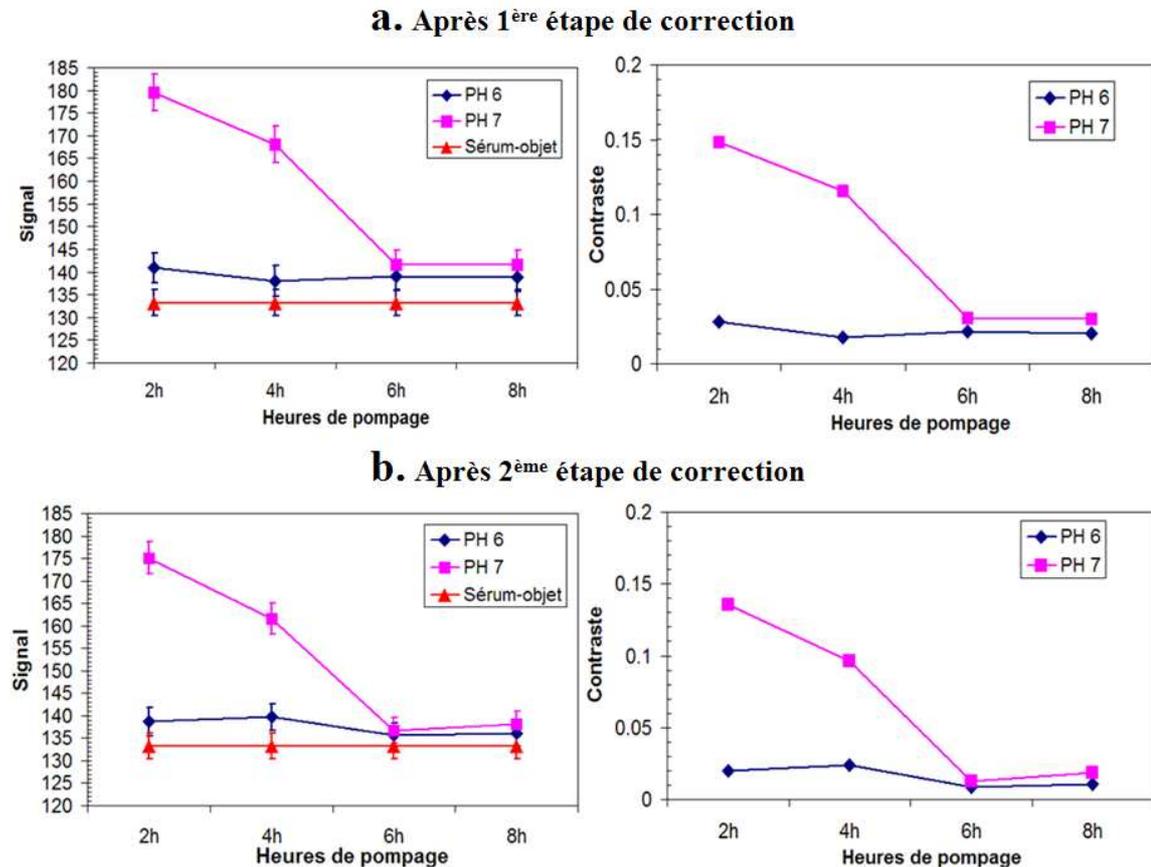


Figure 4-11 : Comparaison en fonction des heures de pompage, à pH6 et pH7, du signal du liquide de perfusion (à gauche) et du contraste liquide-sérum physiologique (à droite) pour les HépaspèresTM de la 1^{ère} étape de correction avec de la 2^{ème} étape. (a) 1^{ère} étape de correction : Signal moyenné dans les quatre orientations. (b) 2^{ème} étape : Signal moyenné et compensé par les facteurs de correction du fantôme.

On observe après la deuxième étape de correction du signal une diminution des écarts-type σ des intensités μ (Figure 4-11 b).

On déduit, d'après la courbe d'étalonnage (Figure 4-5 b) que, lorsque le signal est supérieur à celui du sérum physiologique et le contraste liquide de perfusion-sérum physiologique est important, une quantité d'Endorem[®] est faiblement libérée des HépaspèresTM. Un pourcentage de 0,05 à 0,5 vol./vol., présent et décelable dans le liquide de perfusion. Quand le signal est équivalent à celui du sérum physiologique le contraste devient nul après 6h de pompage ou au-delà, la dissociation n'est plus décelable avec notre approche et sans doute n'existe plus.

- *Signal à pH6*

Le signal du liquide après les 4 cycles de pompage est proche de celui du sérum physiologique. Le signal s'approche également de celui du sérum physiologique après utilisation des facteurs de correction. Le contraste du liquide par rapport au sérum physiologique est faible, il ne dépasse pas 3%. Nous pouvons donc dire dans un premier temps que le produit de contraste n'est pas présent dans le liquide de perfusion, dans les limites de précision de notre approche. La dissociation d'Endorem[®] est quasiment certainement faible voire nulle.

b) Reproductibilité à 37°C et à pH7

La reproductibilité du signal de liquide pour deux groupes d'Hépasphères[™] « pH7(1) et pH7(2) », marquées de façon similaire par l'Endorem[®], a été étudiée pour observer la dissociation pendant les deux premiers cycles de pompage, à pH7.

Les mesures du signal des deux liquides, obtenues après la première (Figure 4-12 a) et la deuxième étape de correction (Figure 4-12 b), montrent un rehaussement positif par rapport au signal du sérum physiologique aux deux premiers cycles de pompage. Elles deviennent ensuite similaires à celles du sérum physiologique pour les deux derniers cycles de pompage. L'allure des deux courbes au cours du temps est similaire et la différence entre elles a diminué de 16% à 10%, soit 6% à 4h de pompage après application de la 2^{ème} étape de correction.

On constate une différence de relargage non négligeable pendant les quatre premières heures de pompage. Ceci a vraisemblablement pour origine l'hétérogénéité dans la distribution de la taille et de la charge des Hépasphères[™].

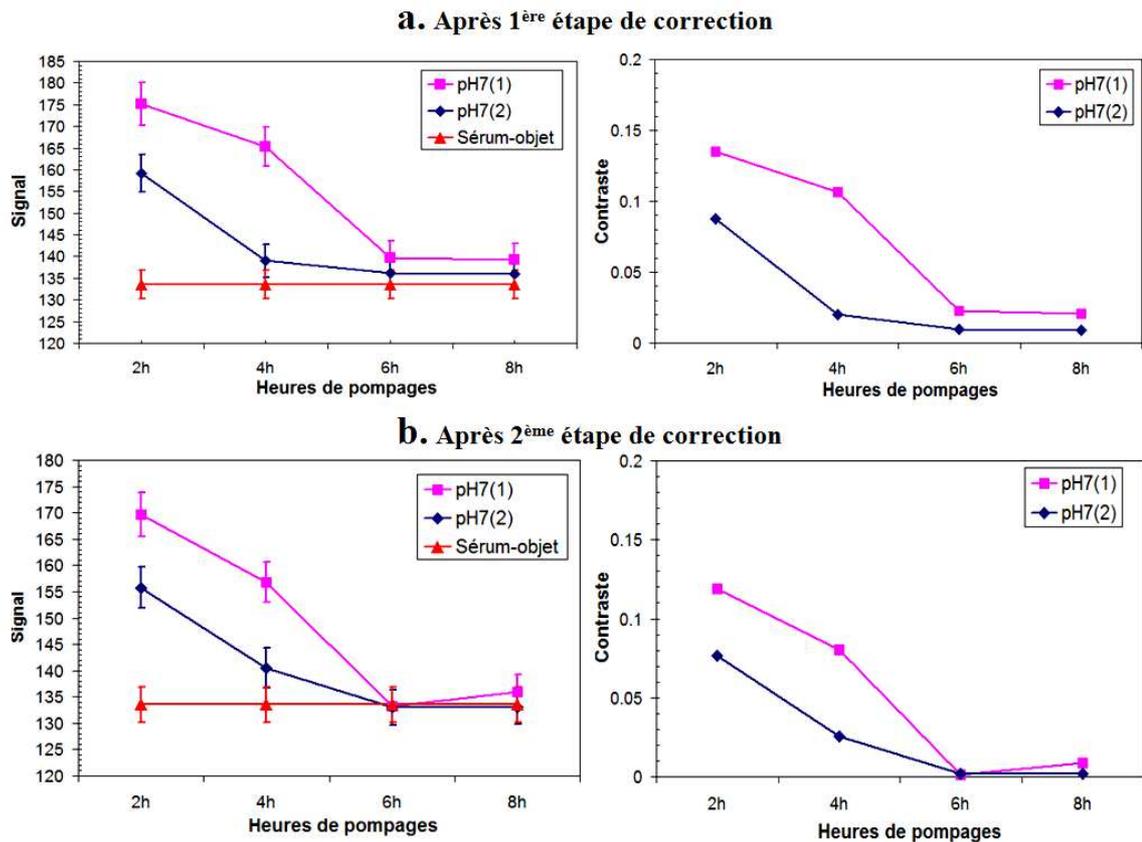


Figure 4-12 : Reproductibilité, à pH7, du signal de liquide de perfusion (à gauche) et du contraste liquide-sérum physiologique (à droite) pour deux groupes d'Hépasphères™ : pH7(1) et pH7(2). (a) et (b) correspondent aux signaux corrigés par la 1^{ère} et 2^{ème} étape de correction.

4.1.3.3 Discussion

La simulation de notre modèle apparenté à un environnement tumoral, avec deux pH différents indique d'après nos mesures une différence de contraste entre le liquide de perfusion et le sérum physiologique à pH7 et à pH6. Cette différence est élevée à 2h et 4h de pompage, soit 14,8% et 11,5%, et faible ensuite, soit 2,5%.

A pH7, milieu neutre, on observe une dissociation d'Endorem®. A pH6, au contraire, on n'observe pas de libération du produit de contraste. Pour un milieu légèrement acide, la présence des ions H⁺ affecte soit directement les microsphères, soit l'agent de contraste libéré, soit les deux en même temps. On peut en effet imaginer que l'acidité du milieu d'une part modifie les propriétés des Hépasphères™ d'une part et d'autre part annule le signal provenant de l'Endorem® libéré. Ce phénomène suggère une analyse du rôle du pH.

Pour limiter les hypothèses, nous étudions dans un premier temps le signal d'une solution d'Endorem® préparée à deux pH différents, pH6 et pH7. Nous analysons à pH7

le comportement respectif de microsphères de Tris-acryl et Hépasphères™ pour savoir s’il se produit le même type de relargage.

- *Influence du caractère ionique du milieu sur l’agent de contraste*

Les ions H^+ peuvent ils séparer les molécules de Dextran des nanoparticules d’oxyde de Fer (Fe_2O_3) ? Le changement des propriétés physiques du marqueur peut-il affecter ses propriétés magnétiques ainsi que le signal du milieu où il se trouve ?

Deux groupes de solutions à pH6 et pH7 dans lesquelles sont diluées trois quantités d’Endorem®, soit 0,025%, 0,05% et 3,75% v/v, dans du sérum physiologique, soit 99,975%, 99,95% et 96,25% v/v. Nous obtenons finalement 3 flacons par pH et un flacon témoin de sérum physiologique au centre de la matrice.

Pour imager les flacons et mesurer ensuite le signal, nous appliquons la même méthode que précédemment, avec les flacons disposés sur le support, les conditions d’acquisitions et la méthodologie de correction des mesures de la Figure 44.

La Figure 413 représente les résultats pour une image T_1 (Figure 413 a) et le signal (Figure 413 b) pour les deux groupes d’Endorem®. Les 3 flacons en haut et en bas de l’image T_1 correspondent respectivement au premier groupe de 3 solutions d’Endorem® à pH7 et au deuxième groupe à pH6. Les concentrations d’Endorem® (% volumique) sont notées près de chaque flacon de l’image T_1 . Les notations en couleurs orange et verte représentent le groupe-1 (pH7) et le groupe-2 (pH6). La notation en bleue au milieu correspond au flacon du sérum physiologique. Le signal est représenté en fonction de la concentration d’Endorem® et du pH du milieu.

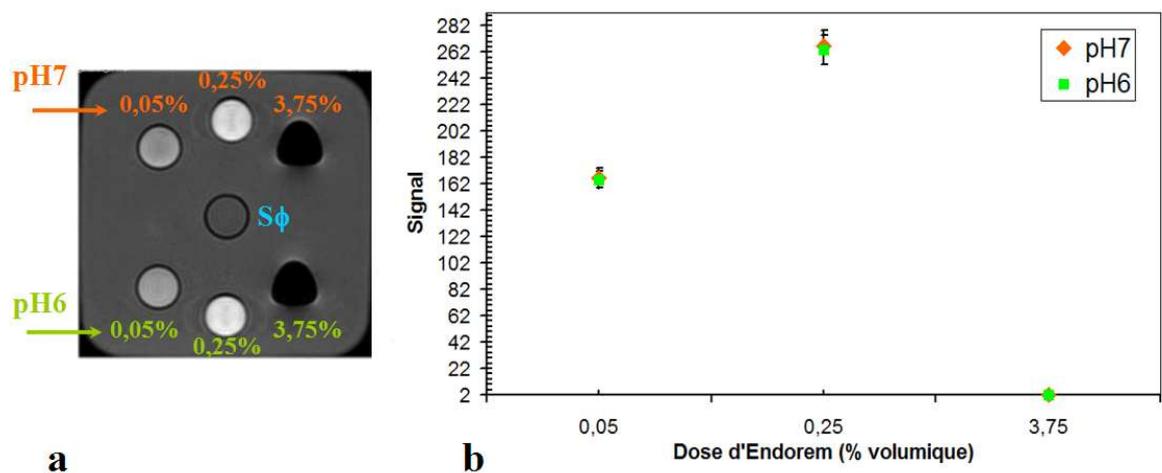


Figure 4-13 : (a) Image IRM T_1 de deux groupes de solution correspondant à trois concentrations d’Endorem® (0,05%, 0,25%, 3,75%) diluées dans du sérum physiologique à pH6 (flacons en bas de l’image) et à pH7 (flacons en haut de l’image). (b) Signal des solutions à pH6 et pH7.

Les valeurs affectées aux signaux correspondant aux deux pH se superposent. Donc, la différence de pH ne modifie pas le signal des liquides préparés, comme elle n'affecte donc pas le liquide de perfusion. Nous en concluons que le faible écart entre le signal image du liquide de perfusion à pH6 et le signal du sérum physiologique sur le modèle utilisant le pompage a pour origine un moindre relargage de l'Endorem[®] des Hépasphères[™] ou autrement dit, une meilleure fixation de l'Endorem[®] sur les Hépasphères[™] à pH6. Nous explorons alors la deuxième hypothèse à pH7.

- *Comportement comparé de relargage des microsphères de Tris-acryl et des Hépasphères[™] à pH7*

Le relargage d'Endorem[®] par les Hépasphères[™] à pH7 est comparé à celui des microsphères de Tris-acryl au même pH par la mesure du signal du liquide de perfusion et le contraste par rapport au sérum physiologique. Ceci est illustré par la Figure 4-14 au cours de la première et la deuxième étape de correction. On observe un écart quasiment nul entre le signal des microsphères de Tris-acryl et celui du sérum physiologique à toutes les heures de pompage tandis qu'il est important pour les Hépasphères[™] à 2h. On constate une différence de contraste entre le liquide de perfusion et le sérum physiologique pour les microsphères de Tris-acryl et les Hépasphères[™]. Il ne dépasse pas 2% pour les microsphères de Tris-acryl tandis qu'il est égal à 9% pour les Hépasphères[™].

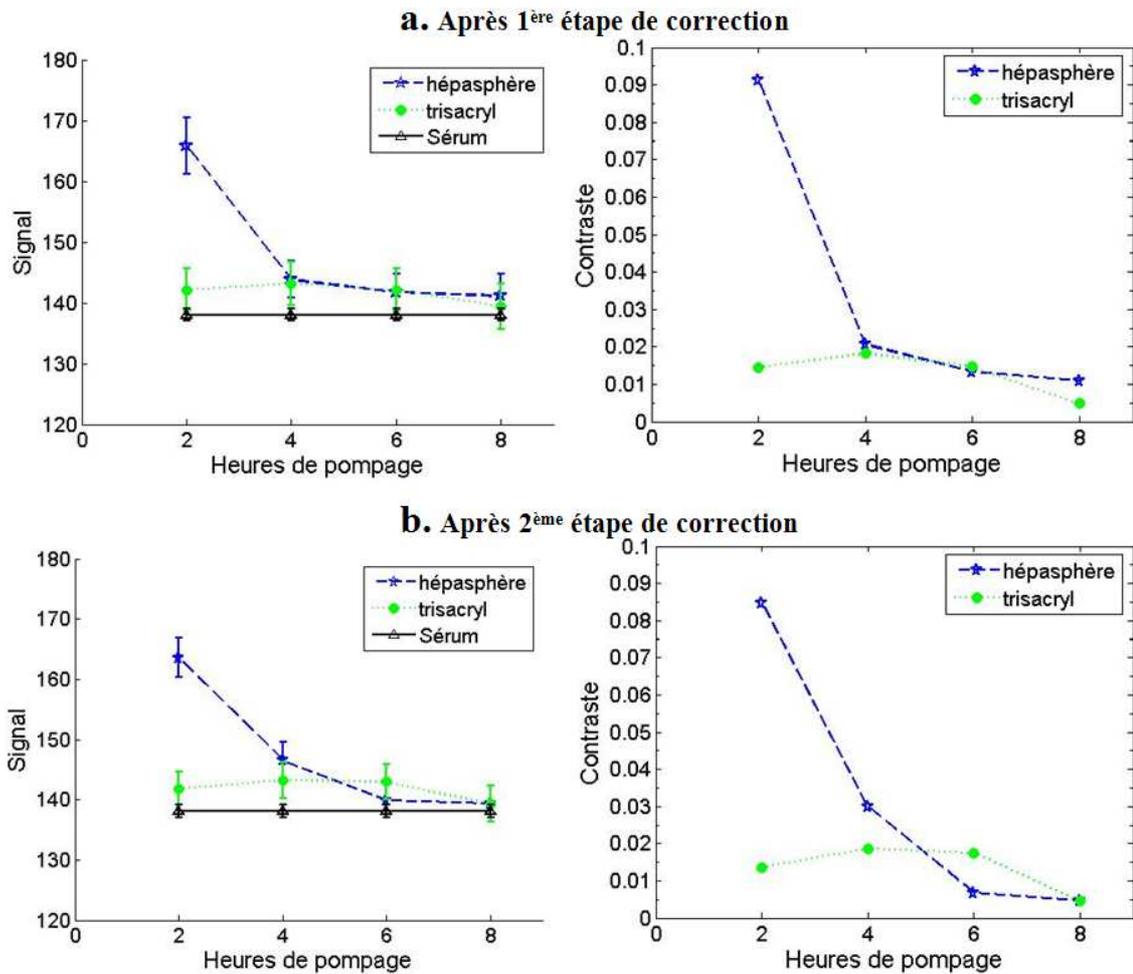


Figure 4-14 : Comparaison, à pH7 et à 37°C, du signal du liquide de perfusion (à gauche) et contraste liquide de perfusion-sérum physiologique (à droite) pour les HépaspèresTM avec ceux pour les microsphères de Tris-acryl marquées avec l'Endorem[®]. (a) correspond aux signaux corrigés par la 1^{ère} étape de correction et (b) par la 2^{ème}.

On remarque au cours de la deuxième étape de correction une diminution des écarts-type du signal mesuré. Ce dernier s'ajuste progressivement à celui du sérum physiologique, à 6h et 8h de pompage.

La stabilité du signal et du contraste pour des microsphères de Tris-acryl durant les quatre cycles de pompage prouve que les particules de produit de contraste sont durablement fixées sur le polymère du gel de Tris-acryl, l'Endorem[®] n'existant pas (ou très peu) dans le liquide de perfusion. Par contre, l'écart entre les courbes pour les deux types de microsphères, à 2h et 4h de pompage, confirme la dissociation d'Endorem[®] des HépaspèresTM et sa présence dans le liquide de perfusion.

Nous interprétons la dose de l'Endorem libéré, à pH7, dans le liquide d'après la courbe d'étalon.

Les Figure 4-15 (a et b) représentent les courbes étalons d'Endorem® sur lesquelles nous avons repéré les valeurs du signal du liquide de perfusion pour deux groupes d'Hépasphères™, pH7(1) et pH7(2). Ces valeurs correspondant à 2h, 4h, 6h et 8h de pompage, sont obtenues après la 3^{ème} correction du signal mesuré (organigramme de la Figure 4-6). A 6h et 8h, le signal du liquide se superpose avec celui du sérum physiologique.

Nous avons divisé la courbe étalon en trois zones :

- **Zone I** : doses d'Endorem® inférieures à 0,1% ;
- **Zone II** : doses d'Endorem® comprises entre 0,1 et 2% ;
- **Zone III** : doses d'Endorem® supérieures à 2%.

Les équivalences en volume (µl) de ces doses sont illustrées par le (Tableau 4-2).

Description		$\bar{S}_{\text{éch.}(n)}$	Contraste Echantillons-Sφ témoin	% Endorem*	Endorem (µl) (%Endorem × 20ml)	
pH7(1)	2h zone I	194	0,18	0,05	10	
	zone II	194		0,43	86	
	4h zone I	180	0,14	0,05	10	
	zone II	180		0,46	92	
	6-8h	zone I	154	0,07	0,04	8
		zone II	154		0,53	106
pH7(2)	2h zone I	180	0,14	0,05	10	
	zone II	180		0,46	92	
	4h	zone I	162	0,09	0,04	8
		zone II	162		0,50	100
	6-8h	zone I	156	0,07	0,04	8
		zone II	156		0,5	100

*% d'Endorem dans 20 ml de sérum physiologique circulant dans le circuit

Tableau 4-2 : Volume et dose d'Endorem® libéré correspondant aux signaux du liquide de perfusion repérés respectivement sur la courbe étalon dans les deux zones I et II.

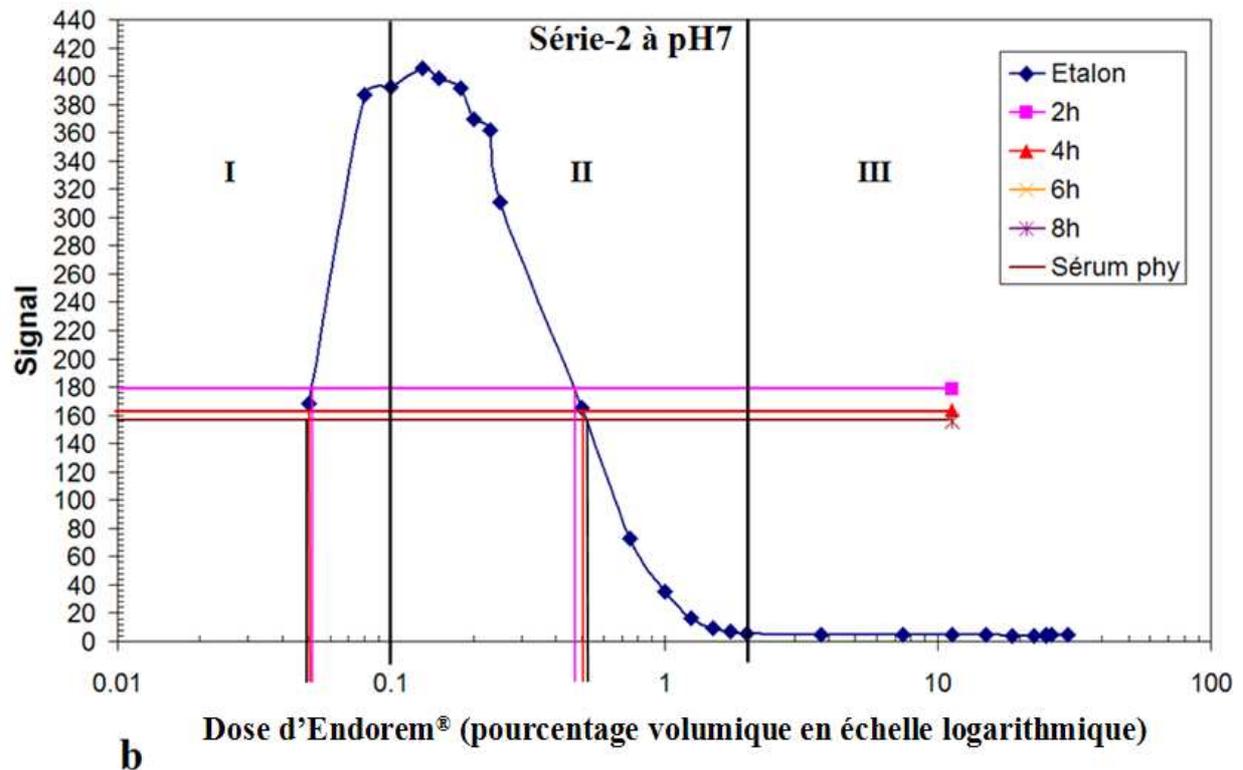
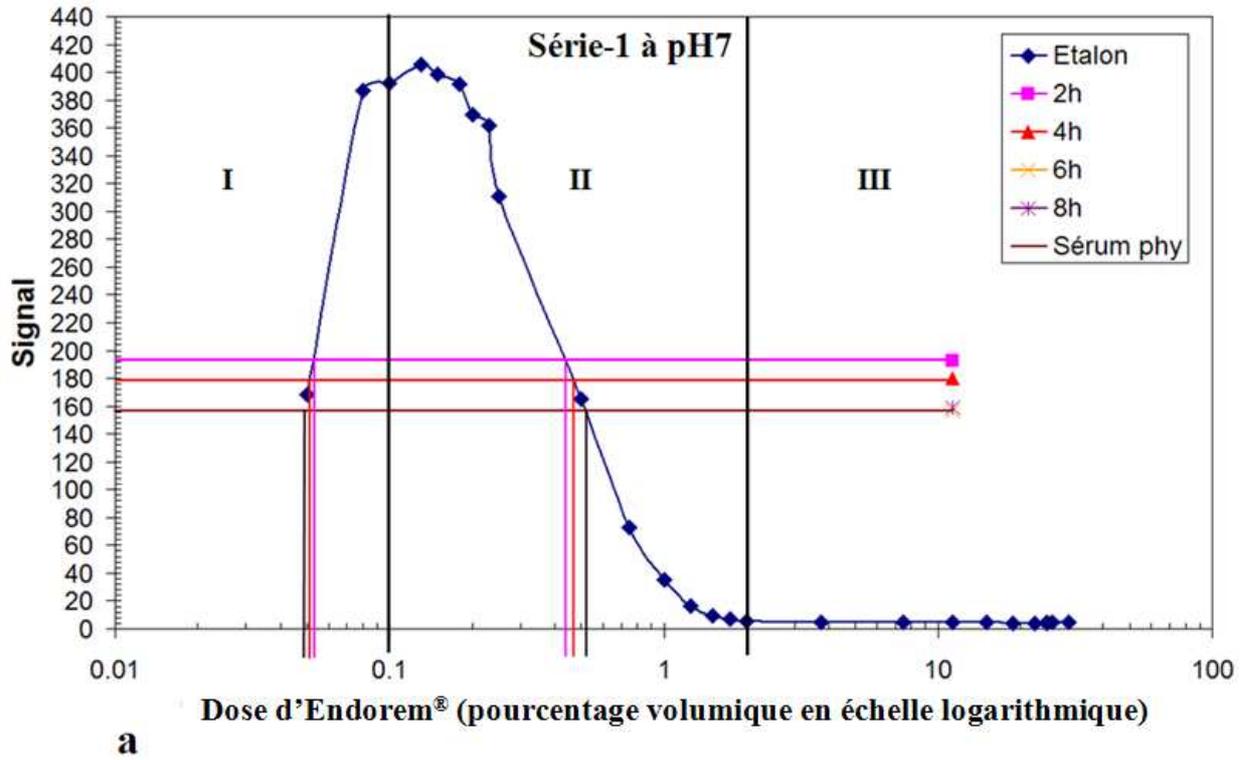


Figure 4-15 : Graphes démontrant la reproductibilité de la quantité d'Endorem® libérée pour deux groupes d'Hépasphères™, (a) pH7(1) et (b) pH7(2), en repérant sur la courbe étalon les signaux du liquide de perfusion corrigés d'après l'organigramme de la Figure 4-6.

Pour chaque valeur de signal repérée sur la courbe étalon correspondent deux doses différentes possibles appartenant respectivement aux zones **I** et **II**. Pour connaître la dose réelle correspondant au signal mesuré dans la zone convenable, nous procédons en deux étapes :

- Etudier l'évolution du signal pendant le pompage ;
- Comparer la couleur du liquide de perfusion à celle des deux groupes de solutions d'Endorem[®] dilué, soit un groupe à 0,04% et 0,05% de dose appartenant à la zone **I**, soit un autre groupe à 0,43% et 0,53% de dose appartenant à la zone **II**.

Sur la Figure 4-12, le signal du liquide de perfusion diminue pendant le pompage, nous constatons une diminution simultanée du signal vers celui du sérum physiologique dans la zone **I** et **II** de la courbe étalon. Les quantités d'Endorem[®] dissociées des Hépasphères[™] sont dans l'ordre croissant en zone **II** (0,43, 0,46 et 0,53%) et décroissant en zone **I** (0,05, 0,05, 0,04%) de la courbe étalon. Etant donné que le signal du liquide de perfusion pour les deux séries d'Hépasphère[™], pH(1) et pH7(2), convergent à 6h et 8h de pompage avec celui du liquide de perfusion pour les tris-acryl, la quantité d'Endorem[®] dissociée des Hépasphères[™] est nécessairement dans l'ordre décroissante, donc une concentration faible de la zone **I**.

En comparant la couleur du liquide de perfusion avec celle des deux groupes de solution d'Endorem[®] dilué, nous observons à 2h et 4h de pompage une correspondance de couleurs avec les couleurs du groupe à 0,04% et 0,05% d'Endorem[®] (Figure 4-16). L'histogramme de la Figure 4-17 représentant le nombre de pixel par les niveaux de gris quantifie la différence entre les doses d'Endorem[®]. Ce que nous observons une dose de la zone **I**.

Les deux arguments convergent vers des doses appartenant respectivement sur la courbe étalon à la zone **I**.

