



HAL
open science

Mesures in vivo de l'oxygénation sanguine et tissulaire par IRM; applications à l'étude de l'hypoxie tumorale chez le rat.

Thomas Christen

► **To cite this version:**

Thomas Christen. Mesures in vivo de l'oxygénation sanguine et tissulaire par IRM; applications à l'étude de l'hypoxie tumorale chez le rat.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00460939

HAL Id: tel-00460939

<https://theses.hal.science/tel-00460939>

Submitted on 3 Mar 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.

Thèse

présentée par

Thomas CHRISTEN

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'université Grenoble I – Joseph Fourier

Spécialité : **Physique**

Option : **Physique appliquée**

**Mesures *in vivo* de l'oxygénation sanguine et tissulaire par IRM;
applications à l'étude de l'hypoxie tumorale chez le rat.**

Thèse dirigée par Emmanuel BARBIER

Soutenue le 16 novembre 2009

Composition du jury :

Rapporteurs : Jacques FELBLINGER, Professeur

Bernard GALLEZ, Professeur

Examineurs : Emmanuel BARBIER, Chargé de Recherche

Françoise HIPPERT, Professeur

Patrick LEVY, Professeur

Samuel VALABLE, Chargé de Recherche

Grenoble Institut des Neurosciences – U836 INSERM / UJF / CEA / CHU

Equipe 5 – Neuroimagerie Fonctionnelle et Métabolique

Résumé : L'objectif de cette thèse était de développer des techniques de mesure de l'oxygénation cérébrale par IRM dans le contexte de l'angiogénèse tumorale. Nous avons mis en place une méthode de mesure de l'oxygénation tissulaire à partir de l'IRM du fluor-19. La réalisation d'une antenne RMN et une étude sur fantôme ont permis de calibrer la relation pO_2/R_1 pour la molécule d'héxafluorobenzène. Après injection intracérébrale du produit, des analyses de la pO_2 dans des cerveaux de rats sains ont montré que les mesures étaient précises et variaient avec l'inspiration de différents gaz. Nous avons également développé une nouvelle méthode de mesure de l'oxygénation sanguine basée sur la quantification de l'effet BOLD. Un modèle mathématique et la combinaison de techniques de mesure du volume sanguin, du T_2 , T_2^* et de B_0 ont permis d'obtenir des mesures quantitatives de la SO_2 . Ce protocole a été corrélé, sur cerveaux de rat sains, à des analyses de gaz du sang sous différentes conditions respiratoires. Des études sur des tumeurs cérébrales et pendant des traitements anti-cancéreux ont permis de comparer nos estimations de la SO_2 à d'autres paramètres vasculaires comme le volume sanguin, l'index de taille des vaisseaux ou la perméabilité. Nous avons également confronté notre approche à l'histologie du pimonidazole, un marqueur de l'hypoxie. Enfin, nous avons développé des simulations informatiques pour estimer la précision des mesures IRM basées sur des modèles mathématiques. La combinaison de deux approches numériques récentes a permis d'intégrer à nos simulations des données réalistes de microvascularisation acquises par microscopie intravitale. Les résultats suggèrent que la modélisation des vaisseaux sanguins par des cylindres droits est justifiée, mais que la densité ou l'orientation des vaisseaux sanguins pourraient être sources d'une surestimation du volume sanguin par RMN.

Mots clé : IRM, oxygénation, tumeurs cérébrales, hypoxie

Abstract: The aim of this study was to develop MR methods to measure brain oxygenation in the context of tumoral angiogenesis. We have developed a method to assess tissue oxygenation using ^{19}F MRI. The build up of a surface coil and a study in phantom have allowed the determination of the calibration curve (pO_2/R_1) of the hexafluorobenzene molecule. After intracerebral injection of the product, analysis of the pO_2 on healthy rat brains have shown accurate measurements which varied with various inspired gaseous conditions. We have also developed a new method based on the BOLD effect to assess the blood oxygenation. Using a mathematical model and a combination of MR methods designed to measure the BVf, T_2 , T_2^* and B_0 we have derived quantitative estimates of the SO_2 . This protocol has been correlated to blood gas analysis in healthy rat brains. A study on tumor and under therapies has been used to compare estimates of SO_2 to other vascular parameters. We have also compared our approach to results obtained with histology using a pimonidazole as a marker of hypoxia. Finally, we have developed numerical simulations to estimate the accuracy of MR methods based on mathematical models. The combination of two recent approaches has allowed the use of realistic microvascular networks acquired with intravital microscopy. The results suggest that the modelisation of the blood vessels as infinite long cylinders is justified but that the density or preferential orientation of the blood vessels may introduce errors on the estimates of BVF with MR.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité INSERM U594 puis U836, laboratoire de RMN de Grenoble, avec le soutien d'une bourse du ministère de la recherche. Ce projet a également bénéficié de soutiens financiers de la part de la région Rhône-Alpes (projet CIBLÉ), du PNR imagerie, de Guerbet et du cancéropôle.

Je tiens tout d'abord à remercier Emmanuel BARBIER pour m'avoir proposé de participer à ce projet. Son enthousiasme, sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses qualités humaines ont permis de guider ce travail dans les meilleures conditions.

J'aimerais également remercier Jacques FELBLINGER, Bernard GALLEZ, Françoise HIPPERT, Patrick LEVY, et Samuel VALABLE pour avoir jugé ce travail.

Merci à Christoph SEGEBARTH pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire pendant ces 3 années et d'avoir toujours été disponible au bon moment.

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble des personnes ayant participé à ce projet :

Nicolas PANNETIER, Olivier BLANC et Nicolas JOUDIOU au cours de leur stage de master.

Régine FARION et Benjamin LEMASSON pour l'aide considérable qu'ils m'ont apportée dans la plupart des expériences.

Sébastien REYT pour l'assistance à domicile Matlab et Aktham ASFOUR pour son aide sur les antennes RMN.

Chantal REMY pour ses conseils précieux et ses relectures attentives.

Merci à toutes les personnes du labo qui ont contribué à rendre agréables ces 3 années. Spéciale dédicace à bigseb, newfransch, nicoco et cocody qui ont fait vivre UT et le GINtonic.

Je n'oublie pas les grenoblois, les belfortains, les toronto-nancéens, les handballeurs, le O'Callaghan, les footeux, le tord boyaux, les rollermen, les skieurs, le Xo, ...

Enfin j'aimerais remercier ma famille, mes sœurs, tous mes parents et Elodie pour toutes ces années et celles à suivre...

TABLES DES MATIERES

TABLES DES MATIERES	7
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION GENERALE	13
CHAPITRE A : ELEMENTS DE CONTEXTE ET OBJET DE L'ETUDE	17
I. L'OXYGÈNE ET LA RESPIRATION	17
<i>I.1. La respiration cellulaire</i>	17
<i>I.2. Le système respiratoire</i>	18
I.2.a. Notion de pO ₂	19
I.2.b. Cascade de l'oxygène	19
<i>I.3. Transport de l'oxygène par le sang</i>	20
I.3.a. Notion de SO ₂ , OEF et CMRO ₂	21
I.3.b. Courbe de dissociation de l'hémoglobine	21
I.3.c. Facteurs influençant la courbe de dissociation.....	22
I.3.d. Le réseau vasculaire.....	23
<i>I.4. Conclusion</i>	24
II. HYPOXIE ET CANCER.....	25
<i>II.1. Définitions</i>	25
<i>II.2. Différents types d'hypoxies</i>	25
II.2.a. Hypoxie chronique	26
II.2.b. Hypoxie aiguë.....	27
II.2.c. Hypoxie anémique	27
II.2.d. Différentes valeurs d'oxygénation au sein de la tumeur.....	27
<i>II.3. Conséquences de l'hypoxie</i>	28
II.3.a. Résistance aux traitements.....	28
II.3.b. Induction d'un caractère agressif	28
<i>II.4. Conclusion</i>	30
III. METHODES DE MESURE DE L'OXYGENATION.....	31
<i>III.1. Mesures de la PO₂</i>	31
III.1.a. Electrodes à oxygène	31
III.1.b. Mesures de la pO ₂ avec Oxylite®	31
III.1.c. Résonance paramagnétique électronique (RPE)	32
III.1.d. Méthodes IRM.....	34
<i>III.2. Rapporteurs biologiques de l'hypoxie</i>	35
III.2.a. Pimonidazoles.....	35
III.2.b. HIF et dérivés.....	36
<i>III.3. Mesures de la SO₂</i>	37
III.3.a. Spectroscopie proche infrarouge (NIRS)	37
III.3.b. Tomographie photoacoustique (TAP).....	38
III.3.c. Méthodes IRM	39
<i>III.4. Mesures du CMRO₂</i>	40
III.4.a. IRM ¹⁷ O.....	40
III.4.b. TEP ¹⁵ O	42
III.4.c. IRMf quantitative.....	42
<i>III.5. Critères d'évaluation des méthodes</i>	42
IV. PLAN D'ETUDE	45
CHAPITRE B : MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE MESURE DE LA PO₂ PAR IRM DU FLUOR¹⁹	47
I. PRINCIPE.....	47
<i>I.1. Variations du temps de relaxation longitudinal avec la PO₂</i>	47
<i>I.2. La méthode FREEDOM</i>	48
<i>I.3. Autres approches</i>	49

II. DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE POUR L'IRM ¹⁹ F	51
II.1. Realisation d'une antenne de surface.....	51
II.2. Produit fluoré et fréquence de resonance.....	52
II.2.a. Caractéristiques de l'héxafluorobenzène	52
II.2.b. Détection RMN de l'HFB.	52
II.3. Séquence IR-flash.....	53
II.3.a. Principe de la séquence.....	53
II.3.b. Recherche des paramètres adaptés à l'étude du fluor	54
II.3.c. Exemple de carte T ₁ sur fantôme	55
III. ETABLISSEMENT D'UNE COURBE DE CALIBRATION POUR L'HEXAFLUOROBENZENE.....	56
III.1. Realisation d'un objet test.....	56
III.1.a. Caractéristiques du fantôme.....	56
III.1.b. Validation	57
III.2. Courbe de calibration à 2,35T.....	59
III.2.a. Protocole	59
III.2.b. Résultats	60
IV. MESURES DE LA PO ₂ SUR RATS SAINS ET PORTEURS DE TUMEURS	62
IV.1. Materiel et methodes.....	62
IV.1.a. Modèle animal et protocole biologique.....	62
IV.1.b. Implantation et croissance des tumeurs cérébrales.....	62
IV.1.c. Injection intracrânienne de l'héxafluorobenzène.....	62
IV.1.d. Protocole IRM	62
IV.2. Resultats.....	63
IV.2.a. Détection in-vivo du fluor	63
IV.2.b. Cartes de pO ₂ sous air.....	63
IV.2.c. Evaluation de la pO ₂ sous différentes FiO ₂	64
V. DISCUSSION SUR LA METHODE	65
CHAPITRE C : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE MESURE DE LA SO₂ A PARTIR DE L'EFFET BOLD	67
I. CARACTÈRE MAGNÉTIQUE DE L'HÉMOGLOBINE	68
I.1. Origines.....	68
I.2. Evaluation de la susceptibilité magnetique.....	68
I.2.a. Définition de la susceptibilité magnétique	69
I.2.b. Susceptibilité magnétique du sang	69
I.2.c. Différences de susceptibilité magnétique	70
II. MODELISATION MATHÉMATIQUE.....	72
II.1. Modelisation des perturbations du signal RMN induites par des inhomogénéités de champ magnétique.....	72
II.2. Perturbation du champ magnetique par un cylindre paramagnetique.....	75
II.3. Perturbation du signal RMN par un ensemble de cylindres paramagnetiques.....	77
II.4. Evolution du signal du voxel.....	79
III. PRINCIPE DE LA MÉTHODE.....	81
III.1. Distinction entre les differentes contributions au signal	81
III.1.a. Méthodes existantes.....	81
III.1.b. Notre approche	82
III.2. Correction des larges inhomogénéités de champ magnetique.....	83
III.2.a. Utilisation d'une carte de champ magnétique.....	83
III.2.b. Acquisitions 3D haute résolution.	85
III.3. Mesures du volume sanguin.....	87
III.4. Mesure du temps de relaxation transverse	88
III.5. Protocole d'acquisition et de traitement.....	89
CHAPITRE D : EVALUATION DE LA METHODE DE MESURE DE LA SO₂.....	93
I. ACQUISITION D'UNE CARTE DE CHAMP MAGNETIQUE.....	93
I.1. Mesures sur fantome.....	93
I.1.a. Matériel et méthodes	94
I.1.b. Déballage de phase et acquisition de la carte.....	94

I.1.c. Susceptibilité magnétique à partir de la carte de champ.....	96
I.2. Mesures in-vivo sur sinus veineux.....	97
I.3. Conclusion.....	98
II. VALIDATION DE LA MESURE DE LA SO ₂ LOCALE SUR CERVEAU SAIN PENDANT CHALLENGE GAZEUX.....	99
II.1. Matériel et méthodes.....	99
II.1.a. Préparation animale.....	99
II.1.b. Groupes d'animaux.....	99
II.1.c. Protocole IRM.....	100
II.1.d. Analyse des données.....	100
II.1.e. Analyses statistiques.....	101
II.2. Résultats.....	101
II.2.a. Evaluation de la méthode.....	101
II.2.b. Variations avec la FiO ₂	104
II.3. Conclusion.....	107
III. ETUDE DE LA RELATION HYPOXIE / SO ₂ SUR TUMEURS.....	109
III.1. Matériel et méthodes.....	109
III.1.a. Protocole d'IRM.....	109
III.1.b. Traitement des données IRM.....	109
III.1.c. Sacrifices des rats et prélèvements.....	110
III.1.d. Analyse d'image.....	110
III.2. Résultats.....	110
III.2.a. Corrélation SO ₂ et pimonidazole.....	110
III.2.b. Corrélation SO ₂ et BVf.....	112
IV. CONCLUSIONS SUR LA METHODE.....	113
CHAPITRE E : QUELQUES DONNEES COLLECTEES EN SITUATIONS PATHOLOGIQUES.....	115
I. MESURES DE LA SO ₂ SUR DEUX MODELES DE TUMEURS ET UN MODELE D'ISCHEMIE CEREBRALE.....	116
I.1. Matériel et méthodes.....	116
I.2. Résultats.....	116
I.3. Discussion.....	117
II. MESURE DE LA SO ₂ APRES UN TRAITEMENT DE CHIMIOETHERAPIE ET/OU UN TRAITEMENT ANTIANGIOGENIQUE.....	118
II.1. Matériel et méthodes.....	118
II.2. Résultats.....	119
II.3. Discussion.....	120
III. SUIVI LONGITUDINAL DE LA SO ₂ TUMORALE PENDANT UN TRAITEMENT ANTIANGIOGENIQUE.....	121
III.1. Matériel et méthodes.....	121
III.1.a. Traitement des rats.....	121
III.1.b. Protocole d'IRM.....	121
III.1.c. Sacrifices des rats et prélèvements.....	122
III.2. Résultats.....	123
III.2.a. Volume sanguin et index de taille des vaisseaux.....	123
III.2.a. Saturation en oxygène et marquage des zones hypoxiques.....	125
III.2.b. Coefficient de diffusion et perméabilité.....	125
III.3. Discussion.....	126
IV. CONCLUSION.....	127
CHAPITRE F : INFLUENCE DES CARACTERISTIQUES DU RESEAU VASCULAIRE SUR LES ESTIMATIONS RMN.....	129
I. SIMULATIONS INFORMATIQUES.....	130
I.1. Calcul du champ magnétique dans le voxel.....	130
I.1.a. Principe.....	131
I.1.b. Validation sur un cylindre droit.....	131
I.2. Calcul du signal RMN.....	132
I.2.a. Principe.....	132
I.2.b. Validation en présence d'un gradient de champ constant.....	134
I.3. Estimations de la fraction volumique sanguine.....	135
I.4. Validation sur un ensemble de cylindres droits.....	135

1.5. Conclusions	137
II. INFLUENCE DE LA GEOMETRIE VASCULAIRE	138
II.1. Etude sur données bi-photon.....	138
II.1.a. Matériels et méthode.....	138
II.1.b. Résultats	139
II.2. Influence des paramètres vasculaires.....	140
II.2.a. Direction des vaisseaux.....	141
II.2.b. Influence de la forme des vaisseaux	142
II.2.c. Influence du rayon de courbure.....	143
II.2.d. Densité des vaisseaux	143
II.3. Conclusions.....	144
III. INFLUENCE DU TAUX D'HEMATOCRITE	145
III.1. Simulations informatiques	145
III.1.a. Conclusion	147
III.2. Etude expérimentale in-vivo.....	147
III.2.a. Matériels et méthodes.....	147
III.2.b. Résultats	148
III.3. Conclusions.....	150
IV. CONCLUSION DU CHAPITRE	151
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	155
RÉFÉRENCES.....	157
ANNEXES.....	171
I. LA PLATE-FORME IRM DE GRENOBLE.....	172
II. DONNEES ACQUISES A L'AIDE DE L'OXYLITE®	173
III. PUBLICATIONS REALISEES PENDANT LA THESE.....	175
IV. TABLE DES FIGURES	177

LISTE DES ABREVIATIONS

ADC	Apparent diffusion coefficient (coefficient de diffusion apparent)
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
BOLD	Blood oxygen level dependent
BVf	Blood volume fraction (fraction de volume sanguin)
CBF	Cerebral Blood Flow (débit sanguin cérébral)
CBF ₀	CBF à l'état basal
CBV	Cerebral Blood Volume (volume sanguin cérébral)
CMRO ₂	Cerebral Metabolic rate of Oxygen
CMRO _{2,0}	CMRO ₂ à l'état basal
dHb	Désoxyhémoglobine
EPI	Echo planar imaging (imagerie echo planar)
FLASH	Fast Low Angle Shot
FOV	Field of view (champ de vue)
FREDOM	Fluorocarbon relaxometry using echo planr imaging for dynamic oxygen mapping
GE	Gradient echo (écho de gradient)
HbO ₂	Oxyhémoglobine
HCT	Taux d'hématocrite
HIF	Hypoxia inducible factor
IRM	Imagerie par résonance magnétique nucléaire
IRMf	IRM fonctionnelle
IV	Intraveineuse
MGE	Multi gradient echo
MGESE	Multi gradient echo spin echo

Liste des abréviations

NIRS	Near infrared spectroscopy (spectroscopie proche infrarouge)
OEF	Oxygen Extraction Fraction (fraction d'oxygène extraite)
pO ₂	Pression partielle en oxygène
ROI	Region Of Interest (région d'intérêt)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPE	Résonance paramagnétique électronique
RSB	Rapport signal sur bruit
SaO ₂	SO ₂ artérielle
SE	Spin echo
SO ₂	Saturation en oxygène de l'hémoglobine
SvO ₂	SO ₂ veineuse
TAP	tomographie photoacoustique
TEP	Tomographie par émission de positrons
TE	Temps d'écho
TF	Transformée de Fourier
TI	Temps d'inversion
TR	Temps de répétition
USPIO	Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide
VSI	Vessel size index (index de taille des vaisseaux)

INTRODUCTION GENERALE

L'oxygène joue un rôle fondamental pour la vie. Depuis plus de 500 millions d'années la vie aérobie s'est imposée sur les formes de vie n'utilisant pas l'O₂. Pourtant, pour les humains, l'oxygène a différents visages. On sait que sa présence est indispensable à notre survie. Un humain ne peut tenir plus de 11'35" sans apport en O₂ (record du monde d'apnée statique du 8 juin 2009). Les bars à oxygène et les produits de beauté à l'oxygène rendent compte des vertus guérissantes et toniques que l'on prête à cette molécule. Mais on sait également qu'il n'est pas possible de survivre plus de quelques jours en respirant une trop grande quantité d'oxygène. On pense aussi depuis quelques années qu'à travers les chemins de la respiration, la présence de ce même oxygène serait à l'origine de notre vieillesse et de notre durée de vie limitée. Ainsi, de nombreux traitements antioxydants sont vendus pour, disent-ils, nous aider à combattre les effets nocifs de l'O₂.

Dans le contexte du cancer, l'absence d'oxygène (ou hypoxie) a également des conséquences variées. D'un côté, la réplication rapide des cellules tumorales entraîne leur éloignement progressif des vaisseaux sanguins et une donc baisse progressive de l'oxygène utilisable. Les cellules privées d'oxygène voient leur métabolisme se ralentir et une exposition prolongée en condition hypoxique peut conduire à la mort cellulaire. D'un autre côté, l'hypoxie tend à activer des mécanismes de défense qui induisent un caractère agressif dans les tumeurs. Les cellules tumorales en état de stress hypoxiques réagissent en activant des mécanismes de lutte contre l'hypoxie à travers un facteur protéique HIF (hypoxia inducible factor). Elles stimulent le développement d'une neo-vascularisation pour subvenir aux besoins en oxygène et favoriser la croissance tumorale. A travers ces vaisseaux souvent anormaux, les cellules tumorales peuvent être transportées dans l'organisme et induire des métastases. La sélection de clones résistants à l'absence d'oxygène peut être à l'origine de récurrences locales ou d'une résistance aux traitements conventionnels de radiothérapie ou chimiothérapie.

Etant donné les différents rôles de l'oxygène dans la biologie des tumeurs, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été envisagées. Il a été proposé de réoxygéner les tumeurs à travers l'utilisation de gaz à forte concentration en oxygène (carbogène) ou en augmentant la capacité de transport du sang (EPO) pour d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie. Les traitements antiangiogéniques ont été développés pour asphyxier la tumeur. Puis, il a été proposé qu'en fait, une normalisation transitoire de la microvascularisation pourrait intervenir, ouvrant brièvement une fenêtre de meilleure oxygénation. Certains médicaments comme la tirapazamine sont conçus spécifiquement pour cibler les cellules hypoxiques et les détruire. Enfin, les thérapies anti-vasculaires tentent, elles, de détruire la microvascularisation cérébrale pour asphyxier la tumeur. Toutes ces thérapies sont toutefois en cours de développement et des outils permettant de bien caractériser leur efficacité restent à trouver.

Dans ce contexte, une caractérisation fiable de l'oxygénation pourrait permettre de prédire ou d'analyser la réponse aux thérapies, de stratifier les patients et de déterminer

la thérapie la plus efficace. Elle pourrait également aider à une meilleure compréhension du développement tumoral et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Même s'il est aujourd'hui possible de mesurer les niveaux d'oxygènes *in vivo* à l'aide d'électrodes à oxygène, une approche utilisant l'imagerie paraît plus appropriée étant donné la nature hétérogène aussi bien spatiale que temporelle de l'oxygénation des tumeurs. Beaucoup de techniques sont envisageables comme la TEP (tomographie par émission de positrons), la RPE (résonance paramagnétique électronique) ou la NIRS (near infrared spectroscopy), mais aucune ne s'est imposée en routine clinique. L'IRM, technique non ionisante et non invasive, autorisant des examens répétés et un suivi régulier du patient après la mise en œuvre d'un traitement pourrait être un outil de choix pour l'étude de l'hypoxie en clinique. Cette technique permet une excellente caractérisation anatomique des différents tissus constituant le cerveau. Elle est aussi appréciée pour la grande variété d'informations physiologiques (flux, débit et volume sanguins, taille des vaisseaux, coefficient de diffusion de l'eau) qu'elle peut fournir. L'IRM est sensible à l'oxygénation au travers de plusieurs paramètres (comme le T_2 , T_1 ou T_2^*) mais, pour l'instant, les méthodes proposées montrent des relations complexes avec l' O_2 et manquent de validation, notamment en situations pathologiques.

Le sujet de cette thèse s'inscrit dans un projet plus général d'étude de la microvascularisation cérébrale pour l'analyse de pathologies cérébrales. L'objectif est d'apporter un outil IRM de mesure de l'oxygénation à l'ensemble des outils IRM de caractérisation de la microvascularisation cérébrale développés précédemment au laboratoire. Pour ce travail, nous avons décidé d'aborder la mesure de l'oxygénation des tumeurs à l'aide d'un paramètre tissulaire (la pression partielle en oxygène ou pO_2) et d'un paramètre vasculaire (la saturation en oxygène de l'hémoglobine ou SO_2). Même si les outils développés peuvent permettre l'analyse de l'oxygénation dans un grand nombre de pathologies, nous nous sommes concentrés pendant cette thèse sur l'étude de l'hypoxie tumorale.

Le manuscrit est organisé en 6 chapitres.

Dans le chapitre A nous exposons le contexte biologique de l'étude à travers la description des phénomènes de la respiration et de l'hypoxie tumorale. Nous explicitons les notions de pO_2 et SO_2 et présentons les principales techniques de mesure de l'oxygénation.

Pour mesurer la pO_2 tissulaire, nous avons mis en place une méthode connue de mesure de la pO_2 par IRM du fluor-19 (Chapitre B). L'étude a principalement consisté en un travail méthodologique pour permettre l'imagerie du fluor¹⁹ sur les imageurs de la plate forme et une étude sur fantôme pour calibrer la méthode. Une courte étude *in vivo* a permis d'évaluer la pO_2 sur des rats sains et porteurs de tumeurs sous différentes conditions respiratoires. Des problèmes matériels (notamment le déménagement des aimants au cours de la thèse impliquant le non fonctionnement du scanner à 2,35T), le caractère invasif de la méthode et la complexité expérimentale de l'approche ¹⁹F nous ont conduit à nous concentrer sur le développement d'une méthode de mesure de l'oxygénation sanguine à partir de l'effet BOLD.

Nous avons proposé une nouvelle approche pour la quantification IRM de la SO_2 à travers les effets T_2^* . Après avoir évalué notre méthode sur rats sains et sous différentes conditions respiratoires, la technique a été appliquée à l'étude de l'hypoxie tumorale et comparée à l'histologie utilisant un rapporteur de l'hypoxie. Ces travaux font l'objet des chapitres C et D.

Parallèlement aux travaux évoqués ci-dessus, plusieurs études en collaboration ont permis de suivre l'évolution de la microvascularisation tumorale pendant des traitements de radiothérapie par rayonnement synchrotron, de chimiothérapie et de thérapie antiangiogénique. Nous exposons au chapitre E les résultats de ces études en nous concentrant sur les valeurs de la SO_2 trouvées et la corrélation avec les autres paramètres microvasculaires.

Enfin, les méthodes utilisées au laboratoire reposant en grande partie sur des modèles mathématiques de la microvascularisation cérébrale, nous avons évalué (Chapitre F) l'impact de certaines hypothèses du modèle sur la précision de nos mesures. Ainsi nous avons mis en place une technique de simulation informatique du signal RMN en présence de sources d'inhomogénéité du champ magnétique. L'influence de la morphologie des vaisseaux sanguins a été évaluée en utilisant des données simulées ou provenant d'acquisitions de microscope à deux photons. Une étude *in silico* sur l'influence du taux d'hématocrite sur les mesures a également été confrontée à une étude expérimentale incluant des conditions d'hémodilution et d'hypoxie intermittente.

En annexe de ce manuscrit, on pourra trouver la description des IRM de la plate forme de Grenoble et la liste des publications réalisées pendant la thèse. Nous présentons également quelques données mesurées avec l'appareil commercial de mesure de la pO_2 (Oxylite®), acquis pendant la thèse.

CHAPITRE A : ELEMENTS DE CONTEXTE ET OBJET DE L'ETUDE

Ce chapitre décrit succinctement le rôle de l'oxygène dans la respiration cellulaire et le système respiratoire. Les notions de pression partielle en oxygène et de saturation en oxygène de l'hémoglobine vont être analysées car elles constituent les deux grandeurs que l'on cherche à mesurer par RMN. On se concentrera sur les valeurs caractéristiques de la littérature dans les conditions saines et pathologiques. Les causes et conséquences de l'hypoxie (ou manque d'oxygène) dans les tumeurs sont décrites pour mettre en avant l'importance d'une mesure précise de l'oxygénation. Les principes des méthodes permettant une caractérisation de l'oxygénation *in vivo* seront alors présentés et analysés selon leur capacité à répondre aux besoins spécifiques de l'étude de l'hypoxie tumorale.

I. L'OXYGÈNE ET LA RESPIRATION

La découverte de l'oxygène est créditée à Scheedle et Priestley en 1773. Lavoisier nomma la molécule et montra en 1793 qu'elle était un élément essentiel pour la vie.

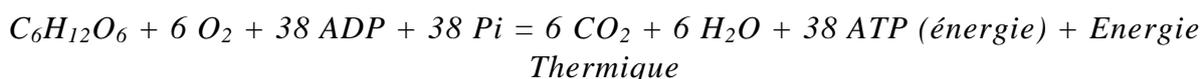
I.1. LA RESPIRATION CELLULAIRE

La respiration cellulaire est une réaction chimique d'oxydoréduction qui fournit l'énergie nécessaire à une cellule pour fonctionner. Le principe est commun à l'ensemble des organismes vivants et repose sur la dégradation de substrats à haute valeur énergétique (sucres, graisses, protéines) et la récupération de l'énergie libre contenue dans leurs liaisons chimiques.

Pour les organismes aérobies, les carburants nécessaires à la réaction sont le glucose, des acides gras ou d'autres molécules organiques (acides aminés, corps cétoniques). Dans le cas des humains, ces carburants proviennent de la digestion et sont amenés par la circulation sanguine.

L'oxygène joue le rôle de comburant. Dans le cas des humains, il est extrait de l'air par la ventilation pulmonaire et est amené à la cellule par la circulation sanguine, fixé sur l'hémoglobine des hématies (globules rouges). La réaction produit du dioxyde de carbone (CO₂) évacué par la circulation sanguine (dissous dans le plasma) et de l'eau H₂O.

La réaction globale pour le glucose est :



où Pi désigne un phosphate inorganique. Les phases finales et caractéristiques impliquant l'oxygène moléculaire se déroulent exclusivement dans les mitochondries. Grâce à la phosphorylation de l'ADP (adénosine diphosphate) en ATP (adénosine triphosphate), une grande partie (40 %) de l'énergie dégagée par la respiration peut y

être récupérée sous une forme immédiatement utilisable par la cellule ; le reste est perdu sous forme de chaleur.

Pour alimenter son métabolisme l'organisme possède d'importants stocks de carburants de base (tissu adipeux, glycogène...), mais il ne possède aucune réserve d'oxygène. Les cellules ont aussi un stock très limité d'ATP. Un apport constant d'oxygène aux mitochondries est donc nécessaire pour assurer le métabolisme aérobie des tissus.

I.2. LE SYSTEME RESPIRATOIRE

La Figure 1 présente les principales voies du système respiratoire.

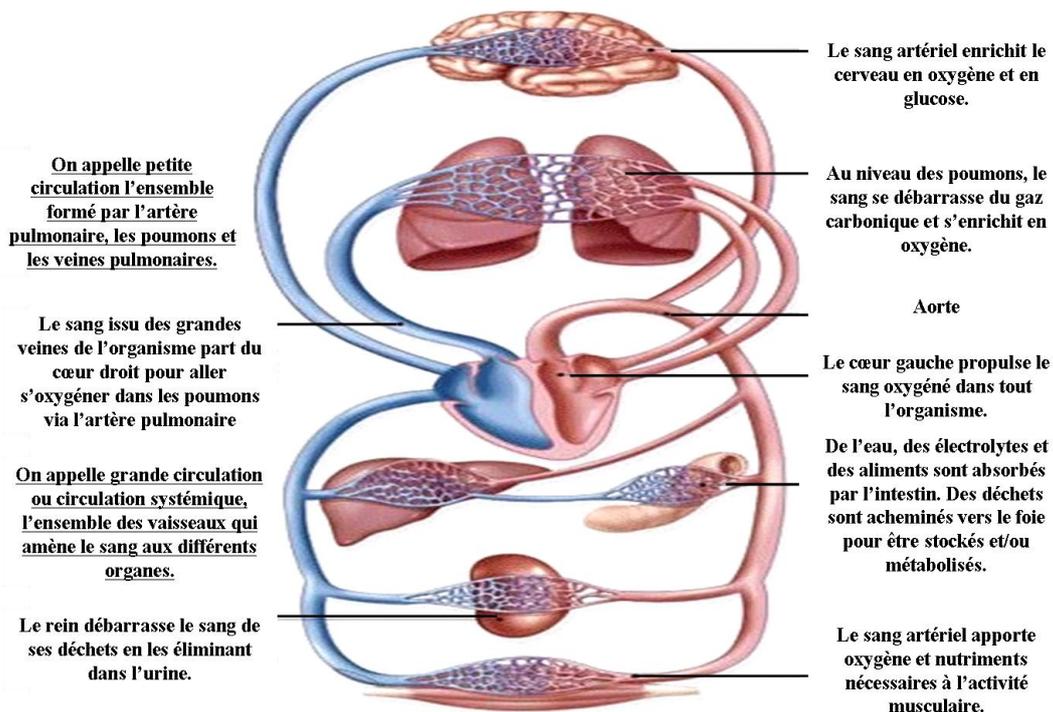


Figure 1: Schéma du système respiratoire. D'après www.sanofi-aventis.fr.

Le transport d'oxygène depuis les poumons jusqu'à la mitochondrie où il est utilisé requiert la juxtaposition de différents processus, les uns dits de « diffusion », les autres de « convection ».

Le transport d'oxygène par diffusion se rapporte au transfert de l'oxygène des poumons au sang et du sang jusqu'aux cellules. Ce transfert est fonction du gradient de pression partielle en oxygène (pO_2) existant entre l'air alvéolaire, le capillaire et l'intérieur de la cellule.

Le transport d'oxygène par convection correspond aux mouvements globaux de l'oxygène dans le sang. Il implique les mécanismes contrôlant la distribution du sang entre les organes et au sein de ceux-ci.

L'ajustement de cet apport d'oxygène, via le contrôle de la ventilation et l'adaptation du débit cardiaque, a pour résultat que la quantité d'oxygène apportée coïncide avec les besoins de l'organisme.

1.2.a. Notion de pO_2

Selon la loi de Dalton, dans un mélange gazeux, la pression totale est égale à la somme des pressions partielles des gaz constituant le mélange. Au sein d'un mélange gazeux, la pression partielle d'un gaz s'obtient donc en multipliant sa concentration fractionnelle (sa « proportion ») par la pression totale exercée par le mélange.

Dans l'atmosphère terrestre l'oxygène exerce une pression égale à 20,95 % de la pression atmosphérique totale. Au niveau de la mer, la pression atmosphérique moyenne étant égale à 760 mmHg, la pO_2 est égale à 159 mmHg (Tableau 1).

Tableau 1 : Composition de l'air sec (au niveau de la mer)

Gaz	Symbole	Proportion (%)	Pression partielle (mmHg)
Azote	N ₂	78,084	593,40
Oxygène	O ₂	20,946	159,22
Argon	Ar	0,934	7,33
Dioxyde de carbone	CO ₂	0,035	0,24
Autres gaz rares	He, Xe, CO...	< 0,003	< 0,01

Le pourcentage d'oxygène dans l'air ne varie pas avec l'altitude mais la pression totale diminue. Ainsi on peut noter une pO_2 de 127 mmHg à 1800 m, de 84 mmHg à 5000 m et de 50 mmHg à 8884 m (Everest).

1.2.b. Cascade de l'oxygène

Chez l'homme et au repos, chaque inspiration amène environ un demi-litre d'air dans les poumons (volume courant) et ceci en moyenne 15 fois par minute (fréquence respiratoire).

Après passage de l'air dans les bronches, celui-ci se sature en vapeur d'eau. A la température corporelle, la pression exercée par la vapeur d'eau étant de 47 mmHg, la pO_2 devient $pO_2 = (760 - 47) * 0.2095 = 149$ mmHg. Le passage de l'air atmosphérique dans les voies aériennes réduit donc la pO_2 de 10 mmHg. Cette baisse progressive de la pO_2 se poursuit jusqu'aux mitochondries et est désignée sous le terme de « cascade de l'oxygène » (Figure 2).

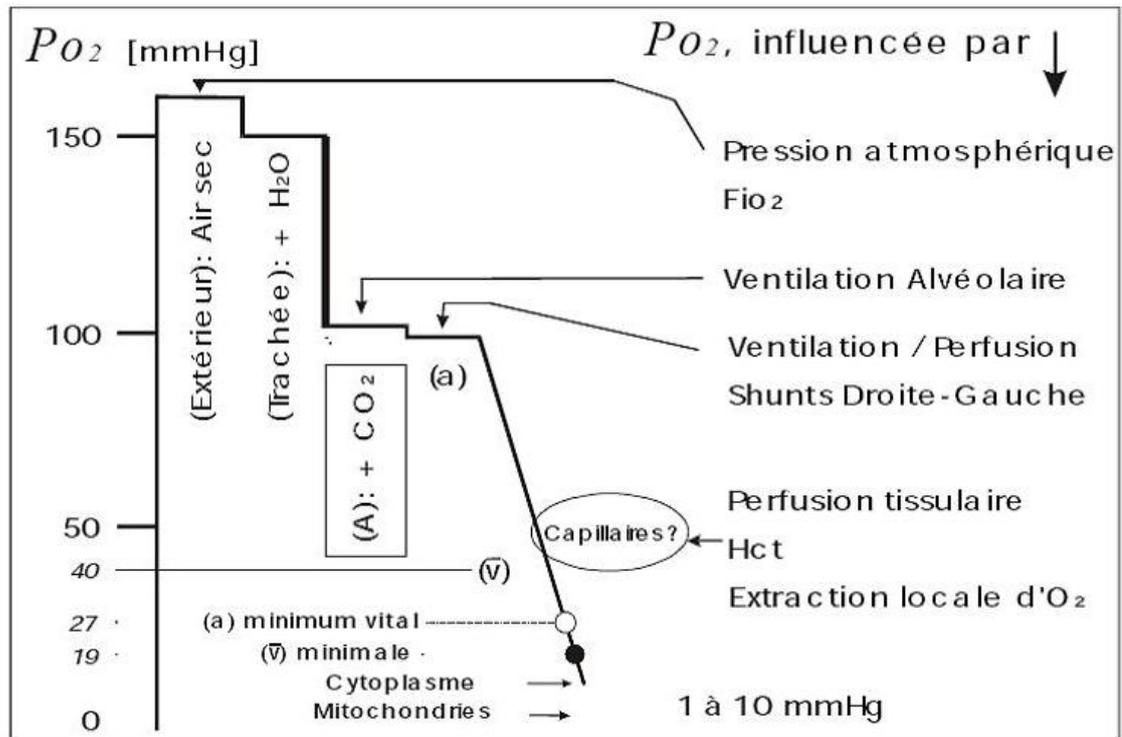


Figure 2 : Cascade de l'oxygène (a)=artériel, (v)=veineux. D'après www.md.ucl.ac.be/virtanes/oxy.PDF

Au niveau des alvéoles pulmonaires la pO_2 se situe aux alentours de 100 mmHg. Le mélange gazeux entre alors en contact du sang. Le gaz qui entre dans la phase liquide est dissous et on peut noter que seule cette forme dissoute exerce une pression partielle. La pO_2 dans le sang artériel est aux alentours de 90-95 mmHg et correspond à un volume d'oxygène dissous dans le sang artériel de 0,3mL pour 100 mL de sang. Cet oxygène dissous joue un rôle remarquable puisqu'il conditionne la forme de transport de l'oxygène combiné à l'hémoglobine (Chapitre A.I.3.). Au niveau tissulaire, l'hémoglobine largue son oxygène dans le sang où il retrouve sa forme dissoute. La pO_2 dans le sang veineux est alors de 40 mmHg.

L'oxygène étant utilisé en permanence dans la mitochondrie, sa pression partielle est donc très basse, de l'ordre de 1 mmHg. Il en résulte que, pour ce gaz, un énorme gradient de pression partielle est créé et entretenu de proche en proche entre les vaisseaux et la mitochondrie, gradient le long duquel l' O_2 diffuse.

Si la pO_2 artérielle est constante, on considère alors que la pO_2 veineuse locale est un témoin de la pO_2 tissulaire locale.

I.3. TRANSPORT DE L'OXYGÈNE PAR LE SANG

L'oxygène capté au niveau des alvéoles pulmonaires n'est que très faiblement transporté sous forme dissoute dans le sang. Le moyen privilégié de transport est la forme combinée à l'hémoglobine, principale composant des hématies.

1.3.a. Notion de SO_2 , OEF et $CMRO_2$

Un globule rouge (ou hématie) contient 280 millions de molécules d'hémoglobine (Hb). Chaque molécule contenant quatre groupements prosthétiques (hème) possédant un atome de fer fixateur de l'oxygène, elle peut fixer quatre molécules d'oxygène. La fixation d'une molécule d'oxygène sur une molécule d'hémoglobine entraîne une modification de la conformation de l'hémoglobine qui augmente l'affinité des trois autres sites de fixation pour l'oxygène. Ainsi, l'hémoglobine se retrouve le plus souvent soit complètement oxygénée, soit complètement désoxygénée. L'oxygène transporté sous forme combinée est de 20,8 mL d'oxygène pour 100 mL de sang. L'hémoglobine transporte 70 fois plus d'oxygène dans les circonstances normales que la phase aqueuse du sang et compte pour 98% du transport de l'oxygène par le sang.

On appelle saturation en oxygène de l'hémoglobine (SO_2), la proportion de molécules d'hémoglobine qui sont oxygénées, parmi la totalité des molécules d'hémoglobine, oxygénées HbO_2 (oxyhémoglobine) et non oxygénées dHb (désoxyhémoglobine) :

$$SO_2 = \frac{HbO_2}{HbO_2 + dHb} \quad \text{Équation 1}$$

Le facteur principal déterminant le taux de saturation de l'hémoglobine en oxygène est la pression partielle en oxygène dans le sang.

La consommation d'oxygène par le tissu cérébral ($CMRO_2$, Cerebral Metabolic Rate of Oxygen) est définie comme la quantité d'oxygène consommée par unité de temps et pour une masse de tissu donnée. Une valeur typique de consommation d'oxygène est de l'ordre de $2\mu\text{mol/g/min}$ dans le cortex humain. Le principe de Fick relie la $CMRO_2$ par le tissu, le débit sanguin cérébral (CBF) et les saturations en oxygène du sang artériel (SaO_2) et veineux (SvO_2) :

$$CMRO_2 = CBF \cdot 4 \cdot [Hb] \cdot (SaO_2 - SvO_2) \quad \text{Équation 2}$$

On peut également définir la fraction d'extraction en oxygène (OEF, Oxygen Extraction Fraction) qui représente la différence relative de saturation en oxygène entre les territoires artériels et veineux :

$$OEF = \frac{SaO_2 - SvO_2}{SaO_2} \quad \text{Équation 3}$$

Dans les conditions physiologiques normales, SaO_2 est proche de 100% et SvO_2 de 60%. L'OEF est alors proche de 40%.

1.3.b. Courbe de dissociation de l'hémoglobine

La courbe de dissociation de l'hémoglobine, encore appelée courbe de Barcroft, met en relation la saturation de l'hémoglobine et la pression partielle en oxygène (Figure 3).

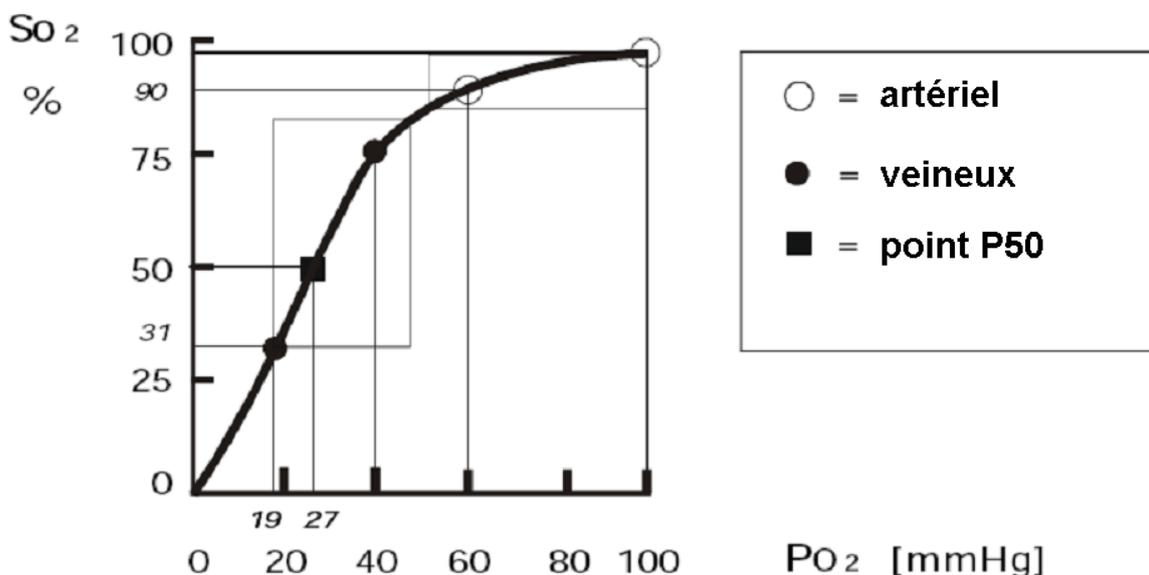


Figure 3 : Courbe de dissociation de l'hémoglobine. D'après www.md.ucl.ac.be/virtanes/oxy.PDF

La forme de la courbe est une sigmoïde et peut se décomposer en deux parties. Dans sa phase ascendante, la pente de la courbe est très forte et de faibles différences de PO_2 entraînent d'importants échanges d' O_2 et donc de grandes modifications de SO_2 . Cette partie se nomme parfois versant 'veineux' ou 'tissulaire' de la courbe.

Par contre dans la phase de plateau (aussi appelée partie 'artérielle' ou 'pulmonaire'), l'hémoglobine est quasi totalement saturée quelle que soit la pO_2 . On remarque une captation maximale d'oxygène aux pO_2 normalement rencontrées dans les alvéoles pulmonaires : plus de 97 % de saturation à 100 mmHg. A une pO_2 de 60 mmHg la SO_2 est encore égale à 90 %. Ce plateau autorise donc une marge de sécurité.

La transition entre ces deux comportements se situe aux environs d'une pO_2 de 60 mmHg, correspondant à une SO_2 de 90%.

Le point d'inflexion de la sigmoïde se situe à une pO_2 de 27 mmHg, ce qui correspond à une saturation de 50%, et est appelé point p_{50} de la courbe. Cette p_{50} est utilisée pour définir l'affinité d'une molécule susceptible de fixer l'oxygène de façon réversible : une p_{50} basse signifie qu'une molécule possède une grande affinité pour l'oxygène.

Enfin, il est à noter qu'une SO_2 de 35 % (ou moins) n'est pas compatible avec une survie prolongée ; elle correspond à une pO_2 de 20 mmHg ou moins.

1.3.c. Facteurs influençant la courbe de dissociation

La courbe de dissociation présentée dans la partie précédente n'est correcte que dans des conditions standards : $pH=7,40$, $PCO_2=40$ mmHg, température= $37^\circ C$.

Certaines situations physiopathologiques modifient l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène en rapprochant la courbe d'un modèle linéaire (*déviaton à droite*) ou en l'éloignant (*déviaton à gauche*).

La déviation de la courbe de dissociation de l'hémoglobine à droite signifie que l'affinité pour l'oxygène est moins importante. Concrètement, cela se traduit par une augmentation de la p50 et une augmentation de la quantité d'oxygène délivrée aux tissus.

Les causes de cette déviation sont :

- une augmentation de la pCO₂ et/ ou une baisse du pH. Ceci est désigné sous le nom de l'effet Bohr.
- une augmentation de température (Exemple : exercice physique).
- une augmentation de production du 2,3 diphosphoglycérate qui est un dérivé de la glycolyse et qui baisse l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène en se fixant sur la forme désoxygénée. Cette augmentation peut se produire à haute altitude.

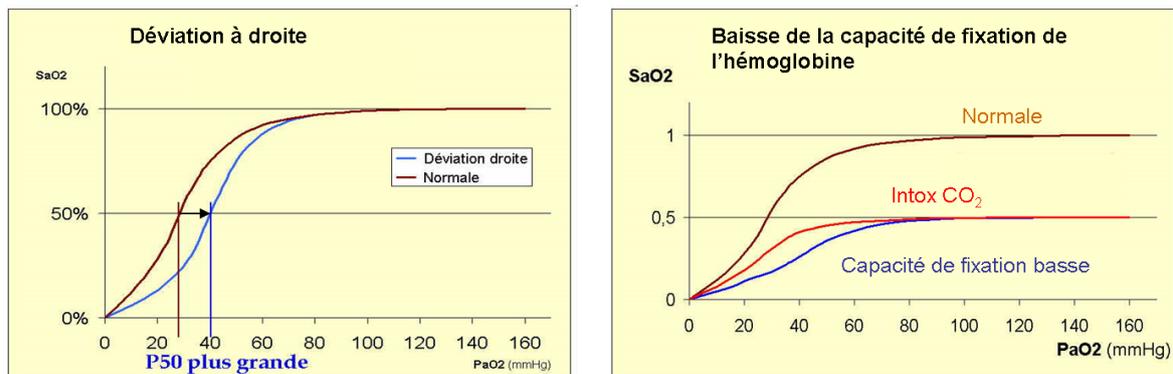


Figure 4 : Modifications de la courbe de dissociation de l'hémoglobine. D'après <http://www.ednes.com>.

La déviation à gauche de la courbe de dissociation indique au contraire une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène avec pour conséquences une baisse de la p50 et de l'apport d'oxygène aux tissus.

Certaines situations peuvent également abaisser la capacité de fixation de l'hémoglobine sans déviation de la courbe de dissociation :

- anémie
- méthémoglobinémie (fer de l'hème devenu ferreux, ne fixant plus)
- hémoglobinose S (drépanocytose)
- Effet du CO qui s'accompagne en plus d'une *déviaton à gauche* de la courbe de dissociation

1.3.d. Le réseau vasculaire

Le sang quitte le cœur par l'aorte, grosse artère qui se ramifie en vaisseaux de plus en plus petits et de plus en plus nombreux : les artères, les artérioles puis les capillaires. C'est au niveau des capillaires que s'effectuent les échanges entre le tissu et le sang. La

densité moyenne des capillaires dans le cerveau est de 400 capillaires par mm^2 . Ces capillaires se regroupent ensuite en veinules, puis en veines de plus en plus grosses, qui donnent in fine deux grosses veines qui rejoignent le cœur. Les caractéristiques fonctionnelles et structurelles des vaisseaux sanguins se modifient au fur et à mesure qu'ils se ramifient. Les parois de l'aorte et des artères sont riches en tissus élastiques et en muscles lisses qui leur permettent de recevoir un débit sanguin important. La paroi des capillaires est fine, sans muscle lisse ni tissu élastique. La longueur des capillaires varie de 10 à 300 μm et leur diamètre est d'environ 5 μm . Leur diamètre est inférieur à celui des érythrocytes qui se déforment donc pour pouvoir y circuler. Les artérioles, les capillaires et les veinules forment ce que l'on appelle la microcirculation.

I.4. CONCLUSION

La $p\text{O}_2$ détermine le passage de l'oxygène d'un endroit à un autre du corps et caractérise l'intensité du phénomène de la respiration. En revanche, l'oxygène lié à l'hémoglobine compte pour 98% du transport de l'oxygène par le sang et caractérise donc la quantité d'oxygène transporté. Pour reprendre une image utilisée par Baele et Van der Linden [<http://www.ednes.com>], si la différence de $p\text{O}_2$ représente la hauteur de la montagne le long de laquelle s'écoule la 'cascade de l'oxygène', le contenu en oxygène du sang représente la quantité d'eau charriée par la cascade. Le lien entre les deux grandeurs que sont la $p\text{O}_2$ et la SO_2 (i.e. la courbe de dissociation de l'hémoglobine) nous permet d'envisager l'étude de l'oxygénation des tissus à travers la SO_2 . Enfin, pour résumer les valeurs numériques données dans ce chapitre, on peut mentionner que dans des conditions saines, on doit trouver dans un échantillon de tissu cérébral de 1 mm^3 (taille moyenne d'un voxel en IRM) des valeurs proches des caractéristiques suivantes :

- un volume sanguin de 3% environ.
- une taille moyenne des vaisseaux de 6 μm .
- un débit moyen de sang de (0,6 mL/g/min).
- une $p\text{O}_2$ (moyennée sur le compartiment sanguin et tissulaire) de 35 à 40 mmHg.
- une SO_2 (moyennée sur les compartiments artériels et veineux) de 65%.
- une CMRO_2 de (3,8 mL O_2 /100g/min).

II. HYPOXIE ET CANCER

On retrouve des situations hypoxiques (ou manque d'oxygène) dans de nombreuses conditions pathologiques comme l'ischémie cérébrale et cardiovasculaire, le diabète, l'inflammation ou le traumatisme crânien. Dans la suite de l'exposé, l'hypoxie sera considérée dans le cas du développement des tumeurs solides où elle joue un rôle important et ambigu.

En 1955, les travaux pionniers de Thomlinson et Gray [THOMLINSON and GRAY(1955)] [GRAY *et al* (1953)] ont montré la présence de zones hypoxiques dans des tumeurs humaines du poumon. Depuis, il a été démontré que la majorité des tumeurs humaines contiennent des régions pauvrement oxygénées.

II.1. DEFINITIONS

L'hypoxie est définie comme un manque d'oxygène et s'établit lorsque la quantité d'oxygène délivrée aux tissus est insuffisante par rapport aux besoins cellulaires. Alors que la pO_2 dans les tissus normaux est en moyenne de 40 mmHg, il est considéré que celle des tissus hypoxiques se situe entre 1 et 10 mmHg. L'hypoxie sévère ou anoxique est atteinte lorsque la pO_2 devient inférieure à 1 mmHg.

Historiquement, les études se sont portées sur le phénomène de l'hypoxie lorsqu'il a été démontré que les tumeurs hypoxiques étaient plus radiorésistantes [GRAY *et al* (1953)]. Dans ce contexte, les zones tumorales présentant une pO_2 inférieure à 2,5 mmHg sont qualifiées d'hypoxiques du point de vue radiobiologique et nécessitent une dose d'irradiation trois fois plus importante.

On peut également mentionner quelques phénomènes reliés à l'hypoxie : l'anoxie qui est la diminution importante de la quantité d'oxygène distribuée par le sang aux tissus. Elle est une conséquence de l'anoxémie (diminution de la quantité d'oxygène contenue dans le sang). L'ischémie est définie comme l'interruption totale généralisée ou localisée du débit sanguin. Elle peut être due à un caillot de sang qui obstrue une artère (thrombose), à une hémorragie qui empêche les tissus d'être correctement alimentés, à une compression d'une artère par un objet extérieur (écrasement d'un membre, garrot) ou par un phénomène interne (hématome, tumeur, épanchement d'un liquide).

II.2. DIFFERENT TYPES D'HYPOXIES

Le statut en oxygène des tumeurs est déterminé par la consommation des cellules tumorales et par l'apport en oxygène de la vascularisation. Ce dernier est influencé par une variété de propriétés vasculaires comme la densité des vaisseaux fonctionnels, le volume sanguin tumoral, le débit sanguin, la saturation en oxygène du sang, la pO_2 tissulaire et la vitesse de diffusion de l' O_2 à l'intérieur de la tumeur.

Alors que les tissus normaux peuvent physiologiquement compenser des états de déficience en oxygène grâce à un accroissement du débit sanguin ou une utilisation plus élevée de l' O_2 disponible, les tumeurs cérébrales ne peuvent pas empêcher le développement de certaines zones hypoxiques.

Il est courant de faire la distinction entre plusieurs types d'hypoxies dépendant des différents processus à l'origine du manque d'oxygène (hypoxie aiguë, chronique ou anémique).

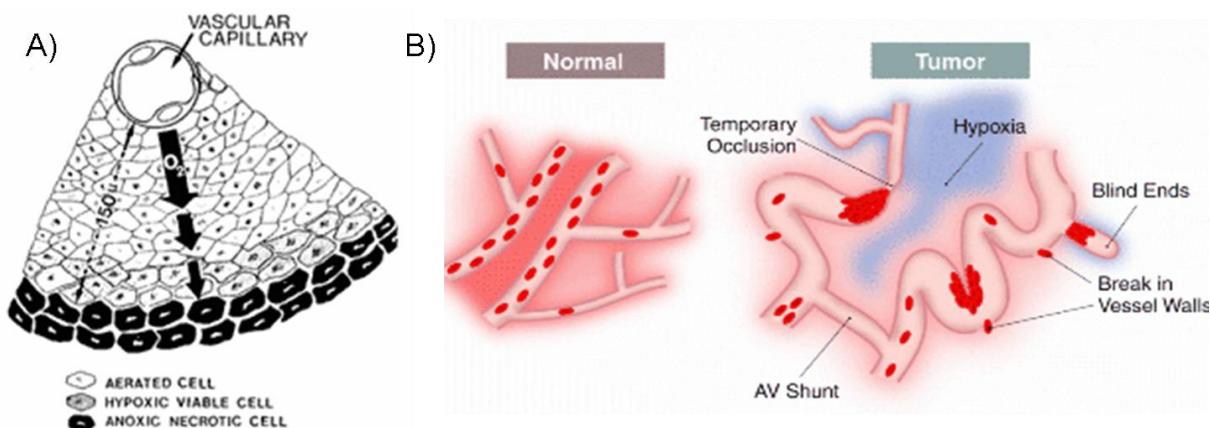


Figure 5 : Causes de l'hypoxie. A) hypoxie limitée par la diffusion d'après www.icr.ac.uk. B) hypoxie induite par des anomalies dans la vascularisation d'après [Brown and Wilson(2004)].

II.2.a. Hypoxie chronique

L'apparition de zones hypoxiques dans les tumeurs est d'abord liée au métabolisme particulier des cellules tumorales qui leur confère un fort pouvoir de division. Ces cellules, en proliférant, s'éloignent progressivement des vaisseaux qui représentent la source d'oxygène. La limite de diffusion de l'oxygène depuis un vaisseau fonctionnel est déterminée par la concentration en oxygène du vaisseau et par le métabolisme des tissus environnant. Typiquement, cette valeur est de l'ordre de 150 microns. Si les vaisseaux sont davantage distants, la concentration en oxygène tombe graduellement de valeurs normales à proximité des vaisseaux, à des valeurs hypoxiques et finalement quasi nulles aux abords d'une partie nécrotique (non viable) (Figure 5A). Ce type d'hypoxie est dit limité par la diffusion ou hypoxie chronique. Selon ce schéma, la tumeur consiste donc en un noyau hypoxique entouré de cellules mieux oxygénées.

En réalité, il a été montré que la répartition de l'oxygène dans les tumeurs est très hétérogène. En effet, la faible pO_2 environnante conduit les cellules tumorales à stimuler le développement d'une néo vascularisation en sécrétant un facteur protéique appelé VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ce dernier, après s'être lié à des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, incite ces dernières à proliférer en direction du foyer tumoral [Ferrara(2002)]. Ce phénomène appelé angiogénèse affecte les niveaux d'oxygénation de plusieurs manières :

- d'un côté les nouveaux vaisseaux permettent un nouvel apport en oxygène et nutriments et contribuent à rétablir une situation normoxique.
- de l'autre, la néo vascularisation peut donner naissance à des vaisseaux ou capillaires anormaux, trop petits, des occlusions ou encore des shunts artérioveineux [Shchors and Evan(2007)]. Le VEGF peut également être à l'origine de la perméabilité de certains vaisseaux, altérant ainsi leur fonctionnement. Toutes ces anomalies au niveau de la

vascularisation vont engendrer un apport en oxygène insuffisant et donc la création de nouvelles zones d'hypoxie (Figure 5B).

II.2.b. Hypoxie aigue

Des données [Kimura *et al* (1996)] [Dewhirst *et al* (1996a)] [Intaglietta *et al* (1977)] indiquent que des fluctuations dans le flux et la concentration en oxygène des vaisseaux conduisent à des cycles périodiques dans l'oxygénation des tumeurs. On observe alors une hypoxie fluctuante ou hypoxie aigue.

II.2.c. Hypoxie anémique

Une réduction de la capacité du sang pour le transport de l'O₂ induite par une anémie (liée à la présence tumorale ou à une thérapie) contribue également au développement de l'hypoxie. On parle alors d'hypoxie anémique [Vaupel and Mayer(2005)].

II.2.d. Différentes valeurs d'oxygénation au sein de la tumeur

Dans les années 90, les études cliniques avec des électrodes à oxygène et des marqueurs moléculaires de l'hypoxie ont permis des mesures directes de l'hypoxie dans les tumeurs [Okunieff *et al* (1993)] [Hockel *et al* (1996)]. Ces résultats ont montré que les tumeurs solides ne sont pas simplement mal oxygénées mais que l'oxygénation est également très hétérogène. Les mesures locales de pO₂ dans des tumeurs humaines du col de l'utérus (Figure 6) ont montré une pO₂ moyenne de 8 mmHg, un pourcentage de pO₂ inférieures à 2,5 mmHg de 27,5% et de 40,5% pour les pO₂ <5 mmHg. Une hypoxie inférieure à 2,5 mmHg a été trouvée dans environ 60% des lésions étudiées.