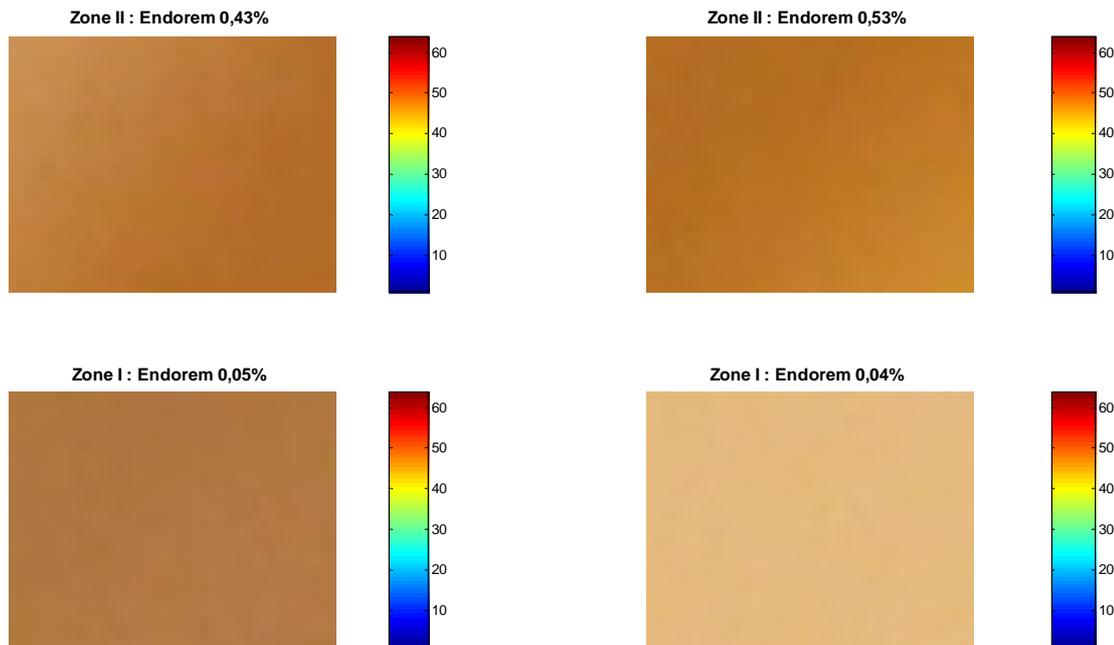


Figure 4-16 : Photos numériques avec échelles de couleurs de quatre solutions d'Endorem[®] de concentrations appartenant respectivement à la zone I et II de la courbe étalon. Zone I : 0,05% et 0,04% d'Endorem[®] et zone II : 0,43% et 0,53% d'Endorem[®].

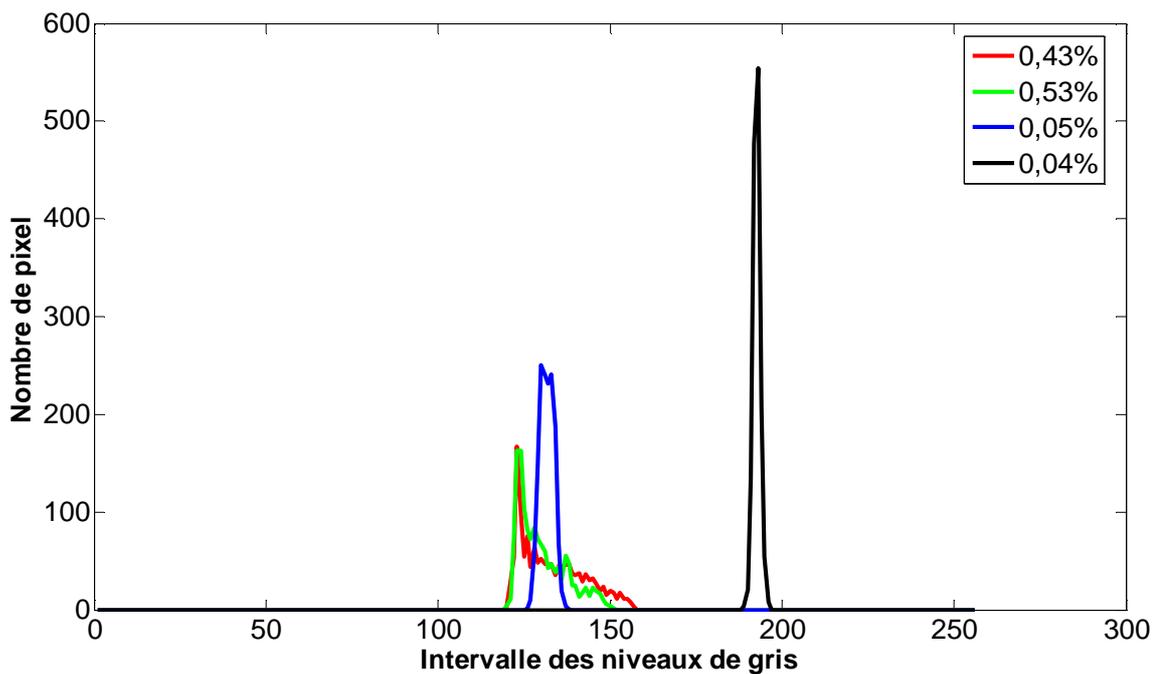


Figure 4-17 : Histogramme représentant le nombre de pixel par les niveaux de gris pour 4 solutions de concentrations différentes en Endorem[®]. Faibles concentrations : 0,05% et 0,04%; Fortes concentrations : 0,43% et 0,53%.

Pour 2h et 4h de pompage pour la série pH7(1) ou pH7(2), le volume approximatif d'Endorem[®] dans le liquide de perfusion est de 21 μ l (Tableau 42). Avec une charge initiale de 500 μ l dans les HépasphèresTM on peut dire que le volume résiduel est de l'ordre de 479 μ l ce qui correspond environ à 24%. On constate que pour une

telle quantité appartenant à la zone III de la courbe étalon, le signal d'Hépasphère™ saturé ne peut pas évoluer pendant le pompage.

L'absence d'Endorem® dans le liquide de perfusion à 6h et 4h de pompage pourrait dépendre du comportent spongieux des Hépasphères™. En exerçant des dépressions consécutives, les Hépasphères™ se dégonflent et se déforment légèrement au cours du temps. Le temps de repos entre chaque deux heures de pompage, permettant de prélever le liquide de perfusion et de rajouter de nouveau 20 ml de sérum physiologique, n'est pas suffisant pour que les Hépasphères™ reprennent leur taille initiale. Le dégonflement consécutif au cours du temps aboutissant à la diminution de la taille des pores pourrait empêcher la libération des particules d'agent de contraste. Par conséquent, à 6h et 8h de pompage, la présence de l'Endorem® dans le liquide de perfusion est nulle et les microsphères sont toujours visibles à l'IRM (Figure 49).

4.1.4 Conclusion : confrontation du signal du liquide prélevé et celui des Hépasphères

Une chose est sûre dans cette étude est que les Hépasphères™ sont visualisables à l'IRM quelque soit le nombre d'heure de pompage et le pH du milieu. Cette étude a démontré la durabilité de la présence de l'Endorem® dans les Hépasphères™ en fonctions de trois paramètres dont les ordres de grandeurs correspondent à ceux de la physiologie tumorale : la température, le pH et le débit sanguin tumoral. Elle a aussi révélé leur comportement sous l'influence d'un flux de sérum physiologique simulant de drainage veineux quand elles sont chargées par différentes molécules.

En étudiant le signal du liquide de perfusion, nous avons déterminé que les Hépasphères™ perdent de l'agent de contraste dans les premières heures de pompage, uniquement à pH7, puis atteignent une stabilité. Le signal du liquide de perfusion devient alors très proche de celui du sérum physiologique témoin. Cette stabilité démontre que les microsphères après plusieurs heures, ne libèrent plus d'agent de contraste. Une libération quasiment nulle de l'agent de contraste à pH6 indique que les Hépasphères™ peuvent être modifiées par un faible abaissement du pH du milieu. La correspondance avec la courbe étalon nous a permis de réaliser des mesures indiquant l'existence d'une perte de marqueurs dans les premières heures. Il est ressorti,

qu'après 4h de pompage, environ 20 µl dissociés à partir de 500 µl d'Endorem[®] se retrouvent dans le liquide de perfusion pour un débit de 10 ml/min. La libération au bout à 6h et 8h de pompage n'a pas été décelée (Tableau 4-2). Etant donné que le débit tumoral est de 2,4 ml/min, l'équivalent de libération des marqueurs (pour 4h de pompage) conduit à environ 5 µl d'Endorem[®], soit 1% de la dose au départ.

Enfin, nous constatons que le procédé de 4h de pompage préalable ainsi mis en place conduit à des Hépasphères[™] visibles sous la forme des trous noirs dans les images *IRM* et qui ne relarguent pas. La méthodologie de correction proposée a permis de réduire les effets des défauts d'intensité selon la position, et a également apporté à nos mesures du signal image du liquide de perfusion une précision permettant la quantification des traces de produit de contraste relargué.

4.2 Greffage des immunoglobulines sur les Hépasphères[™] avec et sans marqueur

L'adressage ou délivrance spécifique de molécules thérapeutiques vers un organe, un tissu ou une cellule malade constitue aujourd'hui un défi majeur pour le traitement des maladies humaines, notamment infectieuses, cancéreuses ou d'origine génétique.

La vectorisation est une technique permettant d'amener, grâce à un vecteur, microsphères ou microcapsules par exemple, une entité, un principe actif, à un endroit précis où son effet est désiré, autorisant ainsi une action ciblée. Le contenu des vecteurs peut être libéré mécaniquement par un stimulus externe (pH, force ionique, champ magnétique et électrique, thermique et irradiation par des ultrasons), par biodégradation d'un polymère dans l'organisme ou par diffusion à travers les pores du gel ou les chaînes du polymère.

La vectorisation a plusieurs objectifs, tels que l'augmentation de la solubilité du principe actif, la modification de sa distribution et la diminution de sa toxicité par augmentation de sa concentration uniquement au niveau de son site d'activité. De nombreux principes actifs présentent des caractéristiques physico-chimiques (hydrophiles, poids moléculaires, etc.) peu favorables au passage des barrières biologiques qui séparent le site d'administration du médicament de son site d'action. D'autres molécules actives se heurtent aussi à des barrières enzymatiques entraînant

leur dégradation et métabolisation rapides. D'une manière générale, il faut noter que les barrières à traverser sont des systèmes très complexes faisant intervenir plusieurs éléments, –épithélium, endothélium, membrane cellulaire–, et plusieurs composantes, –barrières mécaniques et physico-chimiques et barrières enzymatiques–. Sans délivrance locale spécifique, l'obtention de concentrations efficaces en thérapeutique au niveau du site d'action ne peut donc se faire qu'au détriment d'une importante perte de médicament vers d'autres tissus ou cellules, ce qui occasionne des effets toxiques importants et parfois rédhibitoires, pouvant entraîner par exemple, l'abandon du traitement par ce médicament en dépit de son efficacité.

4.2.1 Objectif

Bien que l'embolisation artérielle occupe la partie essentielle de cette thèse, nous pensons que ce genre de thérapie ne peut pas mettre fin à la tumeur sans qu'elle soit combinée à un principe actif.

Nous rappelons que la croissance tumorale dépend fortement de la mise en place d'un réseau vasculaire. Il est réalisé par le mécanisme d'angiogénèse, après sécrétion par les cellules cancéreuses des facteurs de croissance pro-angiogéniques (VEGF et FGF...) agissant sur les cellules endothéliales des vaisseaux situés à proximité d'une tumeur et favorisant ainsi le bourgeonnement de néovaisseaux. Il est indiqué que l'hypoxie relative, près du centre de la tumeur, due à la compression cellulaire est un stimulateur tumoral puissant aboutissant à une expression accrue de VEGF [Scott1998]. Le même cas est observé après embolisation d'une tumeur. Li, Xiong et Kim [Li2004, Xiong2004, Kim2001] ont déterminé d'après des études cliniques, concernant la chimioembolisation de carcinomes hépatocellulaires (CHC), que les cellules tumorales résiduelles viables sont stimulées pour sécréter davantage de VEGF sous l'effet de l'augmentation de l'hypoxie. Par conséquent, le taux du VEGF dans le plasma après embolisation augmente significativement.

Le facteur VEGF apparu comme étant des régulateurs clés de l'angiogénèse a la faculté d'agir directement sur les récepteurs des cellules endothéliales vasculaires [Fayette2004, Hicklin2005]. L'action du facteur VEGF peut être interrompue par un certain nombre de produits à disposition en phase clinique, comme l'Avastin® (Bevacizumab ou RhuFab), approuvé par le FDA (Food and Drug Administration) en

tant qu'agent purement anti-angiogénique. C'est un anticorps monoclonal¹ humain (anti-VEGF) qui se lie au VEGF, l'empêchant de se lier à son récepteur. Son efficacité a été prouvée pour le traitement du cancer du colon et du rectum. Dans ce cas, les cellules endothéliales ne sont plus stimulées, et par conséquent la néo-vascularisation ne se développe plus ce qui évite la métastase tumorale [Jain2001].

Dans cette section, nous proposons une nouvelle stratégie ayant pour but final d'associer deux procédures de traitement anticancéreux : couplage des anti-VEGF « anticorps monoclonaux » à des agents d'occlusion vasculaire, comme les HépasphèresTM. Nous avons démontré la faisabilité de leur marquage et repérage par *IRM*. Le couplage direct proposé éviterait que des anti-VEGF soient libérés dans le sang, en raison de leur convection rapide dans le flux ou leur diffusion dans les régions à proximité de la tumeur. L'action finale de cette stratégie est de combiner les effets de l'occlusion marquée par *SPIO* à ceux d'une distribution locale d'anti-VEGF en plaçant « tout ça ensemble » sur les mêmes supports d'embolisation.

Pour des raisons économiques, nous n'avons pas utilisé l'anticorps monoclonal anti-VEGF dans notre travail, celui-ci étant trop cher. La mise au point des essais de couplage a été réalisée avec des anticorps (immunoglobuline) polyclonaux² de rats puis des anticorps monoclonaux anti-DPN (*para*-dinitrophényl) de type immunoglobuline 1 (IgG1) identique à celui de l'anticorps anti-VEGF.

La stratégie proposée a un double intérêt : Une fois le couplage IgG-Hépasphères-marquées réalisé, nous devrions pouvoir repérer simultanément par *IRM* l'ensemble microsphères-anticorps. Nous aurions ainsi des informations sur la localisation des anticorps dans le réseau vasculaire tumoral. En utilisant des agents d'occlusion vasculaire permanents chargés avec des anti-VEGF, la tumeur serait privée d'oxygène et de nutriments, mais on pourrait supposer également que le relargage de VEGF, serait inhibé sur le site même de sa production et alors tenter de le vérifier.

4.2.2 Procédures de couplage IgG–Hépasphères

L'immunoglobuline IgG1 est un anticorps (Ac) monoclonal anti-DNP (anti-dinitrophénol) et son antigène (Ag) est le DNP (dinitrophénol). La structure, les classes et la nature des anticorps sont détaillées dans l'annexe E. Comme l'anticorps est une

¹ Anticorps monoclonal : Anticorps ne reconnaissant qu'un seul type d'épitope (déterminant antigénique) sur un antigène donné.

² Anticorps polyclonaux : Anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné.

molécule protéique, il possède donc deux fonctions chimiques, amine “NH₂” et acide carboxylique “COOH”. En revanche, le polymère des HépasphèresTM est constitué de 40% d’acrylate de sodium (fonction hydroxyle : OH) et de 60% d’alcool polyvinylique (fonction carboxylique : COOH). La fonction hydroxyle et carboxylique sont une bonne cible pour le couplage.

4.2.2.1 Conditions pour la réaction de couplage

Le greffage d’une entité biologique sur une autre entité, support ou autre molécule, peut se faire par deux genres d’association moléculaire, covalent ou non-covalent c’est-à-dire-à caractère ionique.

Le greffage covalent d’une entité biologique permet d’obtenir des biomolécules, polymères ou autres, stables, utilisables en diagnostic ou en thérapie. Toute modification chimique d’une molécule issue du vivant, et c’est tout particulièrement vrai pour les protéines, peut être considérée comme une altération de l’intégrité de cette dernière, ce qui peut se traduire par des pertes d’activité biologique. Pour éviter ce problème, il faut que les réactions chimiques impliquées dans le greffage aient lieu à des positions prédéfinies sur la protéine, c’est-à-dire dans des sites de la biomolécule qui ne soient pas impliqués dans les processus de reconnaissance macromoléculaire constitutifs de la spécificité des enzymes, des antigènes ou des anticorps.

Une alternative pour pallier cet inconvénient réside dans l’association non-covalente entre la biomolécule et le polymère.

Le premier volet de ce travail concerne la mise au point du greffage d’anticorps polyclonaux sur les HépasphèresTM afin d’optimiser ces réactions et avoir une idée du taux de greffage. Ces réactions ont été ensuite transposées à des anticorps monoclonaux afin de vérifier si ces modifications chimiques ont perturbé les propriétés immunologiques de l’anticorps.

Enfin, l’étude de la stabilité du système Hépasphère-anticorps dans un fluide circulant, sera abordée.

Ce travail a été réalisé en coopération avec des biochimistes de l’Université de Technologie de Compiègne [Doumiati2007], toutefois nous ne détaillerons pas les procédures et les essais de couplage entre les IgG et les HépasphèresTM ainsi que les tests

de dosage. Nous soulignerons uniquement dans l'annexe F la technique principale pour chaque méthodologie de couplage, de dosage et les matériels adaptés à cette étude.

4.2.3 Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de génie enzymatique et cellules (UMR 6022), la plupart des matériels utilisés appartiennent à ce laboratoire. Ils sont récapitulés dans l'annexe F par le Tableau F-1.

Les méthodes réalisées dans ce travail concernent d'abord les essais de couplage covalent et non-covalent (adsorption physique) entre une protéine modèle, l'albumine de sérum de bœuf (BSA), et les HépasphèresTM. Ensuite, ces essais sont transposés à l'avidine et les *IgG* (section 4.2.2.1 et annexe F).

Ces méthodes se rapportent au dosage :

- Des *IgG* biotinylées (degré de biotinylation des *IgG*), avant d'être couplées aux HépasphèresTM, par changement de l'absorbance (A) du réactif HABA-avidine à 500 nm. Cette méthode de dosage consiste à mesurer d'abord l'absorbance du réactif HABA-avidine seul, à 500 nm. Ensuite, l'absorbance est déterminée pour l'ensemble : réactif HABA-avidine avec l'échantillon (*IgG*-biotine). La différence d'absorbance ΔA_{500} entre le complexe avidine-HABA et HABA-avidine plus échantillon est calculée. La quantité de biotine/ml de solution est déterminée d'après la formulation suivante : $(\Delta A_{500}/34) \times 10$ dans laquelle, 34 est le coefficient d'extinction molaire de la biotine ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et 10 est le facteur de dilution de l'échantillon dans la cuve.

Le degré de biotinylation d'*IgG* est obtenu par le rapport suivant : micromoles de biotine (dans 1 ml d'échantillon) / micromoles de protéine (dans 1 ml d'échantillon).

- Des *IgG* couplées aux HépasphèresTM en mesurant l'absorbance à 410 nm par le test ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay). Celui-ci consiste à ajouter aux microsphères marquées par l'anticorps monoclonal biotinylé, existant dans des puits, des anti-*IgG* marquées à la peroxidase. La reconnaissance de l'*IgG* par l'anti-*IgG* donne une coloration verte après 15 à 30 minutes (à l'obscurité).

- D'une Protéine modèle, l'albumine de sérum de bœuf (BSA), se présentant dans les eaux de lavage des échantillons (Hépasphères™ marquées par la BSA). Il repose sur la capacité qu'a le sulfate de cuivre (CuSO_4) à libérer des ions Cu^{2+} en présence de certains acides aminés spécifiques. Les ions cuivreux se lient aux molécules d'acide bicinchoninique (BCA) pour former un complexe de couleur violette. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la quantité des protéines présentes. Une gamme étalon permet l'établissement d'une droite d'absorption à 560 nm, en fonction de la de la concentration en BSA déposée. Il suffit alors de reporter l'absorbance de l'échantillon sur la droite tracée pour en déduire la concentration approximative des protéines.

Le BCA peut être aussi utilisé pour doser l'avidine se présentant dans le liquide de lavage étant donné que celle-ci est une molécule de protéine.

- De l'avidine fixée aux Hépasphères™ par le biais du complexe avidine-biotine. Une fois l'avidine couplée, les Hépasphères™ sont reconditionnées, puis mises en contact avec une solution contenant l'HABA et le complexe résultant présente un maximum d'absorption dans le visible à 500 nm. Tout présence de biotine dans le milieu, déplacera l'HABA et viendra se fixer sur l'avidine. En conséquence, l'absorbance du complexe HABA-avidine diminuera. L'excès de biotine non fixée est déterminé après dosage avec l'HABA ; le taux de biotine est trouvé par différence. Quant à la quantité d'avidine, elle sera calculée à partir de la condition suivante : chaque mg d'avidine fixe en moyenne 13 μg de biotine.

Une méthode qualitative est aussi utilisée pour vérifier l'adsorption physique de l'avidine, la liaison covalente Hépasphère-avidine et le complexe Hépasphère-avidine-IgG biotinylée. Elle concerne l'utilisation d'un marqueur de fluorescence, l'iosocyanate de fluoresceine (FITC). L'avantage de ce marqueur est qu'il n'interagit pas avec le site de reconnaissance de l'antigène, ce qui permet la vérification du complexe anticorps-antigène.

Nous avons couplé le FITC à l'avidine (Avidine-FITC) et à l'IgG biotinylée (IgG-biot-FITC). Les Hépasphères™ ont été couplées à l'avidine-FITC suivie de l'association avec

l'IgG-biot-FITC. De plus l'IgG-biot-FITC a été conjuguée aux Hépasphères-avidine. A chaque expérience d'association, des photos ont été prises par microscopie de fluorescence.

Enfin, le modèle de drainage veineux *in vitro* évoqué dans la section (4.1) est utilisé pour déterminer la stabilité du complexe conjugué Hépasphère™ marquée à l'Endorem® et l'avidine. Ce complexe est placé dans un flux de sérum physiologique circulant à un débit quatre fois supérieur au débit sanguin d'un carcinome de foie. Les Hépasphères™ marquées et associées (association covalente) à l'avidine (10 mg) sont introduites dans une colonne en verre, reliée à une pompe péristaltique assurant un débit de 10 ml/min. Deux essais de pompage ont été réalisés, un avec deux heures et l'autre de quatre heures. Le liquide prélevé après chaque cycle de pompage est passé à l'IRM pour déterminer l'Endorem® libéré. Ensuite, le liquide est dosé avec un spectrophotomètre à 280 nm pour détecter l'avidine éventuellement libérée de son conjugué. Le protocole évoqué dans la section 4.1.2.2 concernant le positionnement des flacons dans l'IRM et la méthodologie de correction de signal sont utilisés dans cette étude.

Nous avons réalisé la même étude précédente, cette fois-ci sur le complexe avidine-Hépasphères™ sans l'Endorem® afin d'éviter le doute sur un troisième élément qui pourrait déstabiliser la fixation. Le liquide prélevé est passé uniquement au spectrophotomètre.

4.2.4 Résultats et discussion

Le but de ce travail est d'associer un nombre maximal d'IgG sur les Hépasphères™.

Pour fixer des anticorps sur les Hépasphères™, trois types d'association sont réalisés :

- Adsorption physique des IgG sur les Hépasphères™.
- Association non-covalente avidine-biotine, l'avidine devant être fixée sur l'Hépasphère™ par adsorption et la biotine sur l'anticorps.
- Association covalente par création d'une liaison amide entre l'Hépasphère™ et l'anticorps via l'avidine- biotine liée à un bras espaceur.

L'adsorption physique des IgG sur les Hépasphères™ est faible, seulement 4,62% des IgG sont fixées. Dans le cas de l'avidine, l'adsorption est de 28%. Cette méthode

qui aurait pu être idéale, car ne faisant pas intervenir d'agents chimiques susceptibles de perturber le polymère des Hépasphères™, ne conduit pas à un édifice stable. Les protéines adsorbées se détachent au cours du temps.

Nous avons préféré faire appel à des méthodes chimiques de couplage et en particulier à la création d'une réaction peptidique (amide) entre les COOH des Hépasphères™ et les fonctions amines de l'avidine, la liaison amide formée étant stable. Cette réaction s'est réalisée en présence de N-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS) et d'éthyle carbodiimide (EDC) pour l'activation des fonctions acides (COOH) des Hépasphères™.

4.2.4.1 Dosage et confirmation qualitative de l'avidine couplée aux Hépasphères™

Le dosage de l'avidine fixée aux Hépasphères™ par le biais des réactifs bicinchoninique (BCA) et HABA-avidine n'est pas satisfaisant. Les résultats obtenus ont donné une quantité d'avidine bien plus grande (1,1 mg / 10 mg de microsphères) que la quantité ajoutée initialement (0,5 mg d'avidine). En effet, pour le dosage par le deuxième réactif, une faible quantité de biotine récupérée dans les eaux de lavage correspond à une grande quantité d'avidine couplée (ce qui est expérimentalement notre cas). Cela peut être expliqué par le fait que la biotine peut s'adsorber sur la microsphère (liaisons hydrogène, adsorption physique, liaisons de Van der Waals, etc.) ou s'infiltrer de la même façon que les molécules du réactif HABA à travers les pores.

La détermination de la taille des pores est donc un besoin qui pourrait justifier l'infiltration de la biotine et du réactif HABA-avidine dans ces microsphères ainsi que la stabilité de l'Endorem® à l'intérieur. Nous avons déterminé la taille des pores par un microscope électronique environnemental ou *environmental scanning electron microscope* (ESEM), de grossissement élevé ($\times 1200$). Le principe de ESEM consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon qui, en réponse, réémet des particules. Celles-ci sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image de haute résolution. L'échantillon balayé par les électrons existe dans une chambre à vide partiel. Celui-ci a évaporé le sérum physiologique autour les Hépasphères™ ce qui a aboutit à des gros cristaux de sel déposés sur les microsphères (Figure 4-18, b). Pour cela, la détermination de la taille des pores par microscopie électronique environnemental est impossible, les Hépasphères™ gonflées doivent être en permanence en suspension dans du sérum physiologique.

L'hypothèse concernant l'infiltration des réactifs de dosage de l'avidine par la biotine et le HABA-avidine à travers les pores des Hépasphères™ n'est pas donc justifiée. Le dosage de l'avidine par ces réactifs est toujours incorrect.

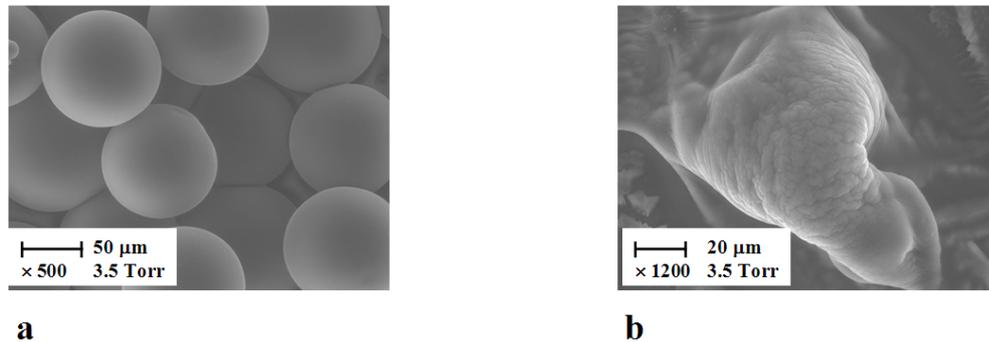


Figure 4-18 : Photos microscopiques des Hépasphères™ obtenues par ESEM avant (a) et après être gonflées (b) par le sérum physiologique.

Pour cela, nous nous sommes tournés vers un dosage par spectrophotométrie à 280 nm, de l'avidine non fixée et récupérée dans le liquide de lavage. La quantité d'avidine accrochée sur les Hépasphères™ est quantifiée par différence. Les résultats obtenus montrent que 60% de l'avidine introduite se retrouvent fixée sur les Hépasphères™ (10 mg) à pH 7,2. Le changement des paramètres pH et le temps de contact n'ont pas amélioré le rendement de couplage. Il est possible que la taille des pores sur la surface ait une influence sur le rendement de couplage de l'avidine. Cette molécule pourrait s'infiltrer à travers les pores.

La quantité d'avidine dosée dans le cas de l'association avidine-Hépasphères marquées à l'Endorem® est identique à celle où l'avidine est fixée aux Hépasphères™ non-marquées. L'Endorem® n'interfère pas dans la réaction de fixation avidine-biotine.

Nous avons aussi vérifié qualitativement l'adsorption physique et l'association covalente avidine-Hépasphères™ par un marqueur de fluorescence, l'isocyanate de fluoresceine (FITC). La Figure 4-19 illustre les images obtenues par microscopie de fluorescence pour les deux types d'association. La Figure 4-19 (a) confirme l'adsorption de l'avidine sur l'Hépasphère™, cette protéine est toujours présente (Figure 4-19, b) après association covalente.

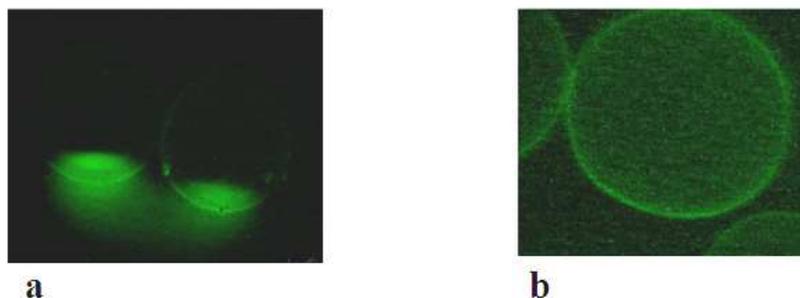


Figure 4-19 : Images microscopique ($\times 20$) montrant la fluorescence de deux types d'association avidine-Hépasphères : (a) association par adsorption : Hépasphère + (avidine-FITC) et (b) association covalente : Hépasphère-(avidine-FITC).

4.2.4.2 Microscopie électronique à transmission

Nous avons tenté d'utiliser cette technique pour s'assurer qu'aucune déformation des HépasphèresTM n'a eu lieu après les traitements chimiques.

Pour cette technique, il est nécessaire d'introduire l'échantillon dans une résine puis de le découper en lamelles. Des contraintes sont survenues, les HépasphèresTM étant trop molles pour être découpées et observées par la suite au microscope.

4.2.4.3 Biotinylation des anticorps

Pour les IgG, le rendement de la réaction d'association directe sur les HépasphèresTM via le carbodiimide (EDC) est faible. Ceci peut être expliqué par l'encombrement stérique³ de l'anticorps par rapport à la fonction carboxylique visée sur la microsphère. Le rendement peut être amélioré en faisant appel au couple avidine-biotine dont la biotine est couplée à l'anticorps. Comme la biotine possède un bras espaceur (biotinyl-6-aminohexanoic acid) assurant une longueur de 22,4 Å entre la molécule visée et la biotine, l'encombrement stérique de l'anticorps par rapport à la fonction carboxylique va diminuer.

La mise au point de la biotinylation avant couplage a été réalisée à l'aide du réactif HABA-avidine sur des anticorps polyclonaux puis transposée aux anticorps monoclonaux anti-DNP. Les résultats obtenus montrent que 9,2 moles de biotine par molécule d'anticorps polyclonal ont été fixées alors que dans le cas de l'anticorps anti-DNP, seulement 5 moles de biotine ont été fixées.