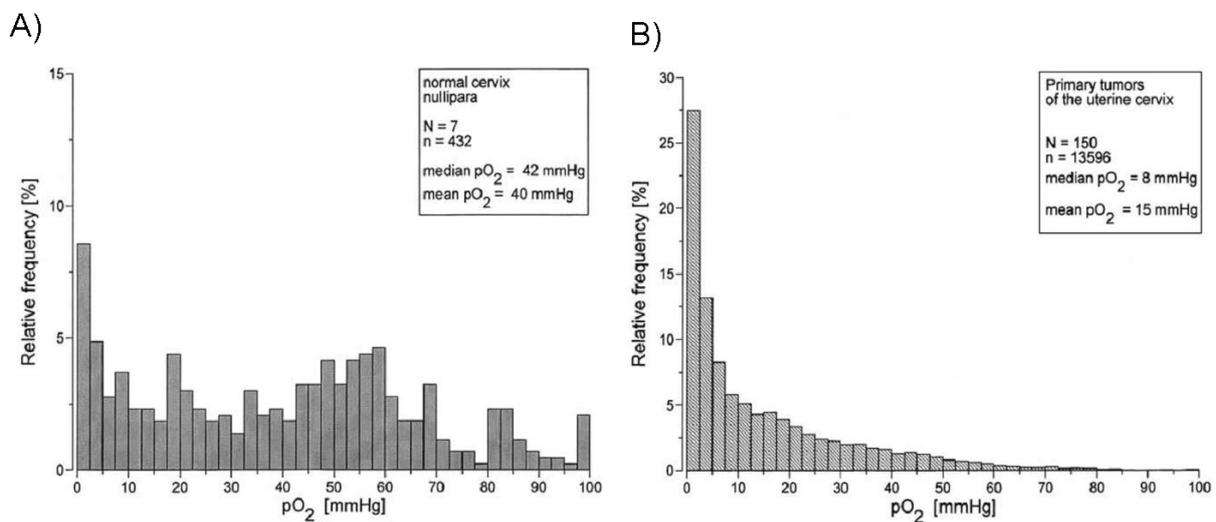


Figure 6 : Répartition des niveaux de pO₂ dans le col de l'utérus en condition normale (A) et en condition tumorale (B). N=nombre de patients, n=nombre de mesures de pO₂. D'après [Vaupel *et al* (2001)].

Les marqueurs ont également montré que les tumeurs humaines contiennent des régions exposées à une hypoxie plus modérée. Toutes ces valeurs sont susceptibles de varier dans le temps.

II.3. CONSÉQUENCES DE L'HYPOXIE

II.3.a. Résistance aux traitements

L'oxygénation des tumeurs est largement reconnue comme un facteur pivot dans l'efficacité de la radiothérapie, de la photothérapie et des chimiothérapies. Un intérêt majeur de l'étude de l'hypoxie réside donc dans l'espoir d'améliorer l'effet des traitements anti-cancéreux. Quelques explications sur la résistance induite par l'hypoxie ont été avancées dans le cadre de la radiothérapie et de la chimiothérapie.

- **Radiothérapie :** L'hypoxie tumorale peut représenter un problème sévère pour les thérapies utilisant des radiations (X ou gamma) puisque la radiosensibilité décroît lorsque la pO_2 est inférieure à 25-30 mmHg. Cette résistance peut provenir de plusieurs sources et les mécanismes exacts ne sont pour l'instant pas déterminés. On peut cependant mentionner que la présence de molécules d'oxygène augmente les dommages subis par l'ADN à travers la formation de radicaux libres (qui sont créés principalement après l'interaction entre le rayonnement et l'eau intracellulaire). Ces radicaux libres peuvent également empêcher la réparation de l'ADN. Il a été également montré que des changements dans le protéome et le génome induits par l'hypoxie peuvent également avoir des effets substantiels sur la radiorésistance [Höckel and Vaupel(2001)]. En pratique, la dose requise pour obtenir le même effet biologique doit être 3 fois supérieure en absence qu'en présence d' O_2 [GRAY *et al* (1953)].
- **Chimiothérapie :** Il a été montré que les cellules dans les tumeurs hypoxiques étaient plus résistantes à la chimiothérapie [Shannon *et al* (2003)]. Ceci est dû en partie au fait que le métabolisme des agents de chimiothérapie dans les régions bien perfusées de la tumeur limite leur capacité à atteindre les régions pauvrement perfusées. En effet, la toxicité d'une drogue diminue lorsque l'on s'éloigne des vaisseaux [Durand(1994)]. Les cellules éloignées des vaisseaux se divisent également moins fréquemment (comme conséquence d'une réduction en nutriments et en oxygène disponible) et sont ainsi protégées des effets chimiothérapeutiques dont l'activité se concentre sur les cellules en division.

II.3.b. Induction d'un caractère agressif

Des études cliniques ont montré que l'hypoxie était impliquée non seulement dans la résistance aux thérapies, mais aussi dans l'accroissement de la malignité des tumeurs [Teicher(1994)]. Le processus d'hypoxie permet un développement invasif local et l'apparition de métastases. L'hypoxie chronique est également connue pour accroître les instabilités génomiques et promouvoir la génération et la sélection de clones mieux adaptés pour survivre dans un environnement hostile.

- **Métastases :** Plusieurs modèles expérimentaux ont montré que l'hypoxie favorise le développement des métastases. Le lien causal entre hypoxie et métastases a été montré *in vitro* et *in vivo* [Rofstad(2000)] [Young *et al* (1988)]. Deux causes ont été mises en évidence : l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la cascade métastatique et la sélection de phénotypes plus agressifs. L'initiation des métastases implique trois processus majeurs : la dégradation des membranes et de la matrice

extracellulaire, la modulation des molécules d'adhésion à la cellule, et la migration cellulaire. Ces effets sont corrélés à l'expression du VEGF.

- Phénotype malin : L'hypoxie produit une sélection de clones ayant perdu leur potentiel apoptotique, en particulier pour les cellules ayant acquis la mutation p53 [Graeber *et al* (1996)]. Il a également été montré qu'elle sélectionnait les cellules avec une voie oncogénique altérée ce qui résulte en un phénotype plus angiogénique. Ensembles, ces caractéristiques augmentent le caractère malin des tumeurs.
- Changements dans l'expression des gènes : Les rôles multiples assignés à l'hypoxie et qui incluent l'angiogénèse, l'apoptose et l'induction de métastases résultent en majeure partie de changements dans l'expression de certains gènes [Wenger(2002)]. Les cellules hypoxiques régulent en effet l'expression de multiples facteurs de transcription. Parmi les facteurs de transcription activés par une faible concentration d'oxygène, se trouvent la protéine liant l'élément de réponse à l'AMP cyclique (CREB), l'Activator Protein-1 (AP-1), le facteur-KB nucléaire (NFkb) et la protéine Early Growth Response-1 (Egr- 1). Cependant, le facteur de transcription inducible par l'hypoxie ou Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) est le régulateur connu le plus important dans la réponse et l'adaptation des cellules à l'hypoxie. HIF-1 est à l'heure actuelle connu pour induire l'expression de plus d'une centaine de gènes agissant essentiellement sur le métabolisme énergétique (expression des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3), la prolifération et la survie cellulaire, la régulation hormonale (érythropoïétine) et la vasoréactivité (endothelin-1, VEGF).

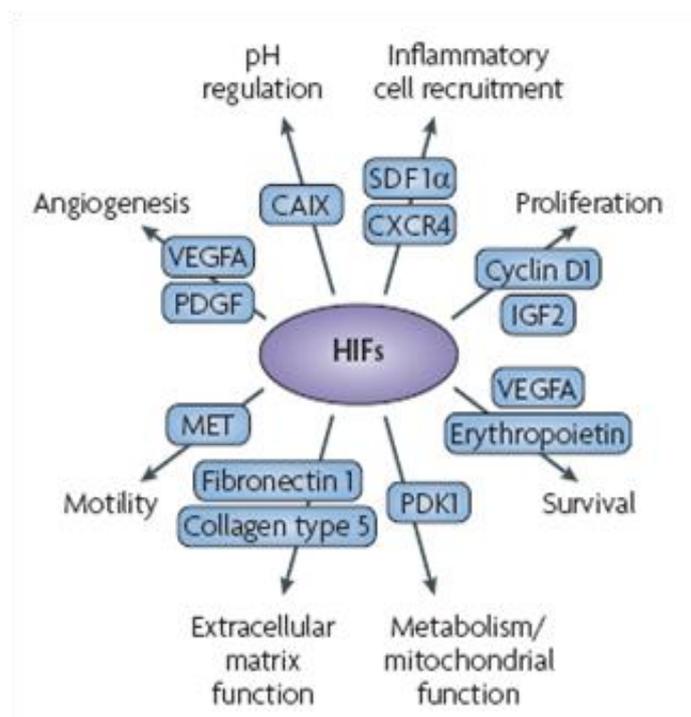


Figure 7 : Gènes activés par les facteurs HIF et qui sont impliqués dans la progression des tumeurs. D'après [Bertout et al (2008)].

II.4. CONCLUSION

L'hypoxie tumorale est un phénomène complexe qui peut avoir de lourdes conséquences sur l'évolution naturelle des tumeurs et sur leur réponse à une thérapie. Il apparaît que c'est un phénomène fluctuant et inhomogène aussi bien dans l'intensité que dans sa distribution spatiale. L'abondance de la littérature sur l'hypoxie témoigne de l'importance qui est donnée aujourd'hui à ce phénomène. Les auteurs s'accordent à dire qu'une technique d'imagerie fiable de l'hypoxie ou de l'oxygénation en général pourrait permettre une meilleure compréhension des processus mis en jeu, mais également servir à l'évaluation des nouvelles stratégies thérapeutiques et aider à l'individualisation des traitements.

Pour plus d'informations sur l'hypoxie tumorale, on pourra se référer aux revues [Tatum *et al* (2006)] [Vaupel *et al* (2001)] [Bertout *et al* (2008)] et [Brahimi-Horn *et al* (2007)].

III. METHODES DE MESURE DE L'OXYGENATION

Il n'existe actuellement pas de 'GOLD standard' et il est probable qu'il n'y aura jamais de méthode unique pour la détection de l'hypoxie. Plusieurs techniques sont cependant disponibles pour la mesure de l'oxygénation. La plus utilisée est celle qui emploie les électrodes polarographiques. Dans cette partie, nous présentons les plus importantes techniques de mesure de l'oxygénation. Les techniques sont présentées selon le paramètre (pO_2 , SO_2 , hypoxie, $CMRO_2$) qu'elles cherchent à déterminer. Pour chaque méthode, on expose brièvement le principe théorique sur lequel elle s'appuie ainsi que les avantages, inconvénients et applications actuelles. En fin de ce chapitre, un tableau récapitulatif et comparatif des méthodes est proposé.

III.1. MESURES DE LA PO_2

La pO_2 est considérée comme le paramètre de choix pour la mesure de l'oxygénation. Elle permet de donner des informations quantitatives sur le degré de l'hypoxie présente et peut être obtenue pour les compartiments sanguins et tissulaires.

III.1.a. Electrodes à oxygène

Utilisée en routine clinique depuis les années 80, cette technique se base sur la mesure du courant qui se forme entre une cathode et une anode après ionisation de l'oxygène. La pO_2 est directement proportionnelle au courant généré à la cathode. Le diamètre des électrodes dépend du type d'utilisation et peut aller de quelques millimètres à quelques dizaines de micromètres. Pour une utilisation pratique des électrodes, le système Eppendorf permet de déplacer l'électrode dans le tissu de façon précise, en minimisant les artefacts de compression et la consommation de l'oxygène par les sondes. Pour beaucoup ce système est considéré comme le gold standard pour les mesures d'oxygénation. Ces électrodes sont faciles d'utilisation et ont été utilisées pour mesurer les gradients d'oxygène entre les vaisseaux tumoraux [Dewhirst *et al* (1994)] ou les pO_2 dans les veinules ou artérioles [Dewhirst *et al* (1996b)]. De nombreuses études se sont servies des électrodes pour évaluer l'impact de l'oxygénation des tumeurs sur le résultat des thérapies [Gatenby *et al* (1988)]. Cette méthode permet de mesurer l'hypoxie chronique et aiguë [Cairns *et al* (2001)] et permet de prédire l'avènement de métastases [Brizel *et al* (1996)] [Hill *et al* (2001)]. Mais cette technique est invasive, ne permet pas de cartographier l'oxygénation de la tumeur et est dépendante de la calibration des sondes. On note également que ces méthodes souffrent de problèmes de rapport signal sur bruit aux basses pressions en oxygène. En fait, le problème majeur de cette technique est qu'elle ne permet pas des mesures répétées au même endroit à cause d'une consommation d'oxygène par les sondes.

III.1.b. Mesures de la pO_2 avec Oxylite®

Il s'agit d'un système commercial (Figure 8B) qui implique l'insertion d'une sonde en fibre optique (Figure 8A) directement dans le tissu. Le système possède un fluorophore (à base de ruthénium) encapsulé dans une matrice de silicone au bout d'une fibre optique de 220 microns de diamètre. Des photodiodes (excitation de 460 nm) stimulent le fluorophore dont le temps de fluorescence est inversement proportionnel à la

pression en O_2 au bout de la sonde. La calibration de ces sondes est stable dans le temps et la sensibilité est accrue pour des pO_2 faibles. Comme l'Oxylite ne consomme pas d' O_2 , il peut servir au suivi de variations temporelles de l'oxygénation. La technique est simple d'utilisation, permet des mesures simultanées et est également compatible avec les mesures RMN. Comme pour les électrodes polarographiques, la distribution spatiale des mesures est cependant limitée au nombre de sondes utilisées et la méthode est invasive. La comparaison avec les électrodes polarographiques [Seddon *et al* (2001)] [Wen *et al* (2008)] montre une bonne corrélation entre les deux systèmes. Les résultats suggèrent que la plus grande différence entre les deux approches est qu'Oxylite tend à donner des valeurs de pO_2 plus grandes que les électrodes polarographiques. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la zone de tissu échantillonné qui est plusieurs centaines de fois plus importante dans le cas de l'Oxylite et qui tendrait à lisser l'hétérogénéité de la distribution de la pO_2 . Mais, dans les tissus sains, les différences ne sont pas visibles.

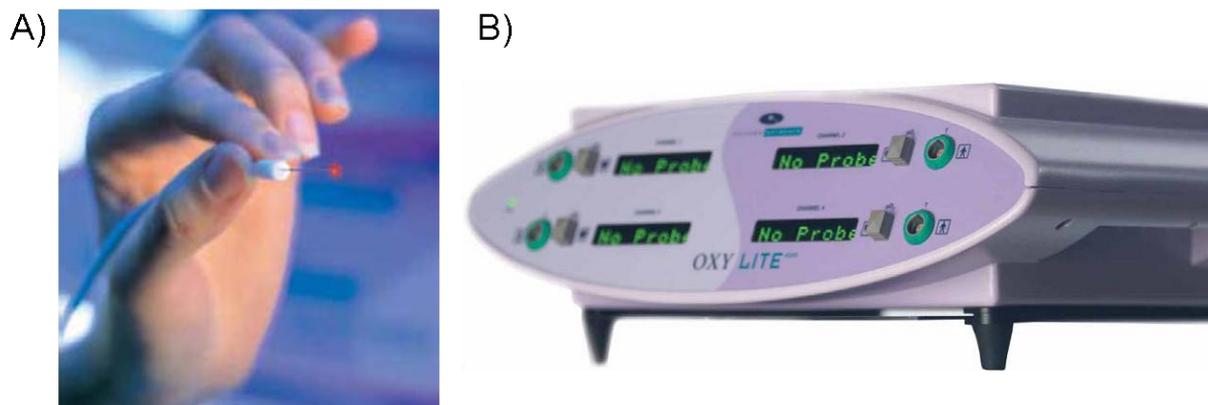


Figure 8: Sonde optique (A) et appareil Oxylite® (B)

Oxylite a été appliqué sur de nombreuses pathologies et organes [Davda and Bezabeh(2006)] [Subarsky and Hill(2008)] [Shui and Beebe(2008)]. Des comparaisons ont été faites avec plusieurs autres modalités d'imagerie de l'oxygénation [Elas *et al* (2006)] [Jordan *et al* (2009)] [Gulliksrud *et al* (2008)]. Dans le cadre de cette thèse, nous avons fait l'acquisition d'un appareil Oxylite. On pourra trouver en Annexe II. quelques données acquises sur rats *in vivo*.

III.1.c. Résonance paramagnétique électronique (RPE)

A l'instar de la RMN qui détecte des noyaux dotés d'un moment magnétique, la RPE détecte des atomes dotés d'électrons non appariés. L'oxygène moléculaire possédant deux électrons non appariés (ce qui le rend paramagnétique), il est donc possible d'acquérir un spectre RPE de l'oxygène gazeux et à pO_2 très basse. En revanche, il apparaît presque impossible de détecter l'oxygène dissous dans des liquides à température ambiante du fait d'une raie de résonance trop large. Il existe cependant des méthodes de mesure de la pO_2 par RPE indirectes basées sur le fait que le

paramagnétisme de l'oxygène agit sur la relaxation d'autres éléments. La technique la plus répandue consiste à évaluer l'élargissement de la raie de résonance (reliée au T_2) d'un produit paramagnétique exogène en regard de la pO_2 environnante. Il peut s'agir de matériaux paramagnétiques solubles (nitroxides ou radicaux triaryl methyl) ou sous forme de particules (lithium phthalocyanine, fusinite...) avec une relation pO_2/T_2 plus ou moins complexe. Les traceurs solubles sont infusés à des concentrations non toxiques en intraveineuse alors que les traceurs particuliers sont administrés localement. Comme pour l'IRM, l'utilisation de gradient de champ magnétique permet d'imager la distribution des agents injectés. La polarisation nucléaire dynamique permet également d'imager l'oxygénation par RPE (Figure 9). Le principe est basé sur l'effet Overhauser et implique la combinaison de la RMN et de la RPE. Une image RMN est réalisée pendant l'excitation de la résonance RPE du produit de contraste paramagnétique. La conséquence est un transfert de polarisation des électrons aux protons et un rehaussement du signal RMN. Le facteur de rehaussement est alors dépendant de la largeur du spectre du composé paramagnétique [Krishna *et al* (2002)] [Hou *et al* (2003)].

L'imagerie RPE de l'hypoxie constitue un challenge technique et n'est pas accessible rapidement en clinique. De plus, l'utilisation des radicaux n'est pas encore acceptée pour utilisation sur l'homme. Mais des études précliniques montrent que les mesures sont robustes et reproductibles [Gallez *et al* (2004)]. La technique a été validée en corrélation avec les électrodes à oxygène ou l'Oxylite [Goda *et al* (1997)] [Jordan *et al* (2002)], avec des données histologiques [Josse *et al* (2001)] et par comparaison avec l'effet BOLD [Dunn *et al* (2002)].

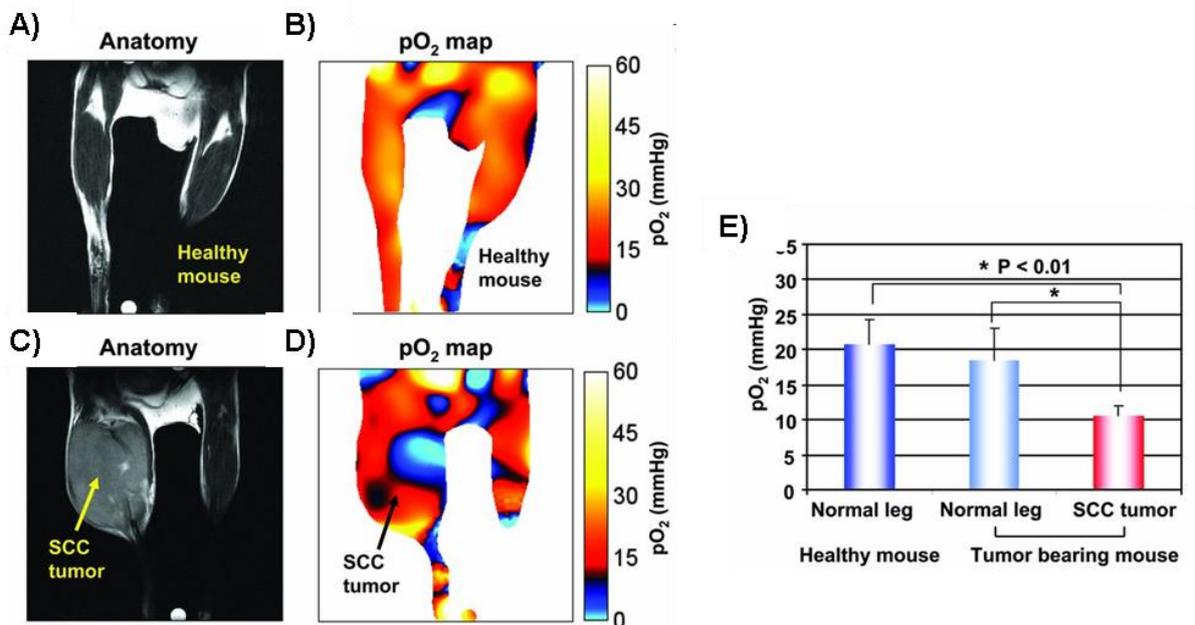


Figure 9 : Imagerie de l'oxygénation par RPE sur muscle de souris A) image anatomique IRM de la patte d'une souris saine et carte de pO_2 RPE correspondante (b). Image anatomique (C) et carte de pO_2 (D) en présence d'une tumeur. E) Comparaison des pO_2 mesurées sur patte normale, controlatérale et tumeur. D'après [Matsumoto *et al* (2008)].

III.1.d. Méthodes IRM

La principale approche pour déterminer la pO_2 in vivo des tissus par RMN repose sur la relation linéaire existant entre la constante de relaxation longitudinale (R_1) et la pO_2 environnante. Cette relation est valable pour tous les tissus, mais n'est spécifique que pour certains composés. La plupart des techniques proposées sont basées sur l'injection de composés fluorés exogènes (perfluorocarbones) dont la courbe de calibration (R_1/pO_2) est déterminée ex vivo et la détection faite par IRM du fluor¹⁹. Mason et al ont développé la technique FREDOM (fluorocarbon relaxometry using echo planar imaging for dynamic oxygen mapping) qui requiert l'injection intra tumorale de la molécule d'héxafluorobenzène (Figure 10A). Cette technique a été utilisée pour l'étude de l'oxygénation après chimiothérapie et radiothérapie et a été comparée à la spectroscopie proche infrarouge (NIRS), aux mesures faites avec des sondes à base de fibre optique, avec des électrodes à oxygène, et des marqueurs de l'hypoxie à base de pimonidazole [Mason *et al* (2003b)] [Zhao *et al* (2003)] [Zhao *et al* (2004)]. Un rapporteur de la pO_2 1H analogue des perfluorocarbones a récemment été proposé [Kodibagkar *et al* (2006)] (Figure 10B). Basée sur le même principe, une méthode a également été proposée pour quantifier la pO_2 des liquides cérébraux [Zaharchuk *et al* (2006)] (Figure 10C).

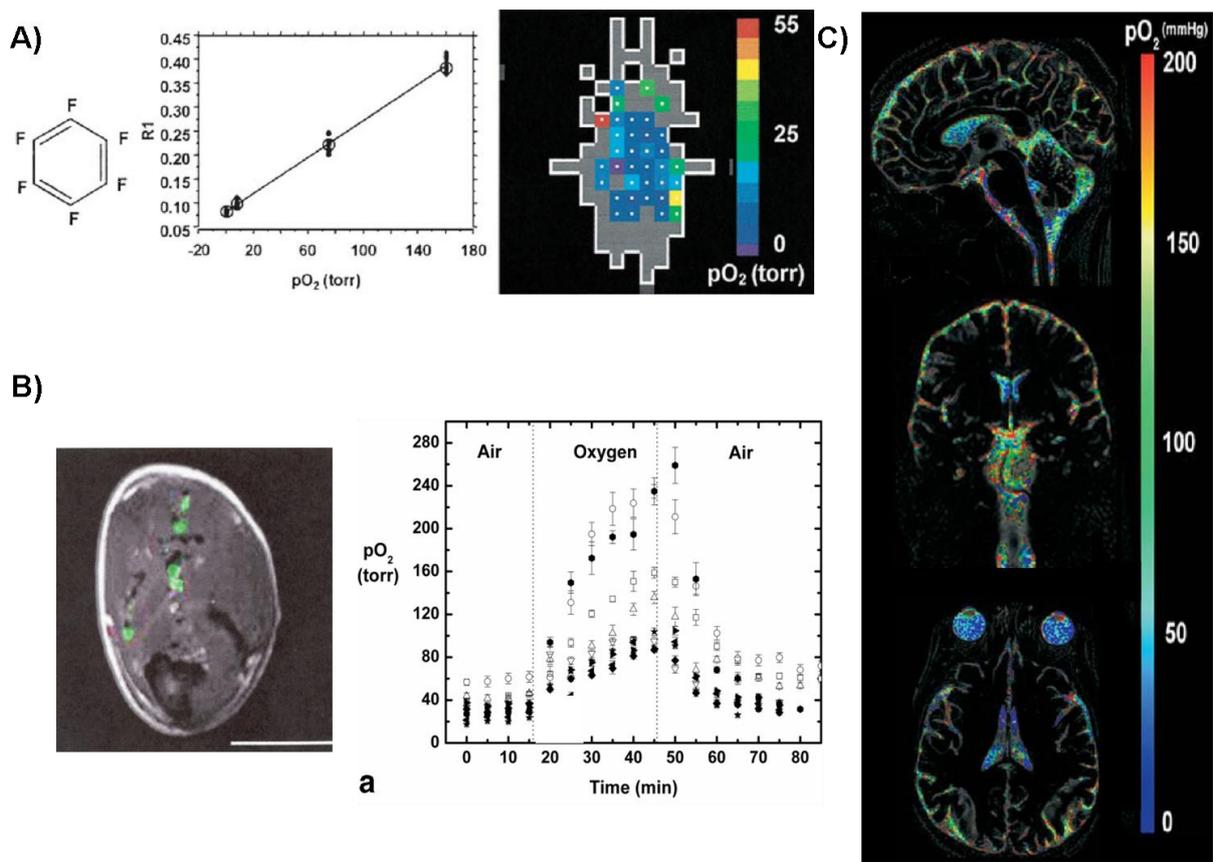


Figure 10 : Mesures de la pO_2 par IRM. A) Méthode IRM ^{19}F FREDOM ; molécule d'héxafluorobenzène, calibration R_1/pO_2 et carte de pO_2 sur une tumeur de rat. D'après [Mason et al (2002)]. B) méthode 1H . répartition de l'hexaméthylsiloxane (HMDSO) dans une tumeur de rat et mesures des variations de la pO_2 pendant un challenge gazeux air/oxygène/air. D'après [Kodibagkar et al (2006)]. C) Mesures de la pO_2 dans les liquides cérébraux D'après [Zaharchuk et al (2006)].

Les principes de ces méthodes seront plus amplement discutés dans le Chapitre B.

III.2. RAPPORTEURS BIOLOGIQUES DE L'HYPOXIE

Dans cette partie nous présentons des marqueurs biologiques de l'hypoxie. Ces rapporteurs ne donnent pas une mesure de l'oxygénation à proprement parler mais permettent de détecter des zones hypoxiques. Beaucoup de techniques non invasives pour la détection de l'hypoxie utilisent les 2-nitroimidazoles et ont été développées pour l'utilisation en TEP (tomographie par émission de positrons). L'autre alternative est l'immunohistochimie qui permet de visualiser des gradients d'hypoxie et de comparer les zones hypoxiques avec l'expression de certains gènes. Ces techniques sont basées sur l'utilisation d'anticorps mono- ou polyclonaux. Les méthodes utilisant des marqueurs de l'hypoxie ont un avantage sur la polarographie pour la détermination d'une hypoxie fiable puisque les rapporteurs de l'hypoxie sont sélectivement réduits dans les cellules hypoxiques viables (alors que les électrodes mesurent la pO_2 sans distinction entre les zones hypoxiques et nécrotiques). Les méthodes *in vitro* utilisant des techniques immunohistochimiques pour détecter des marqueurs intrinsèques ou extrinsèques de l'hypoxie sont généralement précises mais ont certaines limitations. Elles ne peuvent être utilisées que sur de petits échantillons de tumeurs, par biopsie ou résection chirurgicales et ne donnent donc pas d'informations sur le statut global de la tumeur. Il apparaît également difficile de guider des traitements à partir de ces informations.

III.2.a. Pimonidazoles

Les 2-nitromidazoles représentent une classe de composants qui peuvent traverser la membrane cellulaire et être réduits à l'intérieur des cellules à travers plusieurs voies enzymatiques [Kedderis and Miwa(1988)]. Lorsque l'oxygène est absent de la cellule, les nitroimidazoles sont convertis en radicaux libres hautement réactifs qui se lient aux protéines ou à l'ADN environnant [Edwards(1993)]. Dans des conditions normales d'oxygénation, ces produits sont rapidement réoxygénés et retirés des cellules. Ainsi, en monitorant la capture *in vivo*, la distribution dans les tissus et la rétention de ces composants, il est envisageable de détecter la présence d'hypoxie dans les tissus.

Si ces molécules sont préalablement marquées avec un isotope, elles peuvent être détectées dans les tissus en utilisant l'autoradiographie, ou l'imagerie TEP. Des anticorps fabriqués spécifiquement peuvent également se lier aux complexes nitrimidazole-protéine et ont été utilisés pour détecter l'hypoxie en utilisant des méthodes ELISA, d'immunohistochimie ou de cytométrie. Enfin le marquage avec certains composés fluorés permet la détection des nitroimidazoles par RMN [Procissi *et al* (2007)] (Figure 11B).

Le premier marqueur nitroimidazole employé avec l'imagerie TEP est le fluoromisonidazole (^{18}F -MISO) [Rasey *et al* (1987)]. FMISO est hautement lipophile, capturé dans les cellules hypoxiques viables et sélectivement réduit par des nitroréductases. Les résultats obtenus avec cette approche ne sont que faiblement corrélés avec ceux obtenus avec les électrodes à pO_2 . Cela pourrait être dû au fait que les marqueurs de l'hypoxie ne sont réduits que dans des cellules viables alors que les électrodes ne font pas de distinction entre l'hypoxie et la nécrose. L'injection de FMISO est cependant limitée par sa clairance extrêmement lente (sûrement due à son caractère lipophile) qui pose des problèmes de bruit de fond intense. Certains ont également

remarqué des problèmes de stabilité du marquage ^{18}F du FMISO. C'est pourquoi une nouvelle génération de nitroimidazole, plus solubles dans l'eau et peu dégradés par la plupart des mécanismes oxydants du corps, a récemment été proposée. Parmi ceux-ci, les principaux marqueurs sont le ^{18}F -fluoroérythronitroimidazole (FETNIM) [Yang *et al* (1995)] [Lehtiö *et al* (2001)], le fluoroétanidazole (FETA) [Barthel *et al* (2004)] et l'éthanidazole penta-fluorure (EF-5) [Ziemer *et al* (2003)]. Ils ont une clairance plus rapide et donnent moins de bruit de fond. EF-5 a été validé sur animaux et humains. Le TFMISO, analogue du fluoromisonidazole a également été suggéré comme bon marqueur pour l'IRM [Procissi *et al* (2007)].

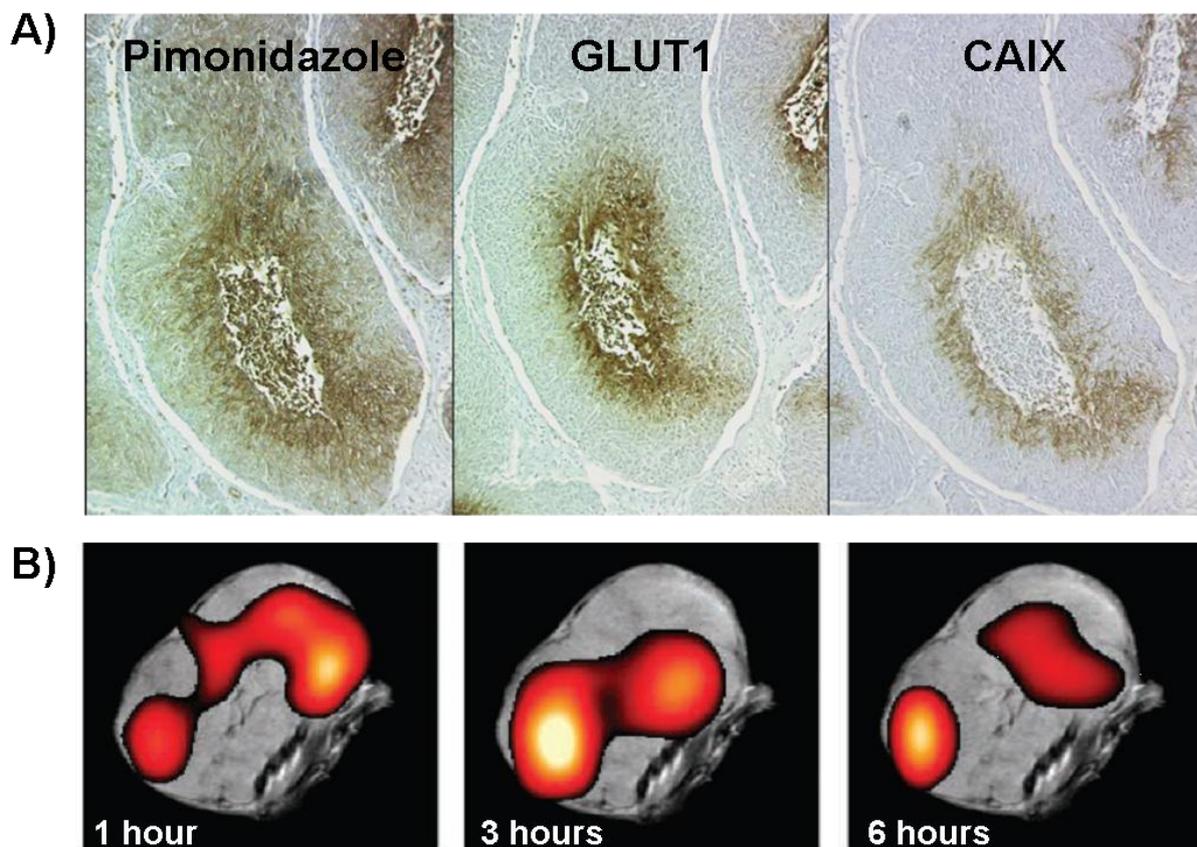


Figure 11: A) Coupes histologiques avec marquage du pimonidazole, GLUT1 et CAIX d'une tumeur de la vessie. D'après [Hoskin *et al* (2003)]. B) Superposition d'une image IRM anatomique d'une tumeur de pied avec une carte de distribution du TFMISO (200mg/kg) 1 h, 3h et 6h après injection. D'après [Procissi *et al* (2007)].

III.2.b. HIF et dérivés

Plusieurs marqueurs intrinsèques immunohistochimiques ont été envisagés pour l'étude de l'hypoxie avec pour lien commun d'être régulés par le complexe HIF (Figure 11A). Parmi tous les marqueurs, l'anhydrase carbonique IX (CAIX) et le transporteur-1 du glucose (GLUT1) ont retenu le plus d'attention. Sur plusieurs types de tumeurs, CAIX a été colocalisée avec du pimonidazole ou avec l'expression du VEGF [Turner *et al* (2002)] [Wykoff *et al* (2000)]. Des études comparatives ont également montré que les marqueurs GLUT1, CAIX et HIF colocalisaient spatialement mais qu'ils pouvaient quand

même constituer des marqueurs indépendants de l'hypoxie [Hoskin *et al* (2003)] (Figure 12).

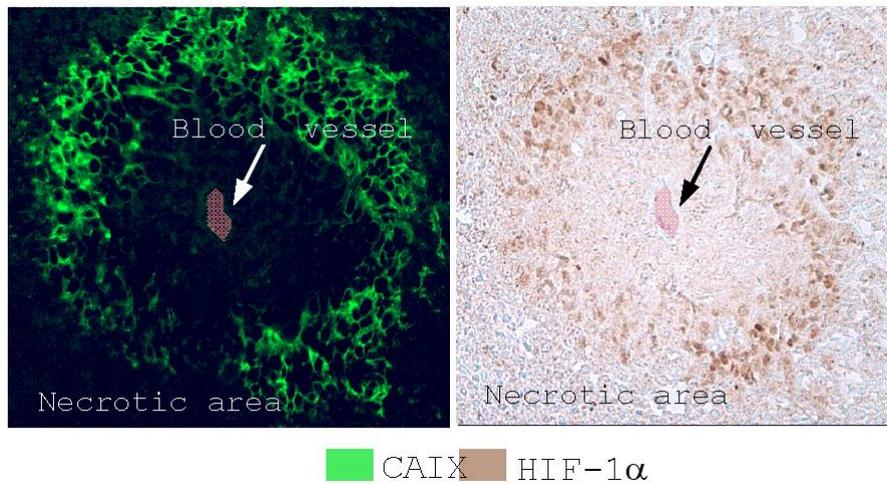


Figure 12 : Coupes histologiques d'adénocarcinome humain montrant à droite les zones hypoxiques (marqueur HIF1α) et nécrotiques ; à gauche visualisation par marquage avec l'anhydrase carbonique IX, (CAIX), un marqueur induit par l'hypoxie via HIF-1. D'après www.academie-sciences.fr.

III.3. MESURES DE LA SO₂

La plupart des méthodes de mesure de la SO₂ reposent sur les différences optiques qui existent entre les formes oxy et désoxy de l'hémoglobine. Les mesures systémiques de la SO₂ sont couramment pratiquées en milieu hospitalier en utilisant une analyse de prélèvement sanguin ou un oxymètre de pouls placé sur le doigt. Il est également possible de déterminer la SO₂ sur des coupes histologiques en utilisant une méthode de cryospectrophotométrie. Cette méthode utilise une calibration de la SO₂ en fonction de l'intensité lumineuse réfléchie à trois longueurs d'ondes différentes et une manipulation précise lors du processus de congélation des tissus pour préserver la répartition de SO₂ [Fenton *et al* (1999)]. Certaines techniques non invasives sont également disponibles comme la spectroscopie proche infrarouge, la tomographie photoacoustique ou l'IRM.

III.3.a. Spectroscopie proche infrarouge (NIRS)

Cette technologie permet de monitorer la SO₂ de façon efficace, en temps réel et de manière non invasive. Dans la gamme de fréquences proches de l'infrarouge (650-1000 nm), l'hémoglobine (HbO₂) et la désoxyhémoglobine (dHb) ont des spectres d'absorption caractéristiques. La NIRS peut être utilisée pour mesurer les changements d'oxygénation sanguine et de volume sanguin en suivant les évolutions de HbO₂ et de la concentration totale d'hémoglobine. La NIRS s'est développée rapidement ces dernières années et est de plus en plus utilisée dans le milieu médical pour la quantification de concentration de chromophores tissulaires comme l'oxy- et la désoxyhémoglobine, l'eau et les lipides. L'utilisation de la gamme des infrarouges permet d'imager plus en profondeur que la gamme du visible.

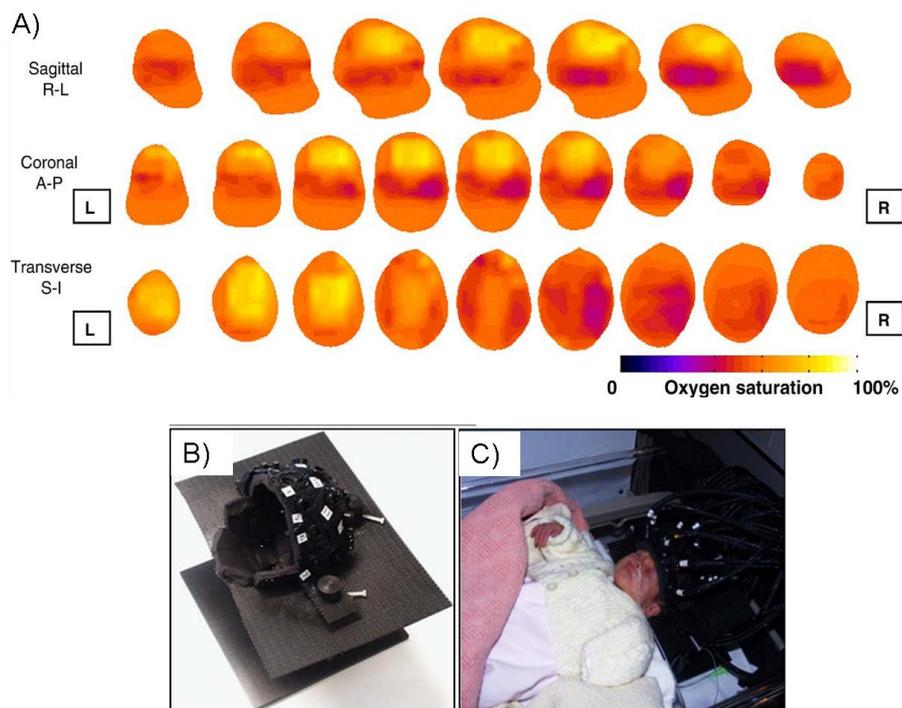


Figure 13 : A) Cartes de So_2 acquises par NIRS sur un cerveau de nouveau né. B) et C) photographies du nouveau né et du casque supportant les capteurs. D'après [Austin et al (2006)].

Cette technique a été appliquée à de nombreuses études incluant la détection de cancer du sein [Franceschini *et al* (1997)], l'imagerie fonctionnelle cérébrale [Benaron *et al* (2000)], et le diagnostic de pathologies vasculaires [Quaresima and Ferrari(1998)]. La théorie et les instruments se sont développés pour augmenter la précision des mesures [Franceschini *et al* (2002)] [Hueber *et al* (2001)]. Cette méthode a été comparée à d'autres approches comme l'IRM [Chen *et al* (2003)]. Le principal inconvénient de cette approche est la faible résolution spatiale et la faible profondeur accessible (<500 μm). Enfin, cette méthode est plus souvent utilisée en mode spectroscopique (1 acquisition localisée) qu'en mode imagerie (Figure 13).

III.3.b. Tomographie photoacoustique (TAP)

C'est une technique hybride qui détecte l'absorption de photons ultrasonores à travers l'effet photoacoustique. Dans le principe, des impulsions laser de courtes durées dirigées sur un tissu vivant induisent des modes ultrasonores large bande par expansion thermoélastique. L'amplitude des ondes photoacoustiques est proportionnelle à l'énergie optique déposée localement et, de ce fait, ces ondes permettent d'obtenir un contraste d'absorption optique. Comme l'énergie déposée localement est reliée au coefficient d'absorption des pigments présents, la concentration de plusieurs pigments peut être quantifiée en faisant varier la longueur d'onde du laser. Parce que la dispersion ultrasonore est deux à trois fois plus faible que la dispersion optique dans les tissus biologiques, cette technique permet d'obtenir des résolutions spatiales plus élevées que les méthodes optiques. Utilisée à 584 nm, la méthode permet d'imager le réseau sanguin. En utilisant deux longueurs d'ondes dans le proche infrarouge, il est possible de distinguer la désoxyhémoglobine de l'oxyhémoglobine et ainsi de remonter à la SO_2

(Figure 14). Ces mesures ont été validées sur du sang bovin ex vivo et montrent une faible (4%) différence avec les mesures optiques classiques (i.e. NIRS).

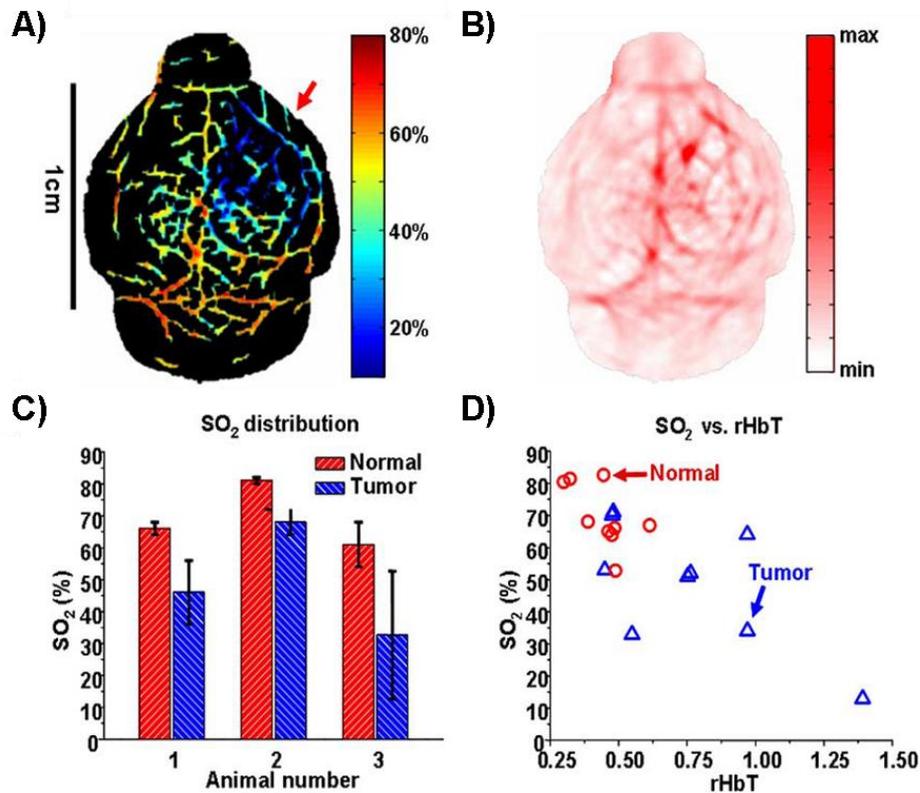


Figure 14 : Acquisitions TAP sur cerveau de souris nude porteuse d'un glioblastome U87. a) Carte de SO₂. b) Carte de HCT. c) Comparaison entre les SO₂ obtenues dans des vaisseaux normaux et tumoraux de trois souris (moyenne et écart type). d) SO₂ vs HCT pour les trois animaux représentés en c. D'après Li et al 2008.

Le principal avantage de cette méthode est de pouvoir imager la SO₂ dans des vaisseaux individuels, à la différence des autres méthodes qui moyennent sur des volumes comprenant artères et veines. La méthode est également non invasive. Même si la profondeur de champ est plus importante que pour les méthodes optiques classiques, elle ne permet cependant pas d'imager à une profondeur de plus de 1 mm et n'est pour l'instant que très peu répandue. Elle a été appliquée sur le rat sain in vivo pour différentes conditions d'oxygénation [Wang *et al* (2006)] [Wang *et al* (2003)] [Zhang *et al* (2006)]. Des études sur tumeurs cérébrales ont également été menées sur le rat [Lungu *et al* (2007)].

III.3.c. Méthodes IRM

L'IRM est sensible à la SO₂ via l'effet BOLD. Plusieurs études ont notamment montré que le paramètre T₂* mesuré par IRM était sensible à l'hypoxie tumorale [Baudelet and Gallez (2002)][Baudelet and Gallez(2005)]. Bien que l'effet BOLD soit largement utilisé pour les applications cognitives, peu d'études se sont penchées sur la quantification de ce contraste. Les difficultés proviennent essentiellement du fait que le paramètre T₂* dépend de plusieurs facteurs comme le débit sanguin, le volume sanguin, etc. Les premiers essais de quantification ont été réalisés par An et Lin [An and Lin(2000)]. Pour

distinguer les contributions des différentes sources au signal BOLD, ils emploient un modèle mathématique décrivant l'évolution temporelle du signal RMN pondéré T_2^* dans un voxel contenant du tissu et un réseau vasculaire [Yablonskiy and Haacke(1994)]. En ajustement leur modèle sur les données, ils obtiennent des cartes paramétriques de SO_2 et de volume sanguin (Figure 15B). Plusieurs évolutions techniques ont été proposées [An and Lin(2002a)] [An and Lin(2002b)] [An and Lin(2003)]. Récemment, une étude sur rat a permis de donner des éléments de validation et d'évaluer l'intérêt de cette mesure dans le cas d'ischémie cérébrale chez le rat [An *et al* (2009)]. Une autre approche considérant le même modèle mathématique a été proposé par He et Yablonskiy [He and Yablonskiy(2007)] (Figure 15A). Cette méthode intègre des améliorations théoriques et a été appliquée à l'homme et à l'animal.

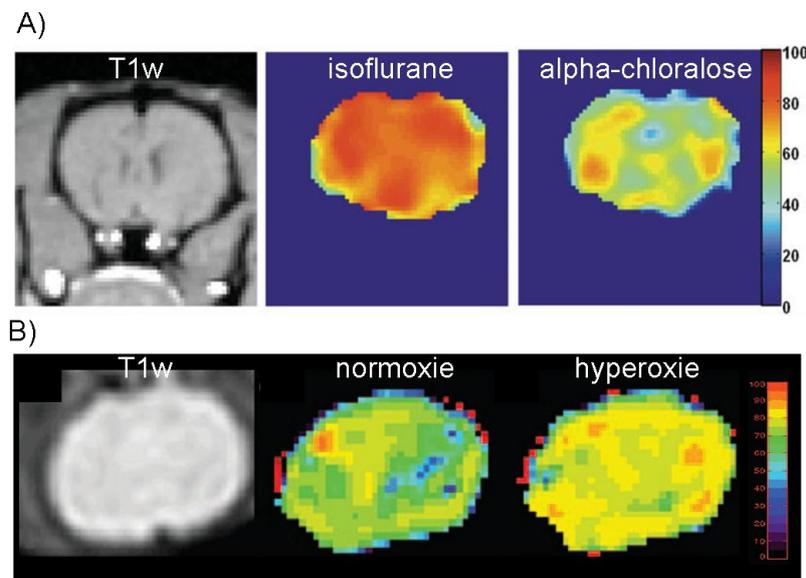


Figure 15 : Cartes de SO_2 obtenues par IRM sur cerveau de rat sous différentes conditions physiologiques et images anatomiques correspondantes. Cartes acquises par méthode He et Yablonskiy(A) et An et Lin (B).

Ces approches sont non invasives. Bien que certains éléments de validation aient été proposés (corrélation avec des mesures de gaz du sang [He *et al* (2008)]), les résultats obtenus avec ces nouvelles approches restent tout de même à confirmer. Le principe de ces méthodes sera plus longuement discuté dans le Chapitre C.

III.4. MESURES DU $CMRO_2$

III.4.a. IRM ^{17}O

L'oxygène 17 est le seul isotope stable de l'oxygène qui puisse être détecté par IRM. Avec un rapport gyromagnétique 7,4 fois plus faible que celui du proton et une abondance naturelle 2700 fois plus faible, ce noyau possède une très faible sensibilité RMN. De plus, les molécules de $^{17}O_2$ ne sont pas détectées par RMN du fait de leur T_2 très court. Il est pourtant possible de réaliser des mesures de $CMRO_2$ en utilisant ce noyau [Zhu *et al* (2005)]. Le principe consiste à faire inhaler du $^{17}O_2$ et à analyser ensuite la quantité de métabolites $H_2^{17}O$ (détectables par RMN) générés à travers la respiration. Comme décrit précédemment, les variations d' $H_2^{17}O$ sont en effet déterminées par trois

processus : l'utilisation de l'oxygène $^{17}\text{O}_2$ pour la génération de H_2^{17}O dans le tissu cérébral, l'élimination de H_2^{17}O par la circulation sanguine et la recirculation d' H_2^{17}O . Un modèle mathématique décrivant les changements de concentration H_2^{17}O permet de déterminer le CMRO_2 . Le CBF doit également être mesuré ; on utilise alors une injection intraveineuse (bolus) de H_2^{17}O à travers la carotide. Deux approches ont été développées pour la détermination du CMRO_2 par IRM ^{17}O :

- une approche directe qui mesure la quantité d' H_2^{17}O par IRM du ^{17}O [Hermán *et al* (2006)], [Zhu *et al* (2002)], [Fiat *et al* (1993)]. En raison de la faible sensibilité, la détection de ^{17}O a d'abord été effectuée sur de larges volumes. La technique de l'imagerie du déplacement chimique a ensuite été employée pour augmenter la résolution spatiale. Avec l'arrivée de spectromètres à champ magnétique élevé, les mesures ont également gagné en précision. D'autant plus que le faible temps de relaxation longitudinal de l'oxygène 17 (quelques millisecondes) permet de moyennner le signal un grand nombre de fois. Le temps de relaxation transversale étant par contre également très court, le signal doit être acquis très rapidement.
- une approche indirecte [Ronen *et al* (1998)] qui utilise les changements du T_2 ou T_1 du signal RMN proton causés par le couplage scalaire ^{17}O - ^1H entre les deux noyaux. La concentration de H_2^{17}O peut ainsi être corrélée quantitativement au temps de relaxation.

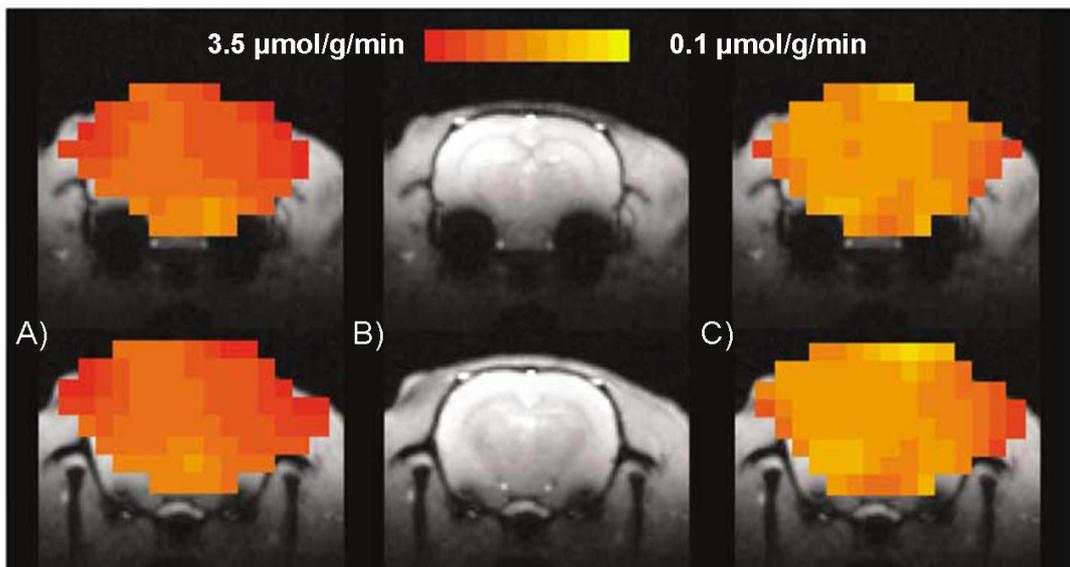


Figure 16 : Cartes de CMRO_2 obtenues sur un rat par IRM ^{17}O . A) en normothermie et C en hypothermie (32°C) ainsi que les images anatomiques correspondantes (B). D'après Zhu (2006).

Ces méthodes ont été appliquées à l'étude du CMRO_2 sur animaux (rats et chats) sains [Zhu *et al* (2005)] [Zhang *et al* (2004)] (Figure 16). Pour l'instant, aucune étude n'a été menée sur l'homme. Comme il a été vu, elles requièrent de travailler à champ magnétique élevé ($>7\text{T}$) ce qui n'est pas accessible partout. Ces méthodes nécessitent également l'injection de $^{17}\text{O}_2$ qui est extrêmement coûteux (1L de gaz à 20% de $^{17}\text{O}_2$ coûte environ 2000 \$) du fait de sa faible abondance naturelle. Enfin, il s'agit de méthodes en développement qui doivent être validées par comparaison avec d'autres approches.

III.4.b. TEP ^{15}O

En termes de méthodologie, il existe une grande similarité entre les approches ^{15}O TEP et les approches $^{17}\text{O}_2$ IRM (spécialement pour la mesure du CBF). La différence entre les deux méthodes repose essentiellement sur le fait que l'approche TEP ne permet pas de séparer les signaux provenant des molécules $^{15}\text{O}_2$ liées à l'hémoglobine, dissoutes dans le sang ou les tissus, de celles émises par les atomes dans les molécules de H_2^{15}O . Il est donc nécessaire dans l'approche ^{15}O TEP de mesurer en plus la quantité de ^{15}O dans les artères (ou la fonction d'entrée artérielle) et le volume sanguin (qui peut être déterminé par inhalation de C^{15}O gaz ou à partir d'approximations théoriques).

III.4.c. IRMf quantitative

Cette méthode permet d'estimer les variations de la consommation d'oxygène (CMRO_2) de façon non invasive par IRM en réalisant des mesures conjointes du signal BOLD et du débit sanguin cérébral. Elle se base sur un modèle décrivant la relation entre les trois paramètres [Davis *et al* (1998)] [Hoge *et al* (1999)] :

$$\frac{\Delta\text{CMRO}_2}{\text{CMRO}_{20}} = \left(1 - \frac{\Delta\text{BOLD}/\text{BOLD}_0}{M}\right)^{1/\beta} \left(\frac{\text{CBF}}{\text{CBF}_0}\right)^{1-\alpha/\beta} \quad \text{Équation 4}$$

M est le maximum théorique du signal BOLD, c'est-à-dire le signal BOLD que l'on mesurerait si toute la désoxyhémoglobine était éliminée du sang. α est l'exposant de la relation de Grubb qui relie le CBV au CBF. β est l'exposant avec lequel la concentration veineuse en désoxyhémoglobine influe sur la relaxivité apparente.

Pour déterminer les variations de CMRO_2 , la technique repose sur une calibration du signal BOLD (détermination du paramètre M). Pour cela, des changements de BOLD et CBF sous CMRO_2 constant sont induits par hypercapnie. Cette hypercapnie, obtenue par inhalation de CO_2 , entraîne une vasodilatation cérébrale globale sans modifier la consommation d'oxygène. Davis [Davis *et al* (1998)] utilise un seul niveau d'hypercapnie, par inhalation de 5% de CO_2 dans de l'air. Hoge [Hoge *et al* (1999)] propose une calibration plus précise en ajustant le modèle aux données obtenues sous quatre concentrations de CO_2 dans de l'air, avec au maximum 5% de CO_2 . La deuxième étape de la méthode consiste à mesurer conjointement les variations de signal BOLD et de CBF lors de la modulation de l'activité neuronale. Récemment des méthodes de calibration sous hyperoxie [Chiarelli *et al* (2007)] ou par apnée [Vazquez *et al* (2006)] ont été proposées. La consommation a été évaluée dans des études concernant les fonctions cognitives, motrices ou sensorielles du cerveau [Stefanovic *et al* (2006)] [Restom *et al* (2007)] et des effets de pathologies sur l'hémodynamique cérébrale [Stefanovic *et al* (2005)]. Cette méthode ne permet d'évaluer que des changements de CMRO_2 . De plus, les calibrations au CO_2 peuvent être irritantes.

III.5. CRITERES D'EVALUATION DES METHODES

Le Tableau 2 récapitule les méthodes de mesure de l'oxygénation présentées dans ce Chapitre.

Bien qu'il ne soit pas évident de définir quels paramètres sont les meilleurs pour décrire l'hypoxie, certains critères devraient être pris en compte pour l'évaluation de techniques de mesure de l'hypoxie. Les techniques doivent être évaluées sur le fait qu'elles mesurent ou non l'oxygène directement et comment elles permettent de rendre compte de l'hétérogénéité des tumeurs. Le volume des échantillons requis, l'intervalle de temps minimum entre deux mesures, la capacité à répéter les mesures et les perturbations potentielles causées par la mesure sont également à prendre en compte. Pour une application en clinique, les notions d'invasivité et d'inconfort pour le patient sont importantes. Ceci inclut le besoin d'injection d'agents exogènes et la quantité de radiations que le patient reçoit. Enfin, l'accessibilité de la méthode, le coût par examen et le nombre de centres où peuvent avoir lieu les mesures sont également des facteurs à ne pas négliger.

Dans ce contexte, on voit que l'IRM pourrait être un bon outil pour mesurer l'hypoxie. Méthode non invasive et non irradiante, elle offre une résolution spatiale de l'ordre du millimètre et une résolution temporelle de l'ordre de la seconde. Son innocuité permet des examens répétés et un suivi régulier. L'implantation de ces appareils d'imagerie dans les complexes hospitaliers s'est généralisée depuis une dizaine d'années. Comme il a été vu dans la partie précédente, plusieurs paramètres d'oxygénation peuvent être évalués grâce à l'IRM : la pO_2 avec l'IRM du fluor (ou des effets T_1), la détection de nitroimidazoles pour la visualisation de zones hypoxique viables, des variations de $CMRO_2$ via l'IRM fonctionnelle quantitative et enfin la détermination de la SO_2 via l'effet BOLD. Enfin, cette méthode permet de fournir des informations anatomiques et un grand nombre d'informations fonctionnelles sur l'environnement tumoral (comme le volume sanguin, le débit sanguin, la perméabilité des vaisseaux ou leur taille...) qui peuvent permettre d'obtenir une vision globale de la tumeur.

Pour plus d'informations sur les méthodes de mesure de l'oxygénation, on pourra se référer aux revues [Gallez *et al* (2004)] [Tatum *et al* (2006)] [Baudalet and Gallez (2005)] [Davda and Bezabeh(2006)] et [Dewhirst *et al* (2000)].

Tableau 2 : Tableau comparatif de méthodes de mesure de l'oxygénation

	Technique	Rapporteur	Résolution spatiale	Résolution temporelle	Invasif	Accessibilité*	Validation
pO ₂	Polarographie	Oxygène	0.05 mm	~1s	oui	2	Animaux et clinique
	Oxylite	RhCl ₂	0.5 mm	1s	oui	3	Animaux
	RPE	Phthalocyanine...	1.0 mm	< 1min	Intracérébral ou IV	1	Animaux
	IRM ¹⁹ F	Perfluorocarbonés	0.5 mm	6.5min	Intracérébral ou IV	2	Animaux
	IRM	R ₁	0.5 mm	~5 min	Non invasif	4	Animaux et clinique
Rapporteurs de l'hypoxie	TEP ¹⁸ F	FMISO	2.0 mm	1 acquisition	IV	3	Animaux et clinique phase3
		EF5	2.0 mm	1 acquisition	IV	2	Animaux et clinique phase2
	IRM ¹⁹ F	nitroimidazole	1.0 mm	1 acquisition	IV	2	Animaux
	Histologie	HIF-1	1.0 µm	1 acquisition	biopsie	4	Animaux et clinique
	Histologie	GLUT-1	1.0 µm	1 acquisition	biopsie	4	Animaux et clinique
	Histologie	CA-IX	1.0 µm	1 acquisition	biopsie	4	Animaux et clinique
	Histologie	Pimonidazole	1.0 µm	1 acquisition	IV + biopsie	5	Animaux et clinique
SO ₂	Cryospectro-photométrie	hémoglobine	1.0 µm	1 acquisition	biopsie	1	Animaux et clinique
	NIRS	hémoglobine	1.0 cm	15 s	Non invasif	4	Animaux et clinique
	TPA	hémoglobine	15µm	~16min	Non invasif	1	Animaux
	IRM BOLD	hémoglobine	0.5 mm	~3min	Non invasif	4	Animaux et clinique
CMR O ₂	IRM	¹⁷ O	1.0 mm	< 1min	Respiration du gaz	2	Animaux
	TEP	¹⁵ O	1.0 mm	< 1 min	Respiration du gaz	2	Animaux et clinique
	IRMf	hémoglobine	1.0 mm	~5s	Respiration de CO ₂	4	Animaux et clinique

* Les valeurs sont réparties sur une échelle de 1 à 5, avec 1 étant le moins accessible et 5 le plus accessible.