³ Stérique : Rapport à la disposition et organisation d'un composé chimique dans l'espace tridimensionnel.

4.2.4.4 Stabilité dans un flux du complexe avidine-Hépasphère™ avec Endorem®

Une fois le rinçage du complexe avidine-Hépasphère™ marquées à l'Endorem™ accompli, la stabilité de ce complexe dans un modèle simulant grossièrement la vascularisation tumorale et son drainage veineux est déterminée à partir du liquide de perfusion après 2h et 4h de pompage. Comme tous les essais précédents, l'avidine qui pourrait se présenter dans le liquide est dosée, puis la quantité d'avidine accrochée sur les microsphères est quantifiée par différence (section 4.2.3).

Dans le cas du liquide qui pourrait contenir de l'Endorem® libéré du complexe avidine-Hépasphères™ marquées avec l'Endorem® après 2h et 4h de pompage, il nous a été impossible de doser l'avidine par spectrophotomètre car l'agent de contraste absorbe dans la même zone que la protéine. Nous n'avons pas pu remarquer de variation de la dose d'avidine entre 2h et 4h de pompage, par mesure de l'absorbance à 280 nm du liquide de perfusion. Cette constance engendrant la stabilité des valeurs du signal (Tableau 4-3) mesurées sur les images *IRM* (Figure 4-20) du liquide de perfusion pour deux et quatre heures de pompage pourrait être la confirmation que seul l'Endorem® est libéré. Le signal image de ce liquide est supérieur à celui du sérum physiologique utilisé comme liquide de contrôle. Par ailleurs, le dosage par spectrophotomètre à 280 nm de l'avidine éventuellement libérée dans le liquide pour des Hépasphères™ non marquées à l'Endorem® est négatif (section 4.2.4.1).

En tenant compte du modèle de drainage veineux, l'association covalente de l'avidine aux Hépasphères™ est stable dans un débit de sérum physiologique quatre fois supérieur à celui du carcinome hépatocellulaire.

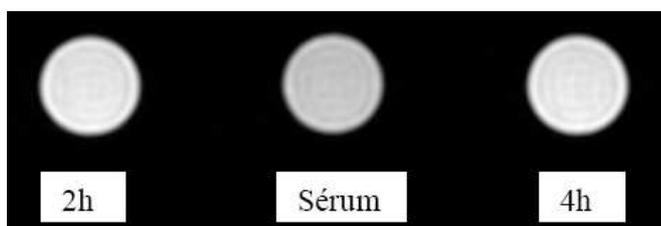


Figure 4-20 : Image *IRM* T_1 du liquide prélevé, après 2h et 4h de pompage, et du sérum physiologique (contrôle). Le signal

Liquide	Signal <i>IRM</i> (unités arbitraires)
De perfusion 2h	162
De perfusion 4h	162
Sérum physiologique	139

Tableau 4-3 : Signaux mesurés sur les images *IRM* du liquide de perfusion, après 2h et 4h de pompage, et du sérum physiologique (contrôle).

4.2.4.5 Dosage et confirmation qualitative du complexe Hépasphère-avidine-IgG

Le dosage des *IgG* fixées aux Hépasphères™ par le test ELISA n'a pas été réalisé par la mesure d'absorbance à 410 nm, la présence de ces microsphères dans les puits ELISA étant une contrainte. Nous nous sommes contentés de l'observation d'une couleur verte obtenue après 15 à 30 minutes dans l'obscurité, après reconnaissance d'*IgG* fixée aux Hépasphères™ par l'anti-*IgG* marquée à la peroxidase.

Le marqueur de fluorescence FITC n'interagissant pas avec le site de reconnaissance de l'antigène, il est utilisé pour vérifier qualitativement le complexe Hépasphère-(avidine)-(IgG-FITC) et Hépasphère-(avidine-FITC)-(IgG-FITC). Sur la Figure 4-21 (a), c'est la molécule fluorescente d'*IgG* que l'on voit. En revanche, sur la Figure 4-21 (b) où les deux molécules avidine et *IgG* sont fluorescentes, on remarque une distribution uniforme de fluorescence sur toute la microsphère qui pourrait être l'avidine-FITC avec un point de fluorescence plus localisé qui pourrait être lié à l'*IgG*. Il est possible que les propriétés immunologiques des *IgG* soient perturbées par les modifications chimiques dues au couplage, le nombre des *IgG* fluorescentes étant très faible.

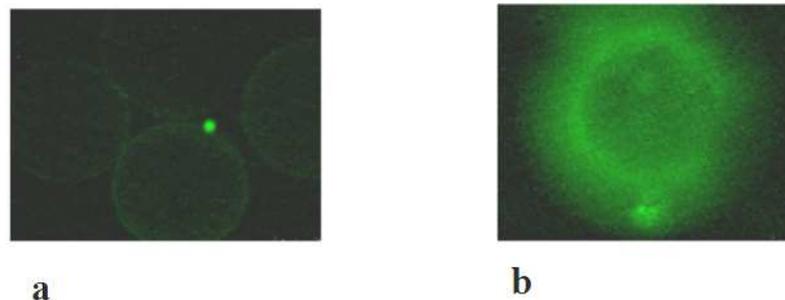


Figure 4-21 : Images microscopique ($\times 20$) montrant la fluorescence de : (a) Hépasphère-(avidine)-(IgG-FITC) et (b) Hépasphère-(avidine-FITC)-(IgG-FITC).

4.2.5 Conclusion

Le couplage d'anticorps sur les microsphères absorbantes (Hépasphères™) semble prometteur, mais le processus de fixation ne garantit pas la conservation des propriétés des *IgG*, ce qui en réduit l'intérêt thérapeutique potentiel.

La réaction de couplage a été réalisée par le complexe avidine-biotine avec modification de quelques fonctions chimiques propres au polymère des Hépasphères™, fonction carboxyle (COOH). Les conséquences de cette modification sur la structure des Hépasphères™ n'ont pas pu être identifiées par la microscopie à transmission

électronique à cause de leur absence de rigidité. Le rendement du couplage covalent de l'avidine sur les HépasphèresTM marquées et non marquées à l'Endorem[®] est de 60%, en revanche, celui du couplage par adsorption n'est que de 28%. Nous avons supposé que la taille des pores sur la surface avait une influence sur le rendement de couplage. La taille des pores n'a pas pu être déterminée par microscopie électronique environnementale (ESEM), car les HépasphèresTM doivent être en permanence dans du sérum physiologique. La microscopie de fluorescence a démontré une association homogène de l'avidine aux Hépasphères marquées à l'Endorem[®] et un faible nombre des IgG biotinylées couplées à l'avidine-Hépasphère. Les propriétés immunologique et chimique des IgG étant changées, le nombre des IgG fixées aux HépasphèresTM est faible et le dosage est difficile.

Les problèmes rencontrés lors de la fixation des IgG sur les HépasphèresTM étant nombreux, nous nous sommes tournés vers une autre stratégie concernant l'utilisation des émulsions, comme système réservoir pour les IgG. Les propriétés de l'eau et de l'huile qui composent ces émulsions semblent inertes pour des principes actifs transportés. D'ailleurs, leur fabrication est relativement simple et rapide. Il est possible de les repérer par *IRM* après leur marquage avec le *SPIO* pour des tailles différentes (chapitre.3).

Un relargage performant des substances immunologiques de ces systèmes par un stimulant externe est un enjeu pour bien cibler l'angiogénèse. Pour cela, nous disposons dans la section (4.3) une étude préliminaire concernant la caractérisation des émulsions électriquement, par impédancemétrie, et mécaniquement, par ultrasons.

4.3 Caractérisation mécanique et électrique des gouttes et globules d'émulsion simple et double

Nous avons montré la détectabilité sous *IRM* par un marquage de différents agents d'occlusion, au chapitre.3, en particulier celle des émulsions. La localisation *in vivo* étant possible, nous cherchons des conditions d'un éventuel relargage *in situ*. Nous nous intéressons ici à la caractérisation de ces émulsions. Leur caractère de neutralité chimique et d'isolant électrique permet de penser que le transport de principes actifs en sera facilité. Les caractéristiques mécaniques en réponse à des ultrasons et à des

excitations électriques pour toute une gamme de fréquences sont explorées pour mieux comprendre leur comportement.

4.3.1 Introduction

Les ultrasons sont des ondes mécaniques dont la propagation met en mouvement oscillatoire les particules rencontrées dans un milieu élastique. Par ailleurs, la propagation des ondes ultrasonores provoque l'apparition de zones de concentration ou de raréfaction des particules. La vitesse des ultrasons dans un liquide varie de 1400 à 1600 m/s, leur fréquence dans les appareillages médicaux est de l'ordre de quelques MHz.

L'étude du relargage contrôlé des substances actives par des ultrasons à partir d'émulsions simples ou doubles et à proximité d'une tumeur est l'un de nos objectifs. Les ultrasons ont déjà été utilisés dans ce domaine comme déclencheurs pour le relargage de cytotoxiques à partir de liposomes [Schroeder2007] ainsi que de micelles polymériques [Rapoport2003] à des basses (20 kHz) et hautes fréquences (1 MHz) [Rosenthal2004]. Les médicaments sont alors vectorisés de manière significative en se libérant au niveau de la cible, par augmentation de la porosité, par résonance mécanique ou par échauffement local [Akihiko2001 ; Kaparissides2006]. Par contre, le mode de déclenchement de relargage contrôlé des principes actifs, notamment avec les anti-VEGF n'est pas encore connu dans le cadre de l'antiangiogénèse tumorale.

L'objectif de ce travail est d'étudier, dans un premier temps, le comportement des émulsions de taille différente lorsqu'elles sont sonifiées par des ultrasons à plusieurs fréquences. Les informations recueillies, l'analyse de l'amplitude du signal de l'écho réfléchi, permettent de déterminer l'absorption énergétique en fonction de la fréquence.

Par analogie avec la caractérisation d'émulsions par des ondes mécaniques, nous mettons en œuvre la même procédure mais électriquement, en employant l'impédancemétrie.

Le courant électrique est souvent utilisé sous forme d'impulsions courtes (onde carrée ou décharge capacitive exponentielle) contrôlées et appliquées sur des cellules vivantes afin de perméabiliser la membrane cellulaire pour laisser pénétrer certaines molécules, par exemple : protéines, métabolites, ADN et anticorps. Cette technique

d'électroporation, est rapide, non toxique et n'altère pas ou peu la structure biologique de la cellule cible ni son fonctionnement [Zimmermann1981 ; Zimmermann1982]. L'électroporation est utilisée aujourd'hui pour contrôler le relargage de principes actifs d'hydrogel par des interactions électrostatiques entre leurs charges électriques opposées sous champ électrique [Kwon1991 ; Kikuchi2002].

Nous nous inspirons de l'électroporation des cellules vivantes qu'il faut comparer à celles qui intervient dans les gouttes et dans les globules d'émulsions, leur interface étant constituée de molécules amphiphiles aussi bien que le sont les membranes des cellules vivantes.

Nous déterminons dans un premier temps l'impédance électrique du milieu contenant des gouttes ou globules d'émulsions, lorsque ce milieu est traversé par un courant alternatif à des fréquences électriques diverses.

La mesure de l'impédance des émulsions est une approche analogue à celle de la bioimpédancemétrie cellulaire consistant à mesurer les propriétés électriques d'un milieu biologique. D'après Kanai et Meijer [Kanai1983 et Meijer1989], la membrane de la cellule se comporte comme un condensateur. En effet, une membrane constituée de phospholipides, elle est isolante. Lorsque le courant rencontre une membrane cellulaire, les charges électriques s'accumulent de part et d'autre de la membrane sans pouvoir la traverser. Il se crée alors une double couche électrique qui forme un condensateur (Figure 422). Le liquide inter et intra cellulaire se comporte comme une résistance, il est en général bon conducteur. On peut donc dire qu'une unité biologique est représentée par un circuit en parallèle comprenant une résistance R_e qui est celle du milieu extracellulaire, une résistance R_i correspondant au milieu intracellulaire, et une capacité C_m schématisant la membrane. Cette dernière crée une réactance :

$$X = \frac{1}{jC_m\omega} \quad (4-9)$$

Avec $\omega = 2\pi f$ où f la fréquence en hertz, X la réactance en ohm et C_m la capacité de la membrane en farads.

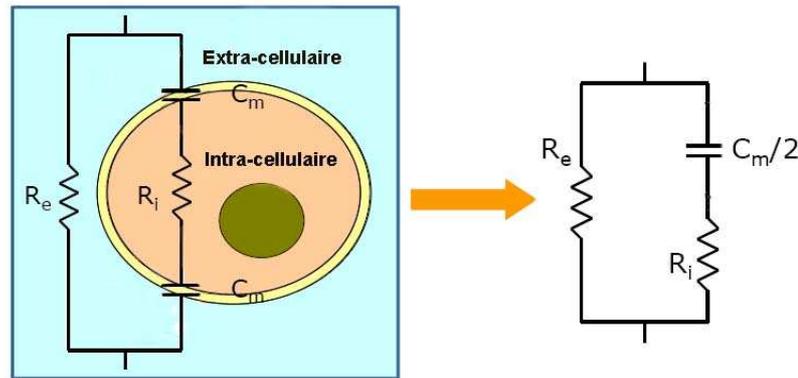


Figure 4-22 : Simple modèle électrique d'une cellule vivante (à gauche) avec le circuit électrique équivalent (à droite). R_e , résistance du milieu extracellulaire, R_i , résistance du milieu intracellulaire, et C_m , capacité de la membrane assimilée à un condensateur. D'après [Ivorra2003]

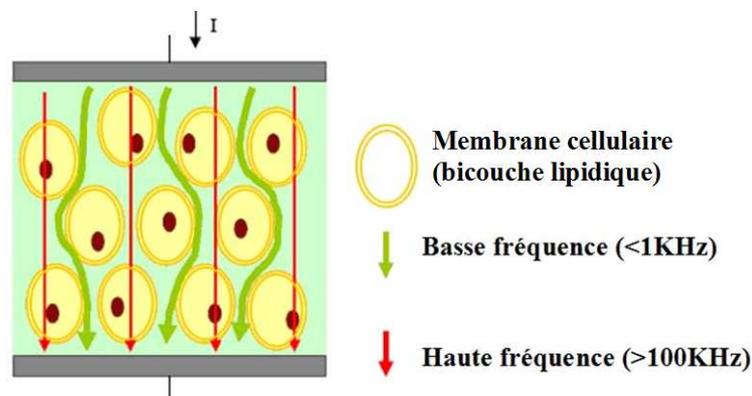


Figure 4-23 : Schématisation simpliste du passage du courant selon la fréquence dans un milieu biologique. D'après [Ivorra2003]

Selon Jenin [Jenin 1975], pour pouvoir distinguer par bioimpédancemétrie le compartiment intracellulaire du compartiment extracellulaire, le courant doit comporter deux composantes à fréquences distinctes : une basse fréquence électrique vers 1 kHz et une haute fréquence, par exemple à 100 kHz. La Figure 4-23 nous schématise le passage du courant dans les tissus selon la fréquence.

À basse fréquence électrique (< 1 kHz), le courant ne pénètre pas ou très peu dans le milieu intracellulaire. À haute fréquence électrique (> 100 kHz), il va pouvoir passer plus facilement à travers la membrane de la cellule. Il va donc circuler à la fois dans le milieu intracellulaire et dans le milieu extracellulaire, mais à des fréquences électriques différentes selon le cas. Le passage du courant est possible grâce à la présence des ions.

Compte tenu de la similitude des comportements électriques du milieu cellulaire et de celui contenant les gouttes ou globules d'émulsions, nous explorons la réponse fréquentielle des émulsions en vue d'une possible utilisation de l'électroporation.

4.3.2 Préparation d'émulsions simple et double

Les matériels utilisés dans la préparation des émulsions simples « E/H » et doubles « E/H/E » pour la caractérisation mécanique par des ultrasons comportent les produits suivant : l'huile de paraffine liquide, les surfactants (Span 83 et Tween 80) et l'eau distillée.

La méthode de préparation de ces émulsions est décrite dans le chapitre.3 (section 3.5.3). Pour obtenir des tailles multiples en émulsions simples et doubles, nous changeons uniquement la vitesse d'agitation (Tableau 44). Les pourcentages volumiques des composants dans la solution et le temps d'agitation sont invariants d'un échantillon à un autre (Tableau 45 et Tableau 46). Une première préparation de six échantillons est réalisée, comprenant : trois échantillons d'émulsions simples et trois autres d'émulsions doubles. Le volume final de la solution pour chaque échantillon est de 5 ml.

Pour étudier la reproductibilité lors de la caractérisation mécanique des émulsions par ultrasons, une deuxième préparation de six échantillons est réalisée de la même manière que la précédente. Les diamètres des gouttes et globules obtenus dans la première et deuxième préparation sont récapitulés par le Tableau 44.

		Indice de vitesses d'agitation		
		V ₆	V ₄	V ₂
Diamètre des gouttes μm	Préparation-1	4-18	6-80	16-110
	Préparation-2	4-24	8-66	16-138
Diamètre des globules μm	Préparation-1	11-48	30-161	21-273
	Préparation-2	14-65	12-100	27-151

Tableau 4-4 : Diamètres (μm) des gouttes et globules pour des émulsions simples et doubles en fonction de la vitesse et du temps d'agitation. Les émulsions sont utilisées dans la caractérisation mécanique avec des ultrasons. L'indice V₆ correspond à la vitesse d'agitation maximale d'environ 1500 tr/min.

	Emulsion simple E/H		
	Huile de paraffine	Surfactant Span 83	Eau distillée
% volumique	70	5	25
Volume (ml)	3,5	0,25	1,25 ml

Temps d'agitation des émulsions simples : 5 min

Tableau 4-5 : Pourcentage volumique de produits utilisés dans la préparation des gouttes d'émulsions simples.

Emulsion double E/H/E			
Phase I : Emulsion simple			
	Huile de paraffine	Surfactant Span 83	Eau distillée
% volumique	73	7	20
Volume (ml)	3,65	0,35	1
*V _{2,5} (10-100 µm), temps d'agitation : 5 min			
Phase II : Emulsion double			
	Phase I : Emulsion simple	Surfactant Tween 80	Eau distillée
% volumique	75	0,02	24,98
Volume (ml)	3,75	0,001	1,249
<i>Temps d'agitation des émulsions doubles : 13 min</i>			

Tableau 46 : Pourcentage volumique de produits utilisés dans la préparation des globules d'émulsions doubles.

Pour la caractérisation électrique, on utilise en plus une préparation d'émulsion simple avec du sérum physiologique (0,2%) dans l'huile. En faisant la même préparation pour les émulsions doubles avec du sérum physiologique, les globules ont perdu leur stabilité en raison de l'échange osmotique avec la phase aqueuse entre l'intérieur et l'extérieur.

Les diamètres obtenus sont illustrées par le Tableau 47.

Diamètre	Indice de vitesses d'agitation		
	V₆	V₄	V₂
gouttes eau dans l'huile (µm)	6-35	7-64	18-154
gouttes sérum physiologique dans l'huile (µm)	4-33	-	20-190
globules eau dans l'huile dans l'eau (µm)	V_{4,5}		V_{3,5}
	16-170		16-201
<i>Temps d'agitation des émulsions simples 5min et doubles 13 min</i>			

Tableau 47 : Diamètres (µm) des gouttes et globules pour des émulsions simples et doubles en fonction de la vitesse (tr/min) et du temps (min) d'agitation. Les émulsions sont utilisées dans la caractérisation électrique.

4.3.3 Caractérisation mécanique par ultrasons

4.3.3.1 Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de mécanique acoustique et matériaux (Roberval)-UMR 6253, la plupart des matériels utilisés appartiennent à ce laboratoire. Nous exposons, dans cette étude, des émulsions de type et de taille différente à des ultrasons à plusieurs fréquences afin d'étudier leur comportement en analysant l'amplitude du signal de l'écho réfléchi.

Le système ultrasonore (Figure 4-24) est composé d'un transducteur plan (10 MHz) de distance focale de 12,7 mm, d'un générateur d'impulsion (Panametrics 5052 UA), d'une chaîne de réception (amplificateur, atténuateur, conditionneur de crête et de fréquence) pour une bande passante de 200 kHz à 35 MHz, d'un réflecteur plan en verre et d'une colonne en inox de liquide (20 mm de diamètre et 10 mm de hauteur pour un volume de 3,14 ml). Le signal réfléchi est acquis sur un oscilloscope (Lecroy 9410) dont le mode échantillonnage entrelacé permet d'échantillonner à 4 GHz.

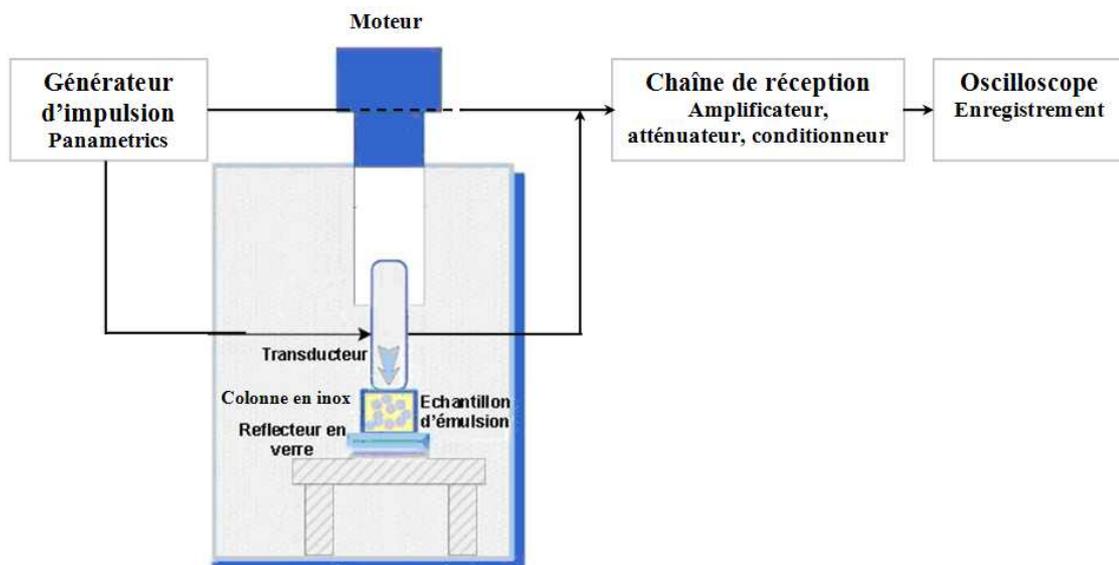


Figure 4-24 : Sonification des émulsions simples ou doubles de plusieurs tailles par un système ultrasonore composé de : transducteur plan (10 MHz), générateur d'impulsion de Dirac, réflecteur plan en verre, chaîne de réception et d'enregistrement.

La sonification des échantillons est effectuée dans un réservoir vide en verre à une température de 25°C. Le transducteur est contrôlé par un moteur pas-à-pas suivant les trois axes, x, y et z. Il est immergé de quelques millimètres au centre de la colonne de liquide et ajusté axialement par rapport à la surface du milieu. Ensuite, le transducteur

est déplacé de ± 1 mm du centre de la colonne de liquide défini comme le point d'origine "0" suivant les axes x et y pour balayer la surface du liquide selon deux directions. Nous déterminons de cette façon la reproductibilité de la réponse reçue en fonction de la position du transducteur dans le liquide. Des ultrasons à plusieurs fréquences sont générés par le transducteur après excitation par des impulsions de 165 ns fournies par un générateur d'impulsions. Ces impulsions se caractérisent par une amplitude de 120V. Les tirs sont effectués sur une période de 10 ms. Celles-ci sont échantillonnées en 27 points avec pour fréquence d'échantillonnage 200 MHz lors de son enregistrement.

Le signal correspondant au premier écho réfléchi sur le verre, après chaque déplacement du transducteur suivant les axes x et y, est enregistré dans le domaine temporel puis traité par le logiciel Matlab[®] 7,0. Nous nous intéressons à la moyenne des signaux de cinq échos réfléchis correspondant au centre de la colonne de liquide, à ± 1 mm du centre sur l'axe x et à ± 1 mm du centre sur l'axe y. Cette moyenne est calculée quelque soit le nombre de gouttes ou globules suspendues dans la colonne de liquide. La moyenne de cinq signaux est ensuite normalisée (Figure 4-25) puis transformée dans le domaine fréquentiel pour donner une information sur l'absorption énergétique par les émulsions, de taille et de type multiple, en fonction de la fréquence. Nous réalisons deux spectres, un spectre correspondant à la première préparation des émulsions et un autre correspondant à la deuxième. Pour l'étude de la reproductibilité, nous effectuons la moyenne des deux spectres et nous calculons leur écart-type à chaque fréquence.

Le spectre du signal de l'écho réfléchi révèle comment les gouttes et globules d'émulsions simples et doubles absorbent chacune de l'énergie par fréquence ultrasonore. Ces spectres sont comparés aux spectres témoins de l'eau distillée et de l'huile de paraffine, qui sont les composants principaux des émulsions. L'amplitude de l'impulsion de Dirac enregistrée est tronquée par la chaîne de réception. Nous supposons donc qu'elle est quasiment parfaite pour une bande passante de 200 kHz à 35 MHz.

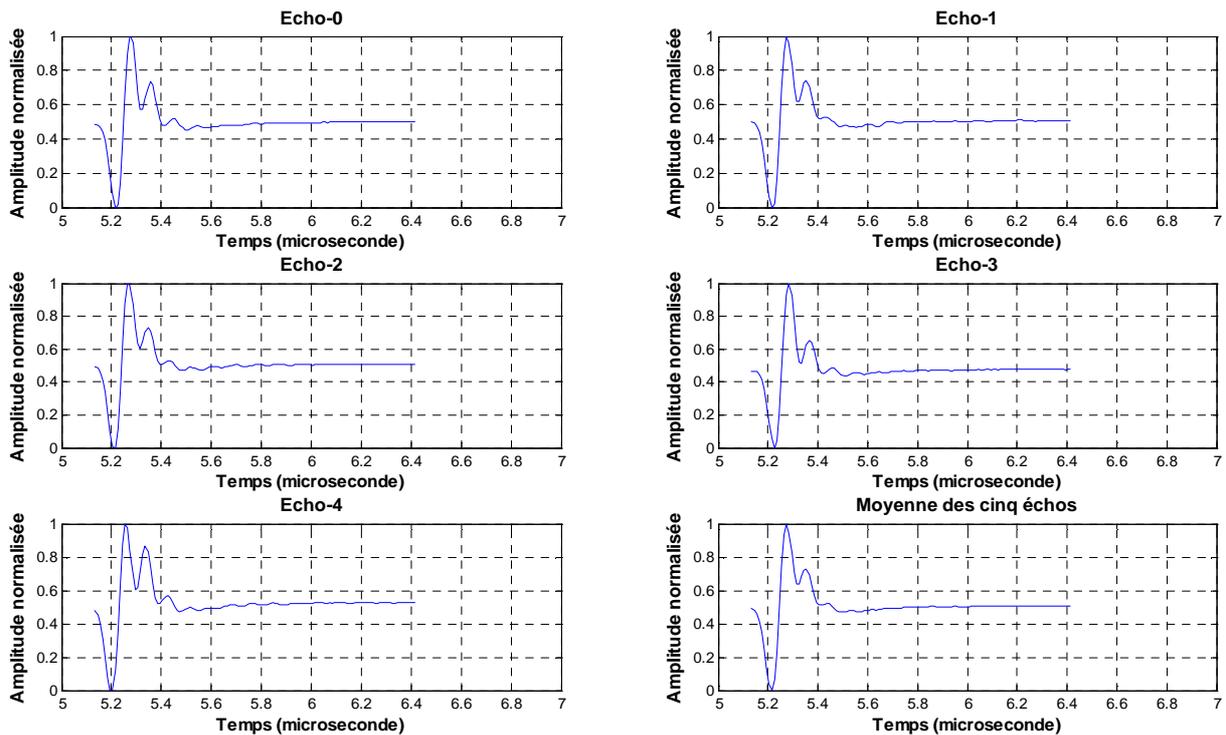


Figure 4-25 : Signal temporel moyenné et normalisé en amplitude pour cinq échos réfléchis sur l'interface émulsion simple et verre. Les échos reçus correspondent à cinq positions du transducteur dans la colonne de liquide contenant des gouttes eau dans l'huile, de diamètre 4-18 μm .

4.3.3.2 Résultats et discussion

- Eau distillée et huile de paraffine

La Figure 4-26 représente le résultat de la sonification de l'eau distillée et de l'huile de paraffine par la moyenne de deux spectres pour deux échantillons similaires en contenance et en volume (5 ml). Cette réponse fréquentielle indique l'absorption énergétique par chacun des deux liquides en fonction de la fréquence avant la formation de l'interface eau-huile dans les gouttelettes d'émulsions. Chaque moyenne dans le domaine fréquentiel correspond à la transformée de Fourier de la moyenne de cinq signaux reçus dans le domaine temporel pour cinq positions du transducteur dans la colonne de liquide. Les profils du spectre de l'eau ainsi que de l'huile dans la Figure 4-26 sont différents. Il y a notamment une différence d'amplitude à basse (5 MHz) et à haute fréquence ultrasonore (15 MHz).

A 5 MHz, l'écart en amplitude entre les réponses fréquentielles des deux composants est de 34%, un pourcentage indiquant une absorption des ultrasons par l'eau. En revanche, à 15 MHz, l'écart est d'environ 60%, indiquant cette fois-ci que l'huile atténue davantage les ultrasons à cette fréquence.

La reproductibilité du spectre de l'eau est meilleure que celle de l'huile selon les écarts-type représentés sur les graphes.