IV. PLAN D'ETUDE

Le sujet de cette thèse s'inscrit dans un projet plus général d'étude de la microvascularisation cérébrale pour l'analyse de pathologies cérébrales. L'objectif de ce travail est d'apporter un outil IRM de mesure de l'oxygénation à l'ensemble des outils IRM de caractérisation de la microvascularisation cérébrale développée précédemment au laboratoire.

Dans un premier temps, nous avons mis en place une méthode connue de mesure de la pO_2 par IRM du fluor¹⁹. L'étude a principalement consisté en un travail méthodologique pour permettre l'imagerie du fluor¹⁹ sur les imageurs de la plateforme et l'établissement de la courbe de calibration de l'héxafluorobenzène. Une courte étude a permis d'évaluer la pO_2 sur des rats sains et porteurs de tumeurs sous différentes conditions respiratoires. Des problèmes matériels (notamment le déménagement des aimants au cours de la thèse impliquant le non fonctionnement du scanner à 2,35T), le caractère invasif de la méthode et la complexité expérimentale nous a conduit à nous concentrer sur le développement d'une méthode de mesure de la SO_2 à partir de l'effet BOLD.

Nous avons proposé une nouvelle approche pour la quantification des effets T_2^* . Après avoir évalué notre méthode sur rats sains et sous différentes conditions respiratoires, la technique a été appliquée à l'étude de l'hypoxie tumorale et comparée à l'histologie utilisant le pimonidazole.

Enfin, les méthodes utilisées au laboratoire reposant en grande partie sur des modèles mathématiques de la microvascularisation cérébrale, nous avons évalué l'impact de certaines hypothèses du modèle sur la précision de nos mesures. Ainsi nous avons mis en place une technique de simulation numérique du signal RMN en présence de sources d'inhomogénéité du champ magnétique. L'influence de la morphologie des vaisseaux sanguins a été évaluée en utilisant des données simulées ou provenant d'acquisitions de microscopie à deux photons. Une étude *in silico* de l'influence du taux d'hématocrite sur les mesures a également été confrontée à une étude expérimentale incluant des conditions d'hémodilution et d'hypoxie intermittente.

Parallèlement aux travaux évoqués ci-dessus, plusieurs travaux en collaboration ont permis de mener des études sur l'évolution de la microvascularisation pendant des traitements de radiothérapie par rayonnement synchrotron, de chimiothérapie et de thérapie antiangiogénique.

CHAPITRE B : MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE MESURE DE LA PO₂ PAR IRM DU FLUOR¹⁹

La mesure de la pO₂ par IRM du fluor¹⁹ est une technique qui a montrée de très bons résultats dans la littérature tant sur rats sains que porteurs de tumeurs (Chapitre A.III.1.d.). Elle a été validée par comparaison avec d'autres méthodes de mesure de la pO₂ ou avec des marqueurs de l'hypoxie. Nous avons donc travaillé à la mise en place d'une approche utilisant ce principe et nommée FREDOM. Comme il sera explicité ultérieurement, cette approche est néanmoins très invasive et ne peut pas être envisagée pour l'étude de l'hypoxie en routine. Pour des approches précliniques, elle doit cependant permettre d'étudier l'environnement tumoral du point de vue de l'oxygénation et en combinaison avec l'IRM ¹H de la microvascularisation. La mise en place de cette approche a nécessité des adaptations matérielles et logicielles de l'IRM pour la détection du ¹⁹F. Après mise en place et validation de la méthode (étude sur fantôme), nous avons étudié la pO₂ dans des environnements sains et pathologiques sur un nombre restreint de rats. La complexité expérimentale de l'approche, ainsi que l'arrêt du spectromètre au cours du déménagement du laboratoire, nous ont finalement poussé à rechercher plus activement une autre approche non invasive pour la mesure de l'oxygénation cérébrale (Chapitre C). Pour ces raisons, certains aspects du travail n'ont pas été finalisés.

La partie calibration ainsi que le développement du fantôme ont fait l'objet d'un stage de Master réalisé par O. Blanc.

I. PRINCIPE

I.1. VARIATIONS DU TEMPS DE RELAXATION LONGITUDINAL AVEC LA PO₂

La molécule d'oxygène est paramagnétique (voir Chapitre C) et cause une diminution du temps de relaxation spin-réseau (T₁) des molécules environnantes. Ce principe est bien connu des chimistes qui, de ce fait, utilisent des procédures compliquées pour extraire l'oxygène dissous de solutions avant de mesurer avec précision les temps de relaxation des solutions. A partir de ce principe, des études IRM classiques du proton ont été mises en place pour évaluer les variations de R₁=1/T₁ en réponse à des changements d'oxygénation [O'Connor *et al* (2009)] [Ichiro Matsumoto *et al* (2006)] [O'Connor *et al* (2007)]. Mais il a été montré que d'autres processus (ions métalliques, pH, cellularité, température...) influencent également le temps de relaxation rendant la relation entre R₁ et pO₂ non spécifique.

Dans ce contexte, une classe de composants nommés perfluorocarbones (PFC) est particulièrement adaptée à l'étude de la pO₂ par IRM. Le R₁ des fluorocarbones varie linéairement avec la pression en O₂ et le pic de résonance des molécules de perfluorocarbones est sensible à la pO₂, à la température et au champ magnétique. En revanche, il a été montré que pour ces composants, la relation entre le R₁ et la pO₂ n'était

Principe

pas sensible au pH, au CO₂ ou à la présence d'ions paramagnétiques chargés. Pour les PFC, on peut donc définir la relation linéaire :

$$R_1 = R_{1a} + (r_{1p} X) \quad \text{Équation 5}$$

avec X la fraction molaire d'O₂ dissoute dans la solution de PFC, R_{1a} est le taux de relaxation anoxique et R_{1p} représente la contribution paramagnétique de l'O₂. Cette relation est valable pour une température et un champ magnétique fixés.

Conformément à la loi de Henry, la fraction molaire d'O₂ dissoute est reliée à la pression partielle en oxygène :

$$pO_2 = KX \quad \text{Équation 6}$$

où K représente la constante d'Henry pour une solution de gaz donnée et à une température donnée. On peut alors écrire :

$$R_1 = R_{1a} + (r_{1p}/K) pO_2 \quad \text{Équation 7}$$

Le rapport r_{1p}/K indique alors la réponse à la pO₂. Une valeur faible de ce rapport représente une meilleure sensibilité à l'O₂ mais il génère également des T₁ longs en conditions d'anoxie et contribue donc à l'augmentation du temps d'acquisition (le T₁ de l'héxafluorobenzène peut atteindre les 12s sous 4.7T). La dépendance à la température dépend de la nature du PFC utilisé. L'erreur relative introduite par un écart de 1° dans la température est d'environ 8 mmHg pour PFTB, 3 mmHg pour PFOB (perflubron) ou 15C5 et 0,1 mmHg pour l'HFB lorsque la pO₂ est de 5 mmHg.

Ainsi, si l'on connaît la relation linéaire décrite par l'équation 7, et si l'on a injecté du perfluorocarbone dans un tissu à analyser, on peut mesurer le R₁ et en déduire la pO₂ locale. En 1988, Thomas et al [Thomas *et al* 1988] ont montré les premières applications de l'utilisation des perfluorocarbones comme rapporteurs de la pO₂ par IRM du fluor¹⁹. Depuis plusieurs méthodes basées sur ce principe ont été décrites.

I.2. LA METHODE FREDOM

Mason et al ont proposé la méthode FREDOM [Mason *et al* (1999)] [Mason *et al* (2003a)] [Zhao *et al* (2003)]. A ce jour, il s'agit de la méthode la plus utilisée. Cette technique permet d'obtenir des cartes paramétriques quantitatives de la pO₂ en quelques minutes avec une précision de 1 à 3 mmHg lorsque la pO₂ est dans un intervalle de 0 à 10 mmHg. Le perfluorocarbone utilisé est l'héxafluorobenzène (HFB). Après avoir établi une courbe de calibration de HFB en faisant buller le produit avec des mélanges gazeux possédant différentes pO₂ et en mesurant le R₁ des solutions, le HFB est injecté directement dans le tissu à analyser. Pour minimiser les dégâts causés par l'injection, une aiguille de très faible diamètre (32G) est utilisée pour déposer environ 3µL de produit. Puis de nouvelles injections (environ 16) sont réalisées pour couvrir le volume de la tumeur. La pO₂ est obtenue à l'aide d'une séquence de mesure de T₁ particulière dénommée PBSR (pulse burst saturation recovery) EPI (Echo Planar Imaging) ARDVARC (alternated relaxation delays with variable acquisition to reduce clearance effects). Le PBSR est bien adapté pour une excitation non uniforme d'une antenne de surface et

permet des mesures de T₁ sans avoir à attendre la repousse totale de l'aimantation entre les impulsions. Alors que les mesures traditionnelles de T₁ utilisent des délais croissants lors de l'échantillonnage de la courbe de repousse de l'aimantation, ARDVARC alterne les délais longs et courts pour éviter une erreur systématique si l'amplitude du signal varie pendant les mesures. Les paramètres typiques de FREDOM sont une matrice 32*32 points pour une FOV de 40*40 mm ce qui donne une résolution dans le plan de 1,25 mm.

I.3. AUTRES APPROCHES

Les autres approches utilisent le même principe que la méthode FREDOM mais diffèrent par le choix du perfluorocarbone et/ou de la technique d'administration du produit.

Beaucoup de perfluorocarbones ont été évalués [Barker *et al* (1993)] [Mason *et al* (1990)] [xin Yu *et al* (2005)]. Les principales caractéristiques recherchées étant une faible dépendance à la température et une bonne sensibilité RMN. Ainsi le composé le plus utilisé est le perfluoro-15-crown-5 éther (15C5) qui possède 15 atomes de fluor magnétiquement équivalents (un seul pic de résonance) et qui permet d'obtenir un rapport signal/bruit élevé.

Pour permettre une utilisation moins invasive que la méthode FREDOM, il a été proposé d'injecter les perfluorocarbones par voie intraveineuse (IV). Etant donné la nature extrêmement hydrophobique des PFCs, ils ne se dissolvent pas directement dans le sang. Par contre, ils peuvent être mis sous formes d'émulsions biocompatibles ([Dardzinski and Sotak(1994)] [Barker *et al* (1994)] [Fan *et al* (2002)] [McNab *et al* (2004)]. Suite à l'injection IV, l'émulsion circule dans le réseau vasculaire avec une demi-vie typique de 12h (qui dépend de la nature de l'émulsion) et une clairance de 2 jours, principalement due à l'activité des monocytes entraînant une accumulation dans la rate, le foie et les os. Certaines équipes ont examiné la pO₂ alors que le PFC était encore dans le sang et ont alors pu donner une mesure de la pO₂ vasculaire [Nöth *et al* (1995)] [Eidelberg *et al* (1988)]. Dans ce cas, le débit sanguin entraîne des artefacts qui doivent être corrigés par des algorithmes spécifiques. Dans le cadre de l'étude des tumeurs cérébrales qui possèdent une vascularisation altérée, les particules de PFC peuvent passer la paroi des vaisseaux sanguins et s'accumuler dans l'espace interstitiel. Le principal inconvénient est que seule une faible quantité de liquide pénètre ainsi dans la tumeur rendant la détection des PFCs difficile. Du fait de leur faible toxicité de grandes doses d'émulsions peuvent cependant être injectées et l'on peut également procéder par injections successives pour augmenter le RSB. Néanmoins, la biodistribution des produits par ce type d'injection est faible puisqu'ils n'interrogent que les parties de la tumeur vascularisées et peuvent sous estimer les zones hypoxiques.

Enfin, il a été proposé d'utiliser le 15C5 injecté dans des capsules d'hydrogel semi-perméables formées à partir d'une solution composée d'alginate et d'ions Ba²⁺ [Nöth *et al* (2004)]. Ces capsules sont imperméables aux cellules et autres grosses molécules (et ne provoquent donc pas de réponse immunitaire) mais la diffusion de petites molécules comme l'oxygène ou le dioxyde de carbone est possible. Les capsules sont placées dans l'environnement tumoral lors de l'injection des cellules tumorales et restent à l'endroit de l'injection. Cette technique permet donc d'obtenir des suivis

Principe

longitudinaux de l'évolution de la pO_2 mais ne peut être utilisée que sur des modèles de tumeurs expérimentales.

L'utilisation des perfluorocarbones n'étant pas autorisée, pour l'instant aucune étude n'a été menée sur l'homme.

II. DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE POUR L'IRM ¹⁹F

Avant de pouvoir appliquer une méthode de type FREDOM, nous avons réalisé des développements méthodologiques pour permettre la détection du ¹⁹F par nos appareils IRM.

II.1. REALISATION D'UNE ANTENNE DE SURFACE

Deux antennes ont été réalisées pour l'étude IRM du ¹⁹F à 2,35T et 4,7T. Les caractéristiques sont communes aux deux antennes et seule la fréquence de résonance change. Le modèle de l'antenne de surface a été choisi pour sa simplicité de réalisation. Elle permet également d'obtenir un bon rapport signal sur bruit nécessaire à l'étude du ¹⁹F. Cette antenne a été utilisée pour l'émission et la réception du signal RMN.

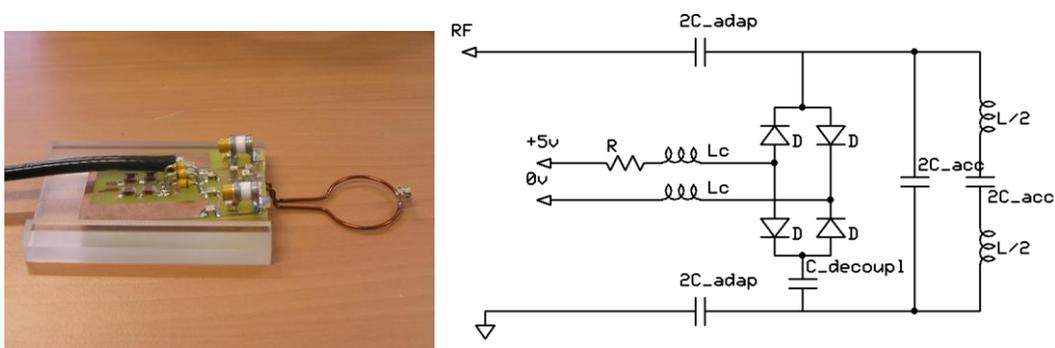


Figure 17 : Photo et schéma électrique de l'antenne de surface ¹⁹F

Les caractéristiques des antennes réalisées sont décrites Figure 17. D'un point de vue électronique, cette antenne est constituée d'une bobine à une seule spire de 2 cm de diamètre qu'il faut accorder et adapter à la fréquence souhaitée (pour annuler, à la fréquence choisie, le signal réfléchi). Ces étapes passent par la mise en série ou parallèle de capacités variables qui permettent de se placer à la bonne fréquence de résonance même si l'échantillon modifie l'impédance de l'antenne. Afin d'optimiser le RSB, les pertes dues au couplage de l'antenne avec l'échantillon (puissance dissipée le long de l'antenne et énergie stockée dans les capacités parasites), les capacités d'adaptations sont réparties de part et d'autres de la bobine. De la même manière les deux capacités d'accord sont réparties sur la bobine elle-même. Les diodes présentes sur le schéma sont des diodes pin permettant le découplage de l'antenne pour une utilisation éventuelle en combinaison avec une antenne de volume en émission.

Un support en plexiglas ainsi que des tiges d'accord et d'adaptation ont également été réalisés pour une utilisation pratique de l'antenne.

Sur la Figure 18, on observe grâce à un appareil dit de wobulation le signal réfléchi par l'antenne à 2,35T.

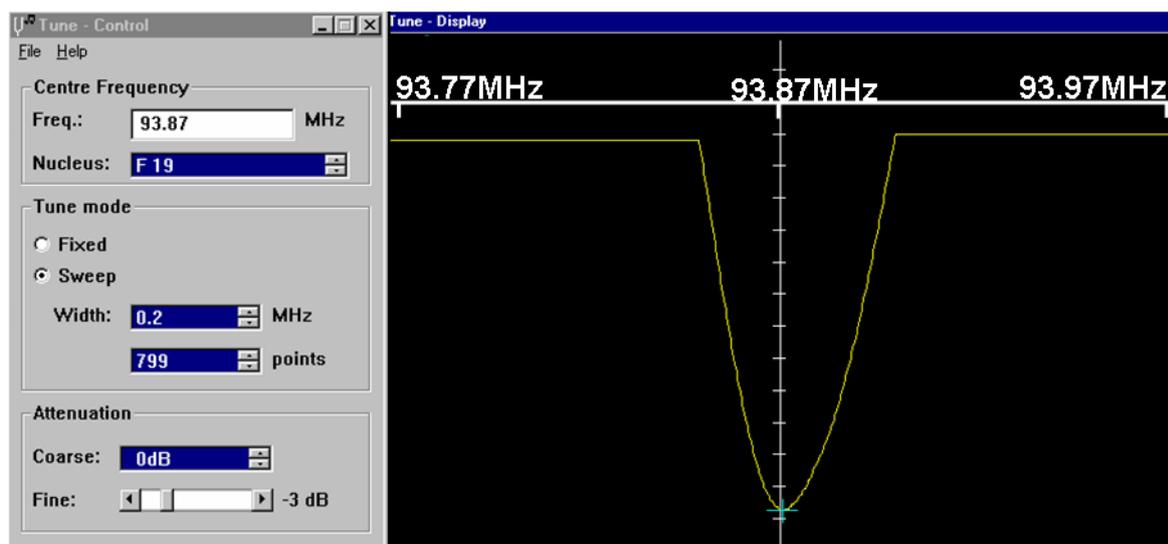


Figure 18 : Courbe de réflexion à -3dB de l'antenne ¹⁹F

On remarque que notre antenne peut s'adapter à la gamme de fréquence voulue. De plus la faible largeur de la courbe de réflexion à -3dB indique un facteur de qualité ($Q = 2f_0/\Delta f = 3610$ [Pimmel(1990)]) similaire à celui des antennes commerciales proton.

II.2. PRODUIT FLUORE ET FREQUENCE DE RESONANCE

Comme pour la méthode FREDOM, le perfluorocarbone que nous avons choisi est l'héxafluorobenzène.

II.2.a. Caractéristiques de l'héxafluorobenzène

Le HFB possède un temps de relaxation T_2 long qui permet l'imagerie RMN. Il est bien caractérisé en terme de toxicité n'entraînant pas de mutagenèse, tératogenèse ou fétotoxicité (HFB a même été proposé comme anesthésique pour des études vétérinaires). Son point de fusion est de 4-6°, sa densité de 1,62 g/ml et l'héxafluorobenzène est extrait du corps en 600min. Son prix est d'environ 2\$/g et est accessible facilement en haute pureté (>99%). Le produit ne nécessite aucun équipement spécial pour sa conservation. Enfin, ce produit est adéquate pour l'IRM puisqu'il ne possède qu'une raie de résonance.

II.2.b. Détection RMN de l'HFB.

Un premier spectre RMN a été réalisé sur un échantillon de 2 mL d'HFB pur et à 2,35T (Figure 19A). Dans ces conditions, on observe que la fréquence de résonance est de 93,87 MHz avec une largeur de raie de 12Hz dans de bonnes conditions de shim.

Les premiers essais de l'imagerie fluor ont été réalisés à 2,35T sur une seringue contenant de l'eau du robinet et de l'héxafluorobenzène (2 mL).

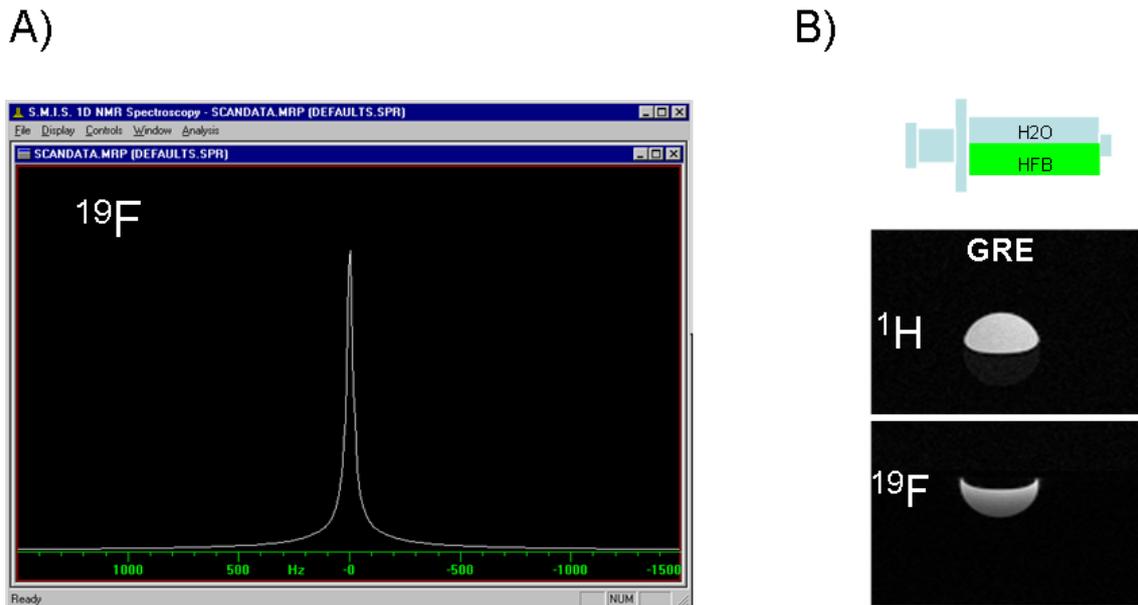


Figure 19 : A) Spectre ^{19}F acquis sur un fantôme d'HFB pur (2mL) à 2,35T. B) Images ^1H et ^{19}F acquises par une séquence écho de gradient sur fantôme seringue à 2,35T.

Les images présentées (Figure 19B) ont été acquises soit avec l'antenne de volume (^1H) soit avec l'antenne de surface fluor (^{19}F). La séquence utilisée est un écho de gradient à TE court (4,5 ms). Comme il a été mentionné précédemment, HFB n'est pas miscible dans l'eau et l'on observe bien deux compartiments distincts. On constate donc qu'il est possible d'imager le fluor sans interférences avec le signal proton. On remarque également que l'antenne de surface ne perturbe pas les acquisitions protons ce qui est pratique pour acquérir des images anatomiques du cerveau en plus de celles de la distribution de l'HFB.

II.3. SEQUENCE IR-FLASH

Il a été vu que la $p\text{O}_2$ affecte la vitesse de relaxation spin-réseau (R_1) des perfluorocarbones. La variable accessible expérimentalement est l'inverse de cette vitesse de relaxation, c'est-à-dire le temps de relaxation T_1 . Il faut donc se munir d'une séquence IRM capable de mesurer cette grandeur. De plus, dans le cas d'une mesure d'oxymétrie in vivo, il a été montré que le T_1 varie de 500 ms à 15 secondes environ. La séquence doit donc être capable de mesurer correctement tous les T_1 de cette gamme. La séquence que nous avons utilisée est la séquence d'inversion récupération équipée d'un module d'acquisition FLASH. Cette séquence était déjà programmée sur les consoles d'acquisition du scanner.

II.3.a. Principe de la séquence

La séquence consiste à inverser l'aimantation à l'équilibre de M_0 à $-M_0$ au moyen d'une impulsion π . D'après les équations de Bloch l'évolution temporelle de l'aimantation dans ce cas est régie par l'équation :

$$M(t) = M_0(1 - 2e^{-t/T_1}) \quad \text{Équation 8}$$

Dans la pratique, l'aimantation longitudinale n'est pas mesurable par IRM. Pour évaluer l'évolution temporelle de M , on va la basculer à différents temps d'échantillonnage T_i dans le plan transverse et mesurer sa valeur. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite d'attendre le retour à l'équilibre de l'aimantation avant de pouvoir effectuer un autre échantillonnage. Le temps de répétition peut donc être important (environ $5T_1$).

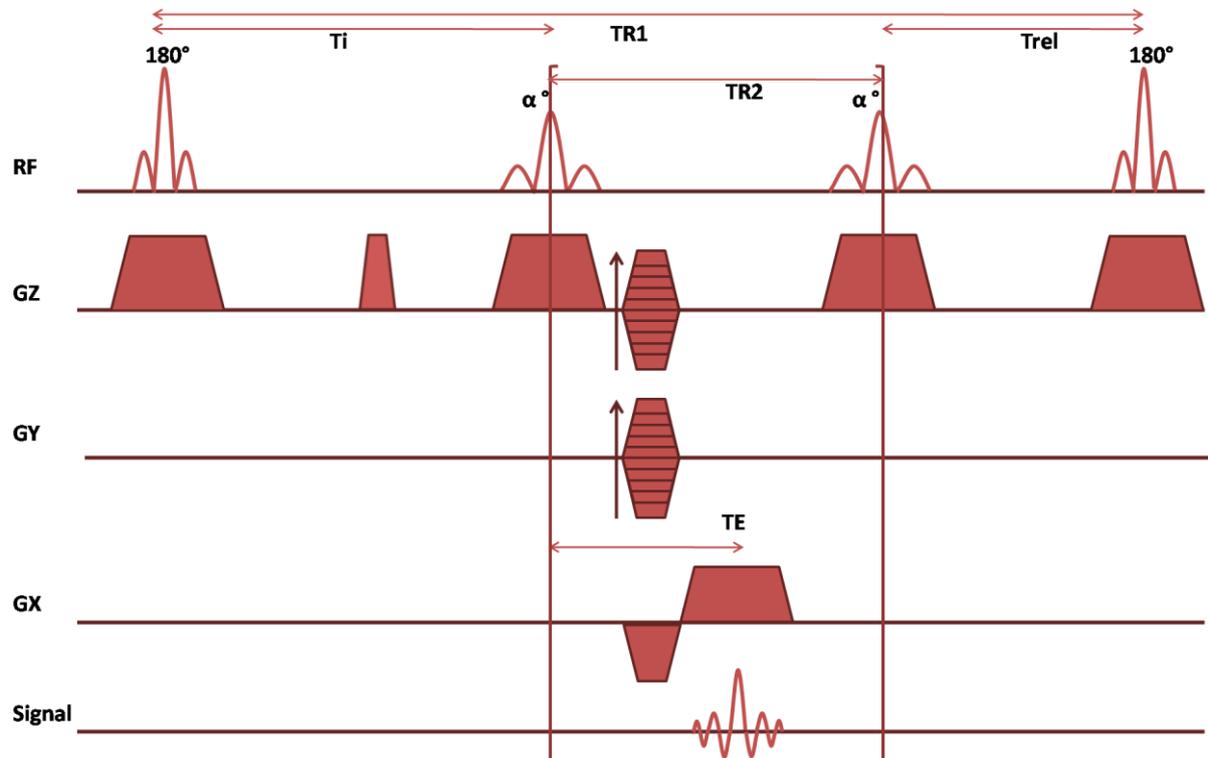


Figure 20 : Chronogramme de la séquence IR-FLASH.

Le processus d'inversion-récupération utilise ici des impulsions adiabatiques (hyperbolique sécant). Ces impulsions ont la propriété d'être peu sensibles aux inhomogénéités du champ créé par l'antenne émettrice (champ B_1). Ces impulsions sont donc bien adaptées pour notre antenne de surface utilisée en émission. Dans notre cas, le module d'imagerie est une séquence rapide FLASH classique (écho de gradient). L'impulsion est un sinus cardinal 5 lobes avec un angle d'environ 15°. La Figure 20 représente le chronogramme de la séquence utilisée. Après l'impulsion d'inversion, on attend un temps T_i de repousse de l'aimantation. Puis le module FLASH mesure l'intensité du signal. Pendant le temps T_{rel} l'aimantation retourne à l'équilibre. La séquence est répétée pour différents T_i afin de permettre un ajustement des données par l'équation 8.

II.3.b. Recherche des paramètres adaptés à l'étude du fluor

L'utilisation des différents temps d'inversion nous permet d'échantillonner la repousse de l'aimantation après l'impulsion π . On sait qu'à $5T_1$ on est à 99% de M_0 . Les différents T_i utilisés doivent être choisis de manière à permettre d'échantillonner la courbe sur cette durée. Comme il a été mentionné précédemment, la gamme des T_1 susceptible d'être mesurée avec l'utilisation des perfluorocarbones est très large. Pour permettre une mesure sur des T_1 courts et longs, un compromis est donc à faire entre une mesure

précise (impliquant un grand nombre de T_i repartis sur l'ensemble de la repousse de l'aimantation) et la durée de l'acquisition. Pour notre étude, nous avons utilisé un jeu de 12 temps d'inversions. Les dix premiers temps sont repartis à intervalles de temps réguliers sur la période où l'aimantation varie de $-M_0$ à $+M_0/2$ et les deux derniers sont respectivement situés à 30s et 50s. La précision de ce protocole a été évaluée à l'aide de simulations informatiques au cours du stage de Master2 d'O. Blanc. Il permet de réaliser des ajustements corrects (erreur < 2%) jusqu'à des T_1 de 15 s. Le faible nombre de temps d'inversion permet d'obtenir des cartes de T_1 en 6 min avec des résolutions spatiales de l'ordre du demi millimètre. Bien entendu, une étude plus approfondie sur les jeux de T_i pourrait permettre de gagner encore en précision et rapidité, mais les caractéristiques obtenues avec notre jeu de T_i paraissent déjà satisfaisantes.

II.3.c. Exemple de carte T_1 sur fantôme

La carte T_1 (Figure 21) a été réalisée à 2,35T sur le fantôme rempli d'héxafluorobenzène et avec la séquence IRFLASH décrite précédemment. La résolution dans l'image est de $468 \times 468 \times 2000 \mu\text{m}$. Comme on peut le voir, l'ajustement de la fonction est correctement réalisé sur le voxel analysé. La carte de T_1 est homogène sur l'ensemble du fantôme ($T_1 = 1963 \pm 23$ ms). L'analyse est réalisée par une application Matlab développée au laboratoire par E. Barbier.