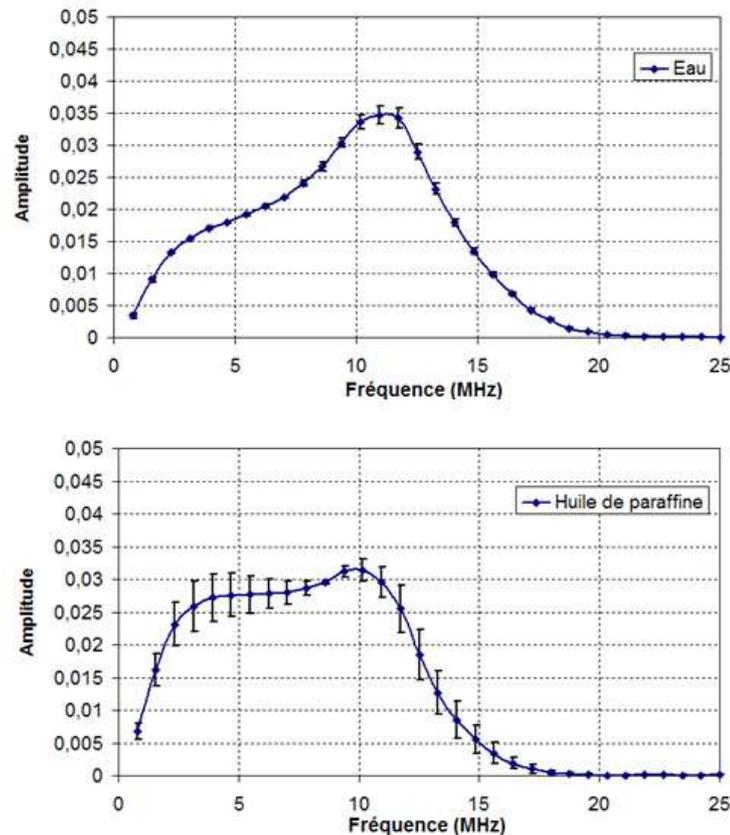


Figure 4-26 : Reproductibilité des spectres et écarts-type correspondant aux signaux moyennés pour cinq échos réfléchis de cinq positions sur l'interface eau-verre, en haut, et huile de paraffine-verre, en bas

- Emulsion simple eau dans l'huile "E/H"

Les trois spectres représentés dans la Figure 4-27 sont les résultats du moyennage des spectres correspondant à deux échantillons d'émulsions simples, de taille de goutte similaire. Les spectres en haut, au milieu et en bas sont les moyennes des spectres correspondant à la gamme de taille 4-18 μm (V_6), 6-80 μm (V_4) et 16-110 μm (V_2) avec ceux correspondant à la gamme de taille 4-24 μm (V_6), 8-66 μm (V_4) et 16-138 μm (V_2).

Les profils des trois spectres obtenus en fonction de la taille des gouttes, sont quasiment similaires. Cependant, ils sont différents des profils du spectre de l'eau et celui de l'huile (Figure 4-26). A basse et haute fréquence, l'absorption des ultrasons est différente. Le milieu atténue les échos réfléchis à 10 MHz quelque soit la taille des gouttes. En revanche, l'atténuation diminue à la fréquence d'environ 3 MHz quelque soit aussi la taille des gouttes. L'atténuation est complète au-delà de 15 MHz pour des fréquences appartenant toujours à la bande passante du transducteur.

La reproductibilité des spectres représentée par les écarts-type varie d'une gamme de taille à une autre. Les écarts-type sont importants à basse fréquence, particulièrement pour les échantillons de gammes de taille 8-66 μm et 6-80 μm . Par contre, les écarts-type sont moins importants pour les autres échantillons. En effet, les résultats obtenus sont reproductibles à toutes les fréquences pour tous les échantillons, mais la diminution de la reproductibilité, uniquement pour le deuxième graphe de la Figure 4-27, nous semble due à la position transducteur qui n'est pas suffisamment ajustée axialement par rapport à la surface de l'échantillon pendant l'expérimentation.

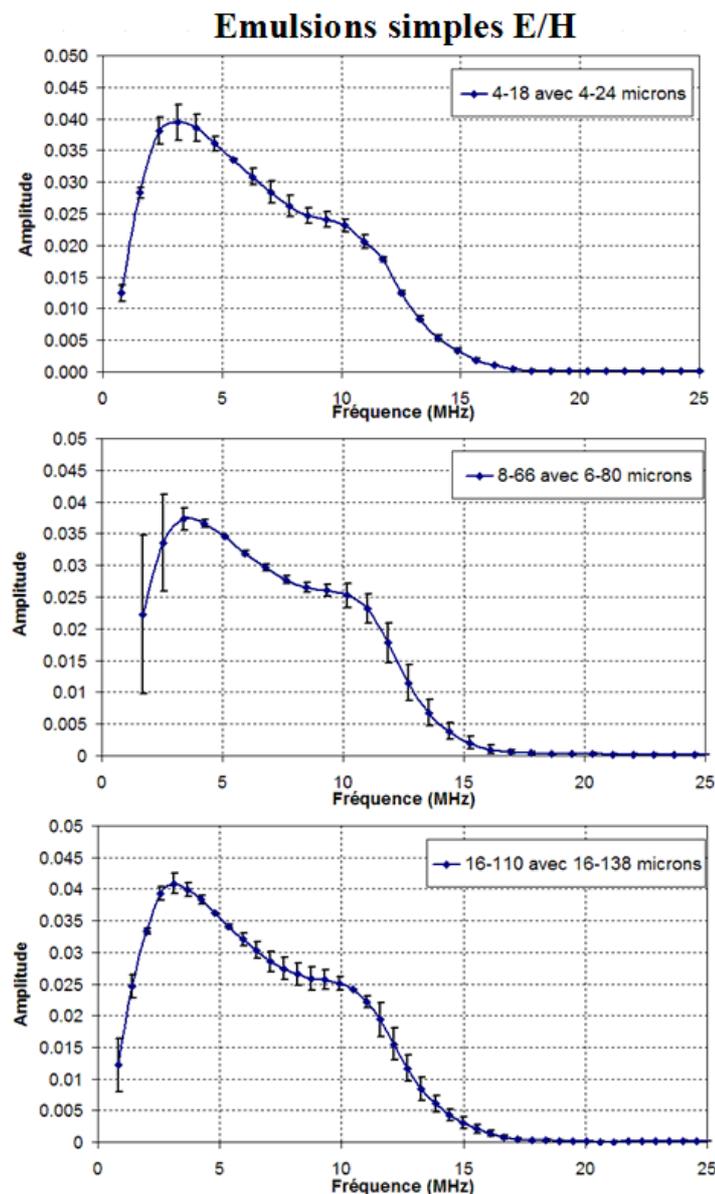


Figure 4-27 : Reproductibilité des spectres et écarts-type correspondant aux signaux moyennés pour cinq échos réfléchis de cinq positions sur l'interface émulsions simples-verre. Les émulsions de type E/H ont les tailles correspondant à la préparation-1 et à la préparation-2, 4-18 μm avec 4-24 μm (en haut), 8-66 μm avec 6-80 μm (au milieu) et 16-110 μm avec 16-138 μm (en bas).

- Emulsion **double** eau dans l'huile dans l'eau « E/H/E »

Les trois spectres représentés dans la Figure 428 sont les résultats de moyennage des spectres correspondant à deux échantillons d'émulsions doubles, de taille de globule similaire. Les spectres en haut, au milieu et en bas sont donc la moyenne des spectres correspondant à la gamme de diamètre 11-48 μm (V_6), 30-161 μm (V_4) et 21-273 μm (V_2) avec ceux correspondant à la gamme de taille 14-65 μm (V_6), 12-100 μm (V_4) et 27-151 μm (V_2).

Les profils des trois spectres ne montrent pas de différence en fonction de la taille des globules d'émulsions. Il s'agit d'une atténuation des échos réfléchis à 10 MHz plus qu'à la fréquence 3 MHz, pour un écart de 23%.

Il faut remarquer qu'en double émulsion, le signal de l'écho réfléchi diminue peu à basse fréquence (3 MHz), de 12% et augmente à haute fréquence (10 MHz), de 13%. Au-delà de 15 MHz, l'écho réfléchi est totalement atténué.

La reproductibilité estimée par les écarts-type varie d'une gamme de taille à une autre. Les écarts-type sont importants à basse fréquence, particulièrement pour les échantillons de 4-24 μm avec 4-65 μm , pour la même raison que précédemment.

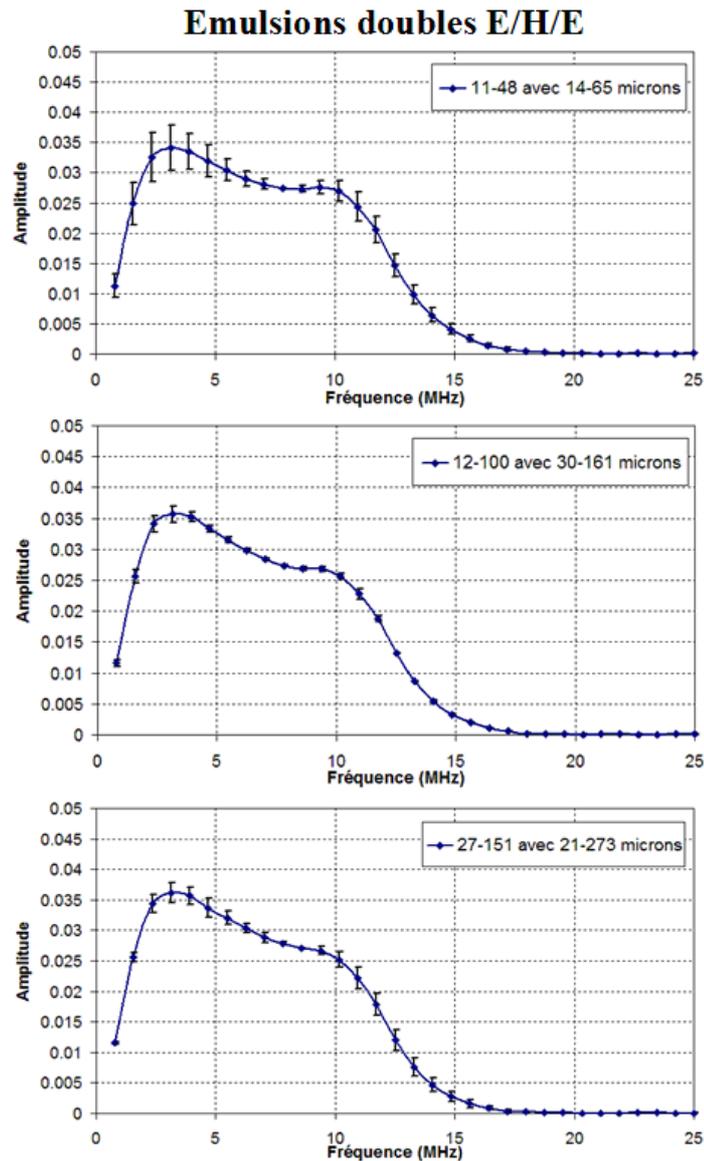


Figure 4-28 : Reproductibilité des spectres et écarts-type correspondant aux signaux moyennés pour cinq échos réfléchis de cinq positions sur l'interface émulsions doubles-verre. Les émulsions de type E/H/E ont les diamètres correspondant à la préparation-1 et à la préparation-2, 11-48 μm avec 16-65 μm (en haut), 12-100 μm avec 30-161 μm (au milieu) et 27-151 μm avec 21-273 μm (en bas).

Pour conclure, l'utilisation des impulsions ultrasonores nous a permis d'étudier le comportement des émulsions simples et doubles soumises aux ultrasons large bande. La représentation spectrale de l'écho reçu après son passage à travers les gouttes ainsi que les globules, a montré une différence de profil avec celui des liquides témoins, l'eau et l'huile. En revanche, les profils des spectres des émulsions ne montrent pas de différence selon la taille ni le type.

La comparaison entre les spectres de l'eau, de l'huile, des gouttes et des globules a mis en évidence l'effet de l'interface eau-huile sur la propagation des ultrasons dans le

milieu : A 5 et 10 MHz, l'absorption des ultrasons par les émulsions est différente de celle par l'huile et par l'eau, en revanche, elle est similaire à des fréquences au-delà de 15 MHz.

L'interface eau-huile des gouttes et des globules a atténué l'écho réfléchi par le verre, à certaines fréquences auxquelles l'eau et l'huile n'ont pas montré un résultat identique.

L'absorption de l'énergie ultrasonore est peu spécifique ou sélective en fonction de la taille des gouttes et globules d'émulsions. L'absorption étant maximale entre 15 et 25 MHz, nous envisageons des tirs à des fréquences uniques, par exemple à 20 MHz. De plus, il reste à déterminer quelle intensité ultrasonore il faudrait appliquer pour arriver à la destruction des émulsions dans le but d'un possible relargage. Vraisemblablement, il faut de grandes intensités pour obtenir un effet de cavitation.

Les observations microscopiques, après les expériences ultrasonores, ne montrent pas de destruction de ces gouttes et globules susceptibles de contenir de principes actifs.

4.3.4 Caractérisation électrique

4.3.4.1 Matériels et méthodes

L'appareil utilisé pour mesurer l'impédance est le modèle HP-Agilent 4284A. Il permet le transfert sur micro-ordinateur des données de réactance (X) et de résistance (R) pour une plage de fréquence de 20 Hz à 1 MHz. Les valeurs de ces données varient entre 0,01 mΩ et 100 MΩ. Le courant appliqué est un courant alternatif variant de 50 μA à 20 mA (valeur efficace). Il est appliqué au liquide par deux électrodes constituant la cellule de mesure (Figure 4-29). Le potentiel est mesuré par les mêmes électrodes. La cellule a une épaisseur de 2 mm.

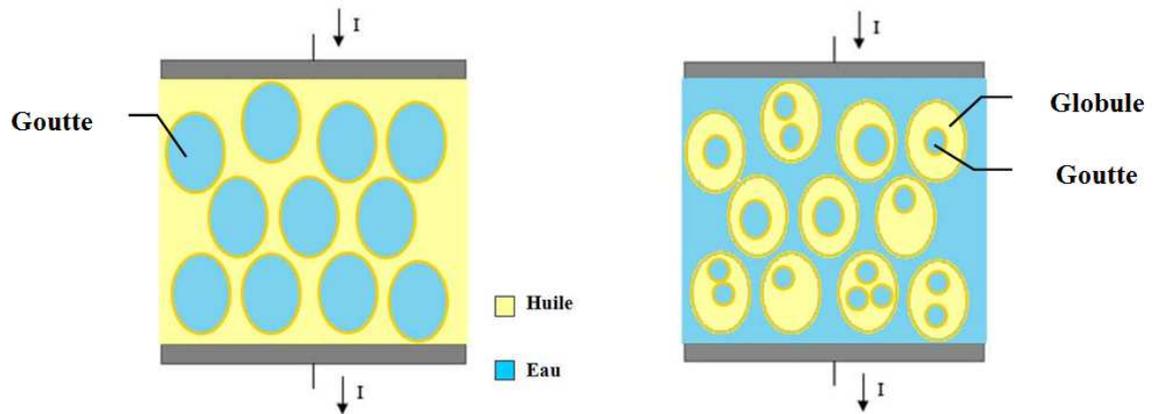


Figure 4-29 : Passage d'un courant alternatif (I) entre deux électrodes (couleur grise) à travers un milieu correspondant à une émulsion simple (à gauche) et double (à droite).

Le module de l'impédance $|Z|$ est déterminé à partir des mesures de réactance et de résistance. Sa représentation graphique en fonction de la fréquence est le diagramme de Bode. Un changement d'impédance de basse à haute fréquence est identifié sur le diagramme de Bode par un point d'inflexion. Celui-ci dépend du chemin choisi par le courant dans le milieu en fonction de la fréquence. En général, le nombre de points d'inflexions observé dépend du nombre des branches RC (R, résistance et C, condensateur) et rend compte du modèle électrique équivalent d'un tissu composé de plusieurs cellules vivantes (Figure 4-22). En effet, les ordres de grandeur des composants dans chaque branche RC sont complètement différents.

Le point d'inflexion peut être illustré sur une autre représentation graphique, le diagramme de Wessel (ou de Cole-Cole ou encore graphe de Nyquist). La partie imaginaire, (avec un signe négatif), de l'impédance est tracée en fonction de sa partie réelle pour chaque fréquence (Figure 4-30). L'avantage de cette représentation est que chaque point d'inflexion est identifié facilement par un pic sur un demi-arc de cercle.

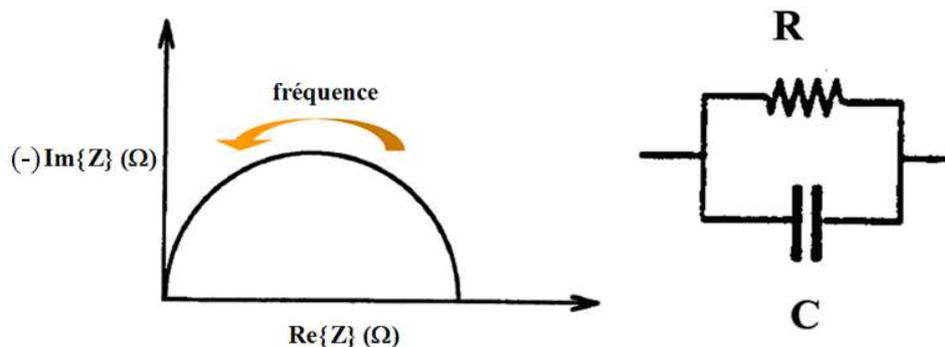


Figure 4-30 : Exemple d'un diagramme de Wessel pour un circuit parallèle RC.

L'application clinique de la bioimpédancemétrie sur un tissu ischémié montre plusieurs arcs de cercle sur le diagramme de Wessel (Figure 4-31). C'est un tissu dans

lequel les cellules gonflent progressivement par pénétration d'eau extracellulaire, riche en ions en raison de la défaillance de la pompe d'ions sous le manque d'oxygène et d'énergie. Par conséquent, les cellules augmentent en taille et envahissent l'espace extracellulaire. Ceci provoque une réduction du courant à basse fréquence, et produit une impédance de module important à la même fréquence. Le diagramme de Wessel pour un tissu ischémique est illustré par la Figure 431, il comporte plusieurs demi-cercles correspondant chacun à une taille cellulaire. Les valeurs de résistance et de réactance à basse fréquence pour chacun de ces arcs augmentent en même temps avec l'augmentation de la taille des cellules. On note sur chaque pic du demi-cercle un point d'inflexion correspondant à une taille cellulaire.

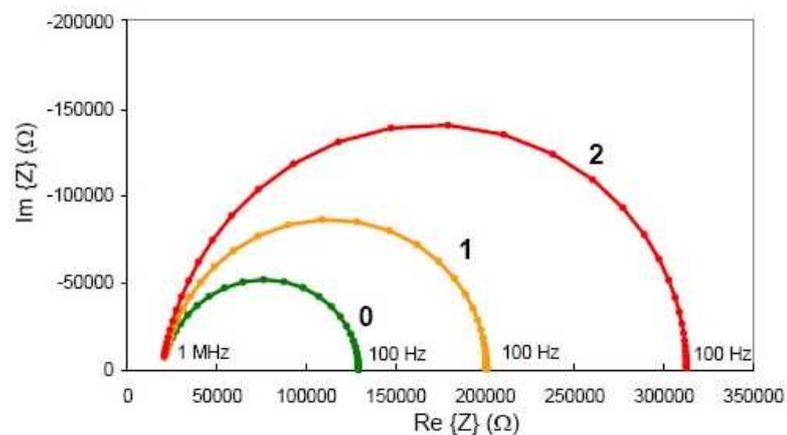


Figure 431 : Diagramme de Wessel d'un tissu non ischémique (0) pour des cellules de taille normale, et ischémique qui augmentent en taille progressivement (1 et 2). [Ivorra2003]

Dans notre étude le module de l'impédance ainsi que le diagramme de Wessel sont déterminés dans notre étude en fonction du type des émulsions et de la taille des gouttes et globules.

4.3.4.2 Résultats et discussion

- Eau distillée, huile de paraffine et sérum physiologique

La Figure 432 et la Figure 433 représentent les diagrammes de Bode et de Wessel de l'huile de paraffine, de l'eau distillée et du sérum physiologique à 0,2%.

Pour les fréquences ≤ 1 kHz, le module d'impédance de l'huile de paraffine est plus important que celui des deux autres composants. Sa valeur décroît de 130 MΩ à 14 MΩ pour l'huile de paraffine, de 929 Ω à 509 Ω pour l'eau distillée, et de 240 Ω à 27 Ω pour le sérum physiologique. Les valeurs pour l'huile à des fréquences inférieures à 100

Hz ne sont pas prises en considération, en raison de la plage de mesure de l'appareil donnant des valeurs erronées au-delà de 100 MΩ.

Pour les fréquences ≥ 100 kHz, les modules de l'impédance des trois milieux sont plus faibles qu'aux fréquences ≤ 1 kHz. Ils ont pour valeurs respectives de 139 kΩ à 14 kΩ pour l'huile de paraffine, de 462 Ω à 325 Ω pour l'eau distillée, et de 2,65 Ω à 2,27 Ω pour le sérum physiologique.

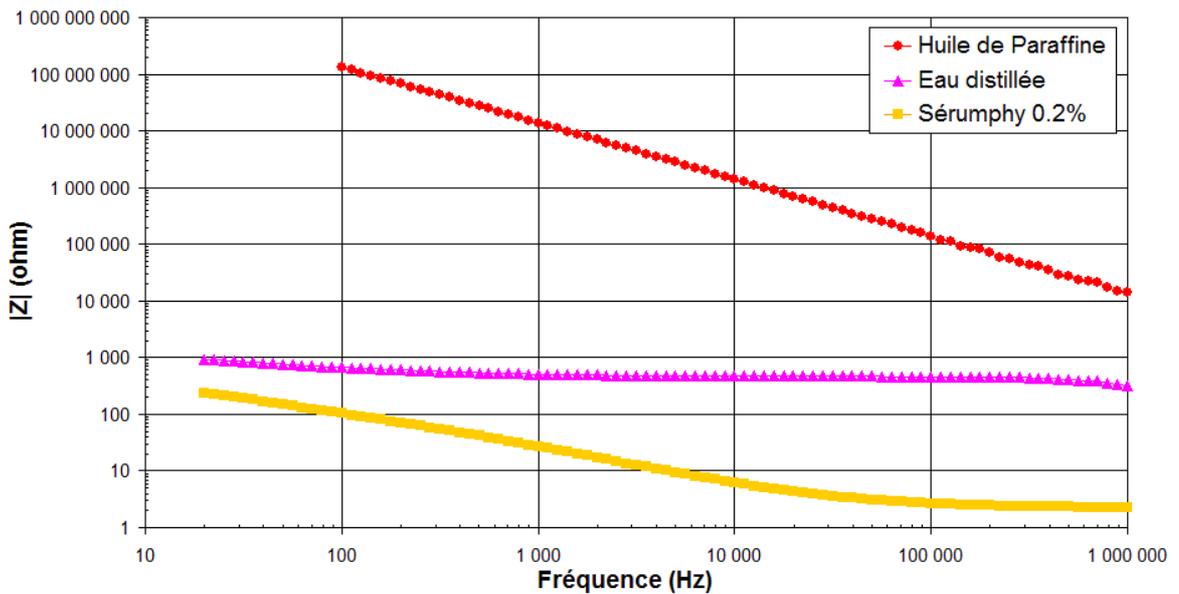


Figure 4-32 : Diagramme de Bode concernant le module de l'impédance $|Z|$ de l'huile de paraffine, de l'eau distillée et du sérum physiologique de 0,2%.

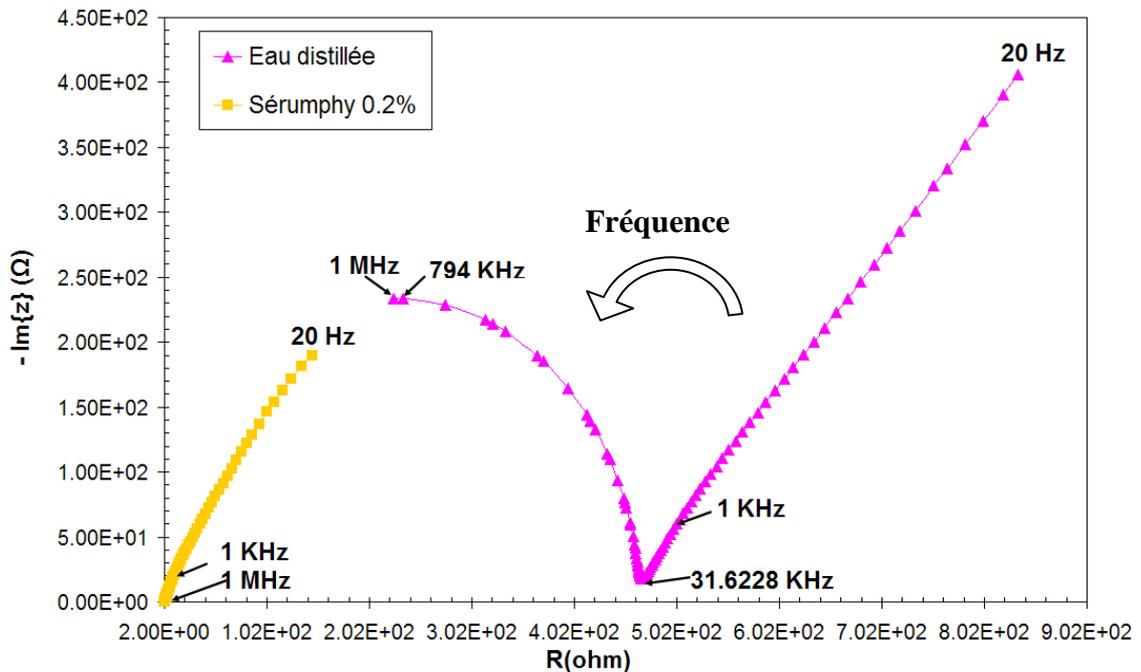


Figure 4-33 : Diagramme de Wessel, concernant la réactance X ($Im\{Z\}$) en fonction de la résistance R ($Re\{Z\}$) à chaque fréquence, de l'eau distillée et du sérum physiologique de 0,2%.

La représentation graphique par le diagramme de Wessel de l'eau distillée et du sérum physiologique montre une diminution linéaire de la réactance et de la résistance d'une fréquence de 20 Hz jusqu'à 31,62 kHz (468 Ω , 17,8 Ω) pour l'eau, et jusqu'à 1 MHz (2,27 Ω , 0,12 Ω) pour le sérum.

On interprète cette courbe de la manière suivante :

A basse fréquence, les ions Na^+ et Cl^- s'accumulent sur les électrodes par effet électrolytique. Il y a alors effet capacitif, on constate une réactance avec des valeurs importantes et un passage du courant électrique à travers le milieu très faible. A haute fréquence, les ions n'ont pas le temps de s'accumuler sur les électrodes, il n'y a alors plus effet capacitif. Il n'y a alors qu'un seul phénomène physique en jeu, et donc on observe un effet conducteur simple, dont la résistance est faible et la partie imaginaire de l'impédance baisse simultanément avec la fréquence pour décrire une décroissance linéaire

En revanche, le graphe de l'eau distillée, c'est-à-dire d'eau non ionisée, décrit une droite décroissante pour les basses fréquences jusqu'à 31,62 kHz puis un quart d'arc de cercle traduisant une augmentation de la réactance et diminution de la résistance jusqu'à atteindre un pic à 1 MHz (226 Ω , 234 Ω).

La partie rectiligne des basses fréquences correspond au même comportement que celui du sérum physiologique mais pour des parties Re et Im beaucoup plus élevées. Comme elle fait avec l'axe des abscisses un angle d'environ 45°, sa forme, selon Hornebecq [Hornebecq2000], est fonction de la nature des électrodes. Le pic à 1 MHz correspondant au quart d'un cercle pourrait être, selon moi, dû à la polarisation des molécules d'eau à cette fréquence pour créer un effet condensateur qui pourrait empêcher le passage du courant à travers le milieu. On pense que le condensateur créé est dû à la réorganisation spatiale des molécules d'eau par rapport à la polarité des électrodes.

- *Emulsion simple eau dans l'huile*

La Figure 4-34 et la Figure 4-35 représentent les diagrammes de Bode et de Wessel des émulsions simples eau dans l'huile.

Pour les fréquences inférieures à 1 kHz, les modules de l'impédance des trois tailles de gouttes sont voisins. Leurs valeurs décroissent de 29,5 M Ω jusqu'à 4 M Ω .

Pour les fréquences supérieures à 1 kHz, les trois courbes sont exactement superposées. Les modules de l'impédance varient respectivement de 3,4 MΩ à 4,5 Ω.

Les réactances sur le diagramme de Wessel à des fréquences inférieures à 1 kHz décroissent de 14,3 MΩ à 4,3 MΩ pour les gouttes de 6-35 μm, de 14,5 MΩ à 4,3 MΩ pour les gouttes de 7-64 μm et de 13,7 MΩ à 4,14 MΩ pour les gouttes de 18-154 μm. Au-delà de 1 kHz, les valeurs diminuent de 667 kΩ à 356 Ω pour les résistances et de 3,38 MΩ à 4,5 kΩ pour les réactances.

Sur le diagramme de Bode, on n'observe pas de différence en fonction de la taille des gouttes d'eau, ce qui explique la prédominance de la très haute impédance de l'huile et de la haute impédance de l'eau distillée à des fréquences inférieures à 1 kHz. Le module de l'impédance par rapport à celui de l'huile de paraffine pure est incurvé à partir des fréquences supérieures à 1 kHz avec des valeurs nettement plus faibles d'environ 71% à 10 kHz (voir Figure 4-32).

Sur le diagramme de Wessel, les trois courbes ne présentent que des différences très faibles qui peuvent être prises sur le compte des incertitudes liées à la technique de mesure.

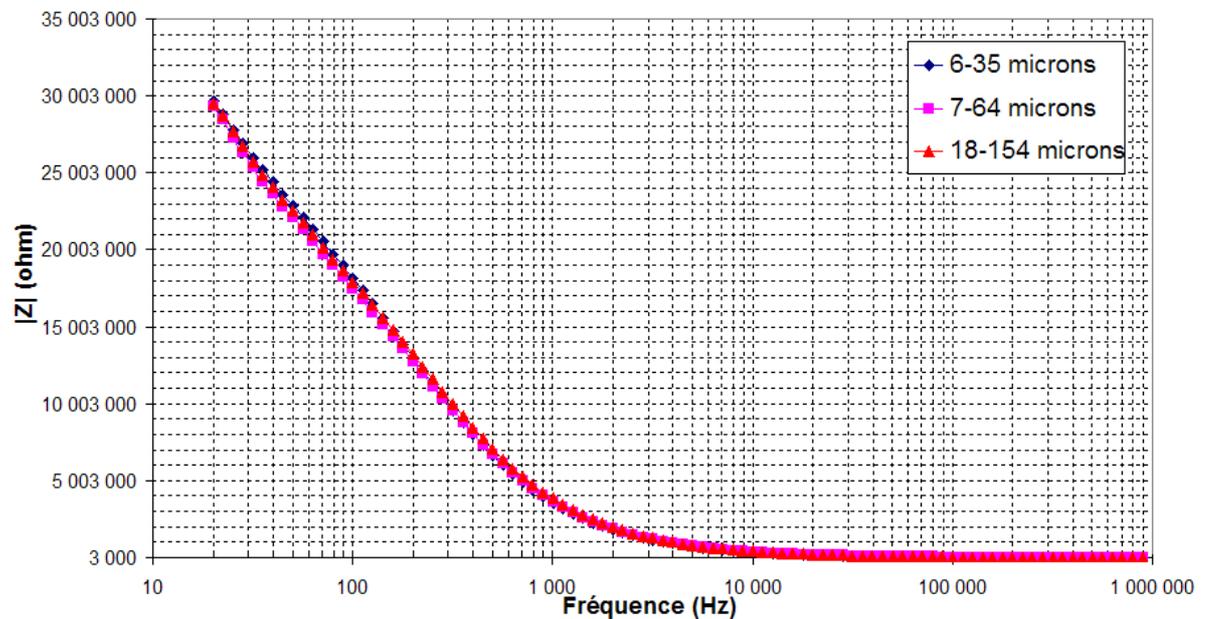


Figure 4-34 : Diagramme de Bode concernant le module de l'impédance $|Z|$ des gouttes d'émulsions simples eau dans l'huile de diamètres 6-35 μm, 7-64 μm et 18-154 μm.

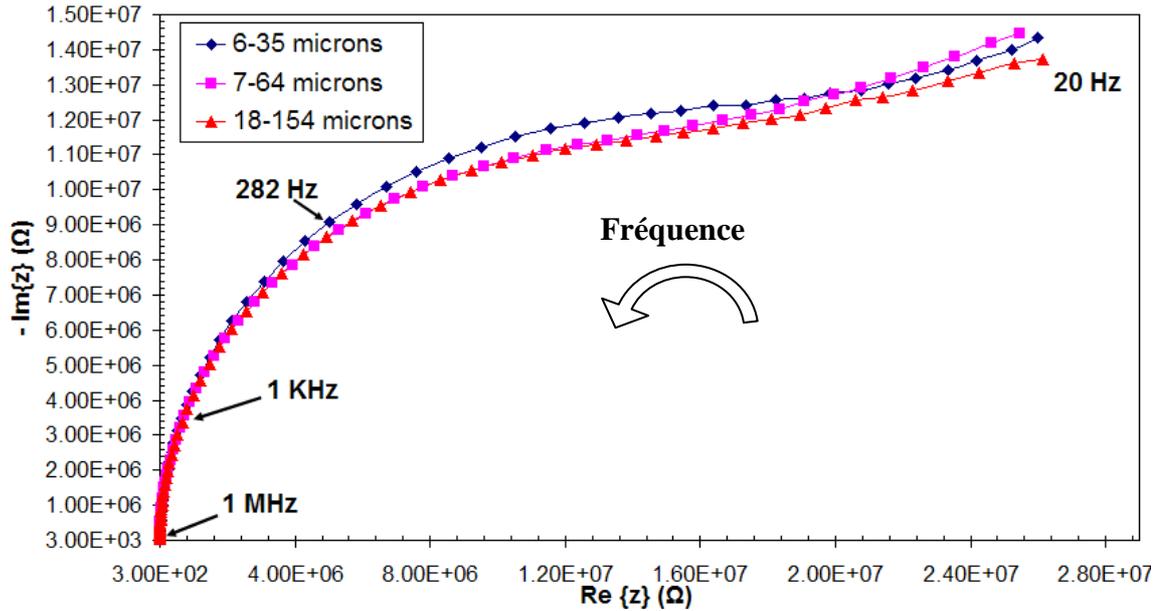


Figure 4-35 : Diagramme de Wessel, concernant la réactance $X (Im\{Z\})$ en fonction de la résistance $R (Re\{Z\})$ à chaque fréquence, pour des gouttes d'émulsions simples eau dans l'huile de diamètres 6-35 μm , 7-64 μm et 18-154 μm .

- Emulsion simple de sérum physiologique dans l'huile

Sur la Figure 4-36, on voit que le module de l'impédance est le même quelque soit la taille des gouttes de sérum physiologique au-delà de 1 kHz, tandis qu'il est en fonction de la taille à des fréquences inférieures à 1 kHz : à 100 Hz, il est de 16,8 M Ω pour les gouttes de 20-190 μm , et de 14 M Ω pour celles de 4-33 μm .

Sur la Figure 4-37, on observe une diminution de la résistance et de la réactance avec la diminution de la taille.

L'impédance résulte de la traversée par le courant de l'huile qui est très peu conductrice et du sérum qui est conducteur, ce que nous interprétons comme une diminution de la taille des gouttes de sérum et une diminution du parcours dans l'huile à basse fréquence. Les distances capacitives entre les gouttes se réduisent quand celles-ci sont petites, comme indiqué sur le schéma de la Figure 4-38, et par conséquent la capacité équivalente est un peu capacitive. En revanche, l'augmentation de la taille des gouttes de sérum se traduit par une augmentation du parcours de courant dans l'huile.

A haute fréquence, l'impédance faible s'explique par l'effet capacitif plus faible de l'huile et du sérum qui est conducteur, ce qui signifie que quelque soit la taille des gouttes de sérum, l'impédance globale est minimale.

Les graphes de la Figure 4-37 sont comparables à ceux d'un tissu ischémique (Figure 4-31).

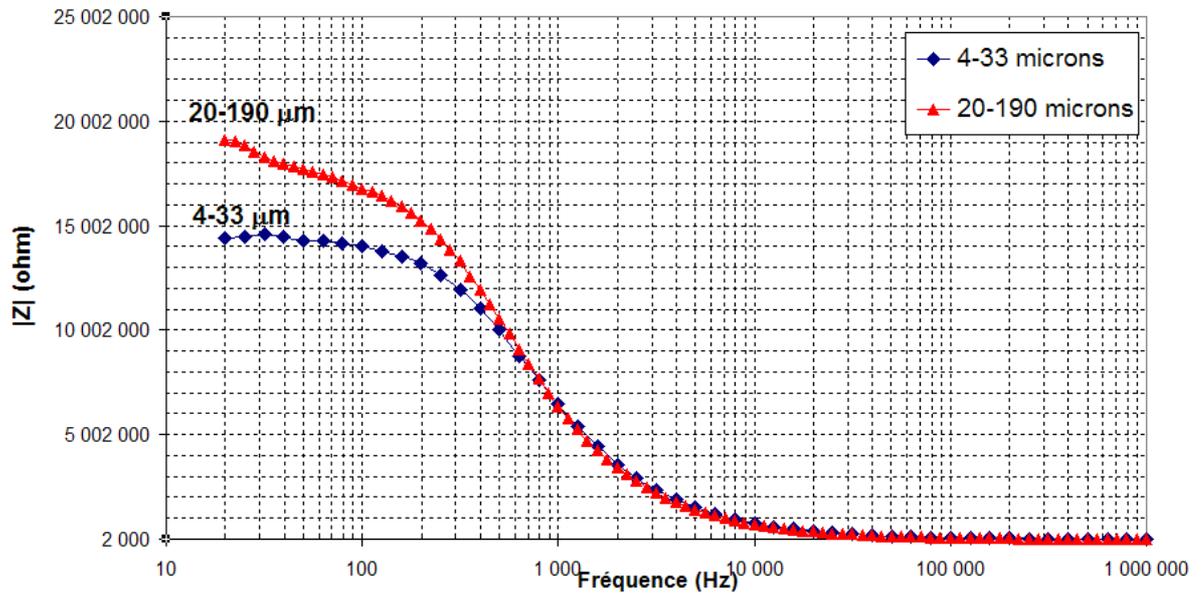


Figure 4-36 : Diagramme de Bode concernant le module de l'impédance $|Z|$ des gouttes d'émulsions simples sérum physiologique dans l'huile de diamètres 4-33 μm et 20-190 μm .

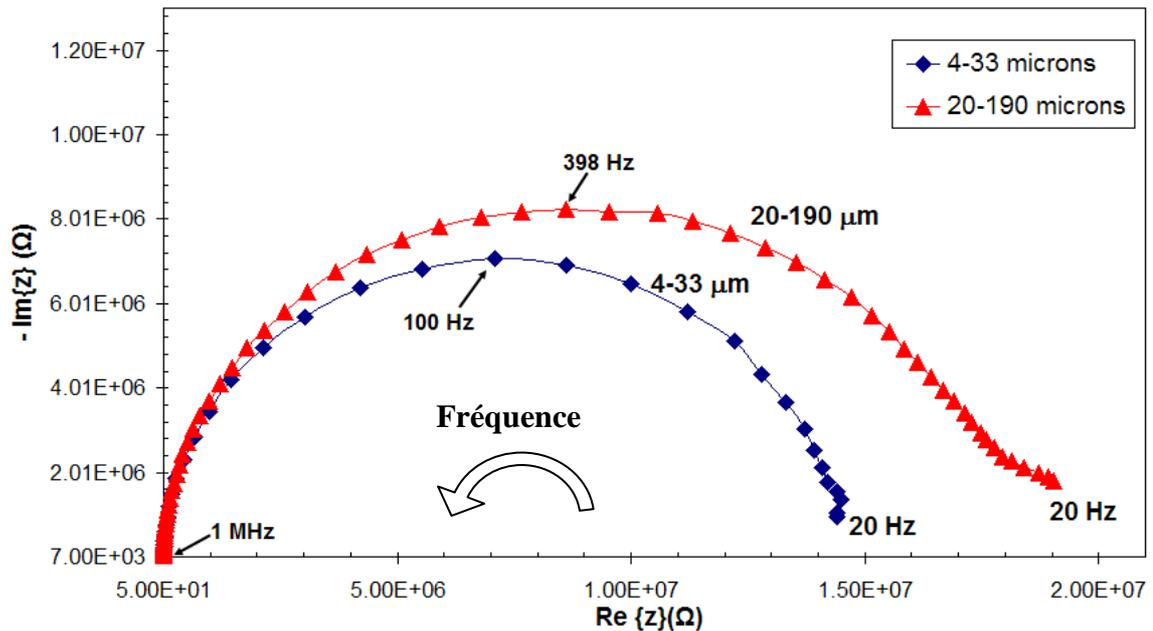


Figure 4-37 : Diagramme de Wessel, concernant la réactance X ($\text{Im}\{Z\}$) en fonction de la résistance R ($\text{Re}\{Z\}$) à chaque fréquence, des gouttes d'émulsions simples sérum physiologique dans l'huile de diamètres 4-33 μm et 20-190 μm .

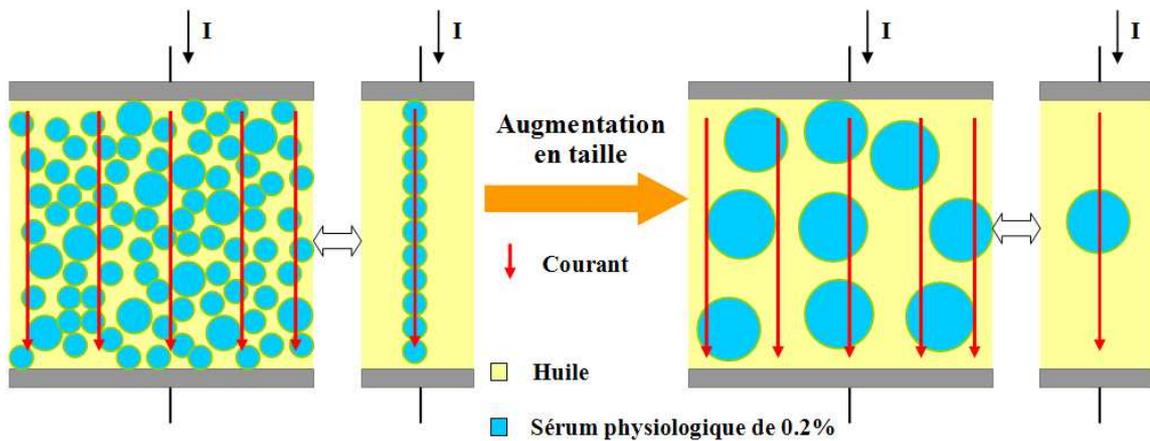


Figure 4-38 : Schéma du courant alternatif traversant un milieu contenant des gouttes d'émulsions simples sérum physiologique dans l'huile de diamètres 4-33 μm et 20-190 μm . À gauche, flux de courant traversant plus les gouttes de sérum de petite taille que l'huile. À droite, flux de courant traversant plus l'huile que les gouttes de sérum de grande taille. Donc, le flux de courant traversant les gouttes de sérum de petite taille est plus important que celui traversant les gouttes de grande taille.

- Emulsion **double** eau dans l'huile dans l'eau

Sur la Figure 4-39, il y a une faible différence d'impédance entre les globules de 16-201 μm et ceux de 16-170 μm au-delà de 500 kHz, tandis que l'écart est important à des fréquences inférieures à 500 kHz : à 1 kHz, le module de l'impédance est de 1,9 K Ω pour les globules de 16-201 μm et de 1,4 K Ω pour ceux de 16-170 μm , avec un écart de 26%.

Sur la Figure 4-40, les graphes décrivent une décroissance linéaire pour les basses fréquences jusqu'à 16 kHz pour les globules de 16-201 μm et jusqu'à 22,3 kHz pour ceux de 16-170 μm (première partie), puis un-demi arc de cercle pour les fréquences moyennes et élevées, lui-même composé d'une seconde partie avec une réactance croissante jusqu'à 501 kHz pour 16-201 μm et jusqu'à 631 kHz pour 16-170 μm , et une troisième partie décroissante pour les fréquences supérieures.

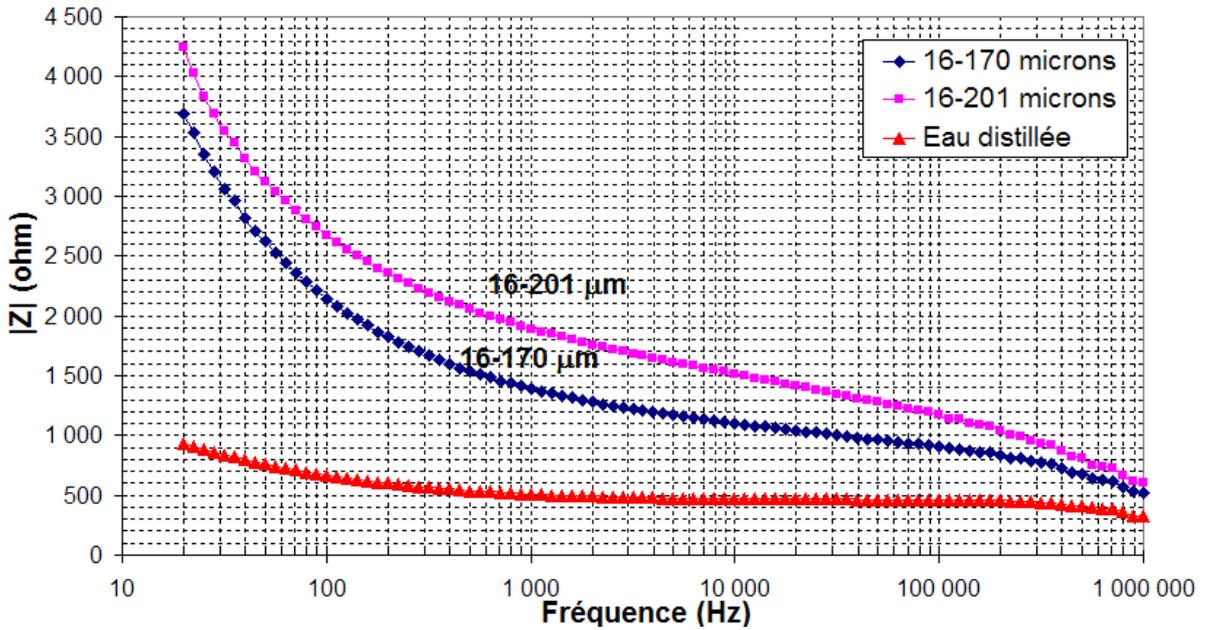


Figure 4-39 : Diagramme de Bode concernant le module de l'impédance $|Z|$ des globules d'émulsions doubles eau dans l'huile dans l'eau de diamètre 16-170 μm et 16-201 μm .

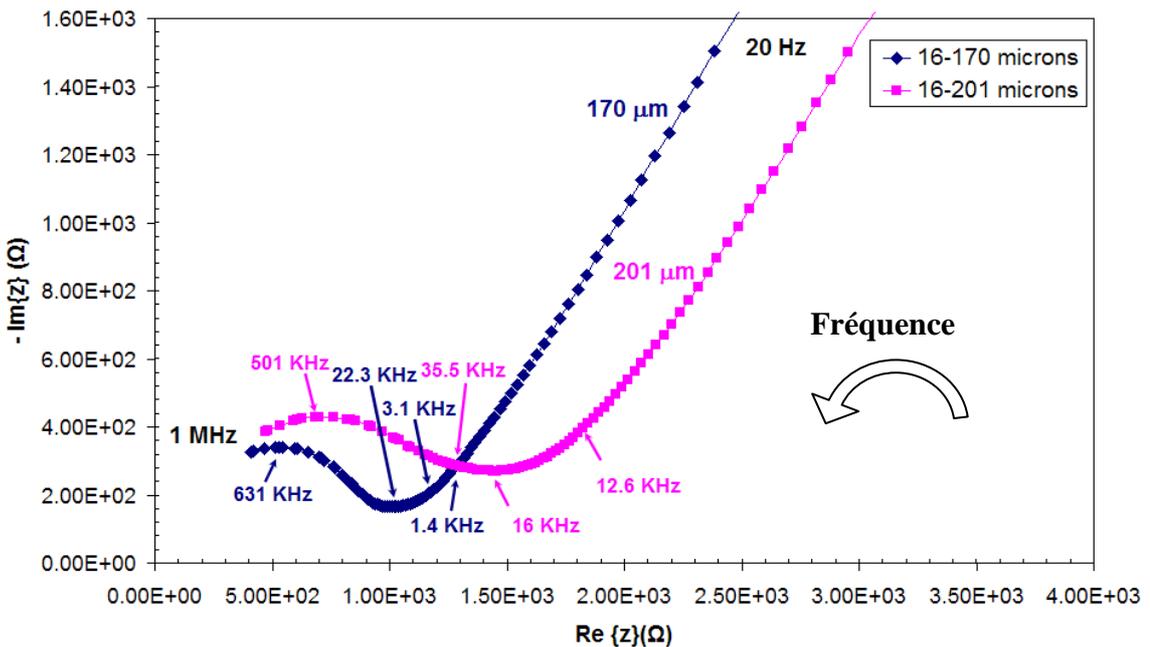


Figure 4-40 : Diagramme de Wessel, concernant la réactance X ($\text{Im}\{Z\}$) en fonction de la résistance R ($\text{Re}\{Z\}$) à chaque fréquence, pour des globules d'émulsions doubles eau dans l'huile dans l'eau de diamètre 16-170 μm et 16-201 μm .

Nous interprétons ce comportement de la manière suivante :

Pour la première partie de ce graphe, la forme principalement linéaire et décroissante de la courbe correspond à la nature des électrodes, à rapprocher du comportement décrit plus haut pour l'eau distillée. Elle signifie aussi que le courant ne

pénètre pas dans les globules car l'impédance de l'huile est très supérieure à celle de l'eau distillée (voir Figure 432). Il s'agit donc d'un courant qui traverse uniquement l'eau distillée à l'extérieur des globules, comme c'est indiqué sur le schéma de la Figure 441.

Dans la seconde partie de la courbe, l'effet capacitif dû à la membrane d'huile entre en considération. Le courant à des fréquences moyennes commence à traverser les globules. Les valeurs maximales des pics sur les demi-cercles de la Figure 440 ne sont pas les mêmes. La valeur de ce maximum de réactance des globules les plus grands est supérieure à celle des globules plus petits, car vraisemblablement, l'épaisseur moyenne d'huile traversée est plus importante.

Aux fréquences situées au-delà du pic du demi-cercle, la réactance diminue, car comme dans un condensateur, le courant à haute fréquence traverse aussi bien les milieux très isolants comme l'huile et que ceux moins isolants comme l'eau distillée.

On peut ainsi caractériser la membrane de l'huile entre globules et gouttes d'eau à l'intérieur des globules par le pic de valeur maximale observé sur la Figure 440, ce qui peut être rapproché du pic d'une bicouche lipidique d'une membrane cellulaire (Figure 431). L'huile à l'intérieur des globules se comporte alors comme un condensateur de capacitance qui dépend de l'épaisseur de l'huile. L'eau distillée à l'intérieur des gouttes et à l'extérieur des globules se comporte comme une résistance. On peut représenter un globule d'une émulsion double par un circuit en parallèle comprenant une résistance pour le milieu extra-globulaire R_e , une résistance pour le milieu intra-goutte R_i , et une capacité pour la membrane huileuse C_H (Figure 442).

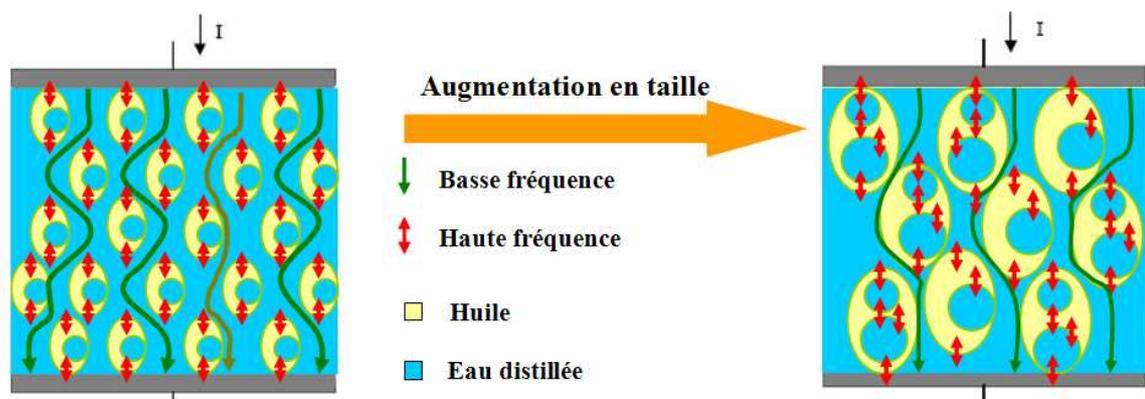


Figure 441 : Schéma du courant alternatif, à basse et haute fréquence traversant un milieu contenant des émulsions doubles eau dans l'huile dans l'eau de diamètres 16-170 μm et 16-201 μm . À gauche, flux de courant traversant les globules de taille petite. À droite, flux de courant traversant les globules de taille grande.

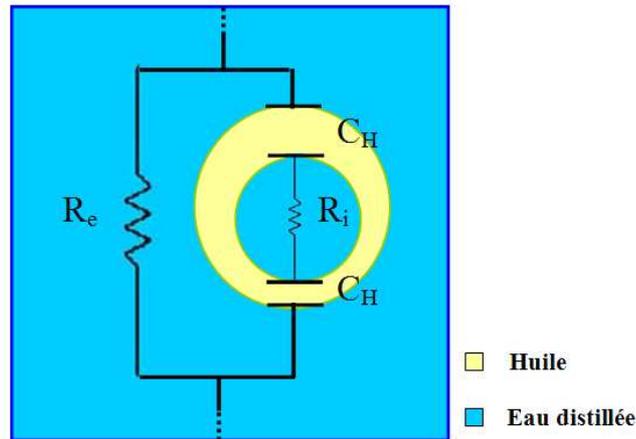


Figure 4-42 : Simple modèle électrique d'un globule d'émulsion double. R_e , résistance du milieu extracellulaire, R_i , résistance du milieu intracellulaire, et C_H , capacité de la membrane huileuse assimilée à un condensateur.

La caractérisation électrique des émulsions simples et doubles donne un résultat intéressant dans la perspective du relargage des molécules de principes actifs sous un champ électrique. En effet, les gouttes d'émulsion simple contenant du sérum physiologique et les globules d'émulsion double ont démontré un profil d'impédances complexes similaires à celui d'une cellule vivante. En adoptant la représentation de Wessel, il apparaît un pic sur un demi-cercle pour les gouttes de sérum physiologique sensible à la taille des gouttes, et un pic sur un demi-cercle pour les globules sensible à l'épaisseur de la membrane d'huile à l'intérieur. L'interface eau-huile et la membrane cellulaire sont détectées à des fréquences différentes (Figure 4-23 ; Figure 4-40), en raison de différences entre la structure de l'interface eau-huile et celle de la bicouche membranaire.

4.4 Conclusion

Le modèle expérimental conçu *in vitro*, avec les HépasphèresTM marquées dans un environnement simulant grossièrement une vascularisation tumorale et son drainage veineux, a pu répondre à nos interrogations sur le relargage éventuel du marqueur avec des "pressions négatives". Grâce à la méthodologie de correction conçue permettant une quantification précise de l'agent de contraste largué dans le liquide de perfusion, le procédé mis en place de 4h de pompage préalable conduit à des HépasphèresTM visibles qui ne relarguent pas. Elles sont donc stables et visibles. Pour le débit d'un carcinome

de foie de 2,4 ml/min, la dissociation estimée par rapport aux mesures déduites du modèle est de 5 µl d'Endorem[®], soit 1% de la dose initiale dans les Hépasphères[™].

Dans le cadre d'exploration des conditions de relargage des principes actifs, la fixation des immunoglobulines (IgG1), équivalent aux anti-VEGF, sur les Hépasphères[™] est faisable. Cependant le rendement des réactions de couplage avidine-Hépasphère n'est pour l'instant que de 60% (couplage covalent), et les interactions chimiques entre sphères et molécules ne garantissent pas la pérennité des propriétés initiales.

La caractérisation mécanique des émulsions simples et doubles par analyse spectrale des échos qu'ils réfléchissent, a mis en évidence l'effet de l'interface entre l'eau et l'huile (atténuation et absorption). Pour les deux types d'émulsions, l'absorption des ultrasons est faible à 10 MHz et forte au-delà de 15 MHz. Une perspective serait d'utiliser des tirs à des fréquences uniques, par exemple à 20 MHz où l'absorption est maximale, et de savoir quelle intensité ultrasonore il faut appliquer pour arriver à la destruction des émulsions, par cavitation ou simple élévation de température, dans le but d'une possible relargage.

Enfin, l'exploration des caractéristiques électriques des émulsions simples et doubles pour toute une gamme de fréquences a démontré un profil d'impédances complexes similaires à celui d'une cellule vivante. Une interface eau-huile et une membrane cellulaire semblent donc pouvoir être caractérisées à des fréquences différentes, en raison de différence entre la structure de l'interface et celle de la bicouche membranaire. Il faudrait envisager des séries de modification systématiques des caractéristiques des impulsions (durée, puissance, forme) pour provoquer une rupture réversible ou irréversible de l'interface eau-huile dans le but d'une possible relargage, et ceci dans l'environnement IRM.

Conclusion

L'embolisation artérielle a récemment émergé sur le plan interventionnel comme un traitement sûr et efficace pour arrêter une hémorragie ou induire la dévascularisation d'un tissu cible. La visualisation directe des agents d'occlusions vasculaires n'est pas toujours possible. L'estimation de leur position dans la branche vasculaire en se basant sur la distribution de produit opaque aux rayons-X est partiellement incorrecte. Un marquage des agents d'occlusion vasculaire est souhaitable pour leur suivi par IRM pendant l'intervention ou à postériori, ce, notamment en raison de la diffusion de l'IRM comme modalité d'imagerie anatomique et interventionnelle.

En conclusion, ce travail comporte un volet méthodologique et un volet expérimental.

Sur le plan méthodologique, notre contribution concerne essentiellement la proposition d'un algorithme pour la correction des faibles variations d'intensité mesurée. Il s'agit dans un premier temps d'un pré-traitement qui optimise les conditions d'acquisition de l'imageur (TR, Nex, épaisseur de la coupe, les gains d'émission et de réception de l'antenne, le choix de l'antenne et de la séquence), la position et la répartition des éléments de l'objet sur le support. Dans un second temps, il concerne un traitement par moyennage de l'intensité mesurée d'un objet sur une image pour une position donnée avec celles du même objet dans d'autres positions ou directions. Ceci réduit les non uniformités afin de permettre de gagner en précision de mesure. Les résultats de notre algorithme sur un fantôme homogène sont satisfaisants, la dispersion de non uniformité par rapport à la moyenne a diminué de 30% sur le fantôme de sérum physiologique et de 51% sur le fantôme d'huile. Ces indications utiles indiquant la fiabilité de notre algorithme nous ont permis de quantifier les faibles variations caractérisant l'échantillon sans avoir une erreur induite par les défauts d'intensité.

Au niveau expérimental et du savoir faire, les agents d'occlusion vasculaire qui étaient invisibles dans le plan interventionnel sont maintenant visibles sous IRM par des trous noirs. Ce résultat est obtenu grâce à la stratégie de marquage élaborée avec une quantité optimale de produit de contraste mise à l'intérieur de microparticules, les séquences définies avec des paramètres optimaux et le bon choix de l'antenne. La signalétique des microparticules sur les images IRM est constamment en hyposignal sur l'ensemble des séquences utilisées, tel que le SPGR (T_1) et la Fiesta (T_2/T_1). Les trous noirs obtenus sur les images IRM, pour des reins de porc ou de brebis, confirment que

le marquage en hyposignal est plus simple et souhaitable pour pouvoir différencier les particules marquées qui se trouvent dans des structures vasculaires des tissus environnants. Quelques soient le nombre et le calibre de microparticules, les trous noirs sur les images IRM sont identiques. Ils ont un diamètre apparent 2,5 fois la taille réelle pour des microsphères de Tris-acryl « Embosphère® » singlets destinées à l'embolisation permanente des fibromes utérins.

Dans le cadre du développement de matériels d'occlusion visibles sous IRM et éventuellement de vecteurs de drogues, les résultats obtenus sur le marquage des microsphères, qui se présentent à l'état initial sous forme de poudre (Hépasphères™), est satisfaisant. De même, le marquage de microparticules ainsi que de microcapsules, réalisées par nos soins concernant des microbilles d'alginate et des modèles d'émulsions est aussi satisfaisant. Ces matériels d'occlusion que nous avons marqués sont visibles sous IRM par des trous noirs. Le seuil de détectabilité des agents d'occlusions vasculaires avec une IRM 1,5T est de moins de 50 µm. La conception d'un modèle expérimental in vitro avec la présence des Hépasphères™ marquées dans un environnement simulant grossièrement une vascularisation tumorale et son drainage veineux, a conduit à des Hépasphères™ visibles qui ne relarguent pas. La réaction de couplage des Immunoglobulines (IgG1), équivalentes aux anti-VEGF, sur les Hépasphères™ comme alternative à l'utilisation des cytotoxiques est possible, mais plus d'essais en chimie sont nécessaires pour améliorer les rendements de couplage. La caractérisation mécanique des émulsions simples et doubles par analyse spectrale des échos qu'ils réfléchissent, a mis en évidence l'effet de l'interface entre l'eau et l'huile (atténuation et absorption). Pour les deux types d'émulsions, l'absorption des ultrasons est faible à 10 MHz et forte au-delà de 15 MHz. L'exploration des caractéristiques électriques pour toute une gamme de fréquences a démontré un profil d'impédances complexes similaires à celui d'une cellule vivante. Une interface eau-huile et une membrane cellulaire semblent donc pouvoir être caractérisées à des fréquences différentes, en raison de différence entre la structure de l'interface et la bicouche membranaire.