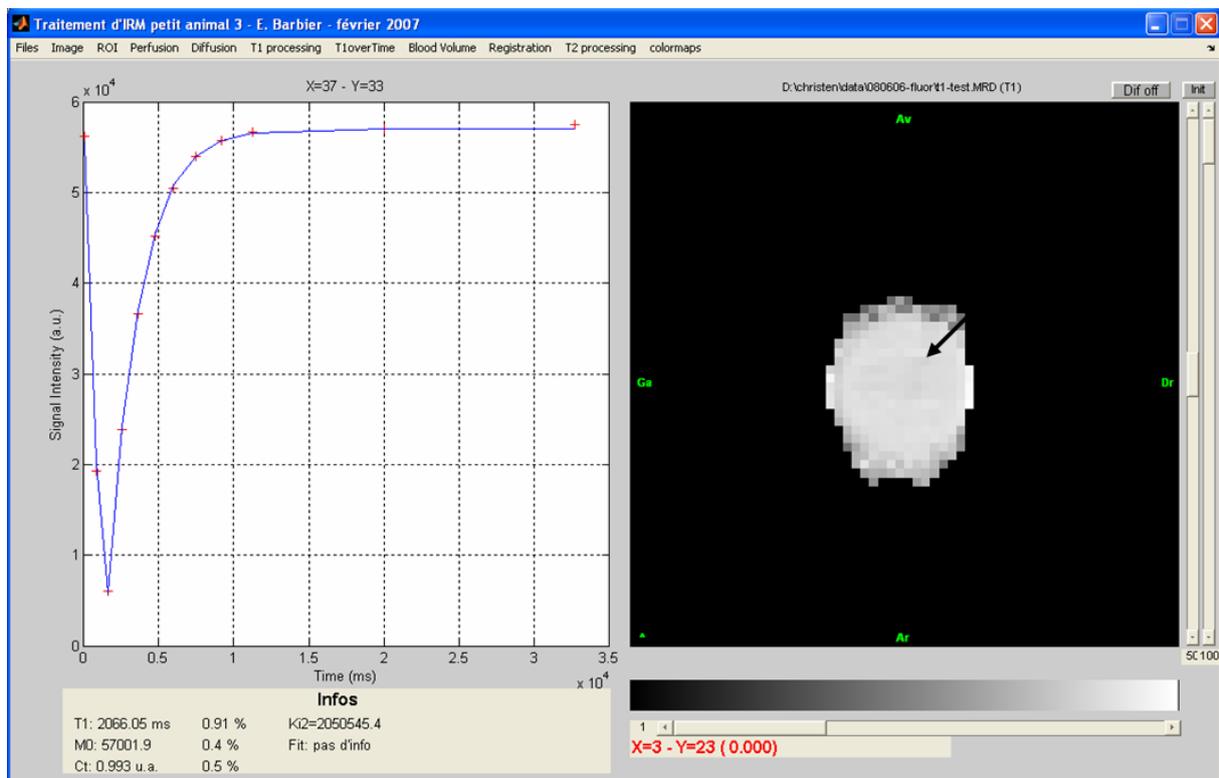


Figure 21 : Carte de T_1 sur fantôme HFB et évolution temporelle du signal pour un voxel (indiqué par la flèche sur la carte T_1).

III. ETABLISSEMENT D'UNE COURBE DE CALIBRATION POUR L'HEXAFLUOROBENZÈNE

Il a été vu (Chapitre B.I.2.) que la méthode d'oxymétrie ^{19}F repose sur la connaissance de la relation entre $p\text{O}_2$ et R_1 du produit choisi. Pour établir la courbe de calibration reliant $p\text{O}_2$ à R_1 , il faut donc réaliser un système qui nous permette de faire varier et de mesurer la $p\text{O}_2$ au sein du liquide fluoré. Il faut également que le système soit compatible RMN pour permettre de réaliser les mesures de R_1 aux mêmes instants. Enfin, la calibration des perfluorocarbones pouvant être influencée par la température, le fantôme doit être équipé d'un système de contrôle de la température.

III.1. REALISATION D'UN OBJET TEST

III.1.a. Caractéristiques du fantôme

Le fantôme est constitué principalement d'un corps et d'un couvercle en plexiglas. Ce matériau a été choisi en raison de sa susceptibilité magnétique proche de celle du fluor limitant ainsi le gradient d'aimantation aux interfaces. De plus, le plexiglas est inerte chimiquement, non conducteur et possède un temps de relaxation transverse court. Il ne donne donc pas de signal RMN aux temps classiquement utilisés pour l'imagerie. Le corps du fantôme est un jonc de 28 mm de diamètre évidé sur 20 mm avec un diamètre interne de 12 mm (volume interne de 3,16 mL). Divers trous sont percés à travers le corps du fantôme. Les trous de plus petit diamètre (2 mm) accueillent un tuyau pour la circulation d'eau et un trou pour l'arrivée du gaz. Ces tuyaux sont en polyéthylène ; leur diamètre externe est de 2 mm et leur diamètre interne de 1mm. Le tuyau de circulation d'eau serpente dans le fantôme. La température de l'eau que l'on fait circuler étant thermostatée par un bain marie (Julabo Ed), on peut ainsi contrôler la température du fluor. Les deux trous de plus grand diamètre (6 mm) servent à accueillir des sondes optiques qui mesurent la $p\text{O}_2$ et la température. Le fantôme est isolé de l'atmosphère extérieure par un couvercle muni d'un joint torique. Pour permettre l'échappement du gaz sans échanges avec l'atmosphère, le couvercle est muni d'un tuyau plongeant dans une vasque d'eau.

Le mélange de gaz que l'on introduit dans le fantôme est obtenu à partir d'azote, d'air et d'oxygène dont on règle les proportions à l'aide de débitmètres à billes. Le mélange est soit recueilli dans une seringue (60mL Braun Omnifix), puis injecté dans le fantôme à l'aide d'un pousse seringue (Fisher scientific), soit injecté directement dans le fantôme à travers un robinet bas débit.

Les mesures de $p\text{O}_2$ sont réalisées par les sondes Oxylite® (Chapitre A.III.1.b. et Annexe2). Les mesures de températures sont effectuées par une sonde optique Fluotemp (Photon control, Canada) dont la précision est de 0,05 degré Celsius pour une gamme de températures allant de 20 à 60°C. Les deux appareils sont interfacés avec un ordinateur équipé d'une carte d'acquisition (National instrument) afin de pouvoir enregistrer les mesures via un programme Labview développé au laboratoire par O. Montigon.

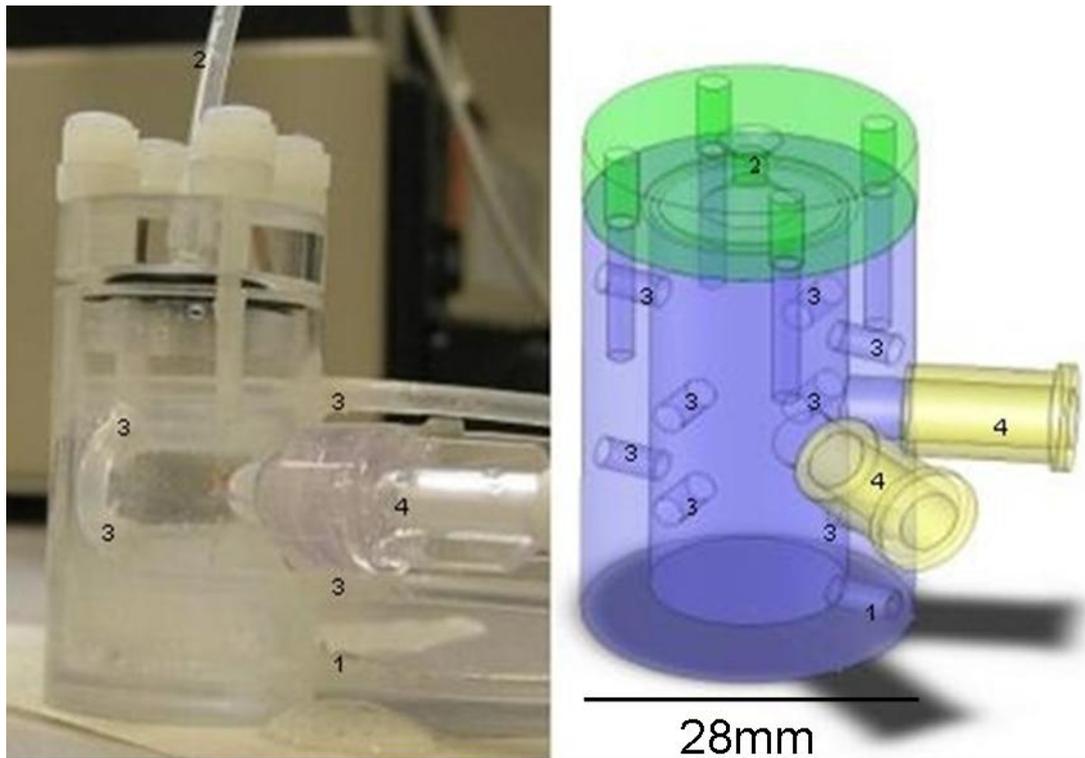


Figure 22 : Photo et plan du fantôme. Tuyau d'injection du mélange gazeux (1), tuyau d'échappement (2), trous servant à faire serpenter le tuyau d'eau thermostatée (3) et connectiques des sondes d'oxymétrie et de température (4).

III.1.b. Validation

Idéalement, lors de l'établissement de la courbe de calibration, le contrôle de la mesure de la pO_2 se réalise dans le liquide fluoré pendant l'acquisition des cartes de R_1 . Les premières expériences utilisant les sondes Oxylite dans l'héxafluorobenzène ont malheureusement montrées que cette mesure n'était pas possible puisque l'HFB attaquait chimiquement les sondes et les rendait inutilisables. Par contre, d'après la loi de Henry, il est théoriquement admis que la pO_2 du liquide (pO_{2liqu}) s'équilibre avec la pO_2 du gaz injecté (pO_{2inj}) après un certain temps. Il a donc été proposé de contrôler la pO_2 du mélange gazeux situé dans le fantôme.

Pour valider cette relation, nous avons réalisé une étude lorsque le fantôme était uniquement rempli d'eau. Pour le protocole, une première sonde oxymétrique mesure la pO_{2inj} juste avant l'injection du gaz, permettant ainsi de contrôler la composition en oxygène du mélange injecté. Une seconde sonde est placée dans le fantôme pour mesurer l'évolution de la pO_{2liqu} . Enfin une troisième sonde mesure la température dans le fantôme. Un exemple d'acquisition est représenté Figure 23.

Des injections d'azote sont réalisées pour baisser la pO_2 entre les différents paliers d' O_2 et sont stoppées lorsque la pO_{2liqu} atteint une valeur de 3 mmHg.

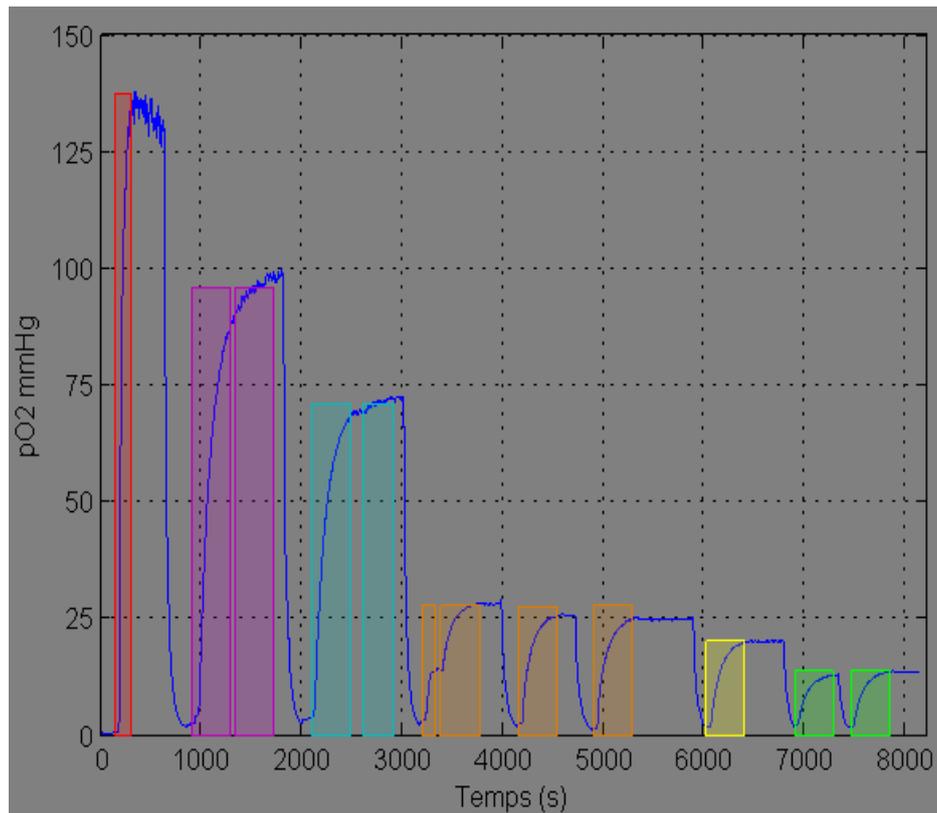


Figure 23 : Evolution de la pO_{2liqu} dans le fantôme. Les rectangles symbolisent les périodes d'injection d'un mélange gazeux (largeur=durée, hauteur = pO_{2inj} mesurée). Air (rectangle rouge), mélange air 50%-azote 50% (rectangle violet), etc.). Les chutes brutales de pO_{2liqu} sont produites par l'injection d'azote dans le fantôme.

Les résultats confirment que la pO_{2liqu} est bien induite par la pO_{2inj} du mélange gazeux. Les valeurs des paliers de pO_{2liqu} sont toujours du même ordre de grandeur que la pO_{2inj} , voire égales. On voit également qu'après l'arrêt de l'injection, la pO_{2liqu} reste stable dans le temps (pour les injections orange, jaune et verte). D'autres expériences ont confirmé cette stabilité pour les autres paliers.

La (Figure 24) montre l'évolution de la température dans le fantôme lorsque l'on fait varier la température du bain-marie. Quatre consignes ont été appliquées : 40, 60, 80 et 95° pendant des périodes suffisamment longues pour permettre au fantôme d'atteindre sa température d'équilibre. De manière générale, on remarque qu'à chaque changement de consigne la température du fantôme évolue dans le même sens mais avec une amplitude différente. Ainsi pour une augmentation de la consigne de 20°, la température du fantôme n'augmente que de 7°. Une fois la température d'équilibre atteinte, celle-ci reste stable : l'écart-type d'un palier est de 0,2°. Par contre, on observe une brusque chute de la température lors de l'injection d'un mélange gazeux dans le fantôme. En effet, le gaz est à la température ambiante et son volume n'est pas négligeable par rapport au volume interne du fantôme ; une baisse de température est donc normale. Durant l'injection, la température remonte légèrement et se stabilise à une valeur inférieure à celle de départ. Après l'injection, la température retrouve la valeur d'équilibre associée à la consigne.

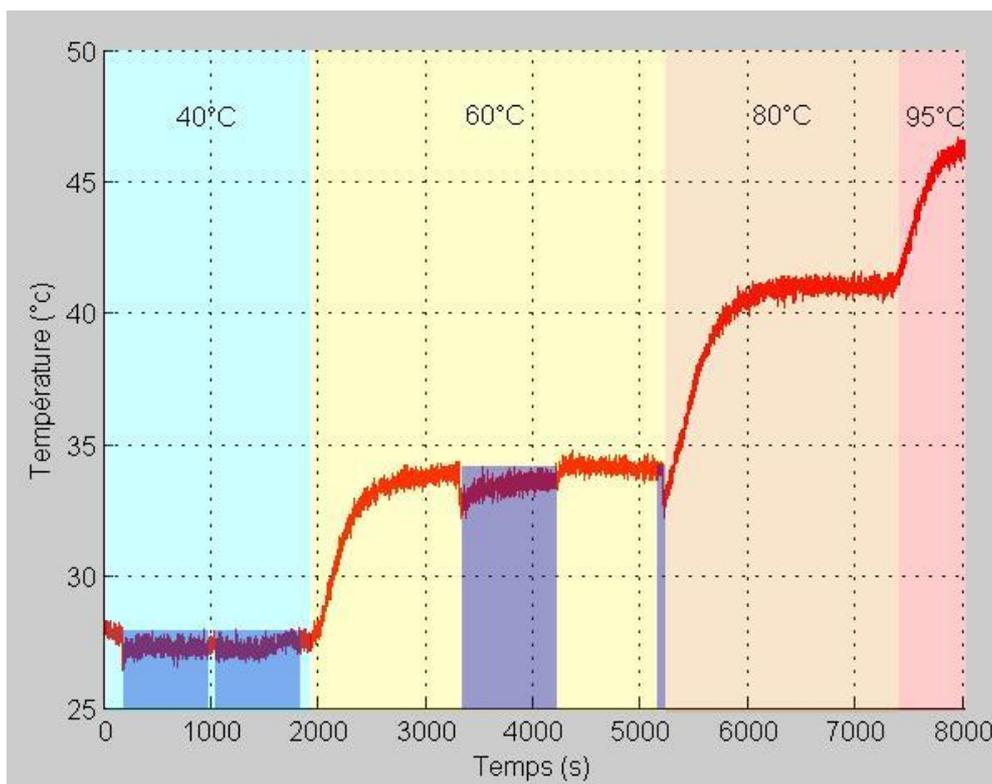


Figure 24 : Evolution de la température dans le fantôme en fonction du temps. La courbe indique la valeur de la température mesurée dans le fantôme. Les différentes couleurs sur le graphique correspondent à la température de consigne du bain-marie. Les quatre rectangles bleus correspondent aux périodes d'injection de gaz.

Le fantôme est donc stable en température comme le montre la (Figure 24). La plage de températures accessibles va de la température ambiante (limite basse du bain marie) jusqu'à 45°C. Le fantôme nous permet d'obtenir des températures observées in vivo (36-38° pour le rat). La (Figure 24) montre aussi que l'injection d'un gaz entraîne une baisse de la température de l'ordre d'un demi degré et que pour effectuer une mesure dans des conditions stables, il faut attendre environ trois minutes. La mesure de T_1 peut s'effectuer dans de bonnes conditions de température. Mais étant donnée la réponse non linéaire de la température du liquide, d'autres expériences sont nécessaires pour caractériser plus précisément les effets de la température.

III.2. COURBE DE CALIBRATION A 2,35T

III.2.a. Protocole

Les images et mesures RMN ont été réalisées sur le spectromètre 2,35T équipé de l'antenne de surface ¹⁹F uniquement. Le fantôme est rempli d'héxafluorobenzène. Le mélange gazeux est réalisé à l'aide des débitmètres ; le robinet contrôle le débit d'injection du gaz dans le fantôme. Comme la pO_{2HFB} ne peut pas être mesurée directement avec Oxylite, elle est mesurée à l'entrée du fantôme. Lorsque la pO_{2inj} est stable depuis plus de 15 min, on considère que la pO_{2HFB} s'est équilibrée. Cette durée provient d'un constat empirique. Une fois la pO_{2HFB} connue, l'injection est stoppée et la séquence de cartographie de R_1 est lancée. Ce protocole est répété pour 6 mélanges gazeux différents. Lors de cette expérience, le bain marie n'a pas été utilisé. En effet, les

effets de la température sur la pO_2 n'étant pas complètement caractérisés (partie III.1.b. de ce chapitre), l'expérience s'est déroulée à température ambiante.

III.2.b. Résultats

La (Figure 25A) montre une image anatomique et une cartographie $T_{1\text{HFB}}$ réalisée au cours de l'expérience. Il s'agit d'une coupe selon le plan transverse (horizontal) de résolution $0,6 \times 0,6 \times 4$ mm. On reconnaît le cylindre correspondant au fantôme vue de dessus. On constate que l'intérieur du fantôme est relativement homogène en T_1 ce qui suggère que la $pO_{2\text{HFB}}$ est homogène dans le liquide.

Les valeurs du tableau (Figure 25B) correspondent aux valeurs de $T_{1\text{HFB}}$ en fonction de la $pO_{2\text{inj}}$ lors de la mesure. Il s'agit de moyennes réalisées à l'intérieur de régions d'intérêt comme indiqué en bleu sur la Figure 25A. On peut constater que l'écart type sur la mesure de T_1 n'excède jamais 3% de la valeur.

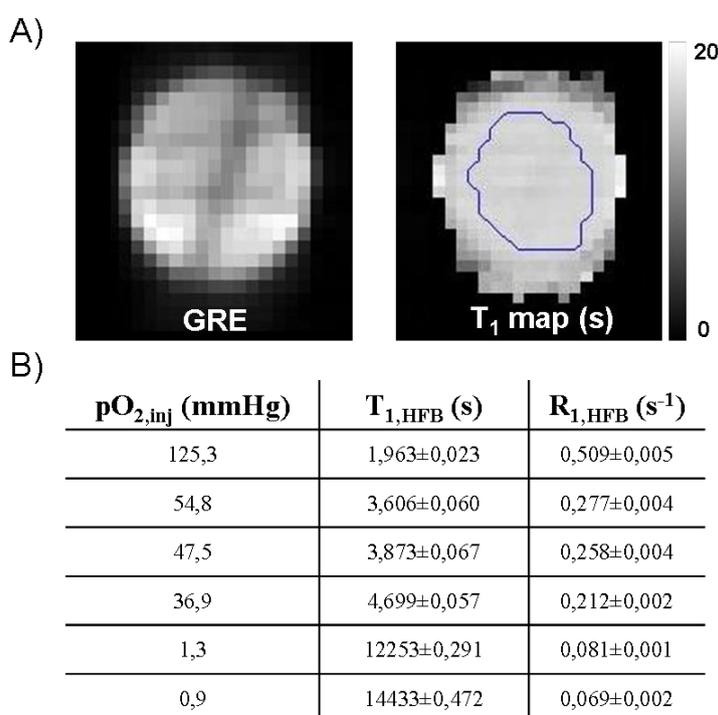


Figure 25 : A) Image anatomique en écho de gradient et cartographie T_1 du fantôme rempli de HFB. Le cercle bleu délimite une région d'intérêt. B) Tableau récapitulatif des valeurs de $T_{1\text{HFB}}$ en fonction de la $pO_{2\text{inj}}$ lors de la mesure.

La (Figure 26) montre la relation entre $R_{1\text{HFB}}$ et $pO_{2\text{inj}}$. L'ajustement de ces données par une droite montre que la vitesse de relaxation longitudinale du HFB est bien linéairement dépendante de la pression partielle en oxygène, avec comme paramètres :

$$R_1 = 0,0035 \cdot pO_2 + 0,0791$$

Équation 9

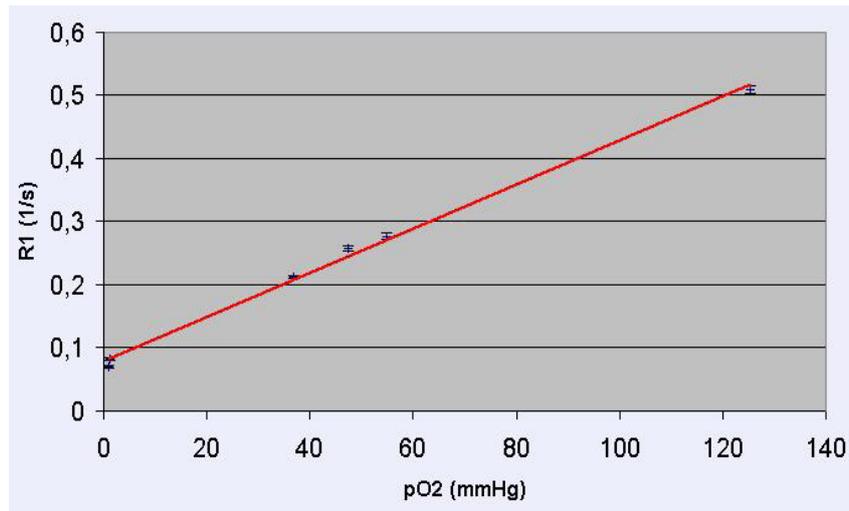


Figure 26 : Courbe de calibration de HFB à 2,35T. En bleu: valeurs de la vitesse de relaxation en fonction de la pO_{2inj} . En rouge: ajustement linéaire des données.

IV. MESURES DE LA PO₂ SUR RATS SAINS ET PORTEURS DE TUMEURS

IV.1. MATERIEL ET METHODES

IV.1.a. Modèle animal et protocole biologique

Toutes les expérimentations animales ont été menées sous les autorisations n°380521 pour le chercheur impliqué, A3851610004 pour les locaux d'expérimentation et B3851610003 pour les locaux d'animalerie. Toutes les manipulations d'animaux sont réalisées sous anesthésie. L'induction est pratiquée avec 5% d'isoflurane dans un mélange d'air et d'O₂ (FiO₂=40%). (L'isoflurane contenant du fluor, nous avons vérifié au préalable qu'il ne perturbait pas nos mesures IRM ¹⁹F). Que ce soit pour l'implantation des tumeurs ou les protocoles d'imagerie, l'animal est maintenu sous anesthésie au masque avec 2% d'isoflurane dans de l'air. La température rectale est maintenue à 37,0±0,5° au moyen d'une couverture chauffante électrique ou d'un circuit d'eau chauffant lorsque l'animal est dans l'imageur.

IV.1.b. Implantation et croissance des tumeurs cérébrales

On utilise le modèle de gliome C6 qui est un modèle de tumeur orthotopique. La lignée cellulaire est implantée chez des rats Wistar (175-200g). L'animal est placé dans un cadre stéréotaxique dans lequel deux barres d'oreilles et une barre à dents permettent l'immobilisation parfaite de la tête. La voûte crânienne est dégagée par une incision longitudinale au scalpel. Un trou de 1 mm de diamètre est pratiqué dans l'os du crâne, à 3 mm à droite du bregma. La préparation des cellules se fait comme décrit dans la thèse de (Sonja Zoula 2002). La suspension de cellules (10⁵ cellules dans 5 µL de milieu de croissance (D-MEM) complété avec 2% de glutamine et 1% de pénicilline streptomycine) est injectée en 5 min avec une seringue Hamilton, dans le noyau codé droit, i.e. à 5mm sous l'os. L'aiguille est relevée avec soin, 5min après injection, et la craniotomie est rebouchée avec de la cire végétale. La peau est refermée par suture. Les animaux sont imagés 13 jours après implantation des cellules.

IV.1.c. Injection intracrânienne de l'héxafluorobenzène

Avant l'injection du produit fluoré, des images anatomiques sont réalisées pour évaluer la position de la masse tumorale. Puis le rat est placé comme pour l'injection tumorale sur le cadre stéréotaxique. En se basant sur les images anatomiques IRM, l'héxafluorobenzène est injecté dans la tumeur avec une seringue Hamilton munie d'une aiguille fine 32G. Le volume de fluor est de 10µL injecté à 0,5µL/min à l'aide d'un pousse seringue (model KDS 310, GENEQ). Le diamètre fin de l'aiguille et le faible débit d'injection doivent permettre de réaliser une injection sans reflux [Rousseau et al (2007b)] [Rousseau et al (2007a)].

IV.1.d. Protocole IRM

Les expériences sont réalisées sur l'aimant horizontal à 2,35T. L'animal est installé dans le berceau et sa tête est maintenue par des barres d'oreilles et une barre à dents. Pour les images anatomiques proton, l'antenne de volume polarisée linéairement est utilisée en émission et réception. Des acquisitions FLASH réalisées en continu et dans les trois

directions, permettent d'imager le positionnement de l'animal en temps réel. Le « shim » est réglé de manière automatique grâce à une séquence de type FASTMAP [Gruetter(1993)]. Une image anatomique en écho de gradient et écho de spin est réalisée à l'aide d'une séquence Multi Gradient Echo Spin Echo (MGSE, 6 échos, 7 tranches, SE=60ms, ST=1mm). Puis on réalise l'accord et l'adaptation de l'antenne de surface fluor, une image anatomique fluor (MGSE) pour vérifier la distribution du produit et l'acquisition d'une carte de T₁ à l'aide de la séquence IR-FLASH.

IV.2. RESULTATS

IV.2.a. Détection in-vivo du fluor

L' image anatomique (Figure 27A) représente la superposition des acquisitions ¹⁹F et ¹H pour un rat porteur de tumeur (résolution=234*234*1000μm).

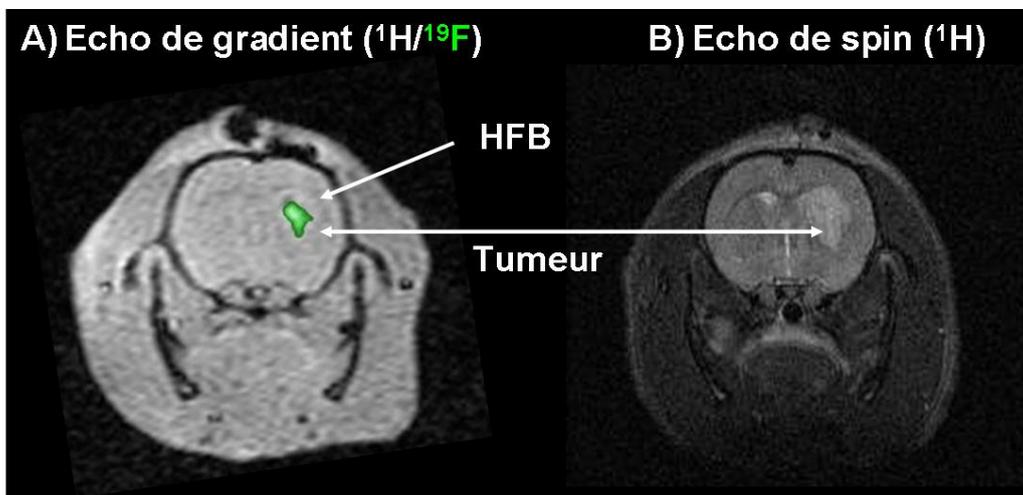


Figure 27 : Détection du fluor in vivo.

En correspondance, on voit également (Figure 27B) une image anatomique haute résolution (résolution=117x117x1000μm) en écho de spin qui montre la répartition de la tumeur. On s'aperçoit qu'avec les outils méthodologiques développés, on peut donc détecter du fluor in vivo dans le cerveau. Cette détection est possible pour une faible quantité de liquide (<5μL).

Dans ce cas le fluor est bien positionné à l'intérieur de la tumeur. On verra que ce n'est pas toujours le cas.

IV.2.b. Cartes de pO₂ sous air

Des cartes de T₁ ont été réalisées lorsque les animaux inspiraient de l'air (FiO₂=21%). La correspondance avec la pO₂ est réalisée à l'aide de la courbe de calibration de l'HFB déterminée précédemment. Il faut noter que cette courbe a été réalisée à 25°C et ne correspond donc pas à la température in vivo des rats. Néanmoins, d'après les études sur l'HFB, celui-ci ne devrait pas être sensible à la température [Zhao *et al* (2004)]. Les résultats numériques présentés ici sont moyennés sur l'ensemble du signal fluor détecté. Pour les animaux sains (n=3) on trouve une pO₂ de 35.8±5.3 mmHg dans le striatum. La mesure de cette pO₂ est stable dans le temps comme le montre la Figure 28A. Dans les

tumeurs (n=3), la pO₂ est de 10.2±4.2 mmHg. Le signal détecté est suffisamment important pour réaliser des cartes de pO₂ (Figure 28B).