Cette compréhension de la problématique et ce savoir faire pour le suivi, l'amélioration des techniques destinées à l'IRM interventionnelle ou de thérapie vectorisée constituent maintenant une base pour orienter des recherches cliniques. Selon les indications des outils adaptés permettront plus d'efficacité : localisation des

microsphères de Tris-acryl pour les fibromes utérins, utilisation d'Hépasphère™ pour les carcinomes du foie, largage contrôlé localisé de principes actifs sur certaines tumeurs.

Il reste un certain nombre d'interrogations, d'essais et de progrès à prévoir. Ceux-ci pourront être éclaircis dans l'avenir par plusieurs stratégies :

- Utilisation d'un imageur à champ plus intense.
- Production d'émulsions de tailles plus régulières.
- Utilisation des tirs ultrasonores à des fréquences pures où l'absorption est maximale, et contrôle de la destruction des émulsions.
- Etude du comportement des émulsions dans un flux sanguin.
- Chargement des émulsions avec des principes actifs.

Au terme de cette étude, et malgré de nombreux limites existant encore, une nouvelle voie de recherche sur les techniques de détectabilité des matériels d'embolisation vasculaire sous IRM se dessine, grâce au développement de savoir faire dans notre laboratoire, à l'observation expérimentale et à la compréhension des mécanismes physico-chimiques mis en jeu.

Bibliographie

- [Ahmed1999] Ahmed M. N., Yamany S. M., Mohamed N. A., Farag A. A. et Moriarty T. Bias field estimation and adaptive segmentation of MRI data using a modified Fuzzy C-Means algorithm. *Proc. 13th International Symposium and Exhibition on Computer Assisted Radiology and Surgery (CARS '99)*. Paris (France), 1999; p. 1004.
- [Akihiko2001] Akihiko K., Teruo O. Pulsatile drug release control using hydrogels. *Advanced drug delivery reviews* 2002; 54 : 53–77.
- [Anderson1981] Anderson J.H., Gianturco C., Wallace S. Experimental transcatheter intra-arterial infusion-occlusion chemotherapy. *Invest Radiol* 1981; 16: 496.
- [Andrews2003] Andrews R., Binkert CA., Relative rates of blood flow reduction during transcatheter arterial embolization with tris-acryl gelatin microspheres or polyvinyl alcohol: quantitative comparison in a swine model. *J Vasc Interv Radiol* 2003; 14:1311–1316.
- [April Palmer2004] April Palmer, M.S. Angiogenesis. *Medanderson Seminars* 2004.
- [Axel1987] Axel L., Constantini J. et Listerud J. Intensity correction in surface-coil MR imaging. *Am. J. Roentgenol* 1987; Vol. 148, p. 418–420.
- [Baird1987] Baird, A., Ling, N. Fibroblast growth factors are present in the extracellular matrix produced by endothelial cells in vitro: implications for a role of heparinase-like enzymes in the neovascular response. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1987; 142: 428–35.
- [Barker1998] Barker G.J., Simmons A., Arridge S. R. et Tofts P. S. A simple method for investigating the effects of non-uniformity of radiofrequency transmission and radiofrequency reception in MRI. *Brit. J. Radiol.* 1998; vol. 71, n°841, p. 59–67.
- [Beaujeux1996] Beaujeux R., Laurent A., Wassef M., Casasco A., Gobin Y.P., Aymard A., Rüfenacht D., Merland J.J. Trisacryl gelatin microspheres for therapeutic embolization, II : Preliminary clinical evaluation in tumors and arteriovenous malformations. *Am J Neuroradiol* 1996; 17: 541–548.
- [Beuf1996] Beuf O., Briguet A., Davis R. Magnetic Resonance Imaging for the Determination of Magnetic Susceptibility of Materials. *Journal of Magnetic Resonance* 1996; Series B 112, 111–118.

- [Bloch1946] Bloch F., Hanson W.W., Packard M.E. Nuclear induction. *Phys. Rev.* 1946; 69, p.127.
- [Bottomley1984] Bottomley P.A., Foster T.H., et al. A review of normal tissue hydrogen NMR relaxation times and relaxation mechanisms from 1–100 MHz: dependence on tissue type, NMR frequency, temperature, species, excision and age. *Med phys.* 1984; 11: 425–48.
- [Brey1988] Brey W. W. et Narayana P. A. Correction for intensity falloff in surface coil magnetic resonance imaging. *Med phys.* 1988; vol. 15, n°2, p. 241-245.
- [Bridcut2001] Bridcut R. R., Redpath T.W., Gray C.F. et Staff R.T. The use of SPAMM to assess spatial distortion due to static field inhomogeneity in dental MRI. *Phys. Med. Biol.* 2001; vol.46, n°5, p. 1357–1367.
- [Brinkmann1996] Brinkmann B.H, Manduca A., Robb R.A. Quantitative analysis of statistical methods of greyscale inhomogeneity correction in magnetic resonance images. *Proceedings of Medical Imaging: Image Processing* 1996; 2710: 542–52.
- [Brinkmann1998] Brinkmann B. H., Manduca A. et Robb R. A. Optimized homo-morphic unsharp masking for MR grayscale inhomogeneity correction. *IEEE Trans. Med. Im.* 1998; vol. 17, n°2, p. 161–171.
- [Brockmans1996] Brockmans FJ, Heitbrink MA, Hompes PG, Schoute E, Falke T, Schoemaker J. Quantitative MRI of uterine leiomyomas during triptorelin treatment : reproducibility of volume assessment and predictability of treatment response. *Magn Reson Imag.* 1996; 14: 1127–35.
- [Burgess1989] Burgess WH, Maciag T. The heparing binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 575–606.
- [Buttram1981] Buttram Jr. V.C., Reiter R.C. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. *Fertil Steril* 1981; 36: 433–445.
- [Camilleri1987] Camilleri JP. Hypertension et vieillissement artériel. *Paris : Laboratoires Servier*, 1987.
- [Chambon1993] Chambon C., Clément O., Le Blanche A.F., Schouman-Clayes E., Frija G. Superparamagnetic iron oxides as positive MR contrast agents : in vivo and

- in vitro evidence. *Magn Reson Imag.* 1993; 11: 509–519.
- [Chapot2000] Chapot R. Marquage IRM d'hydrogels acryliques. *DEA, GBM, UTC* 2000.
- [Chiang1978] Chiang C., Fuller G.C., Frankenfeld J.W., Rhodes C.T. Potential of liquid membranes for drug overdose treatment. In vitro studies. *J. Pharm. Sci.* 1978; 67: 63–66.
- [Chretien2004] Chretien C., Chaumeil J.C. Release of a macromolecular drug from alginate-impregnated microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 304: 18–28.
- [Chretien2005] Chretien C., Chaumeil J.C. Release of a macromolecular drug from alginate-impregnated microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 304: 18–28.
- [Clare2001] Clare S., Alessi M. et jezzar P. Compensating for B₁ inhomogeneity using active transmit power modulation. *Magn. Reson. Imaging* 2001; vol.19, n°10: p.1349–1352.
- [Cliff1965] Cliff, W. J. Kinetics of wound healing in rabbit ear chambers: a time lapse cinemicroscopic study. *Q. J. Exp. Physiol. Log. Med. Sci.* 1965; 50: 79–89.
- [Cohen2000] Cohen M. S., DuBois R. M. et Zeineh M. M. Rapid and effective correction of RF inhomogeneity for high field magnetic resonance imaging. *Hum. Brain Mapp.* 2000; vol. 10, n°4, p.204–211.
- [Damadian1971] Damadian R. Tumor detection by magnetic resonance. *Science* 1971; 171, p.1151.
- [Dameron1994] Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582–4.
- [Davies1997] Davies PF, Barbee KA, Volin MV, Robotewskyj A, Chen J, Joseph L, et al. Spatial relationships in early signalling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.* 1997; 59: 527–49.
- [Dawant1993] Dawant B.M., Zijdenbos A.P. et Margolin R.A. Correction of intensity variations in MR images for computer-aided tissue classification. *IEEE Trans. Med. Im.* 1993; vol. 12, n°4, p 770–781.

- [De Baere1995] De Baere T., Dufaux J., Roche A., Counnord J.L., Berthault M.F., Denys A., Pappas P. Circulatory alternations induced by intra-arterial injection of iodized oil and emulsion of iodized oil and doxorubicin: Experimental study. *Radiology* 1995; 194: 165–170.
- [De Luis2008] De Luis E., Bilbao J.I., et al. In vivo evaluation of an new embolic spherical particle (HepaSphere) in a kidney animal model. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2008; 31: 367–376.
- [Deichmann2002] Deichmann R., Good C. D. Et Turner R. RF inhomogeneity compensation in structural brain imaging. *Magnet. Reson. Med.* 2002; vol.47, n°2, p.398–402.
- [Derdeyn1997] Derdeyn C., Graves V., Salamat M., Rappe A. Collagen-coated acrylic microspheres for embolotherapy: in vivo and in vitro characteristics. *AJNR* 1997; 18:647–653.
- [Dion1986] Dion J.E., Rankin R.N. Fox A.J., et al. Dextran microsphere embolization : Experimental and clinical experience with radiologic-pathologic correlation. *Radiology* 1986; 160: 717–721.
- [Douglas1994] Douglas M.C., Kenneth R.S., Wayne F.Y. Embolotherapy: agents, clinical applications, and techniques. *RadioGraphics* 1994; 14: 623–643.
- [Doumiati2007] Doumiati S., et Bedel C.B.C. Marquage des Hépapshères par des anticorps pour l’embolisation de néovasculisations tumorales. Mémoire du Master 2 en Biotechnologie 2006-2007; *Université de Technologie de Compiègne*, UTC.
- [Dvorak1985] Dvorak, H. F., Senger, D. R., Dvorak, A. M., Harvey, V. S., and McDonagh, J. Regulation of extravascular coagulation by microvascular permeability. *Science (Wash. DC)* 1985; 227: 1059–1061.
- [Dvorak1986] Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 1986; 315: 1650–1659.
- [Dvorak1995] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS.* 1997; 79: 233–269.
- [Dvorak2002] Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth

- factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 4368–4380.
- [Elster2001] Elster A.D., Burdette J.H. Questions and answers in magnetic resonance imaging. *Livre second edition* 2001; Chap 8, pp. 181–183.
- [Endrich1979] Endrich, B., Intaglietta, M., Reinhold, H. S., and Gross, J. F. Hemodynamic characteristics in microcirculatory blood channels during early tumor growth. *Cancer Res.* 1979; 39: 17–23.
- [Endrich1982] Endrich. B., Hammersen, F., Goetz, A., and Messmer, K. Microcirculatory blood flow, capillary morphology, and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-MEL-3. *J. Natl. Cancer Inst.* 1982; 68: 475–485.
- [Favard1995] Favard C, Party V, Prats H, Plouet J, Bayard F. Growth factors binding heparin: FGF and VEGF. Physiological and physiopathological importance, therapeutic implications in diabetic retinopathy. *J. Annu. Diabetol Hôtel Dieu* 1995; 39–51.
- [Fayette2004] Fayette J., Soria J.C., Armand J.P. Use of angiogenesis inhibitors in tumor treatment. *European Journal of Cancer*; 2004; 41: 1109–1116.
- [Feng1997] Feng Si-S., Chien S. Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science* 2003; 58: 4087–4114.
- [Fidelman2002] Fidelman N., Wilson M.W., Weber O. M., Martin A.J., Kerlan R.K., Laberge J.M., Gordon R.L. Real-time MR properties of particule embolic agents tested in a dynamic flow model. *J Vas Interv Radiol.* 2002; 13: 613–618.
- [Filder 1994] Filder IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994; 79: 185–188.
- [Fleischer2000] Fleischer AC, Donnelly, EF, Campbell MG, et al. Three-dimensional color Doppler sonography before and after fibroid embolization. *J ultrasound Med.* 2000; 19: 701–705.
- [Folkman1971] Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N. Engl. J.*

- Med.* 1971; 285: 1182–1186.
- [Folkman1974] Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer. Res.* 1974; 19: 331–58.
- [Folkman1990] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent ? *J. Natl. Cancer Inst.* 1990; 82: 4–6.
- [Folkman1995] Folkman J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 1757–63.
- [Folkman1995] Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. *The molecular basis of cancer.* Philadelphia: W.B. Saunders 1995; 206–32.
- [Foyeke1998] Foyeke O., Opawale and Diane J. Burgess. Influence of interfacial properties of lipophilic surfactants on water-in-oil emulsion stability. *Journal of Colloid and Interfacial Science* 1998; 197: 142–150.
- [Frates1994] Frates MC, Benson CB, Doubilet PM, Di Salv DN, Brown DL, Laing FC, Rein MS, Osathanondh R. Cervical ectopic pregnancy: results of conservative treatment. *Radiology* 1994; 191: 773–775.
- [Frayon2005] Frayon S, Cueille C, Prat R , Garel J-M. La cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV). *Biologie et Multimédia* 2005; Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie.
- [Freeman1971] Freeman R, Hill HDW. Phase and intensity anomalies in Fourier transform NMR. *J Magn Reson* 1971; 4: 366–383.
- [Garti1998] Garti N., Bisperink C. Double emulsions: progress and applications, curr. Opin. *Colloid Interface Sci.* 1998; 3: 657.
- [Gerber1998] Gerber H, McMurtrey A, Kowalski J, et al: Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival by the PI3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 30336–30343.
- [Goding1996] Goding J.W. Antibody structure and function. *Monoclonal Antibodies, Academic Press* 1996; 72–100.
- [Goldstein1975] Goldstein HM, Medellin H, Ben-Menachem Y, Wallace S. Trancatheter arterial embolization in the menagement of bleeding in the cancer patient.

- Radiology* 1975; 115: 603–608.
- [Gospodarowicz1987] Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L., Neufeld, G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrine reviews* 1987; vol.8, n°2, pp.95–114 (237 ref.).
- [Greenwood1987] Greenwood LH, Glickman MG, Schwartz PE, Morse S, Denny DF. Obstetric and nonmalignant gynecologic bleeding: treatment with angiographic embolization. *Radiology* 1999; 10: 1159–1165.
- [Guery2006] Guery J. Emulsions doubles cristallisables : stabilité, encapsulation et relargage. *Thèse de doctorat de l'université Paris VI*, 2006.
- [Haacke1999 a] Haacke EM, Brown RW, Thompson MR, Venkatesan R. In: Magnetic resonance imaging: *physical principles and sequence design*, 1999; chap.1, p.3.
- [Haacke1999 b] Haacke EM, Brown RW, Thompson MR, Venkatesan R. In: Magnetic resonance imaging: *physical principles and sequence design*, 1999; chap.18.
- [Haacke1999 c] Haacke, E. M., Brown, R. W., Thompson, M. R. and Venkatesan, R. Magnetic Resonance Imaging. *Physical Principles and Sequence Design* 1999; Wiley-Liss, New York, chap.22, p 661.
- [Haase1990] Haase A. “Snapshot FLASH MRI: application to T₁, T₂, and chemical shift imaging”. *Magn. Reson.* 1990; Med 13: 77–89.
- [Hahn2002] Hahn W.C et al. Rules for making human tumor cells. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 1593–603.
- [Hammersen1985] Hammersen, F., Endrich, B., and Messmer, K. The fine structure of tumor blood vessels. I. Participation of non-endothelial cells in tumor angiogenesis. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 1985; 4: 31–43.
- [Han2001] Han C, Hatsukami T. S. et Yuan C. A multi-scale method for automatic correction of intensity non-uniformity in MR images. *Magn. Reson. Int.* 2001; vol. 13, n°3, p.428–36.
- [Hargreaves2002] Hargreaves B., Meyer C.H., Yang P., Hu B., Nishimura D.G. Spiral SSFP coronary artery imaging. *Proc ISMRM* 2002; 245.

- [Harris1994] Harris G. J., Barta P. E., Peng L. W., Lees S., Brettschneider P. D., Shah A., Henderer J. D., Schlaepfer T.E. et Pearlson G. D. MR volume segmentation of gray matter and white matter using manual thresholding: Dependence on image brightness. *Am. J. Neuroradiol* 1994; Vol. 15, n°2, p.225–230.
- [Hayes1985] Hayes C. E., Edelstein W. A., Schenck J. F., Otward M. M., and Eash M. An efficient, Highly Homogeneous Radiofrequency Coil for whole-body NMR Imaging at 1.5 T. *Journal of Magnetic Resonance* 1985; vol. 63, p. 622–628.
- [Hermanson1996a] Hermanson G.T. Zero length cross linkers. *Bioconjugate Techniques. Academic Press Inc* 1996 (USA); 169–176.
- [Heymann2005] Heymann D. Histologie vasculaire PCEM2. *QCM et exercices corrigés et commentés d'histologie*. Paru en 03/2005.
- [Hicklin2005] Hicklin Daniel.J, Ellis Lee M. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *JCO* 2005; 23: 5.
- [Higashi2000] Higashi S., Setoguchi T. Hepatic arterial injection chemotherapy for hepatocellular carcinoma with epirubicin aqueous solution as numerous vesicles in iodinated poppy-seed oil microdroplets: clinical application of water-in-oil-in-water emulsion prepared using a membrane emulsification technique. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000; 45: 57–64.
- [Hino2000] Hino T., Kawashima Y., Shimabayashi S. Basic study for stabilization of W/O/W emulsion and its application to transcatheter arterial embolization therapy. *Advanced Drug Delivery* 2000; 45: 27–45.
- [Hirano1975] Hirano, A., and Matsui, T. Vascular structures in brain tumors. *Human Pathol.* 1975; 6: 611–621.
- [Holtz1996] Holtz J. Peripheral circulation: Fundamental concepts, comparative aspects of control in specific vascular sections, and lymph flow. Livre : *Comprehensive human physiology* (Greger R. et Windhorst U.), vol.2, Chap.94, 1865–1915.
- [Hori1996] Hori S., Okada A., Sakamoto K. A new embolic material: superabsorbant polymer microsphere and its embolic effects. *Jpn J Interv Radiol* 1996; 11: 375–381.

- [Hoult1976] Hoult D. I., Richards R. E. The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment. *J. Magn. Res.* 1976; 24, p.71.
- [Hoult2000] Hoult, D. I. The principle of reciprocity in signal strength calculations – a mathematical guide, conc. *Magn. Reson.* 2000; vol.12, p.173–187.
- [Huguet1994] Huguet M.L. Etude des billes d'alginate de calcium recouvertes de polymère polycationique. *Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine*, 1994.
- [Imran1999] Imran J., Langevin F., et al. Two-point method for T1 estimation with optimized gradient-echo sequence. *Mag Reson Imag.* 1999; 17: 1347–56.
- [Imran2000] Imran J. Estimation des variations de température par IRM : Optimisation des conditions expérimentales et de la précision des mesures. Thèse 2000; *Université de Technologie de Compiègne*.
- [Iverson1996] Iverson RE, Chelmow D, Strohbehn K, Waldman L, Evantach EG. Relative morbidity and mortality of abdominal hysterectomy and myomectomy for management of uterine leiomyomas. *Ostet. Gynecol.* 1996; 88: 415–419.
- [Ivorra2003] Ivorra A. Bioimpedance monitoring for physicians : an overview. *Centrale Nationale de Microélectronique* 2003; Biomedical Application Groups.
- [Jager-Lezer1997] Jager-Lezer N., Terrisse I., Bruneau F., Tokgoz S., Ferreira L., Clausse D., Seiller M., Grossiord J.L. Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of water-soluble molecules entrapped in a W/O/W multiple emulsion. *J. Control. Release* 1997; 45: 1–13.
- [Jain 1987] Jain, R. K., and Ward-Hartley, K. A. Dynamics of cancer cell interaction with microvasculature and interstitium. *Biorheology* 1987; 24: 117–125.
- [Jain1988] Jain R K. Determinants of tumor blood flow: A review¹. *Cancer Research* 1988; 48, 2641–2658.
- [Jain2001] Jain R.K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001; 7: 987–989.
- [Jain2002] Jain RK, Munn LL, Fukumura D. Dissecting tumor pathophysiology using intravital microscopy. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 266–76.

- [Jassar2008 a] Jassar H. et Langevin F. Labelled microspheres assessment using 1.5T scanner for embolization follow up. *5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging ISBI 2008*, From Nano to Macro; 189–192.
- [Jassar2008 b] Jassar H. Marked microspheres assessment using 1.5T scanner for embolization follow up. *16th International for magnetic resonance in medicine ISMRM 2008*; 2995.
- [Jassar2009] Jassar H. et Langevin F. Marked droplet emulsion assessment using 1.5T scanner for embolization follow-up. *26th European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology ESMRMB 2009*; 225.
- [Jenin1975] Jenin P., Lenoir L., Roullet C., Thomasset A.L., Ducrot H.: Determination of body fluid compartments by electrical impedance measurements. *Aviat, Space, Environ Med* 1975; 46: 152–155.
- [Jha2005] Jha RC, Allison SJ, Ascher SM. Imaging of leiomyomata, the uterus and the pelvis. In Spies JB, Pelage JP, eds. *Uterine artery and gynaecologic embolotherapy*. Baltimore, Md: Lippincott Williams & Wilkins 2005; 37–51.
- [Jiao2003] Jiao J., Burgess D.J. Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing span 83 and tween 80. *AAPS PharmSci* 2003; 5 (1).
- [Johnston1996] Johnston B., Atkins M. S., Mackiewich B. Et Anderson M. Segmentation of multiple sclerosis lesions in intensity corrected multispectral MRI. *IEEE Trans. Med. Im.* 1996; vol. 15, n°2; p.154–169.
- [Kahle1990] Kahle W, Leonhardt H, Platzer W. Anatomie. *Tome 2, viscères*. 2^{éd}. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 1990.
- [Kallinowski1989] Kallinowski, F., Schienger. K. H., Runkel, S., Kloes. M., Stohrer, M., Okunieff, P., and Vaupel, P. Blood flow, metabolism, cellular microenvironment, and growth rate of human tumor xenografts. *Cancer Res.* 1989; 49: 3759–3764.
- [Kalluri 2003] Kalluri R. Basement membranes: Structure, assembly and role in tumor Angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3(6): 422–33.
- [Kamat1995] Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J*

- Pathol* 1995; 146: 157–65.
- [Kanai1983] Kanai H., Sakamoto K., Haeno M. Electrical measurement of fluid distribution in human legs: estimation of extra- and intra cellular fluid volume. *The Journal of Microwave Power* 1983; 18: 233–243.
- [Kangarlu1999] Kangarlu A., Baertlein B.A. et al. Dielectric resonance phenomena in ultra high field MRI. *Journal of computer assisted tomography* 1999; 23(6): 821–831.
- [Kaparissides2006] Kaparissides C., Alexandridou S., Kotti K., Chaitidou S. Recent advances in novel drug delivery systems. *Journal of Nanotechnology Online* 2006. Volume.2 DOI : 10.2240/azojono0111.
- [Kerbel 2001] Kerbel R.S., Yu J., Tran J., et al. Possible mechanisms of acquired resistance to antiangiogenic drugs: Implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* 2001; 20: 79–86.
- [Khankan2004] Khankan et al. Embolic effects of superabsorbent polymer microspheres in rabbit renal model: comparison with tris-acryl gelatin microspheres and polyvinyl alcohol. *Radiat Med* 2004; 22: 384–390.
- [Kikuchi2001] Kikuchi A. Okano T. Pulsatile drug release control using hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; 54 : 53–77.
- [Kim2001] Kim Y.B., Park Y.N., Park C. Increased proliferation activities of vascular endothelial cells and tumor cells in residual hepatocellular carcinoma following transcatheter arterial embolization. *Histopathology* 2001; 38: 160–166.
- [Kim2006] Kim S.H., Choi D., Lim H.K., Kim M.J, et al. Detection of hepatic VX2 carcinomas with ferucarbotran-enhanced magnetic resonance imaging in rabbits : Comparison of nine pulse sequences. *EJR* 2006; 59(3): 413–423.
- [Kirsch1991] Kirsch J.E. Basic principles of magnetic resonance contrast agents. *Top Magn Reson Imaging* 1991; 3: 1.
- [Klahn2002] Klahn J.K., Janssen J.J.M., Vaessen G.E.J et al. on the escape process during phase inversion of an emulsion. *Colloid Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 2002; 210: 167.
- [Koivula1997] Koivula A., Alakuuala J. et Tervonen O. Image feature based automatic correction of low-frequency spatial intensity variations in MR images.

- Magn. Reson. Imaging* 1997; vol.15, n°10, p.1167–1175.
- [Kustlinger1981] Kustlinger F., Brunelle F., Chaumont P., Doyon D. Vascular occlusive agents. *AJR* 1981; 136 : 151–156.
- [Kwon1991] Kwon I.C., Bae Y.H., Okano T., Kim S.W. Drug release from electric current sensitive polymers. *J. Control. Release* 1991; 17 : 149–156.
- [Labarre2002] Labarre D., Laurent A., Lautier A., et al. Complement activation by substituted polyacrylamide hydrogels for embolization and implantation. *Biomaterials* 2002; 23:2319–2327.
- [Lai1999] Lai S.-H. et Fang M. A new variational shape-from-orientation approach to correcting intensity inhomogeneities in magnetic resonance images. *Med. Image Anal.* 1999; vol.3, n°4, p. 409–24.
- [Laurent1996] Laurent A., Beaujeux R., Wassef M., et al. Trisacryl gelatin microspheres for therapeutic embolization, I: Development and in vitro evaluation. *AJNR* 1996; 17: 533–540.
- [Laurent2001] Laurent A., Labarre D. Biomatériau a base de polymère hydrophile présentant in signal spécifique en imagerie par résonance magnétique et procédé de préparation d'un tel biomatériau. Brevet n° WO 01/81460 A1, 1 novembre 2001.
- [Laurent2004] Laurent A., Wassef M., Chapot MD., Houdart E., Merland J.J. Location of vessel occlusion of calibrated Tris-acryl gelatine microspheres for tumor and arteriovenous malformation emolization. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 491–496.
- [Lavabre-Bertrand2005] Lavabre-Bertrand T. Histologie de l'appareil cardio-vasculaire. *Module intégré en Cardiologie et Pneumologie PCEM2* 2005; Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
- [Le Roux1994] Le Roux A. Cartographie d'un champ de température en IRM : Etude des phénomènes physiques, application à l'imagerie in vivo. Thèse 1994; *Université Paris XI-France*.
- [Lemaire1983] Lemaire R. L'écoulement du sang dans les veines. Sandoz, Paris 1983.
- [Leung1989] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goedel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted mitogen. *Science* 1989; 246:

- 1306–9.
- [Lever1995] Lever MJ. Mass transport through the walls of the arteries and veins, In biological flows, Ed. By M.Y. Jaffrin and C.G. Caro. *Plenum Press, New York* 1995; 177–197.
- [Lewis2006] Lewis A. L., Gonzalez M. V., Lloyd A. W., et al. DC bead : In vitro characterization of a drug-delivery device for transarterial chemoembolization. *J Vasc Inter Radiol* 2006; 17: 335–342.
- [Lewis2006] Lewis A.L., Taylor R.R., Hall B., et al. Pharmacokinetic and safety study of doxorubicin-eluting beads in a porcine model of hepatic arterial embolization. *J Vasc Inter Radiol* 2006; 17: 1335–1343.
- [Li2002] Li S., Wang X.T., Zhang X.B., Yang R.J., et al. Studies on alginate–chitosan microcapsules and renal arterial embolization in rabbits. *Journal of Controlled Release* 2002; 84: 87–98.
- [Li2004] Li X., Zhuo C.K., Zheng C.S., Zhuo C.K., Liu X. Expression of plasma vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma and effect of transcatheter arterial chemoembolization therapy on plasma vascular endothelial growth factor level. *World J Gastroenterol* 2004; 10(19): 2878–2882.
- [Likar2000] Likar B. Viergever M.A. et Pernus F. Retrospective correction of MR intensity inhomogeneity by information minimization. 3rd Int. Conf. on *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI '00)*. Pittsburgh (USA), 11–14 Oct.2000. Lecture Notes in Computer Science. 2000; vol. 1935, p 375–384.
- [Lupattelli2004] Lupatlli T., Basile A., Garaci F. G., Simonetti G. Percutaneous uterine artery embolization for the treatment of symptomatic fibroids : current status. *European Journal of Radiology* 2005; 54: 136–147.
- [Marieb1993] Marieb EN. Anatomie et physiologie humaine. *De Boeck université, édition* 1993.
- [Martinsen1989] Martinsen A., Skjåk-Bræk G., and Smidsrød O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginates gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* 1989; 33: 79–89.

- [Matsumoto1976] Matsumoto S., Kita Y., Yonezawa D. An attempt at preparing water-in-oil-in-water multiple-phase emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 1976; 57 (No.2): 353–361.
- [Matsumoto1989] Matsumoto S., Kang W.W. Formation and application of multiple emulsions. *J. Dispersion Sci. Technol.* 1989; 10 : 455–482.
- [Mc Donald1974] Mc Donald DA. Blood Flow in Arteries. In: *Arnold Edward, Editor (2nd edition)* 1974, Londres.
- [Meadows2001] Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K: Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 49289–49298.
- [Medina2002] Medina RA, Owen GI. Glucose transporter: expression, regulation and cancer. *Biol. Res.* 2002; 35: 9–26.
- [Meijer1989] Meijer J.H., de Vries P.M., Goovaerts H.G., Oe P.L., Donker A.J., Schneider H. Measurement of transcellular fluid shift during haemodialysis. Part 1. Method. *Medical & Biological Engineering & Computing* 1989; 27: 147–151.
- [Melki1991] Melki P, Mulkern RV, Panych LP, Jolesz FA. Comparing the FAISE method with conventional dual-echo sequences. *J Magn Reson Imaging* 1991; 1: 319.
- [Meyer1995] Meyer C.R., Bland P.H. et Pipe J. Retrospective correction of intensity inhomogeneities in MRI . *IEEE Trans. Med. Im.* 1995; vol. 14, n°1, p 36–41.
- [Mignatti1989] Mignatti, P., Tsuboi, R., Robbins, E., Rifkin, D. B. In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J. Cell Biol.* 1989; 108: 671–82.
- [Mihara1998] Mihara H., Iriguchi N. et Uneo S. A method of RF inhomogeneity correction in R imaging. *Magn. Reson. Mater. Phy.* 1998; vol. 7, p.115–120.
- [Milles2002] Milles J. Modélisation et correction des inhomogénéités d'intensité en imagerie cérébrale par résonance magnétique. *Thèse de doctorat*, 2002. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

- [Montesano1986] Montesano, R., Vassali, J. D., Baird, A., Guillemin, R., Orci, L. 1986. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 83:7297–7301
- [Mulkern1991] Mulkern R.V, Melki P.S. et al. Phase-encode order and its effect on contrast and artefact in single-shot RARE sequences. *Med. Phys.* 1991; 18: 1032–1037.
- [Munsch1995] Munsch B, Lizard G, Gueldry S, Gambert P Les inducteurs de mort des cellules de la paroi vasculaire. *Ann. Biol. Clin.* 1995; 53: 473–80.
- [Narayana1995] Narayana P. A. et Bourthakour A. Effect of radio frequency inhomogeneity correction on the reproducibility of intra-cranial volumes using MR image data. *Magnet. Reson. Med.* 1995; vol.33, n°3, p.396–400.
- [Nikolic2000] Nikolic B, Spies JB, Lundsten MJ, Abbara S. Patient radiation dose associated with uterine artery embolization. *Radiology* 2000; 214: 121–5.
- [Novak1990] Novak D, Embolization Materials, I, : Interventional neuroradiology, Dondelinger RF, Rossi P, Kurdziel JC, Wallace S, editors. New York: Thieme Medical Publishers, and Verlag, Stuttgart: *Georg. Thieme* 1990; p.295–313.
- [Oberfield1979] Oberfield R.A., McCaffrey J.A., Polio J., et al. Intra-arterial hepatic infusion chemotherapy in advanced metastatic adenocarcinoma from colorectal primary. *Cancer* 1979; 44: 414.
- [Omary2002] Omary RA, Vasireddy S, Chrisman HB, et al. The effect of pelvic MR imaging on the diagnosis and treatment of women with presumed symptomatic uterine fibroids. *J Vasc Interv Radiol.* 2002; 13: 1149–53.
- [Osuga2002] Osuga et al. Embolization of high flow arteriovenous malformations: experience with use of superabsorbent polymer microspheres. *J Vasc Interv Radiol* 2002; 13: 1125–1133.
- [Papetti2002] Papetti M. et al. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002; 282: C497–C970.
- [Parkin2005] Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108.