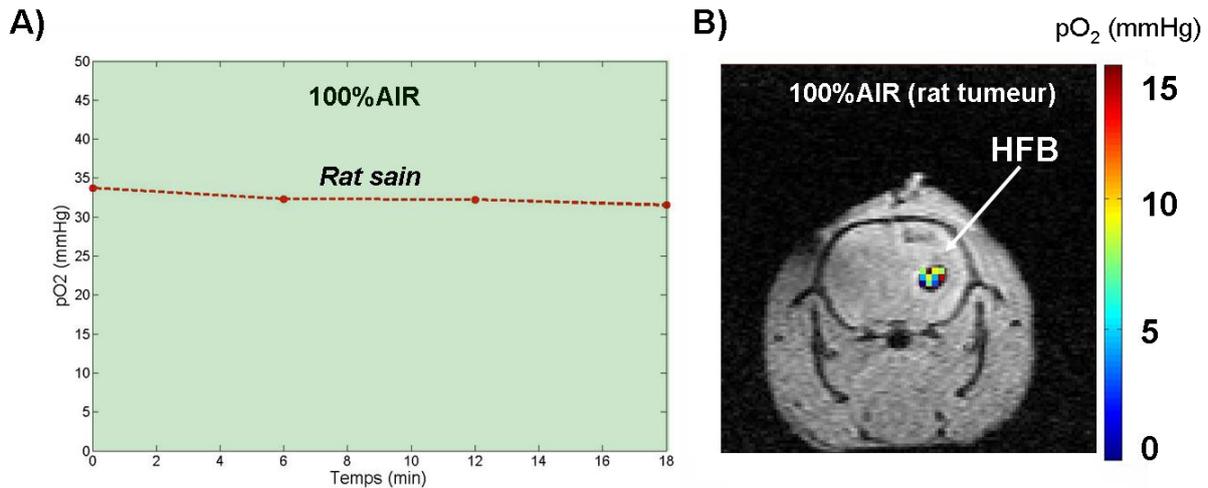


Figure 28 : Mesures in vivo de la pO₂ sous air. A) Suivi temporel de la pO₂ sur rat sain. B) Carte de pO₂ sur tumeur.

IV.2.c. Evaluation de la pO₂ sous différentes FiO₂

Pour plusieurs animaux, la FiO₂ a été changée au cours de l'expérience. Ainsi, on peut voir (Figure 29A) que l'on détecte des changements de pO₂ sur cerveau d'un rat sain pendant inspiration d'oxygène pur (FiO₂=100%). Les valeurs de pO₂ reviennent à leur valeur de base après retour à une FiO₂ de 21%.

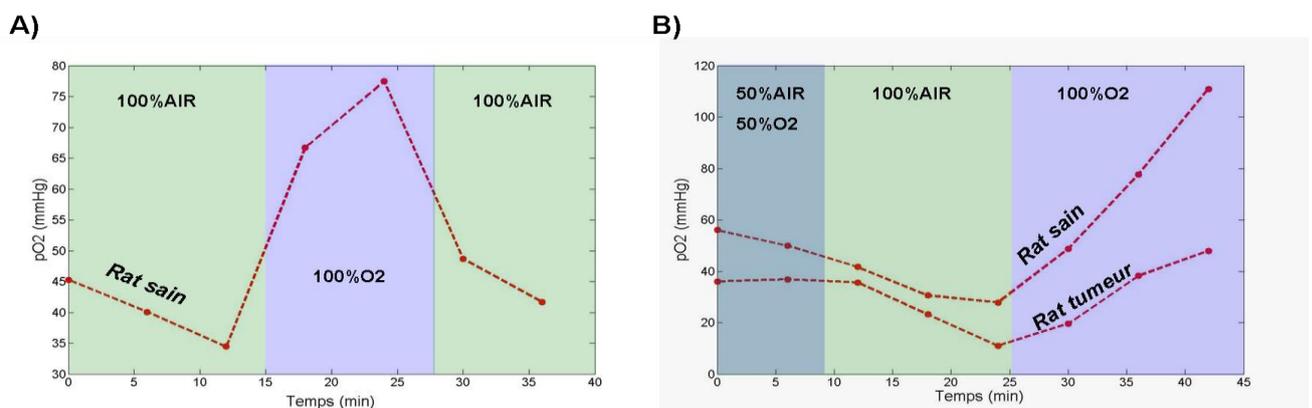


Figure 29 : Variations de la pO₂ avec un challenge gazeux. A) Variations avec un challenge AIR/O₂/AIR sur rat sain. B) Variations avec un challenge 50%AIR/50%O₂/AIR/O₂ sur rat sain et tumeur.

Des changements sont également visibles lors d'un challenge gazeux impliquant l'inspiration d'un mélange air/oxygène (FiO₂=50%), suivi d'air et finalement d'oxygène pur (Figure 29B). La méthode permet donc des mesures dynamiques de la pO₂. Ces variations ont également été observées sur tumeurs (Figure 29B). Sous oxygène pur, on mesure une pO₂ de 83±15 mmHg dans le cerveau sain (n=3) et une pO₂ de 30±16 mmHg dans la tumeur (n=3).

V. DISCUSSION SUR LA METHODE

Nous avons mis en place une méthode connue pour la mesure de la pO₂ *in vivo* basée sur l'approche FREDOM. La méthode semble donner des résultats précis, reproductibles et en accord avec la littérature. Elle permet de détecter des variations spatiales de pO₂ et des changements de pO₂ sous différentes conditions d'oxygénation.

Nous n'avons pas cherché au cours de ce travail de thèse à mener une étude biologique de caractérisation de l'hypoxie à l'aide de cette approche. Ceci est du en grande partie du fait du mauvais fonctionnement du spectromètre à 2,35T après le déménagement du laboratoire mais également du fait de la complexité méthodologique de l'approche. En effet, même si le principe de la méthode est simple, sa mise en œuvre est compliquée. En plus de combiner l'imagerie RMN sur deux noyaux différents, elle requiert dans le cas des méthodes de type FREDOM une chirurgie importante avant l'acquisition. Ainsi l'injection du produit fluoré requiert souvent plus de temps que l'imagerie IRM. Nous nous sommes également aperçu que l'injection intracérébrale était difficilement reproductible. Même en se basant sur les images anatomiques réalisées avant l'injection, il est difficile de placer le liquide fluoré dans la zone désirée. De plus, même en utilisant une aiguille de diamètre fin et un débit lent d'injection, des phénomènes de reflux sont souvent visibles (spécialement dans les tumeurs ou la pression interstitielle peut être élevée). Le fluor est, dans ce cas, rejeté en grande partie dans les ventricules avant les acquisitions IRM (Figure 30A). Enfin, des données histologiques que nous avons acquises sur certains rats (Figure 30B) suggèrent que l'injection intracérébrale du fluor peut endommager les tissus. On ne voit en effet plus de cellules à l'endroit où était placé le fluor, et l'on peut se demander quelle est la signification d'une mesure de la pO₂ dans un tel environnement.

La technique est donc en l'état peu adaptée à un suivi de l'hypoxie, mais reste néanmoins utile d'un point de vue méthodologique. Des études sur une optimisation de l'injection du produit [Rousseau *et al* (2007b)] ou l'utilisation d'émulsions lipidiques [McNab *et al* (2004)] pourraient permettre de simplifier la méthode. Dans ce projet de thèse, nous avons cependant préféré nous concentrer sur le développement d'une méthode non invasive de mesure de l'oxygénation sanguine qui fait l'objet des chapitres suivants.

Enfin, on peut mentionner que les méthodes d'imagerie ¹⁹F développées au cours du travail de thèse peuvent également être employées pour d'autres applications ; comme la détection de l'hypoxie avec l'emploi de fluoromisonidazole (ChapitreA.III.2.a.) ou la détection d'agents exogènes comme des cellules marquées avec du ¹⁹F [Bulte(2005)] [Ahrens *et al* (2005)].

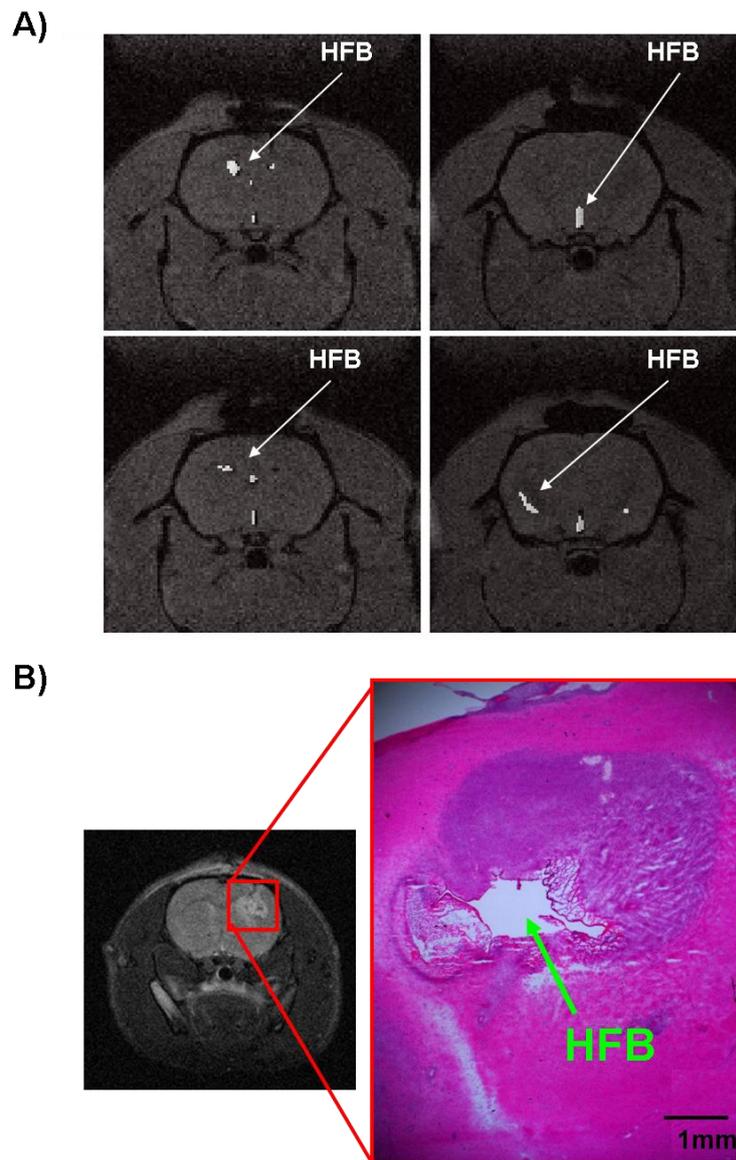


Figure 30 : A) Reflux de l'HFB dans les ventricules. Superpositions images $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ acquises à 2,35T B) Acquisition IRM et image histologique correspondante d'une tumeur après injection intracérébrale de l'HFB.

CHAPITRE C : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE MESURE DE LA SO₂ A PARTIR DE L'EFFET BOLD

Ce chapitre théorique détaille la méthode de mesure de la SO₂ que nous avons développée. La technique repose sur la quantification des effets induits sur le signal RMN par le paramagnétisme de la molécule de désoxyhémoglobine. En effet, la différence de susceptibilité magnétique entre le sang désoxygéné et le tissu induit des perturbations du champ magnétique autour des vaisseaux. L'effet sur le signal RMN est bien connu et se nomme effet BOLD (blood oxygen level dependent). Ce contraste est couramment utilisé pour l'imagerie dite « fonctionnelle », mais la quantification du phénomène n'est cependant pas évidente.

Pour extraire une estimation quantitative de SO₂, nous nous basons sur un modèle biophysique de l'évolution du signal RMN dans un voxel théorique. Ce voxel contient du tissu et un nombre important de vaisseaux répartis de façon homogène et isotrope dans l'espace. Dans la modélisation mathématique, les vaisseaux sanguins sont assimilés à des cylindres droits. Nous verrons comment la détermination de la perturbation du champ magnétique par un cylindre paramagnétique et une intégration statistique nous permet d'estimer l'évolution du signal RMN. Celui-ci dépend de plusieurs paramètres (BVf, T₂...) qu'il est difficile de distinguer en une seule expérience. Les deux techniques existantes de mesures de la SO₂ par RMN utilisent pour cela de lourdes procédures d'ajustement du modèle.

En se plaçant dans certaines conditions expérimentales, nous pouvons néanmoins simplifier le modèle. Dans ce cas, nous pouvons séparer les contributions en les mesurant de façon indépendante par des méthodes connues de l'IRM. Ainsi, en déterminant expérimentalement le volume sanguin, le temps de relaxation transverse et les variations spatiales du champ magnétique, nous obtenons en théorie une estimation de la SO₂ dans notre voxel.

Pour les lecteurs qui seraient peu intéressés par cette partie théorique, les résultats expérimentaux obtenus à l'aide de la méthode sont décrits dans le chapitre suivant. Il est également possible de comprendre le principe de la méthode (partie 3 de ce chapitre) sans avoir lu les principes physiques exposés dans les parties 1 et 2.

I. CARACTÈRE MAGNÉTIQUE DE L'HÉMOGLOBINE

Les propriétés magnétiques de la désoxyhémoglobine ont été caractérisées par Pauling et Coryell dès 1936 [Pauling and Coryell(1936)], bien avant la découverte de la résonance magnétique nucléaire. Ces auteurs mentionnent même dans leur introduction que Faraday avait déjà laissé une note à propos des propriétés magnétiques du sang.

I.1. ORIGINES

Une molécule d'hémoglobine est constituée de 4 hèmes (groupement prosthétique) et de 4 chaînes de globine (enchaînement d'acides aminés). Chaque hème accueille en son centre un atome de fer, dont le rôle est de lier l'oxygène de façon réversible (Figure 31A).

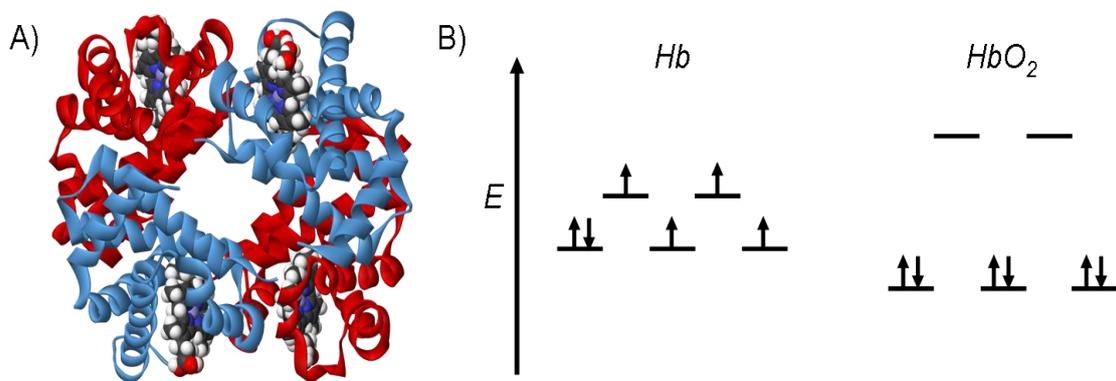


Figure 31 : A) Représentation d'une molécule d'hémoglobine. B) Répartition des niveaux d'énergie des électrons de la dernière couche de l'atome de fer pour la désoxyhémoglobine (Hb) et l'oxyhémoglobine (HbO₂).

Le fer se trouve à l'état ferreux (Fe²⁺), et possède 6 électrons sur la dernière orbitale (3d). Lorsqu'il est lié à la molécule d'hémoglobine, l'oxygène crée un champ fort qui provoque un écart énergétique important entre les deux niveaux d'énergie des orbitales 3d. Ainsi, tous les électrons se trouvent appariés au niveau d'énergie le plus bas. Sans la molécule d'O₂, l'écart d'énergie est plus faible et les électrons se répartissent entre les deux niveaux, laissant ainsi 4 électrons célibataires (Figure 31B). Ces derniers donnent un caractère paramagnétique à la désoxyhémoglobine.

I.2. EVALUATION DE LA SUSCEPTIBILITE MAGNETIQUE DU SANG

L'origine de l'effet BOLD provient du fait que le sang, lorsqu'il n'est pas totalement oxygéné, ne possède pas la même susceptibilité magnétique que les tissus environnants. Lorsque l'échantillon est placé à l'intérieur de l'aimant RMN, on observe des variations locales dans le champ magnétique qui influencent le signal RMN.

Pour quantifier l'effet BOLD il faut d'abord estimer cette différence de susceptibilité magnétique sang/tissu.

1.2.a. Définition de la susceptibilité magnétique

La susceptibilité magnétique caractérise la propriété d'un matériau à perturber et à interagir avec un champ magnétique. Lorsque cette grandeur est négative, on parle de matériau diamagnétique. Lorsqu'elle est positive, on parle de paramagnétisme. Cette grandeur est sans dimension, il faut toutefois mentionner qu'elle dépend du système d'unité dans lequel elle est exprimée. Ainsi pour passer d'une valeur de susceptibilité exprimée dans le système MKS (mètre, kilogramme, seconde) au système CGS (centimètre, gramme, seconde) on utilise la relation :

$$\chi_{MKS} = 4\pi \cdot \chi_{CGS} \quad \text{Équation 10}$$

Pour être cohérent avec l'ensemble des publications traitant de la susceptibilité magnétique du sang, dans le reste de l'exposé, on parlera de susceptibilité volumique (par opposition aux susceptibilités massiques ou molaires) que l'on exprimera dans le système CGS. On peut également noter que le mouvement orbital des électrons, le spin électronique et le spin nucléaire répondent à l'application d'un champ magnétique. C'est la totalité des réponses qui détermine la susceptibilité magnétique d'un matériau. Dans le cas du spin nucléaire, l'effet est faible, mais c'est celui que l'on observe à l'aide de la RMN. Pour la susceptibilité du sang, ce sont surtout les électrons qui sont à l'origine des effets sur le signal RMN.

1.2.b. Susceptibilité magnétique du sang

Pour estimer la susceptibilité magnétique du sang, on peut se baser sur les calculs effectués par [Spees *et al* (2001)]. La susceptibilité magnétique du sang peut être calculée en estimant la susceptibilité de chacun de ses composants, principalement du plasma et des globules rouges :

$$\chi_{sang} = (1 - Hct) \cdot \chi_{plasma} + Hct \cdot \chi_{GR} \quad \text{Équation 11}$$

avec χ_{plasma} la susceptibilité magnétique du plasma, χ_{GR} celle des globules rouges et Hct le taux d'hématocrite (où la proportion volumique de globules rouges dans le sang).

Le plasma est composé en grande partie d'eau et de quelques protéines sans métaux magnétiques qui constituent 7% de son poids. Les susceptibilités de toutes les protéines ne contenant pas de métaux magnétiques étant relativement similaires, on peut écrire :

$$\chi_{plasma} = 0,93 \cdot \chi_{H_2O} + 0,07 \cdot \chi_{protéines} = -0,72 \cdot 10^{-6} \quad \text{Équation 12}$$

Où χ_{H_2O} désigne la susceptibilité magnétique de l'eau et $\chi_{protéines}$ celle des protéines ne contenant pas de métaux.

Les globules rouges sont composés d'eau et de molécules d'hémoglobine. Soit :

$$\chi_{GR} = (1 - [Hb]_{GR}) \cdot \chi_{H_2O} + [Hb]_{GR} \cdot \chi_{Hb} \quad \text{Équation 13}$$

Avec $[Hb]_{GR} = 0,265 \cdot 10^{-3}$ la fraction volumique de l'hémoglobine dans les globules rouges. La susceptibilité magnétique de l'hémoglobine est représentée par χ_{Hb} .

Enfin la molécule d'hémoglobine est diamagnétique lorsqu'elle est sous forme totalement oxygénée (susceptibilité $\chi_{\text{dia,Hb}}$). Comme il a été vu dans la partie précédente, la susceptibilité de l'hémoglobine contient également un terme paramagnétique qui dépend de la quantité d'oxygène liée aux atomes de fer. Soit :

$$\chi_{\text{Hb}} = \chi_{\text{dia,Hb}} + (1 - \text{SO}_2) \cdot \chi_{\text{dHb}} \quad \text{Équation 14}$$

$\chi_{\text{dia,Hb}} = -7,8364 \cdot 10^{-7}$ a été mesurée par Cerdonio [Cerdonio *et al* (1977)]. χ_{dHb} , la susceptibilité de l'hémoglobine désoxygénée, peut être calculée à partir du moment magnétique moyen du Fe²⁺ dans l'hémoglobine. Elle a été déterminée par Pauling et Coryell [Pauling and Coryell(1936)] : $\chi_{\text{dHb}} = 0,996 \cdot 10^{-6}$.

On peut donc écrire à l'aide de la combinaison des équations 13 et 14 :

$$\chi_{\text{GR}} = -0,736 \cdot 10^{-6} + (1 - \text{SO}_2) \cdot 0,264 \cdot 10^{-6} \quad \text{Équation 15}$$

Finalement la susceptibilité magnétique du sang est donnée par :

$$\chi_{\text{sang}} = \text{Hct} \cdot (-0,736 \cdot 10^{-6} + (1 - \text{SO}_2) \cdot 0,264 \cdot 10^{-6}) + (1 - \text{Hct}) \cdot (-0,722 \cdot 10^{-6}) \quad \text{Équation 16}$$

On voit que la susceptibilité magnétique du sang dépend de la saturation en oxygène de l'hémoglobine.

1.2.c. Différences de susceptibilité magnétique

Si l'on s'intéresse à la différence de susceptibilité existant entre les globules rouges entièrement oxygénés et entièrement désoxygénés, on obtient simplement d'après l'équation 15 :

$$\Delta\chi_{\text{GR}} = 0,264 \cdot 10^{-6} \quad \text{Équation 17}$$

Cette différence de susceptibilité magnétique a été estimée dans plusieurs études. [Spees *et al* (2001)] ont mesuré par deux méthodes différentes un $\Delta\chi_{\text{GR}}$ de $0,27 \pm 0,03 \cdot 10^{-6}$ (à 37°C). [Thulborn *et al* (1982)] ont mesuré un $\Delta\chi_{\text{GR}} = 0,2 \cdot 10^{-6}$. [Weisskoff and Kihne(1992)] ont mesuré la susceptibilité des globules rouges par rapport à celle de l'eau pure, pour différentes oxygénations. Ils en déduisent une différence de susceptibilité par rapport à l'eau de $1,57 \cdot 10^{-7}$ pour la désoxyhémoglobine, et de $-0,26 \cdot 10^{-7}$ pour l'oxyhémoglobine, soit un $\Delta\chi_{\text{GR}} = 0,18 \cdot 10^{-6}$. Toutes ces valeurs expérimentales s'accordent bien avec celle théorique donnée par l'équation 17. Pour le reste de l'étude, on prendra $\Delta\chi_{\text{GR}} = 0,264 \cdot 10^{-6}$.

Pour obtenir la différence de susceptibilité entre le sang entièrement oxygéné et entièrement désoxygéné, on multiplie simplement $\Delta\chi_{\text{GR}}$ par Hct.

Etant donné que le sang complètement oxygéné possède une susceptibilité magnétique équivalente à celle des tissus environnants [Schenck(1996)], l'origine du contraste BOLD provient donc de la différence de susceptibilité entre le sang oxygéné et désoxygéné.

$$\Delta\chi_{sang/tissu} = 0,264 \cdot 10^{-6} \cdot Hct \cdot (1 - SO_2) \quad \text{Équation 18}$$

Pour une SO_2 de 50, 60, 70 et 80% et une hématoците de 40%, on trouve une différence de susceptibilité entre sang et tissu de $\Delta\chi = 0,0528, 0,0422, 0,0317, 0,0211$ ppm respectivement.

II. MODELISATION MATHEMATIQUE

Pour comprendre les effets induits par la présence de sang non oxygéné sur le signal RMN, plusieurs études ont employé des simulations informatiques de type Monté Carlo [Boxerman *et al* (1995)]. Il a également été proposé des modélisations mathématiques du phénomène. Celles-ci diffèrent selon le nombre de paramètres pris en compte (en particulier l'impact de la diffusion moléculaire). Ces modélisations ont permis de constater qu'il était possible de quantifier par IRM des caractéristiques de la microvascularisation. Ainsi, à partir de ces modèles, des méthodes de mesures quantitatives de volume sanguin et d'index de taille des vaisseaux ont été développées ces dernières années au laboratoire [Troprès *et al* (2001)].

Ici, nous nous basons sur le modèle mathématique décrit par Haacke et Yablonskiy [Yablonskiy and Haacke(1994)]. Ce modèle est une étude statistique sur les perturbations du champ magnétique induites par un ensemble d'objets de susceptibilité connue, placés dans un volume donné et soumis à un champ magnétique extérieur. Cette théorie est valable pour des objets présentant des caractéristiques géométriques quelconques mais une solution analytique n'est accessible que dans le cas des sphéroïdes (comprenant sphères et cylindres). Dans le cas qui nous intéresse, la modélisation des vaisseaux sanguins par des cylindres droits permet d'obtenir une équation analytique simple de l'évolution RMN du signal.

Les principes suivants sont illustrés par des simulations que nous avons réalisées avec le logiciel Matlab.

II.1. MODELISATION DES PERTURBATIONS DU SIGNAL RMN INDUITES PAR DES INHOMOGENEITES DE CHAMP MAGNETIQUE

On considère un voxel RMN de volume V composé de :

- un compartiment de susceptibilité magnétique χ_t et de volume V_t représentant le tissu. Le temps de relaxation transverse du tissu est noté T_2^t .
- un compartiment constitué d'un nombre important $N \gg 1$ d'objets (sphéroïdes) orientés et positionnés aléatoirement et représentant les vaisseaux sanguins. Chaque sphéroïde est caractérisé par une susceptibilité magnétique χ_b et un volume v_b (Figure 32). Le volume occupé par l'ensemble des sphéroïdes est noté V_b . La fraction volumique occupée par les sphéroïdes ($BV_f = V_b/V$) est supposée assez faible pour qu'il n'y ait pas d'interactions entre eux. Le temps de relaxation transverse du sang est noté T_2^b . Les paramètres géométriques des sphéroïdes (forme, taille, orientation) sont représentés par la fonction Ω_n .

La densité des spins à l'intérieur du voxel, ρ , est supposée homogène. On considère un champ magnétique externe homogène B_0 . Le calcul est effectué dans le cas de l'approximation du régime statique ; c'est-à-dire que l'on estime que le déphasage des spins créé par les inhomogénéités de champ apparaît avant celui créé par la diffusion des spins. Cette condition est favorisée par la présence de champs magnétiques intenses

et une grande différence de susceptibilité magnétique entre les objets et le milieu. A priori pour $B_0 > 4T$, le régime statique est valable pour tous les vaisseaux sanguins. On verra dans le Chapitre F, que dans notre cas cette hypothèse est vérifiée. On considère enfin ω_0 la fréquence de précession dans le repère tournant et les résultats sont présentés dans ce référentiel. Les développements méthodologiques exposés ici ont été réalisés par [Yablonskiy and Haacke(1994)].

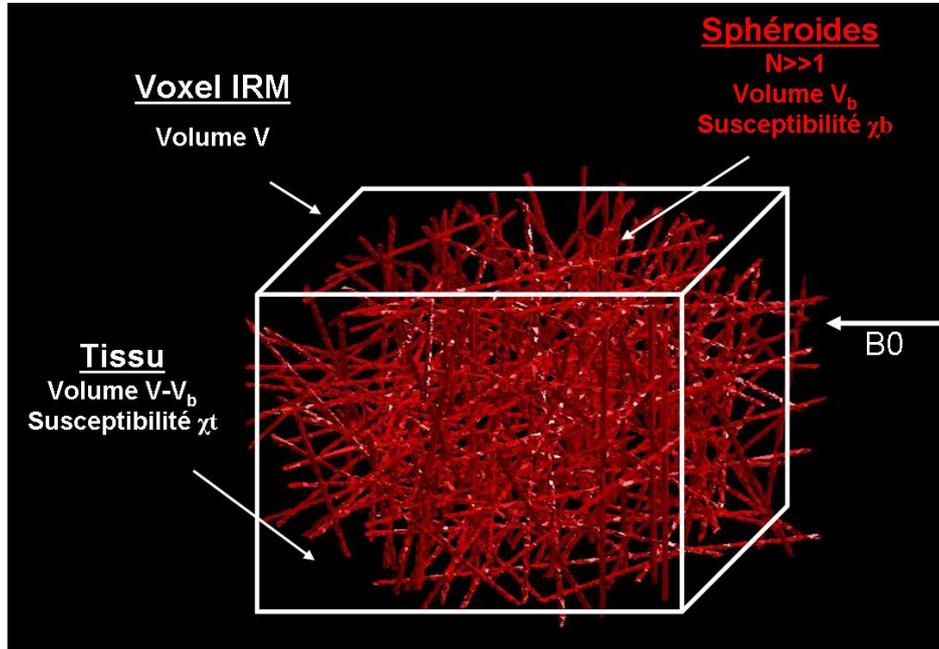


Figure 32 : Représentation du voxel IRM théorique.

Selon les lois de l'électromagnétisme, les objets vont perturber le champ statique et l'on peut considérer qu'ils « induisent » au point r un champ additionnel $\delta B(r)$ tel que :

$$\delta B(r) = \sum_1^N \delta B_n(r - r_n, \Omega_n) \quad \text{Équation 19}$$

avec δB_n la contribution du $n^{\text{ième}}$ objet situé au point r_n .

Dans le cas d'une expérience RMN ne comportant qu'une seule impulsion RF suivie d'une période d'acquisition, le signal FID normalisé sur le volume V peut être représenté par :

$$S(t) \propto \frac{1}{V} \int_V \exp(-t/T_2(r)) \exp(-i\omega(r)t) dr \quad \text{Équation 20}$$

La fréquence locale de précession $\omega(r)$ est la somme de toutes les contributions des objets et correspond à la projection du champ magnétique local sur la direction du champ externe B_0 ($B(r)$). Dans l'approximation Lorentzienne, on peut écrire :

$$B(r) = B_0(1 + 4\pi\chi_t/3) + \delta B(r) \text{ dans le tissu} \quad \text{Équation 21}$$

$$\text{Et } B(r) = B_0(1 + 4\pi\chi_b/3) + \delta B(r) \text{ dans les objets} \quad \text{Équation 22}$$

L'intégration du signal est réalisée sur tout le volume V , incluant le volume occupé par les objets (V_b) et le volume en dehors ($V_t=V-V_b$). On peut donc exprimer $S(t)$ sous la forme :

$$S(t) = S_t(t) + S_b(t) \quad \text{Équation 23}$$

où S_t et S_b sont respectivement les contributions au signal des compartiments tissulaires et sanguins.

L'équation 20 décrit l'évolution du signal RMN dans un voxel particulier (i.e pour une distribution donnée des objets magnétiques dont les caractéristiques sont fixées). Pour obtenir un comportement plus général du signal, il faut réaliser une étude statistique sur l'ensemble des positions et paramètres (orientation, forme, taille, etc.) possibles des objets. On introduit alors les fonctions de distributions des positions $P_1(r_n)$ et la fonction de distribution des paramètres $P_2(\Omega_n)$.