- [Pays2000] Pays K. Les émulsions doubles : coalescence et mûrissement de composition. *Thèse de doctorat* 2000; Université de Bordeaux 1, France.
- [Pays2001] Pays K., Giermanska-Kahn J., Pouligny B., Bibette J., Leal-Calderon. Double emulsions: how does release occur? *Journal of Controlled Drug Release* 2002; 79: 193–205.
- [Pelage1998] Pelage JP, Le Dref O, Mateo J, Soyer P, Jacob D, Kardache M, Dahan H, Repiquet D, Payen D, Truc JB, Merland JJ, Rymer R. Life-threatening primary postpartum hemorrhage. Treatment with emergency selective arterial embolization. *Radiology* 1998; 208: 359–362.
- [Pelage1998a] Pelage JP, Le Dref O, Jacob D, Soyer P, Herbreteau D, Rymer R. Selective arterial embolization of the uterine arteries in the management of intractable post-partum hemorrhage. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 1999a; 78: 698–703.
- [Pelage1999] Pelage J.P., Laurent A., Wassef M., Bonneau M., Rymer R., Merland J.J. Experimental uterine embolization using polyvinyl alcohol particles and calibrated microspheres [abstract]. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1999; 22(suppl): 176.
- [Pelage2003] Pelage J.P., Le Dref O., Beregi J.P., Nonent M., Laurent A., Rymer R. Limited uterin artery embolization with trisacryl gelatin microspheres for uterine fibroids. *J Vasc Inter Radiol* 2003; 14: 15–20.
- [Pelage2005] Pelage J.P., Cazejust J., Pluot E., Le Dref O., Laurent A., et al. Uterine fibroid vascularization and clinical relevance to uterine fibroid embolization. *RadioGraphics* 2005; 25: S99–S117.
- [Pepper2000] Pepper M. S. Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire : de la biologie cellulaire à la clinique. *médecine/sciences* 2000; 16: 1378–86.
- [Pfeiffer2001] Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 2001; 292: 504–7.
- [Pham1999] Pham D.L. et Prince J.L. A generalized EM algorithm for robust segmentation of magnetic resonance images. *33rd Annual Conference on Information Sciences and Systems* 1999; p 558–563.
- [Pouliquen1991] Pouliquen D., Le Jeune J. J., Perdrisot R., Ermias A., Jallet P. Iron oxyde

- nanoparticles for use as an MRI contrast agent : pharmacokinetics and metabolism. *Magnet Reson Imaging* 1991; 275–283.
- [Prima2001] Prima S., Ayache N., Barrick T. et Roberts N. Maximum Likelihood Estimation of the Bias Field in MR Brain Images: Investigating Different Modelings of the Imaging Process. 4th Int. Conf. on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MIC-CAI '01). Utrecht (Hollande), Oct. 2001; Lecture Notes in Computer Science, vol.2208, p.811–819.
- [Purcell1946] Purcell E.M, Torrey H.C., Pound R.V. *phys. Rev* 1946; 69: p.37.
- [Raffi2002] Raffi S, Lyden D, Benezra R, et al. Vascular and hematopoietic stem cells: Novel targets for angiogenesis therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 826–835.
- [Rapoport2003] Rapoport N., Pitt W.G., Sun H., Nelson J.L. Drug delivery in polymeric micelles: from in vitro to in vivo. *J Control Rel* 2003; 91 : 85–95.
- [Ravina1995a] Ravina JH, Bouret JM, Fried D, Benifla JL, Darai E, Pennehouat G, Madelenat P, Herbreteau D, Houdart E, Merland JJ. Intérêt de l'embolisation pré-opératoire des fibromes utérins: à propos d'une série multicentrique de 31 cas. *Contracept. Fertil Sex* 1995a; 23: 45–49.
- [Reeder1998] Reeder S. B., Faranesh A. Z., Bouxerman J. L. et Mcveigh E. R. In vivo measurement T_2^* and field inhomogeneity maps in the human heart at 1.5 T. *Magnet. Reson. Med.* 1998; vol.39, n°6, p.988–998.
- [Riseau1997] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671–4.
- [Rohrer2004] Rohrer M., Bauer H., Mintorovitch J., Requardt M., Weinmann H.J. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest. Radiol.* 2005; 40: 715–724.
- [Rosano1999] Rosano C., Arosio P. et Bolognesi. The X-ray three-dimensional structure of avidin. *Biomolecular Engineering* 1999; 16 : 5–12.
- [Rosenthal2004] Rosenthal I., Sostaric J.Z., Riesz P. Sonodynamic therapy—a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* 2004; 11 : 349–363.
- [Schaper1996] Schaper W, Ito W. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res.* 1996; 79: 911–9.

- [Scheffler2003] Scheffler K., Lehnhardt S. Principles and applications of balanced SSFP techniques. *Eur Radiol.* 2003; 13: 2409–2418.
- [Schlappack1991] Schlappack OK, Zimmermann A, Hill RP. Glucose starving and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumor cells. *Br J Cancer* 1991; 64: 663–70.
- [Schroeder2007] Schroeder A., Avnir Y., Weisman S., Najajreh Y., Gabizon A., et al. Controlling liposomal drug release with low frequency ultrasound : mechanism and feasibility. *Langmuir* 2007; 23, 4019–4025.
- [Schuhmacher1987] Schuhmacher, J.H.; Clorius, J.H.; Semmler, W.; et al. NMR relaxation times T1 and T2 of water in plasma from patients with lung carcinoma: Correlation of T2 with blood sedimentation rate. *Magn. Reson. Med.* 5:537–547; 1987.
- [Scott1998] Scott P.A., Gleadle J.M, Bicknell R., et al. Role of the hypoxia sensing system, acidity and reproductive hormones in the variability of vascular endothelial growth factor induction in human breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1998; 75: 706–712.
- [Sevick1989] Sevick, E. M., and Jain, R. K. Viscous resistance to blood flow in solid tumors: effect of hematocrit on intratumor blood viscosity. *Cancer Res.* 1989; 49: 3513–3519.
- [Shi2001] Shi Q, Le X, Wang B, Abbruzzese JL, Xiong Q, He Y, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor by acidosis in human cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 3751–6.
- [Shroth1996] Schroth G., Haldemann A.R., Mariani L, Remonda L., Raveh J. Preoperative embolization of paragangliomas and angiofibromas. Evaluation of intratumoral arterio-venous shunt. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122(12): 383–395.
- [Simmons1992] Simmons A., Tofts P. S., Barker G. J., Wicks DAG., Arridge S. R. Considerations for RF nonuniformity correction of spin echo images at 1.5 T. *Proceedings of the SMRM. 11th Annual Meeting, Berlin* 1992; vol.2, p.4240.
- [Simmons1994] Simmons A., Tofts P.S., Barker G. J. et Arridge S.R. Sources of intensity non uniformity in spin echo images at 1.5T. *Magnet. Reson. Med.* 1994;

- vol.32, n°1, p.121–128.
- [Singer1999] Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341: 738–46.
- [Sled1998] Sled J.G. Zijdenbos A.P et Evans A.C. A nonparametric method for automatic correction of intensity nonuniformity in MRI data. *IEEE Trans. Med. Im.* 1998; vol. 17, n°1, p 87–97.
- [Solans1997] Solans C., Kunieda H. Industrial applications of microemulsions. *Livre* 1997; TP156.E615- chap.1, p.8.
- [Stancato-Pasik1997] Stancato-Pasik A., Mitty H.A., et al. Obstetric embolotherapy: effect on menses and pregnancy. *Radiology* 1997; 104: 791–793.
- [Stephan2000] Stephan D, Weltin D, Zaric V, Chapelon D, Da Silva A, Lugnier C. Angiogenèse: de la physiologie à la thérapeutique. *Réanim. Urgences* 2000; 9: 534–44.
- [Stewart2001] Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001; 357: 293–298.
- [Stryer1997] Stryer L. Anticorps et récepteur des cellules T. *Biochimie, Médecine-Sciences*, Flammarion, Paris, 367–368.
- [Styner2000] Styner M., Brechbuhler C, Szekely G. et Gerig G. Parametric estimate of intensity inhomogeneities applied to MRI. *IEEE Trans. Med. Im.* 2000; vol.19, n°3, p.153–165.
- [Tanaka1984] Tanaka H., Matsumura M., Veliky I.A. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* 1984; 26: 053–058.
- [Tancredi1999] Tancredi T., McCuskey P.A., Kan Z., Wallace S. Changes in rat liver microcirculation after experimental hepatic arterial embolization: comparison of different embolic agents. *Radiology* 1999; 211: 117–181.
- [Tedgui1994] Tedgui A, Levy B. *Biologie de la paroi artérielle*. Masson, Paris 1994.
- [Terranova1985] Terranova, V. P., DiFlorio, R., Lyall, R. M., Hic, S., Friesel, R., Maciag, T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *Cell Biol.* 1985; 101: 2330–34.
- [Thakker1999] Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, et al: The role of

- phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem.* 1999; 274: 10002–10007.
- [Thickman1990] Thickman D., Hendrick R.E., Jerjian K.A., Schanker C.S. Liver-lesion tissue contrast on MRI images: Effect of iron oxide concentration and magnetic field strength. *Radiology* 1990; 176: 557–562.
- [Thomas1985] Thomas, K. A. Fibroblast growth factors. *FASEB J.* 1987; 1: 434–40
- [Thulborn1998] Thulborn K. R., Boada F. E., Shen G. X., Christensen J.D. et Resse T.G. Correction of B₁ inhomogeneities using echo-planer imaging of water. *Magnet. Reson. Med.* 1998; vol.39, n°3, p.369–375.
- [Tincher1993] Tincher M., Meyer R., Gupta R. et Williams W.M. Polynomial modelling and reduction of RF body coil spatial inhomogeneity in MRI. *IEEE Trans. Med. Im.* 1993; vol. 12, n°2, p 143–147.
- [Tischer1991] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947–11954.
- [Tofts1994] Tofts PS. Standing waves in uniform water phantoms. *J. Magn. Reson. Ser. B* 1994a; 104: 143–147.
- [Tofts2003] Tofts P. Quality assurance, accuracy, precision and phantom. Book: *Quantitative MRI of the brain*, 2003; chapter 3, p.69.
- [Turner1979] Turner GA. Increased release of tumor cells by collagenase at acid pH: a possible mechanism for metastasis. *Experientia* 1979; 35: 1657–8.
- [Vaughan2001] Vaughan J.T, Garwood M., Collin C.M., et al. 7T vs. 4T: RF power, homogeneity, and signal-to-noise comparison in head images, *Magn. Reson. Med.* 2001; 46: 24–30.
- [Vaupel1975] Vaupel, P. Interrelationship between mean arterial blood pressure, blood flow, and vascular resistance in solid tumor tissue of DS-carcinosarcoma. *Experientia (Basel)* 1975; 31: 587–589.
- [Vaupel1989] Vaupel, P., Rallinowski, F., and Okunieff, P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review1. *Cancer research* 1989; 49: 6449–6465. December 1.

- [Veikkola1999] Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9: 211–20.
- [Vinuela1992] Vinuela F, Halbach VV, Dion JE, editors. Interventional neuroradiology-endovascular therapy of the central nervous system. *New York: Raven Press* 1992; p.1–193.
- [Vlodavsky1987] Vlodavsky, I., Folkman, J., Sullivan, R., Fridman, R., Ishai-Michaeli, R., et al. Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 2292–96.
- [Vokurka1999] Vokurka E. A., Thaker N. et Jackson A. A fast model independent method for automatic correction of intensity nonuniformity in MRI data. *J. Magn. Reson. Im.* 1999; vol.10, n°4, p.550–562.
- [Wagner1994] Wagner EF, Risau WL. Oncogenes in the study of the endothelial cell growth and differentiation. *Semin, Cancer Biol.* 1994; 5: 137–45.
- [Wald1995] Wald L. L., Carvajal L., Moyher S. E., Nelson S. J., Grant P. E., Barkovich A. J. et Vigneron D. B. Phased array detectors and an automated intensity-correction algorithm for high-resolution MR imaging of the human brain. *Magnet. Reson. Med.* 1995; vol. 34, n°3, p. 433–39.
- [Wang2001] Wang J., Hussain S., Krestin G. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur. Radiol.* 2001; 11: 2319–2331.
- [Wanger1994] Wanger EF, Risau W. Oncogenes in the study of endothelial cell growth and differentiation. *Semin Cancer Biol.* 1994; 5(2): 137–45.
- [Warren1979] Warren B. A. The vascular morphology of tumors. In: H. I. Petersen (ed.). *Tumor Blood Circulation, Chap. I. Boca Raton, FL: CRC Press*, 1979; pp. 1–47.
- [Weiss1979] Weiss, L., Hultborn, R., and Tveit, E. Blood flow characteristics in induced rat mammary neoplasia. *Microvasc. Res.* 1979; 17: 19.
- [Wells1996] Wells W.M., Grimson W.E.L., Kikinis R. et Jolesz F.A. Adaptive segmentation of MRI data. *IEEE Trans. Med Im.* 1996; vol. 15, n°4, p 429–442.

- [White2000] White RI Jr, Pollak J, Persing J, Henderson KJ, Thomson JG, Burdge CM. Long-term outcome of embolotherapy and surgery for high-flow extremity arteriovenous malformations. *J Vasc Interv Radiol* 2000; 11: 1285–1295.
- [White2000] White RI. JR., Pollak J., Persing J., et al. Long-term outcome of embolotherapy and surgery for high-flow extremity arteriovenous malformations. *J Vasc Interv Radiol* 2000; 11: 1285–1295.
- [Wicks1993] Wicks D. A. G., Barker G. J., and Tofts P. S. Correction of intensity nonuniformity in MR images of any orientation. *Magn. Reson. Imaging* 1993; Vol.11, p.183–196.
- [Willis1973] Willis, R. A. *The Spread of Tumors in the Human Body*. London: *Butterworths*, 1973.
- [Willmott1987] Willmott N. Chemoembolization in regional cancer chemotherapy: a rationale. *Cancer Treat Rev* 1987; 14: 143.
- [Wiltchek2006] Wilchek M., Bayer E.A., Livnah O. Essentials of biorecognition : The (sterpt)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. *Immunology Letters* 2006; 103: 27–32.
- [Xiong2004] Xiong Z.P., Yang S.R., Liang Z.Y., Xiao E.H. et al. Association between vascular endothelial growth factor and metastasis after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3(3): 386–390.
- [Yakes1997] Yakes W.F. Diagnosis and management of vascular anomalies. In: Castaneda WF, ed. *Interventional Radiology*. Baltimore, MD: *Williams and Wilkins* 1997; 103–138.
- [Zachary2001] Zachary I, Glikli G: Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 568–581.
- [Zhang2001] Zhang Y., Brady M. et Smith S. Segmentation of brain images through a hidden Markov random field model and the Expectation-Maximization algorithm. *IEEE Trans. Med Im.* 2001; vol. 20, n°1, p 45–57.
- [Zhou2001] Zhou L. Q., Zhu Y. M., Bergot C., Laval-Jeantet A. M., Bousson V., Laredo J. D. et Laval-Jeantet M. A method of radio-frequency

- inhomogeneity correction for brain tissue segmentation in MRI. *Comput. Med. Imag. Grap.* 2001; Vol.25, p.379–389.
- [Zimmermann1981] Zimmermann U., Scheurich P., Plwat G., Benz R. Cells with manipulated functions. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 1981; 20 : 235–344.
- [Zimmermann1982] Zimmermann U. Electric field mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982; 694 : 227–277.
- [Zur1988] Zur Y, Stokar S, Bendel P. An analysis of fast imaging sequences with steady-state transverse magnetization refocusing. *Magn Reson Med* 1988; 6: 17–193.
- [Zweifach1984] Zweifach, BW, and Lipowsky HH. Pressure-flow relations in blood and lymph microcirculation. Bethesda, MD: American Physiological Society, In: E. M. Renkin and C. C. Michel (eds.), *Handbook of Physiology* 1984; Sect.2, Vol.4, Chap.7, pp.251–308.

Annexe

Annexe A

Agents d'occlusion vasculaire utilisés en clinique

Agents	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Applications	Références
Gelfoam®	Particules ; Poudre à l'état sec devenant une éponge gélatineuse dans une solution aqueuse; Compressible ; Poreux ; Insoluble dans l'eau	Occlusion mécanique rapide et partielle des artères larges	Occlusion temporaire	Trauma; Occlusion temporaire ; Tumeurs	[Douglas1994]
Lipiodol® (Guerbet S.A.)	Fluides ; Esters éthyliques d'acides gras iodés de l'huile d'œillette ; Mélangé avec une solution saline, un agent de contraste (I-131) ou un agent anti-cancéreux	Occlusion des vaisseaux tumoraux périphériques; Fixé préférentiellement par la tumeur	Répétition du processus chaque 3 ou 4 mois ; Occlusion temporaire	Chimio-embolisation temporaire des Hépatocarcinomes Cellulaires	[De Baere1995]; [De Baere1996]; [Pelletier1998]

Tableau A-1 : Agents d'embolisation temporaires de forme géométrique irrégulière.

Agent	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Applications	Références
Spire	Implants expansibles ; Longueur : 2-30 mm ; Métallique (Tungstène : MDS® ou Platine : GDS®, DCS®)	Rapide ; Disponible ; Facile à utiliser	Approprié aux Vaisseaux collatéraux ; Occlusion unique des artères larges ; Inélastique	Trauma; Varicocèle ; Limité pour le traitement tumoral	[Douglas1994]
Polyvinyl alcohol (PVA)	Particules non sphériques (Ultra Ivalon®, Trufill®, Contour®) ; 150–1,000 µm,	Occlusion rapide et permanente	Occlusion au niveau des petites artérioles ; Forme irrégulière	Tumeurs	[Douglas1994]

Ethanol	Fluide ; Agent sclérosant (Ethibloc®) en dénaturant les protéines dans le sang pour créer une thrombose vasculaire	Occlusion rapide et permanente	Occlusion au niveau des capillaires ; Toxique ; Embolisation non ciblée	Malformation artérioveineuse ; Tumeurs	[Douglas1994]
Colle	Particules (Histoacryl®); Liquide n-butyl-cyanoacrylate (nBCA) qui se polymérise en gel lors son contact avec le sang, la saline ou l'agent de contraste ionique	Occlusion permanente ; Conforme aux lésions	Occlusion du cathéter	Malformation artérioveineuse	[Douglas1994]

Tableau A-2 : Agents d'embolisation permanents de forme géométrique irrégulière.

Agent	Caractéristiques		Applications	Références
	Communes	différentes		
Microsphère : Embosphere® (BioSphere Medical, S.A.)	Hydrophile ; Microporeuse ; Pas d'agrégation ; Embolisation ciblée ;	Polymère acrylique (Tris-acryl) imprégné par la gélatine porcine ; 6 calibres [40-1200µm] ; Non radio opaque ; Translucide	Tumeurs hyper-vascularisées ; Fibromes ; Malformation artérioveineuses	[Laurent2004] [Pelage2003] [Beaujeux1996]
Microsphère : HepaSphere™ (BioSphere Medical, S.A.)	Biocompatible ; Compressible ; Non résorbable Elastique ;	Poly(vinyl alcool-sodium acrylate) copolymère ; Poudre en 3 calibres [50–200 µm] ; Expansible dans 0.9% du NaCl ;	Chimio-embolisation des carcinomes hépatocellulaires et métastases hépatiques	[Luis2008] [Osuga2002] [Khankan2004]

Tableau A-3 : Agents d'embolisation permanents de forme géométrique régulière.

Annexe B

Protocole de fabrication de billes d'alginate marquées par agent de contraste

Etapes	Procédures	
I – Solutions préalables à la fabrication de billes		Temps
I – 1	Quatre bouteilles de 500cc de <u>sérum physiologique</u> à 0,9% stérile sont achetées à la pharmacie. (ce nombre de bouteille est suffisant pour réaliser toutes les étapes de la fabrication, du rinçage et du stockage de 5 doses citées dans le <i>Tableau 3–20</i>).	
I – 2	<u>Préparation du bain de polymérisation</u> en versant de la poudre de CaCl ₂ dans le sérum physiologique et laissant la solution en agitation pendant <u>15 minutes</u> . Garder ensuite la solution au frigo. Cette solution peut être préparée quelques jours avant la fabrication de billes.	15 min
I – 3	<u>Préparation de la solution d'alginate à 2%</u> avec le <u>marqueur</u> en mélangeant, pendant <u>5 minutes</u> , le sérum physiologique avec une certaine quantité de marqueur pour obtenir la concentration souhaitée (voir <i>Tableau 3–20</i>). Verser ensuite la poudre d'alginate au milieu aqueux qui va rester en agitation pendant <u>2 heures</u> afin de dissoudre totalement l'alginate. La quantité de la poudre est déterminée par une balance de haute précision (voir <i>Tableau 3–20</i>).	5 min + 2 h
		Total 2h20min
II – Fabrication de billes d'alginate		Temps
II – 1	<u>Nettoyage</u> de tuyaux de la pompe péristaltique et de buse par l'eau distillée	20 min
II – 2	<u>Polymérisation de la solution d'alginate à 2% avec le marqueur à encapsuler*</u> en tirant celle-ci (Figure B-1 a) par une pompe péristaltique** (Figure B-1 b) jusqu'à une buse équipée d'une aiguille (Figure B-1 c). La solution est extrudée, sous forme de gouttelettes, par pression d'air comprimé*** (Figure B-1 f et d) dans le bain de polymérisation**** (Figure B-1 d) qui est déjà placé sur l'agitateur (Figure B-1 d) et sous la buse (Figure B-1 c) d'une distance de 5 cm. *0,2 g de la poudre d'alginate est mélangé avec une solution de 10 ml du S ϕ et de marqueur (dans notre cas). **Débit de la pompe est équivalent à un indice de 5,65. ***Débit d'air est réglé en fonction du calibre de billes souhaité (indice 55 : 600 μ m). ****10 ml d'une solution d'alginate nécessite 80 ml d'une solution de CaCl ₂ (il faut 8.5g de CaCl ₂ pour 500 ml du S ϕ).	10 min (pour 10ml de gel)
II – 3	Billes marquées et polymérisées sont gardées en agitation	15 min
II – 4	<u>Rinçage</u> de billes par le sérum physiologique*. L'opération est répétée deux fois. A chaque fois, le bécher contenant les billes est remis sur l'agitateur pour 1 minute lors de nouvel sérum physiologique est rajouté pour effectuer ensuite le deuxième rinçage. *10 ml de la solution d'alginate nécessite 80 ml du S ϕ pour rincer les billes.	6 min
II – 5	<u>Conservation</u> de billes d'alginate dans du S ϕ *. *10 ml de la solution d'alginate nécessite 80 ml du S ϕ pour conserver les billes dans le flacon	2 min
		Total 53 min

Les billes d'alginate marquées sont ensuite passées à l'IRM le jour même de leur fabrication

Tableau B-1 : Procédure de la fabrication de billes d'alginate avec le marqueur à encapsuler.

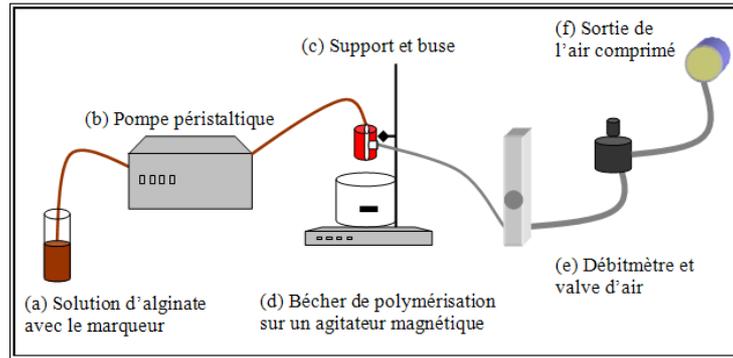


Figure B-1 : Schéma des matériels utilisés lors de la production de billes d'alginate.

Protocole de préparation du support

Étape	#	Action	Matériel	Note
Préparation du support	1	Mettre la gélose à fondre à 100°C pendant 1 min.	Gélose Micro-onde	
	2	Sortir la gélose de la micro-onde	Gélose	
Préparation du contenant	6	Couler une quantité de gélose dans le contenant	Solution de gélose Boîte de Pétri	La gélose doit être complètement liquide.
	7	Laisser refroidir la gélose pendant 20 min	Boîte de Pétri avec gélose	
Ajout des billes	9	Prélever quelques mL de MS dans une seringue	Flacons de billes d'alginate 600 µm Cône de 20G (0.9mm) Micropipette (20µl)	
	10	Faire tomber 1 goutte sur la couche de gélose	Micropipette Cône de 20G (0.9mm) Boîte de Pétri avec gélose	
	11	Placer les MS individuellement ou en amas sur la couche gélose	Cône de 20G (0.9mm) (Microscope)	Des amas de billes de 1, 2, 3, 4, 5
Recouvrement des billes		Prélever quelques mL de gélose dans une micropipette	Gélose liquide Cône de 20G (0,9mm) Micropipette (20µl)	
	12	Faire tomber quelques gouttes de gélose sur les billes pour les fixer	Micropipette Cône de 20G (0,9mm) Boîte de Pétri avec gélose	
	13	Laisser refroidir pour 10 min		
		Prendre des photos microscopiques	Microscope Appareil photo numérique	
		Lentement, verser de la gélose sur la première couche	Gélose liquide Boîte de Pétri	Les billes sont entre les 2 couches de gélose
		Laisser refroidir 20 min		

Tableau B-2 : Méthode de préparation du support en gélose dans des boîtes de Pétri, ensuite la méthode de fixation des billes entre les deux couches de gélose.

Annexe C

Structure chimique des tensioactifs

Classe	Structure chimique du tensioactif	
	Agent	Utilisation et caractéristique
	Synthétique	
Cationique*	Chlorure de Benzalkonium, Chlorure de Benzéthonium	
Anionique*	Savon avec l'amine (stéarate de triéthanolamine), savon avec l'alkali (oléate de sodium ou de potassium), détergents (laurylsulfate de sodium, doucusate de sodium, dicotyl sulfosuccinate de sodium)	Emulsion H/E*** Des ions positifs (cations) ou négatifs (anions) sont libérés en solution aqueuse HLB élevée
Non-ionique*	Esters de sorbitan (Span®), Tween®, ou esters de glycérol)	Emulsion H/E ou E/H**** selon la valeur de HLB
Amphotère**		Emulsion H/E Détergents, charges libérés en solution aqueuse suivant le pH du milieu, alcalin (anions) ou acide (cations) HLB élevée
	Naturel	
Dérivés des végétaux	Acacia, agar, pectine, lécithine de soja, tragacanthé, carragénane	Emulsion H/E Pas chers, non toxiques, manipulables, efficaces à des grandes quantités, aident à la croissance microbienne
Dérivés des animaux	Gélatine, lanoline, cholestérol, lécithine du jaune d'oeuf	Emulsion H/E formant une couche monomoléculaire, causant des réactions allergiques, aidant à la croissance microbienne, donnant des odeurs désagréables
Agents semi-synthétiques	Méthylcellulose, carboxyméthylcellulose	Emulsion H/E Emulsifiants forts, non toxiques, indépendants de la croissance microbienne, très chers
Agents synthétiques	Carbopols®	Emulsion H/E et E/H Augmentation de la viscosité du milieu dispersé pour éviter les interactions entre les gouttelettes
Agents auxiliaires	Acides gras (acide stéarique), alcools gras (alcool stéarylique ou cétylique), esters gras (monostéarate de glycéryle)	Stabilisateurs et durcisseurs des émulsions, émulsifiants faibles, combinés avec d'autres émulsifiants

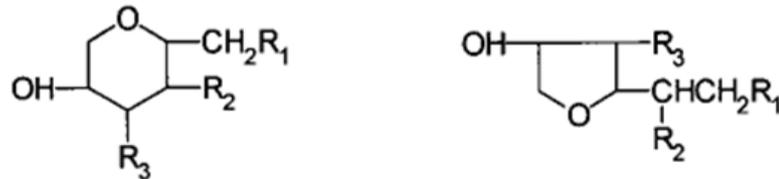
* Cationique, anionique, non ionique : la tête polaire de la molécule du tensioactif comporte une charge positive, négative ou aucune charge nette. ** Amphotère : la tête polaire de la molécule comporte une charge positive et négative (la charge globale est nulle).

H/E : huile dans l'eau. *E/H : eau dans l'huile

Tableau C-1 : Structure chimique, utilisation et caractéristique des tensioactifs.

Tensioactif	CMC (%w/V)	Tension superficielle à CMC (dynes/cm)	Surface moléculaire ($\text{\AA}^2/\text{molécule}$)	HLB
Span 80	0,025	11,05	32,45	4,3
Span 83	0,024	13,18	34,58	3,7

Tableau C-2 : Valeurs de la concentration micellaire critique (CMC), du HLB, ainsi que de la surface moléculaire de deux tensioactifs non-ioniques obtenues à l'interface eau-huile minérale (25°C). [Foyeke1998]



Tensioactif	R_1	R_2	R_3
Span 80	$\text{OOC}(\text{C}_{17}\text{H}_{33})$	OH	OH
Span 83	$\text{OOC}(\text{C}_{17}\text{H}_{33})$	$\text{OOC}(\text{C}_{17}\text{H}_{33})$	OH

Figure C-1 : Structures chimiques de Spans 80 et 83.

Annexe D

Etalonnage de l'agent de contraste : l'Endorem[®]

Gamme	Numéro Flacon	Sérum phy (ml)	Endorem [®] (ml)	% Endorem [®]
Témoin	0	4	0	0%
I	1	3,998	0,002	0,05%
	2	3,997	0,003	0,08%
	3	3,996	0,004	0,10%
	4	3,995	0,005	0,13%
	5	3,994	0,006	0,15%
	6	3,993	0,007	0,18%
	7	3,992	0,008	0,20%
	8	3,991	0,009	0,23%
II	9	3,99	0,01	0,25%
	10	3,98	0,02	0,50%
	11	3,97	0,03	0,75%
	12	3,96	0,04	1,00%
	13	3,95	0,05	1,25%
	14	3,94	0,06	1,50%
	15	3,93	0,07	1,75%
	16	3,92	0,08	2,00%
III	17	3,85	0,15	3,75%
	18	3,7	0,3	7,50%
	19	3,55	0,45	11,25%
	20	3,4	0,6	15,00%
	21	3,25	0,75	18,75%
	22	3,1	0,9	22,50%
	23	3	1	25,00%
	24	2,8	1,2	30,00%

Tableau D-1 : Gamme de concentration croissante d'Endorem[®].

Annexe E

Structure et classes des anticorps, nature de la liaison antigène-anticorps

Structure et classes des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines « IgG » formées de 4 chaînes polypeptidiques (150 kDa) : 2 chaînes lourdes (**H** pour *heavy* de 50 kDa chacune, en violet sur la Figure E-1) et 2 chaînes légères (**L** pour *light* de 25 kDa chacune, en vert) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité de la molécule. Ces chaînes forment une structure en Y et sont constituées de domaines immunoglobulines de 110 acides aminés environ.

Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant et d'un domaine variable; les chaînes lourdes sont composées d'un fragment variable et de 3 ou 4 fragments constants selon l'isotype. Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères.

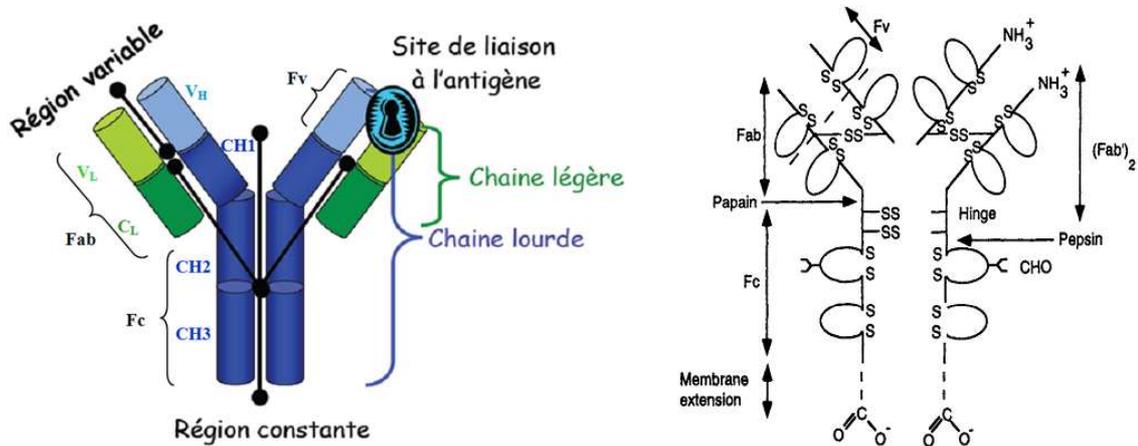


Figure E-1 : Structure d'une immunoglobuline générale (à gauche) et chimique (à droite).

Les domaines constants sont caractérisés par une séquence en acides aminés très proche d'un anticorps à l'autre, caractéristiques de l'espèce et de l'isotype (classe). Chaque chaîne légère en possède un exemplaire noté C_L . Les chaînes lourdes comportent, selon l'isotype, trois ou quatre domaines constants CH1, CH2, CH3 et CH4 qui ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, mais interviennent dans

l'activation du système du complément¹. Les cellules immunitaires possédant les récepteurs aux fragments constants (Rfc) sont capables de lier les anticorps.

Les anticorps sont subdivisés en classes ou isotypes selon la structure des domaines constants des chaînes lourdes [Goding1996], telles que les immunoglobulines : IgG, IgA, IgM, IgE et IgD. Il existe également des sous-classes d'immunoglobulines, reflétant des différences plus fines entre chaînes lourdes. L'homme possède ainsi quatre sous-classes d'IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃ et IgG₄) et 2 sous-classes d'IgA (IgA₁ et IgA₂).

Un anticorps possède quatre domaines variables situés aux extrémités des deux « bras ». L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde (V_H) et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère (V_L) constitue le site de reconnaissance (ou paratope) de l'antigène. Ainsi, une molécule d'immunoglobuline possède deux sites de liaison à l'antigène, un au bout de chaque bras. Ces deux sites sont identiques (mais destiné à différents épitopes²), d'où la possibilité de lier deux molécules d'antigène par anticorps [Stryer1997].

Le clivage enzymatique spécifique permet d'isoler différents fragments :

Le fragment « Fc » (cristallisable) est le support des propriétés biologiques de l'immunoglobuline, en particulier sa capacité à être reconnu par des effecteurs de l'immunité ou à activer le complément. Il est constitué des fragments constants des chaînes lourdes (CH₂), situés sous les deux bras. C'est un fragment qui ne reconnaît pas l'antigène.

Le fragment « Fv », le plus petit, est constitué uniquement des régions variables (V_L) et (V_H) pour fixer l'antigène.

Le fragment « Fab » est formé de la chaîne légère en entier (V_L+C_L) et d'une partie de la chaîne lourde (V_H+CH₁).

Le fragment F(ab')₂ correspond à l'association du fragments « Fab » et à la première petite partie constante de la chaîne lourde qui est située sous la les deux bras.

¹ Complément : Groupe de protéines présent dans le sérum sanguin et agit de pair avec les anticorps pour réaliser la destruction des particules étrangères telles des cellules sanguines ou des bactéries.

² Epitope : Partie d'un antigène reconnu par un récepteur situé à la surface d'un anticorps.

Nature de la liaison antigène-anticorps

La liaison entre un antigène et son anticorps nécessite des interactions non covalentes multiples : liaisons hydrogène, forces de Van der Waals, forces électrostatiques et interactions hydrophobes.

Les mesures thermodynamiques montrent que la combinaison antigène-anticorps est réversible avec une énergie de liaison de l'ordre de 34 à 45 kJoules/mole ; la constante de dissociation de cette liaison est de l'ordre de 10^{-5} M à 10^{-10} M.

Cette liaison antigène-anticorps est stable dans la gamme de pH4 à pH9 et pour une plage de concentration en NaCl de 0 à 1M.

Annexe F

Procédures de couplage IgG-HépasphèresTM

Couplage covalent entre IgG et HépasphèreTM

Le couplage covalent des IgG sur des HépasphèresTM peut être réalisé par la création de liaisons peptidiques (amide) selon quatre manières :

- activation de la fonction carboxyle du polymère par le biais de *N*-éthyl-*N'*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide et de sel de sodium *N*-hydroxysulfosuccinimide (EDC/sulfo-NHS) afin d'obtenir une liaison peptidique entre le groupe amine (-NH₂) de l'IgG et le groupe acide carboxylique (-COOH) du polymère (Figure F-1) [Hermanson1996a] ;
- couplage covalent indirect entre les deux entités via une liaison peptidique avec l'avidine (protéine) après activation de la fonction carboxylique du polymère par l'EDC/sulfo-NHS (Figure F-2) ;

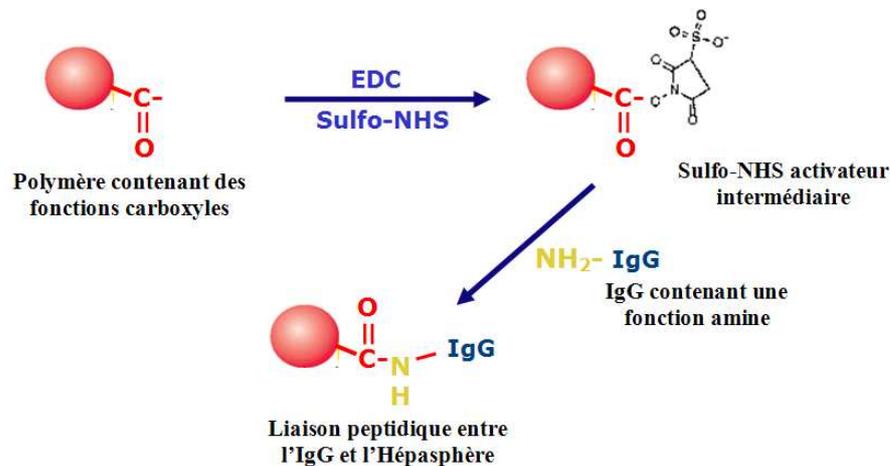


Figure F-1 : Couplage direct via une liaison peptidique (-CO-NH-) entre la fonction amine de l'IgG et carboxyle (COO) de l'HépasphèreTM après activation par EDC/Sulfo-NHS.

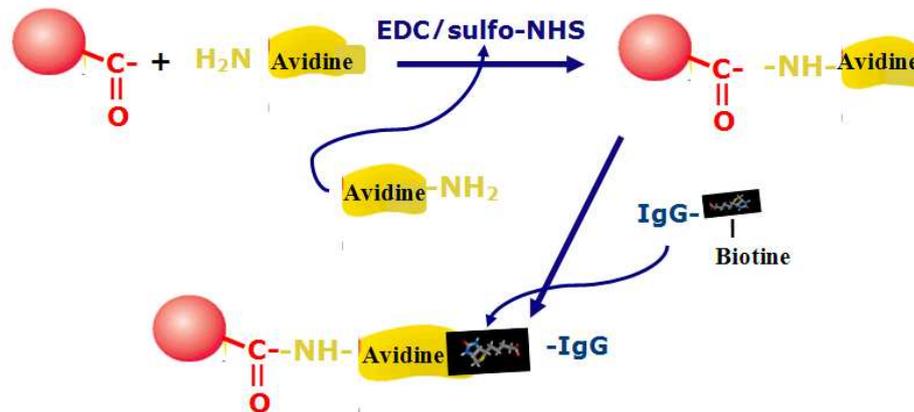


Figure F-2 : Couplage covalent indirect entre l'IgG et l'Hépasphère™ via une liaison peptidique covalente entre des molécules amines (avidine) et des fonctions carboxyles du polymère (Hépasphère).

Couplage non-covalent entre IgG et Hépasphère : interaction avidine-biotine

Le couplage non-covalent entre l'IgG et l'Hépasphère™ concerne une adsorption physique directe de l'IgG sur le polymère de la microsphère, ou indirecte par l'avidine (Figure F-3). Ce genre d'association n'est qu'une alternative pour pallier l'inconvénient concernant des pertes d'activité biologique de l'anticorps qui réside dans l'association covalente entre la biomolécule et le polymère.



Figure F-3 : Couplage par adsorption physique directe entre l'IgG et l'Hépasphère™ (à gauche) ou indirect par l'avidine (à droite).

L'avidine est une protéine glycosylée¹ chargée positivement que l'on trouve en faible quantité, dans le blanc des œufs d'oiseaux, de reptiles et d'amphibiens. Elle est secrétée sous forme d'un tétramère : 4×128 acides aminés (Masse molaire 62,4 kDa). L'intérêt de l'avidine réside dans sa liaison forte, presque irréversible avec la biotine (vitamine H). Le volume tétramère (avidine) est approximativement égal à $56 \times 50 \times 40$ Å³. Les quatre sous unités s'assemblent pour former une structure quaternaire (Figure F-4).

¹ Glycosylé : Glucide lié d'une façon covalente à une chaîne peptidique ou protéine.

L'avidine possède une très forte affinité pour la biotine : une molécule d'avidine peut théoriquement se lier à quatre molécules de biotine. Cette interaction est non-covalente, avec une constante de dissociation $k_d = 10^{-15}$ M, c'est-à-dire six fois plus puissante qu'une affinité antigène-anticorps [Doumiati2007] dont la constante de dissociation est comprise entre 10^{-6} et 10^{-9} M. Le site de reconnaissance de la biotine est une poche profonde (Figure F-4), son volume est à peu près égal au volume moléculaire de la biotine (293 \AA^3). Lors de l'association de la biotine avec l'avidine, il y a formation de 36 ponts d'hydrogène² et à peu près 100 liaisons de type de Van der Waals³ [Rosano1999].



Figure F-4 : Structure quaternaire de l'avidine.

La biotine ou vitamine H de forme de poire (Figure F-5) est un facteur de croissance présent en faible quantité dans chaque cellule. C'est un composant clé pour les réactions de décarboxylation : il est un cofacteur et un transporteur de CO_2 . La biotine est le plus souvent associée avec les fonctions amines ($-\text{NH}_2$) qui existent par exemple dans les *IgG*, nous parlons alors de la biotinylation des anticorps suivant leur couplage covalent avec la biotine.

Tous les agents de biotinylation sont composés d'un noyau bicyclique et d'un groupe fonctionnel réactif (Figure F-5). Les dérivés commerciaux sont constitués de biotine sur laquelle ont été greffés des bras espaceurs variés [Hermenson1996c]. Ceux-ci facilitent l'accessibilité des composés biotinylés à l'avidine.

² Ponts d'hydrogène : Interaction électrostatique de faible intensité reliant les molécules. Elle implique entre des charges positives portées par des atomes liés à un atome électronégatif (cas H et O) et des charges négatives localisées sur un atome électronégatif se trouvant à proximité.

³ Liaison de Van der Waals : Interaction électrique de faible intensité entre atomes, molécules, ou entre une molécule et un cristal. Elle est due aux interactions entre les moments dipolaires électriques des deux atomes mis en jeu. Aucun électron n'est mis en commun entre les deux atomes.

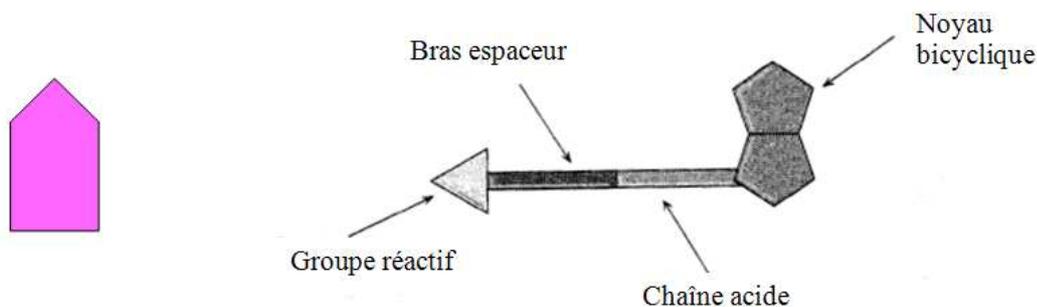


Figure F-5 : Biotine de forme d'une poire (à gauche) et avec un bras espaceur (à droite).

La reconnaissance moléculaire ou biorecognition est au cœur de tout processus biologique. Il est clair qu'une combinaison d'interactions non-covalentes (ioniques), de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes a lieu. La complémentarité de la forme semble jouer un rôle crucial dans le processus de biorecognition. Le système avidine-biotine est pris comme modèle pour cette biorecognition aussi bien dans le cas d'une forte affinité que dans le cas d'une faible affinité. Il est intéressant de noter que les changements conformationnels sont attribués à l'exclusion de molécules d'eau : cinq molécules d'eau sont libérées de la poche à biotine pour laisser la place à la vitamine H. Seule l'interaction de la biotine avec le tétramère d'avidine est essentielle pour l'obtention d'une affinité élevée ; pour ce complexe, la constante d'association est de 10^{15} M^{-1} , alors qu'elle n'est plus que de 10^7 M^{-1} pour le complexe avidine-biotine 1/1.

En revanche, une interaction présentant une faible affinité peut s'établir entre l'avidine et une petite molécule comme, par exemple l'acide 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoïque (HABA) [Wiltchek2006] ; ce type d'interaction permet en particulier de doser l'avidine.

En absence de biotine, le colorant (HABA) forme un complexe de coordination⁴ avec l'avidine, spécifiquement sur les sites de liaison de la biotine. Dans une solution aqueuse, l'adsorption caractéristique de ce complexe est à 500 nm (le coefficient d'extinction molaire⁵ : $\epsilon = 3\,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ par mole d'HABA liée). L'affinité HABA-avidine est de $6 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1}$. L'addition de biotine à ce complexe déplace HABA de son complexe et libère le site de fixation de cette même biotine. Au cours de la libération

⁴ Complexe de coordination : Liaison covalente moins solide entre une espèce chimique (composés covalents comme NH_3 , Cl^- , H_2O , OH^- ...) disposant de doublets d'électrons "non liants" disponibles pour interagir avec d'autres atomes. Cette interaction n'est pas un partage symétrique du doublet avec un autre.

⁵ Coefficient d'extinction molaire : rapport entre l'absorptivité et la concentration d'une entité chimique absorbante dans ce milieu (exprimé en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

des sites de fixation de la biotine, l'absorbance du complexe HABA-avidine diminue en fonction de la quantité de biotine ajoutée.

Nous adopterons ce dosage dans cette étude, afin de déterminer le degré de biotinylation des anticorps ainsi que le taux d'avidine fixée sur les Hépasphères™.

Matériels

Appareils			
	Marque		Commentaires
Spectrophotomètre	UVIKON XS (SECOMAN)		Mesure l'absorbance d'une molécule pour la doser dans une solution
Microscope inversé à fluorescence	Leica DM 600M		Agrandi la zone fluorescente
Centrifugeuse	Jouan CR3		
Pompe à vide	Pression Millipore		
Agitateur tangentiel	Yellow line 2 basic		
Lecteur de microplaque	DYNEX MRX		Test ELISA (Enzyme Linked Immuno-absorbent Assay)
pH mètre multical			Mesure le pH de la solution
Cuves en quartz de 1.2 ml			
Produits chimiques et biologiques			
Noms	Fournisseur	Référence	Commentaires
Albumine de sérum de bovin (BSA)	Sigma	A7906	Protéine modèle
IgG de souris	P.A.R.I.S	IG 13-2	Anticorps polyclonaux
IgG1 de rat purifié (prod rat) (anti-DNP)	P.A.R.I.S	TC 181-0	Anticorps monoclonaux
Anti IgG (H+L) de rat purifié	P.A.R.I.S	BI 2411	Anticorps marqués à la peroxidase HRP (horseradish peroxidase)
1-Fluoro,2,4-dinitrobenzène (DNFB)	Sigma	D1529	Antigène DNP
Avidine	Sigma	A9275	Coupleur (protéine glycosylée)
Biotinamidohexanoic acid 3-sulfo-N-hydroxy-succinimide ester sodium salt (sulfo-NHS)	Sigma	B1022	Ester activé de la Biotine
N-(+)biotynil-6-aminohexanoic acid	Aldrich	14407	Bras espaceur lié à la biotine
N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl carbodiimid (EDC)	Aldrich	3449	Coupleur entre une fonction acide et une fonction amine primaire (activateur de la fonction carboxyle) pour créer des liaisons peptidiques
Bicinchoninic acid (BCA)	Sigma	B9643	Aide à doser la quantité de protéine modèle existant dans les eaux de lavage
N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS)	Aldrich	56485	Coupleur générant un ester activé bien plus avec la fonction amine
4'-hydroxyazo-benzene-2-	Sigma	H2153-IVL	Réactif permettant de doser par

carboxylic acid / avidin reagent (HABA-avidine)			spectrophotométrie les IgG biotinylés ou l'avidine
Fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC)	Sigma	F7250	Marqueur fluorochrome utilisé pour le dosage des protéines

Tableau F-1 : Appareils, produits chimiques et biologiques utilisés pour le couplage des IgG sur les Hépasphères[™] et pour leur dosage.

Notation

Notations

$A_{\text{temoin}(0)}$	différence du signal IRM des flacons témoins
$\left \frac{\Delta S}{S} / \Delta T \right $	variation relative du signal IRM des microsphères avant et après échauffement
α°	angle de bascule
ΔT	variation de la température
$\vec{\mu}_i$	moment magnétique élémentaire
\vec{M}	moment magnétique macroscopique
ν_0	fréquence de Larmor
$V(\vec{a})$	volume d'un voxel
K	constante de Boltzmann
δf	bande passante du récepteur
$\beta(\vec{a})$	sensibilité de l'antenne au point \vec{a}
θ	Angle après rotation de support
σ	Ecart-types des intensités
γ	rapport gyromagnétique du noyau
θ	angle entre $\vec{\mu}_i$ et \vec{B}_0
ρ	densité protonique
χ	susceptibilité magnétique
ε	constante diélectrique
σ	conductivité électrique
$\Delta\omega_l$	largeur spectrale de l'impulsion RF
$\omega_{(r)}$	pulsation angulaire d'un spin à la position r
ω_0	pulsation de résonance
μ_0	perméabilité magnétique
Δ_z	largeur de la coupe
$[c]$	concentration du produit de contraste
$1/T_1$	vitesse de relaxation longitudinale
$1/T_2$	vitesse de relaxation transversale
$1/T_{\text{observé}}$	vitesse de relaxation observée
$1/T_{\text{produit de contraste}}$	vitesse de relaxation du produit de contraste
1H	noyau d'Hydrogène
$2D$	acquisition d'une image en bidimensionnelle
$3D$	acquisition d'une image en 3 dimensions
Ac	anticorps

<i>ADN</i>	acide désoxyribonucléique
<i>Ag</i> :	antigène
<i>AMI-25</i>	endorem [®] /Feridex [®]
<i>AMM</i>	autorisation de mise sur le marché
<i>ATP</i>	adénosine triphosphate
<i>AX</i>	fréquence centrale
<i>B₀</i>	champ magnétique statique ou principal
<i>B₁</i>	champ magnétique de la radiofréquence
<i>BCA</i>	acide bicinchoninique
<i>BW</i>	bande passante
<i>C</i>	contraste
<i>Ca²⁺</i>	ion de Calcium
<i>CaCl₂</i>	dichlorure de calcium (solution de polymérisation)
<i>CDI</i>	N, N'-carbonyldiimidazole
<i>CE</i>	marquage à la conformité européenne
<i>Cl⁻</i>	ion de chlore
<i>C_m</i>	capacité membranaire
<i>CMC</i>	concentration micellaire critique
<i>CO₂</i>	dioxyde de carbone
<i>COOH</i>	fonction carboxylique
<i>CR2I</i>	centre de recherche d'imagerie interventionnelle
<i>CT</i>	computed tomographe (tomodensitométrie)
<i>CuSO₄</i>	sulfate de cuivre
<i>D₁, D₂, D₅, D₁₀ ou D₂₀</i>	dose du marqueur dans la solution d'alginate (1, 2, 5, 10 et 20 µl/ml)
<i>DICOM</i>	digital imaging and communications in medicine (imagerie et communication numériques en médecine)
<i>D</i>	droite
<i>E/H</i>	eau dans l'huile
<i>E/H/E</i>	eau dans l'huile dans l'eau
<i>éch.</i>	échantillon
<i>ED</i>	émulsion double
<i>EDC</i>	N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide
<i>ELISA</i>	enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (dosage d'immunosorption liée à enzyme)
<i>EM</i>	expectation maximization
<i>EPCs</i>	endotheliale progenitor cells (progéniteurs endothéliaux circulants)
<i>ES</i>	émulsion simple
<i>ES</i>	echo spacing (espace de temps entre les échos)
<i>étal.</i>	étalon
<i>ETL</i>	echo train length (train d'écho)

F_{ab}	fragment variable d'un anticorps
$f_{ant.}$	fantôme
F_c	fragment constant d'un anticorps
FCM	fuzzy C Means
FDA	food and drug administration
Fe_2O_3	ferrite
Fe_3O_4	magnétite
$F_{fant.}$	facteur de correction du fantôme
FGF	fibroblast growth factor (facteur de croissance du fibroblaste)
$FGRE$	fast gradient recalled echo (echo de gradient rapide)
FID	free induction decay (signal d'induction libre)
$Fiesta$	fast imaging employing steady state acquisition
FOV	field of view (champ de vue)
FSE	fast spin écho
G	acide guluronique
\bar{G}	gradient champ magnétique
G	gauche
Gd^{3+}	ion métallique de gadolinium
$Gd-Dota$	dotarem [®]
$Gd-DTPA$	magnevist [®]
$Gd-DTPA-BMA$	omniscan [®]
$Gd-HP-DO3A$	proHance [®]
$G-G-G-$	bloc d'acide guluronique
G_\emptyset	gradient de phase
G_R	read gradient (gradient de lecture)
GRE	gradient recalled echo (écho de gradient)
G_{SS}	gradient de sélection de coupe (gradient slice selection)
G	pourcentage de non uniformité
G_{intra}	pourcentage de non uniformité intra-coupe
$G_{corr.(n)}$	pourcentage de non uniformité du fantôme après correction
$G_{moy.}$	moyenne de $G_{corr.(n)}$
$G_{fant.}$	pourcentage de non uniformité du fantôme avant correction
HBA	acide 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoïque
HLB	hydrophilic-lipophilic balance (balance hydrophile-lipophile)
i	nombre d'orientation (1 à 4)
I	inférieur
IgG	immunoglobuline G
$IgG1$	immunoglobuline de type 1 ou anticorps monoclonal
$INRIA$	institut national de la recherche agronomique

<i>IR prep</i>	inversion recovery (préparation du temps d'inversion)
<i>IRM</i>	imagerie par résonance magnétique
<i>j</i>	$\sqrt{-1}$
<i>LEE</i>	limitantes élastiques externe
<i>LEI</i>	limitantes élastiques interne
<i>m</i>	nombre de matrice en huit flacons pour la gamme étalon
<i>M</i>	acide mannuronique
<i>M₀</i>	moment magnétique macroscopique à l'équilibre
<i>MG</i>	bloc mannuronique et guluronique mixte
<i>MIP</i>	maximum intensity projection
<i>M-M-M-</i>	bloc d'acide mannuronique
<i>MSMR</i>	microsphères marquées
<i>MSMR-E</i>	microsphères marquées avec l'Endorem [®]
<i>MSMR-R</i>	microsphères marquées avec le Resovist [®]
<i>M_{xy}</i>	composante transversale du moment macroscopique
<i>M_z</i>	composante longitudinale du moment macroscopique
<i>μ</i>	intensités
<i>μ_{fant.}</i>	intensités des flacons du fantôme
<i>μ_{éch.}</i>	intensités des flacons échantillons
<i>μ_{étal.}</i>	intensités des flacons étalons
<i>n</i>	indice de la position des flacons sur le support en bois (0 à 8)
<i>N^o</i>	nombre de coupe
<i>Na⁺</i>	ions de sodium
<i>NaAlg</i>	poudre d'alginate de sodium
<i>NaCl</i>	chlorure de Sodium
<i>N_{ex}</i>	nombre d'excitations
<i>NH₂</i>	fonction amine
<i>O₂</i>	molécule d'oxygène
<i>OH</i>	fonction hydroxyle
<i>PDGF</i>	platelet derived growth factor (facteur de croissance plaquettaire)
<i>pH</i>	potentiel hydrogène mesurant l'activité chimique des ions H ⁺
<i>Prescan</i>	opération de calibration de l'imageur IRM
<i>PVA</i>	alcool polyvinylique
<i>Q</i>	facteur de qualité de l'antenne
<i>R</i>	résistance
<i>\vec{r}</i>	position spatiale
<i>r₁</i>	relaxivité longitudinale d'un agent de contraste
<i>R₁</i>	gain de réception analogique
<i>r₂</i>	relaxivité transversale d'un agent de contraste

R_2	gain de réception numérique
RC	circuit résistance-condensateur
R_c	résistance dû aux courants de Foucault en couplage inductif à l'antenne
R_e	résistance extracellulaire
RF	radiofréquence
RMN	résonnance magnétique nucléaire (signal mesuré aux bornes de l'antenne)
ROI	région d'intérêt
R_p	résistance ohmique de l'antenne
RSS	root sum of square
$S\phi$	sérum physiologique
S	supérieur
S/B	signal sur bruit
$SAP-MS$	superabsorbant polymer microspheres (microsphères de polymère superabsorbantes)
SE	spin echo (écho de spin)
$SH U 555$	resovist [®]
$Span 80$	sorbitan monooleate
$Span 83$	sorbitan sesquioleate
$SPGR$	spoiled gradient echo
$SPIO$	superparamagnetic iron oxide (oxide de fer superparamagnétique)
$Sulfo-NHS$	sel de sodium du N-hydroxysulfosuccinimide
\bar{S}	moyenne du signal IRM dans les 4 orientations
$\bar{S}_{fant.(0)}$	signal du flacon central du fantôme
$\bar{S}_{fant.(n)}$	signal des flacons périphériques du fantôme
$\bar{S}_{témoin éch.(0)}$	signal du flacon témoin en commun aux deux matrices échantillons
$\bar{S}_{éch.(n)}$	signal des échantillons périphériques
$\bar{S}_{témoin étal.(0)}$	signal du flacon témoin en commun aux deux matrices étalons
$\bar{S}_{étal.(n)}$	signal des flacons périphériques de la gamme étalon
S	signal IRM mesuré
$S_{corrigé.éch.(n)}$	2 ^{ème} correction du signal IRM des échantillons
$S_{corrigé.étal.(n)}$	2 ^{ème} correction du signal IRM des étalons
$S_{final corrigé éch.(n)}$	3 ^{ème} correction du signal IRM des échantillons
\bar{S}	moment cinétique ou spin
T	température absolue
T_1	temps de relaxation longitudinale ou spin-réseau
T_2	temps de relaxation transversal ou spin-spin

<i>TAE</i>	transcatheter arterial embolization therapy (traitement par embolisation artérielle)
<i>TE</i>	temps d'écho
<i>TE_{eff}</i>	temps d'écho efficace
<i>TG</i>	transmission gain (gain de transmission)
<i>TGFβ</i>	transforming growth factor β (facteur de croissance transformant β)
<i>TI</i>	temps d'inversion
<i>T_L</i>	temps de lecture
<i>TNFα</i>	tumor necrosis factor α (facteur de nécrose tumoral)
<i>t_p</i>	temps d'impulsion de la radiofréquence
<i>TR</i>	temps de répétition
<i>Tween 80</i>	polyoxyEthylene Sorbitan monooleate
<i>v/v</i>	volume/volume
<i>V₆, V₄, V₂</i>	indices de vitesses d'agitations pour un agitateur
<i>V_{eff}</i>	volume effectif de l'antenne
<i>VEGF</i>	vascular endothelial growth factor (facteur de croissance vasculaire)
<i>VEGFR</i>	VEGF receptor (récepteur VEGF)
<i>VPF</i>	vascular permeability factor (facteur de perméabilité vasculaire)
<i>X</i>	réactance
<i>Z</i>	impédance
<i>Zip 2</i>	zero-fill interpolation processing (interpolation par remplissage de zéro)