- Etant donné le faible volume occupé par l'ensemble des objets ($V_b \ll V$), on considère que la fonction de distribution des positions est homogène, et on peut écrire :

$$P_1(r_n)dr_n = \frac{dr_n}{V - V_b} \cong \frac{dr_n}{V} \quad \text{Équation 24}$$

- Dans le cas des sphéroïdes, le paramètre Ω dépend de trois termes décrivant la forme et l'orientation du sphéroïde. Soit :

$$P_2(\Omega) = P_l(l)P_{\sigma_0}(\sigma_0)P_\alpha(\alpha) \quad \text{Équation 25}$$

$P_l(l)$ représente la fonction de distribution de la distance entre les deux foyers du sphéroïde (ou taille du sphéroïde).

P_α représente la fonction de distribution de l'angle existant entre l'axe de rotation du sphéroïde et le champ magnétique externe. Pour une distribution uniforme de l'axe de direction des objets, on peut écrire :

$$P_\alpha(\alpha) = \frac{\sin(\alpha)}{2}, 0 \leq \alpha \leq \pi \quad \text{Équation 26}$$

P_{σ_0} représente la fonction de distribution de la forme du sphéroïde. Comme on a fait l'hypothèse que tous les objets ont la même forme, le paramètre σ_0 est fixe.

Les contributions au signal des compartiments tissulaire et sanguin (cette fois-ci moyennées sur l'ensemble des distributions) peuvent s'écrire :

$$\overline{S_b(t)} \propto \rho BVf \exp(-t/T_2^b - i\omega_0 t) s_b(t) \quad \text{Équation 27}$$

$$\overline{S_t(t)} \propto \rho (1 - BVf) \exp(-t/T_2^t - i\omega_0 t) s_t(t) \quad \text{Équation 28}$$

avec s_b et s_t des facteurs sans dimension représentant la décroissance du signal due à la présence des objets dans le voxel et définis par :

$$s_b(t) = \int \frac{P_2(\Omega)}{v(\Omega)} d\Omega \int_{v_b} \exp[-i\delta\omega_b(r, \Omega)t] dr \quad \text{Équation 29}$$

$$\text{et } s_t(t) = \left[\int P_2(\Omega) d\Omega \left(1 - \frac{1}{V} \times \int_{v_t} (1 - \exp[-i\delta\omega_t(r, \Omega)t]) dr\right) \right]^N \quad \text{Équation 30}$$

avec $\delta\omega_b(r, \Omega)$ et $\delta\omega_t(r, \Omega)$ l'écart à la fréquence ω_0 à l'intérieur et à l'extérieur de l'objet avec les paramètres Ω et situé au point r .

Dans le cas statistique N infini, V infini, $N/V = \text{constante}$, la fonction s_t peut s'écrire :

$$s_t(t) = \exp[-BVf f(t, \Omega)]$$

avec

$$f(t, \Omega) = \int \frac{d\Omega}{v(\Omega)} \int_{v_t} \{1 - \exp[-i\delta\omega_t(r, \Omega)t]\} dr \quad \text{Équation 31}$$

Ces équations sont générales pour n'importe quel système à deux compartiments. On ne peut aller plus loin dans les calculs que si la forme des objets est spécifiée.

L'approximation du modèle proposé par Yablonskiy [Yablonskiy and Haacke(1994)] consiste à considérer les vaisseaux sanguins comme des cylindres droits infiniment longs. C'est ce que nous faisons maintenant.

II.2. PERTURBATION DU CHAMP MAGNETIQUE PAR UN CYLINDRE PARAMAGNETIQUE

Pour développer les équations précédentes, on cherche ici à calculer la perturbation du champ statique induite par la présence d'un cylindre de longueur infinie dans le voxel.

On considère donc un cylindre de rayon R et faisant un angle θ par rapport au champ B_0 . La différence de susceptibilité magnétique entre le cylindre et le tissu se note $\Delta\chi$.

La perturbation du champ magnétique créée par un objet se calcule en résolvant l'équation de Laplace pour le potentiel magnétique (Φ) :

$$H = -\nabla\Phi, \quad \nabla^2\Phi = 0 \quad \text{Équation 32}$$

avec comme conditions aux surfaces de l'objet, la continuité du potentiel et la continuité de la composante normale de l'induction magnétique.

Pour une géométrie cylindrique, l'équation de Laplace admet une solution analytique. Ainsi, la distorsion du champ magnétique créée par le cylindre est donnée par :

$$\delta B(r; \varphi) = \begin{cases} \frac{\delta\omega}{\gamma} \frac{R^2}{r^2} \cos 2\varphi \sin^2 \theta & \text{pour } r > R \\ \frac{\delta\omega}{\gamma} \left(\cos^2 \theta - \frac{1}{3} \right) & \text{pour } r < R \end{cases} \quad \text{Équation 33}$$

Ou r et φ représentent la distance et l'angle azimutal dans un plan orthogonal au cylindre (Figure 33). γ le rapport gyromagnétique. $\delta\omega$ est défini par :

$$\delta\omega = 2 \pi \gamma \Delta\chi B_0 \quad \text{Équation 34}$$

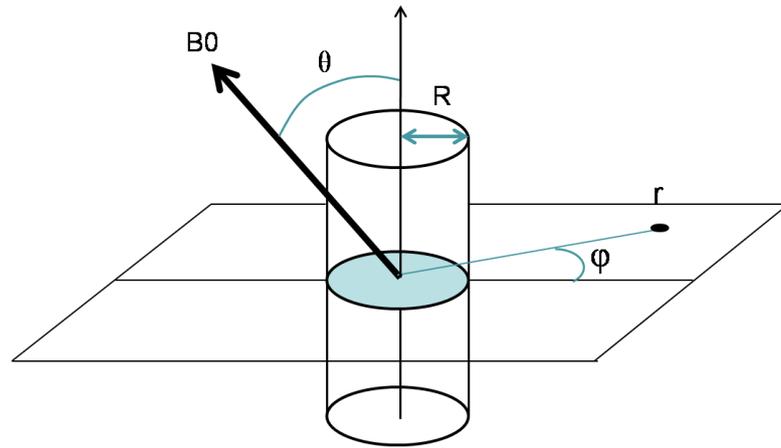


Figure 33 : Représentation du cylindre.

Lorsque le cylindre est parallèle à B_0 (Figure 34A), on trouve :

$$\delta B(r; \varphi) = \begin{cases} 0 & \text{pour } r > R \\ \frac{2}{3\gamma} \delta\omega & \text{pour } r < R \end{cases} \quad \text{Équation 35}$$

Lorsque le cylindre est perpendiculaire à B_0 (Figure 34B), on trouve :

$$\delta B(r; \varphi) = \begin{cases} \frac{\delta\omega}{\gamma} \frac{R^2}{r^2} \cos 2\varphi & \text{pour } r > R \\ -\frac{\delta\omega}{3\gamma} & \text{pour } r < R \end{cases} \quad \text{Équation 36}$$

On remarque que la distorsion du champ est maximale lorsque le cylindre est perpendiculaire à B_0 et aux bords du cylindre. Dans ce cas, quand $r=4,47R$, il ne reste que 5% du signal.

Lorsque le cylindre est parallèle au champ, on n'observe pas de perturbation du champ à l'extérieur du cylindre.

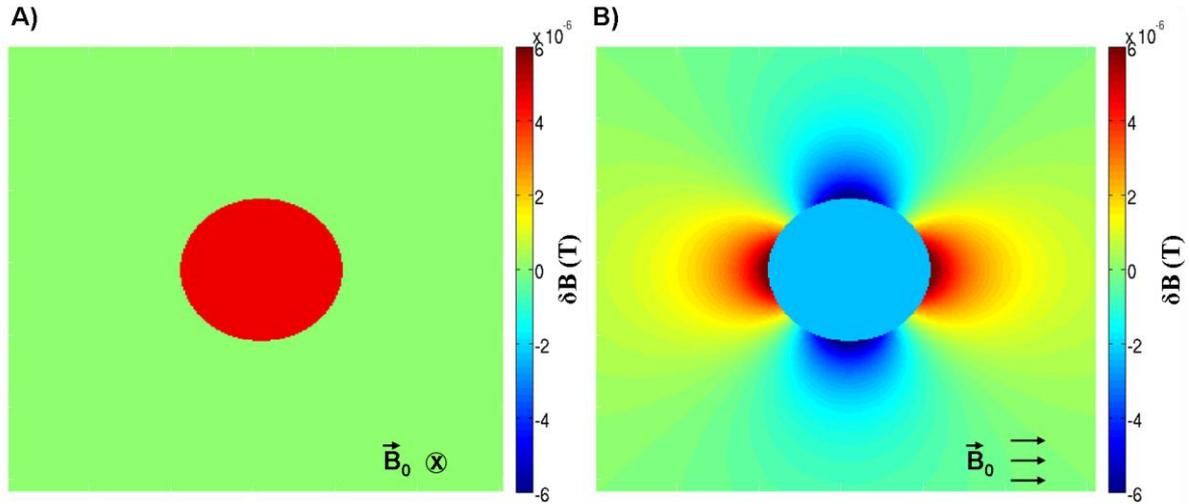


Figure 34 : Perturbations du champ magnétique $B_0=4.7T$ par un cylindre présentant une différence de susceptibilité magnétique $\Delta\chi=0.264$ ppm par rapport au milieu dans lequel il est placé. A) cylindre placé parallèlement à B_0 . B) cylindre placé perpendiculairement à B_0 .

II.3. PERTURBATION DU SIGNAL RMN PAR UN ENSEMBLE DE CYLINDRES PARAMAGNETIQUES

Connaissant maintenant la perturbation du champ B_0 par un cylindre, il est possible de développer les termes des équations 29 et 30 pour un ensemble de N cylindres magnétiques infiniment longs. Ces développements ont été décrits par Yablonskiy pour la fonction S_t [Yablonskiy and Haacke(1994)] et Kiselev pour la fonction S_b [Kiselev and Posse(1999)].

Pour la fonction de déphasage dans le tissu, il a été trouvé :

$$\overline{S_t(t)} \propto \rho (1 - BVf) \cdot \exp(-R_2^t \cdot t) \cdot \overline{f_t(t)} \quad \text{Équation 37}$$

$$\text{avec } \overline{f_t(t)} = \exp(-BVf \cdot \frac{1}{3} \cdot \int_0^1 (2+u) \cdot \sqrt{1-u} \cdot \frac{1 - J_0(\frac{3}{2} \cdot t/t_c \cdot u)}{u^2} \cdot du) \quad \text{Équation 38}$$

où J_0 représente la fonction de Bessel d'ordre zéro. t_c est homogène à un temps et est défini par :

$$t_c = \frac{1}{\gamma \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \Delta\chi \cdot B_0} \quad \text{Équation 39}$$

Le comportement temporel de la fonction f_t est représenté Figure 35 pour $B_0=4,7T$. La différence de susceptibilité magnétique entre le sang et le tissu ($\Delta\chi$) est calculée pour HCT=40%, $SO_2=60\%$. On considère un BVf de 3% dans le voxel. Dans ce cas la constante t_c vaut 4,27ms.

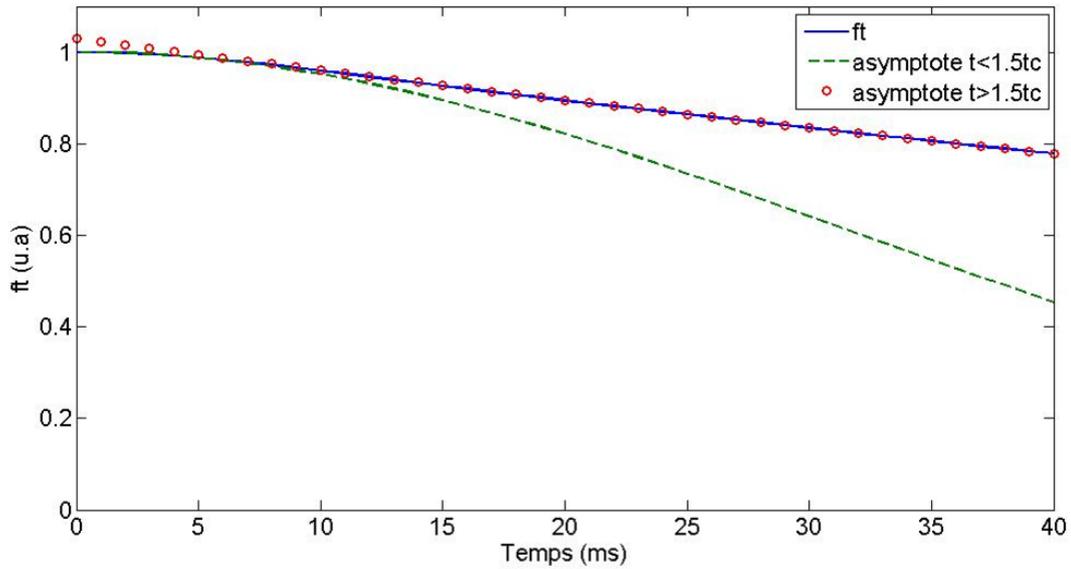


Figure 35 : Fonction de déphasage f_t du tissu et ses deux asymptotes obtenues pour $t < 1,5t_c$ et $t > 1,5t_c$.

On peut observer deux comportements différents de la fonction S_t . Pour $t < 1,5 \cdot t_c$ l'évolution peut être considérée comme quadratique (en échelle log). Pour les temps longs l'évolution est linéaire.

Pour la fonction de déphasage dans le compartiment sanguin, il a été trouvé :

$$\overline{S_b(t)} \propto \rho \cdot BV_f \cdot \exp(-R_2^b \cdot t) \cdot \overline{f_b(t)}$$

$$\text{avec } \overline{f_b(t)} = \int_0^\pi \frac{\sin(\theta)}{2} \cdot \exp(-i \cdot \frac{t}{t_c} \cdot (\cos(\theta)^2 - \frac{1}{3})) d\theta \quad \text{Équation 40}$$

Avec R_2^b le temps de relaxation transverse du sang (qui dépend de l'oxygénation).

Le comportement temporel de la fonction S_b est représenté Figure 36 pour les mêmes paramètres que la Figure 35.

Comme pour la fonction de déphasage dans le tissu, on retrouve deux asymptotes aux temps courts et longs. On observe également une décroissance du signal plus rapide que pour la fonction f_t .

Remarque: Si l'on considère les cylindres comme des vaisseaux sanguins, alors le paramètre $\Delta\chi$ correspond à celui déterminé dans la partie I.2.c. de ce chapitre. Nous constatons donc que le signal RMN est dépendant de l'oxygénation sanguine à travers le paramètre t_c .

Comme il a également été noté, le T_2 du sang est aussi sensible à l'oxygénation sanguine.

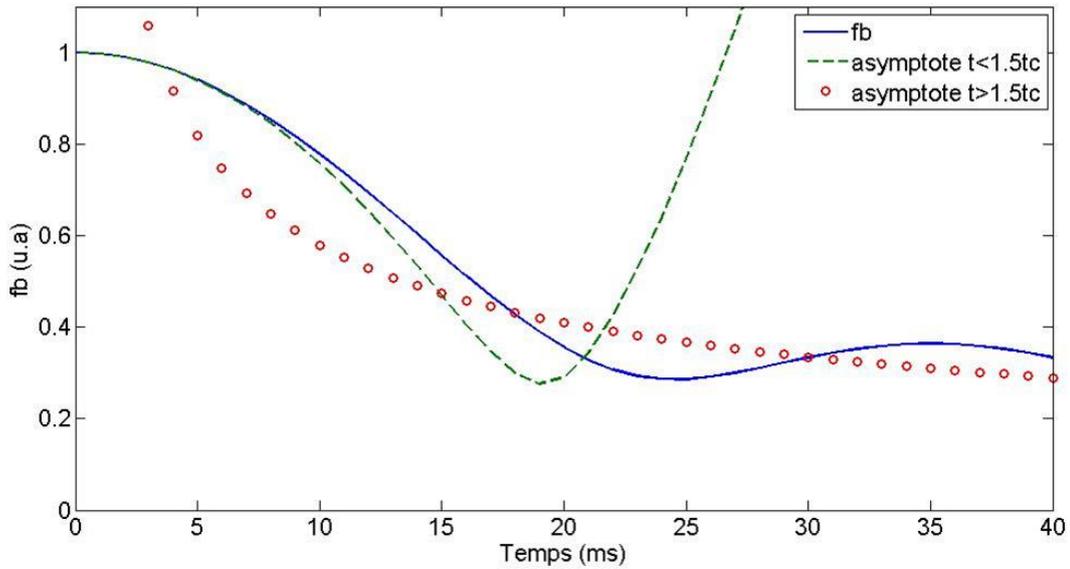


Figure 36 : Fonction de déphasage f_b du sang et ses deux asymptotes obtenues pour $t < 1,5t_c$ et $t > 1,5t_c$.

II.4. EVOLUTION DU SIGNAL DU VOXEL

D'après les équations précédentes, l'évolution du signal RMN dans le voxel s'écrit :

$$S(t) = S_0 \left((1 - BV_f) \cdot \exp(-R_2^t \cdot t) \cdot \overline{f_i(t)} + BV_f \cdot \exp(-R_2^b \cdot t) \cdot \overline{f_b(t)} \right) \quad \text{Équation 41}$$

avec S_0 le signal au temps $t=0$ qui dépend de l'aimantation du voxel et des paramètres de la séquence IRM.

Cette équation n'est cependant pas complète. En effet, jusqu'à présent, il a été considéré que le champ B_0 était homogène. Or il s'avère que cette condition n'est en pratique jamais respectée. Dans ce cas, on observe, en plus des inhomogénéités locales créées par les vaisseaux, des inhomogénéités créées sur une distance largement supérieure aux dimensions du voxel.

La fonction de distribution spatiale de ces inhomogénéités est notée $b_{macro}(r)$ et on trouve une autre fonction de déphasage (distincte de F_t et F_b) notée $F(t)$:

$$F(t) = \frac{1}{V} \int \exp[-i \cdot \gamma \cdot b_{macro}(\vec{r}) \cdot t] \cdot dr \quad \text{Équation 42}$$

Si $b_{macro}(r)$ est une fonction linéaire (présence d'un gradient de champ G_x à l'intérieur du voxel de taille Δx), alors F s'exprime sous la forme :

$$F(t) = \text{sinc} \left(\frac{\gamma}{2} \cdot G_x \cdot \Delta x \cdot t \right) \quad \text{Équation 43}$$

On observe sur la Figure 37 l'évolution temporelle de la fonction F en présence de différents gradients de champ magnétique.

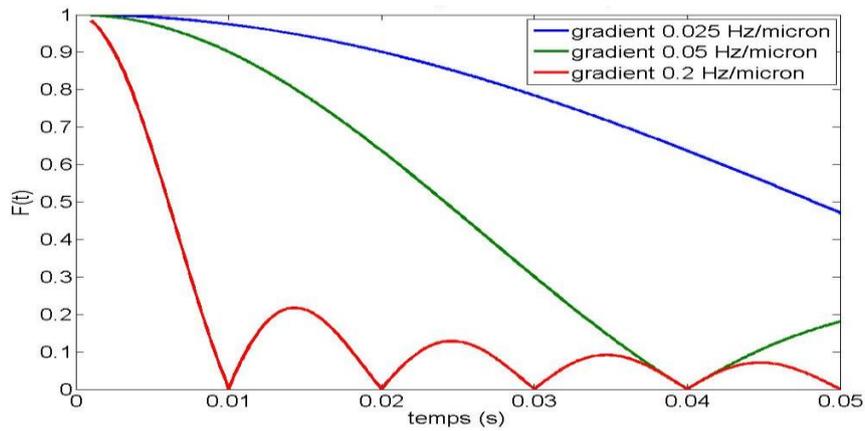


Figure 37 : Fonction $F(t)$ en présence de différents gradients de champ.

Enfin, si l'on considère maintenant l'ensemble des perturbations du champ magnétique, l'évolution du signal RMN dans le voxel en fonction du temps est donnée par :

$$S(t) = S_0 \cdot F(t) \cdot ((1 - BVf) \cdot \exp(-R_2^t \cdot t) \cdot \overline{f_t(t)} + BVf \cdot \exp(-R_2^b \cdot t) \cdot \overline{f_b(t)}) \quad \text{Équation 44}$$

En résumé, le signal RMN dans un voxel dépend des T_2 du sang et du tissu et des caractéristiques géométriques des objets. Les contributions au déphasage micro- ou macroscopiques peuvent être décrites et modélisées. C'est sur ce modèle que s'appuie notre méthode de mesure de la SO_2

Remarque : il est souvent considéré que la décroissance du signal RMN sous l'influence des inhomogénéités de champ magnétique est exponentielle avec une constante de temps T_2^* . Ici, on s'aperçoit que ceci n'est vrai que si cette décroissance est considérée après $1,5tc$ et surtout si les effets des inhomogénéités macroscopiques sont faibles.

III. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

III.1. DISTINCTION ENTRE LES DIFFÉRENTES CONTRIBUTIONS AU SIGNAL

III.1.a. Méthodes existantes

Comme il a été mentionné dans le chapitre A.III.3.c. , quelques études ont utilisé le modèle précédent pour extraire une information sur l'oxygénation sanguine. En effet, on remarque que dans l'équation 44, l'évolution du signal dépend de la saturation en oxygène de l'hémoglobine. Mais on s'aperçoit également que le signal dépend d'autres facteurs comme le volume sanguin ou le temps de relaxation transversal du tissu. La principale difficulté des méthodes de mesure de la SO₂ est donc de différencier les contributions au signal.

An et Lin se servent des comportements asymptotiques du signal [An and Lin(2000)]. La différence entre le comportement quadratique aux temps courts et linéaire des temps longs permet d'estimer le volume sanguin. Le T₂ est estimé à l'aide d'une méthode décrite dans [Yablonskiy and Haacke(1997)]. Enfin la SO₂ est calculée à partir de l'asymptote aux temps longs.

Les premiers instants de la décroissance ($<1,5t_c$) du signal sont essentiels pour estimer le volume sanguin. En pratique, puisque la valeur du signal au temps $t=0$ n'est pas accessible du fait de l'application des gradients d'imagerie, ils utilisent une séquence IRM qui échantillonne le signal pendant un écho de spin (GESSE : gradient echo sampling of the spin echo). Le signal acquis au temps d'écho de spin correspond au signal de référence ($t=0$) lorsque les spins sont tous en phase. Dans leur première étude, l'influence du compartiment intravasculaire est négligée ainsi que les effets des inhomogénéités de champ statique. Dans des publications ultérieures [An and Lin(2002a)] [An and Lin(2003)], ces effets sont analysés et partiellement corrigés par des méthodes RMN.

Plus récemment He et Yablonskiy se sont servis du modèle complet [He and Yablonskiy(2007)] [He *et al* (2008)]. Pour obtenir des conditions initiales proches de la réalité, ils se servent d'estimations réalisées avec la méthode asymptotique d'An et Lin. Le T₂ du sang est estimé d'après les mesures réalisées par [Silvennoinen *et al* (2003)].

Un exemple d'analyse des données par cette approche est donné Figure 38.

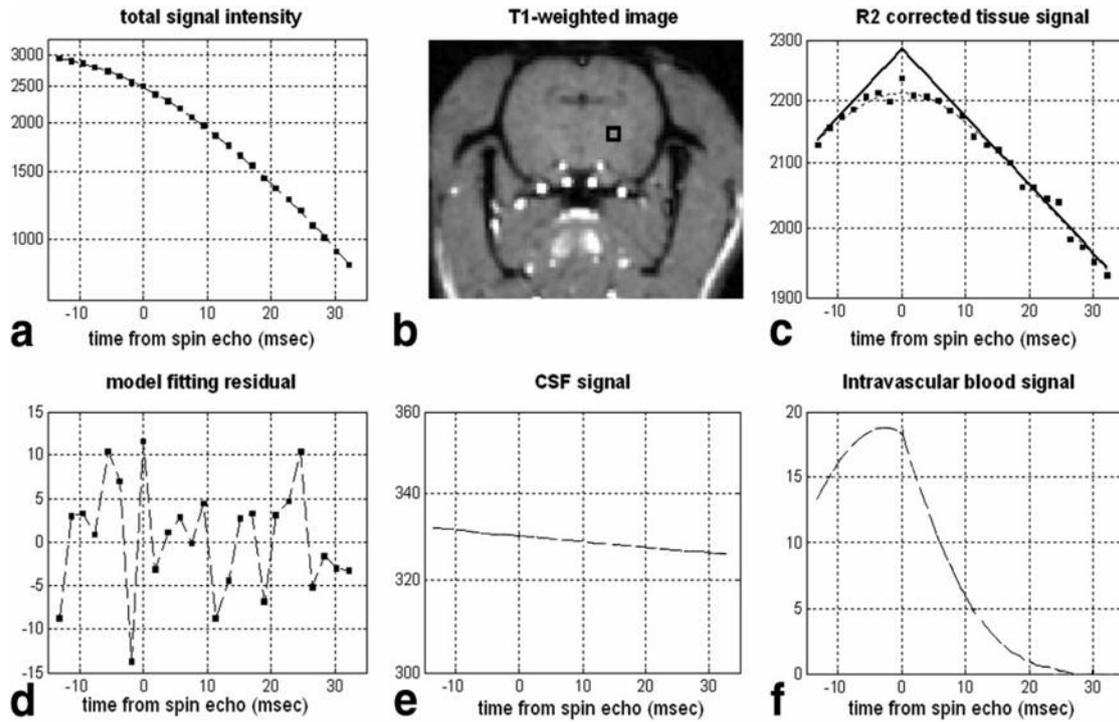


Figure 38 : Analyse de données acquises à l'aide d'une séquence GESSE sur un rat par méthode [He et al (2008)]. A) signal (carrés) et ajustement du modèle (pointillés) provenant d'un voxel indiqué par un rectangle sur l'image pondérée T_1 (B). C) contribution extravasculaire au signal après soustraction des contributions intravasculaire (F), du CSF (E), et du R_2 . D) résidus de l'ajustement.

III.1.b. Notre approche

Bien que donnant des résultats encourageants, les méthodes précédentes requièrent un rapport signal sur bruit élevé. Les équations dépendent en effet d'un grand nombre de paramètres et ajuster de telles équations sur le signal peut être gourmand en temps et est extrêmement sensible aux conditions initiales.

Pour les deux approches, c'est la différence de comportement entre les temps courts et longs qui permet faire la distinction entre les paramètres BVf et SO_2 . En effet si l'on considère le signal à des temps $>1,5t_c$, on peut écrire pour la fonction de déphasage dans le tissu :

$$s(t) = Cte \cdot F(t) \cdot \exp(-R_{2r} \cdot t - BVf \cdot \gamma \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \Delta\chi_0 \cdot Hct \cdot (1 - lSO_2) \cdot B_0 \cdot t) \quad \text{Équation 45}$$

Le T_2 du sang étant faible à des champs magnétiques élevés [Silvennoinen et al (2003)], et le compartiment sanguin étant également soumis au déphasage induit par les inhomogénéités de champ, la contribution du compartiment sanguin à la décroissance du signal à ces instants peut raisonnablement être négligée. Ainsi l'équation 45 représente l'évolution du signal dans le voxel.

Dans cette équation simplifiée, on s'aperçoit que la distinction entre les différentes contributions n'est pas possible à travers une seule expérience car tous les paramètres sont placés dans la fonction exponentielle.

Or, il existe plusieurs moyens IRM de mesurer indépendamment certains de ces paramètres. Notre méthode consiste à mesurer séparément les inhomogénéités macroscopiques de champ $F(t)$, le volume sanguin BVf et le T_2 du tissu. Si tous ces paramètres sont connus, il ne reste dans l'équation 45 que les termes Cte et SO_2 à estimer. Cette équation simple peut alors être aisément ajustée sur les données IRM. On peut noter également que pour cette approche, il n'est pas nécessaire d'échantillonner le signal après un écho de spin puisque l'on ne s'intéresse au signal qu'à partir des temps longs ($t > 1,5t_c$). Dans notre approche, l'évolution temporelle du signal RMN est donc échantillonnée par une séquence classique de multi-écho de gradient (MGE) (Figure 43).

Nous allons maintenant détailler les techniques de mesures de $F(t)$, BVf et T_2 . On présentera également le protocole d'acquisition et de traitement des données que nous avons mis en œuvre.

III.2. CORRECTION DES LARGES INHOMOGENEITES DE CHAMP MAGNETIQUE

La proximité des cavités nasales, d'interface air/tissu ou simplement des variations spatiales du champ B_0 entraîne des inhomogénéités de champ magnétique qui influencent la décroissance du signal RMN. Les variations spatiales de ces inhomogénéités s'étendent sur des longueurs plus importantes que la taille du voxel (partie II.4. de ce chapitre). Plusieurs méthodes ont été proposées ces dernières années pour corriger les effets de ces inhomogénéités sans compromettre la mesure des effets microscopiques induits par la présence de la désoxyhémoglobine dans le compartiment sanguin. Ces stratégies se basent sur (i) la réduction de la taille des pixels et des tranches [Reichenbach *et al* (1997)], (ii) des profils radiofréquence particuliers [Chen and Wyrwicz(1999)], (iii) la compensation des gradients de sélection de tranche [Yang *et al* (1998)] [Glover(1999)] ou (iv) des techniques de correction post-acquisition [Fernández-Seara and Wehrli(2000)]. Ces méthodes ont été comparées dans plusieurs articles [Merboldt *et al* (2000)] [Wadghiri *et al* (2001)] [Franconi *et al* (2006)].

Pour notre étude, nous avons considéré deux approches. La première a été proposée par He [He and Yablonskiy(2007)] et consiste à évaluer la fonction $F(t)$ à l'aide d'une cartographie du champ magnétique. La seconde utilise les qualités d'une acquisition à haute résolution spatiale dans le plan et d'un codage de phase dans la direction de tranche.

III.2.a. Utilisation d'une carte de champ magnétique.

Le champ B au point r peut se décomposer en un champ statique intense, B_0 , et en un champ variable $\Delta B(r)$ de plus faible amplitude que l'on cherche à caractériser.

$$B(\vec{r}) = B_0 + \Delta B(\vec{r}) \quad \text{Équation 46}$$

Il est possible d'utiliser l'information de la phase du signal RMN pour obtenir des cartes de la distribution du champ magnétique à l'intérieur de l'échantillon. En effet la phase du signal RMN peut s'écrire :

$$\varphi(\tau, \vec{r}) = \varphi_0 - 2\pi\gamma\Delta B(\vec{r}) \quad \text{Équation 47}$$

φ_0 étant inconnu, pour obtenir des cartes de champ magnétique, on fait l'acquisition de la phase à un temps τ_1 et une seconde à τ_2 . La différence des phases conduit à :

$$\Delta B(\vec{r}) = \frac{\varphi(\tau_1, \vec{r}) - \varphi(\tau_2, \vec{r})}{2\pi\gamma(\tau_1 - \tau_2)} \quad \text{Équation 48}$$

Pratiquement, on utilise une séquence à deux échos de gradient (Figure 39). De plus, la phase étant bornée entre $-\pi$ et π , les acquisitions de phase doivent d'abord être déroulées à l'aide d'un algorithme spécifique [Jenkinson(2003)].

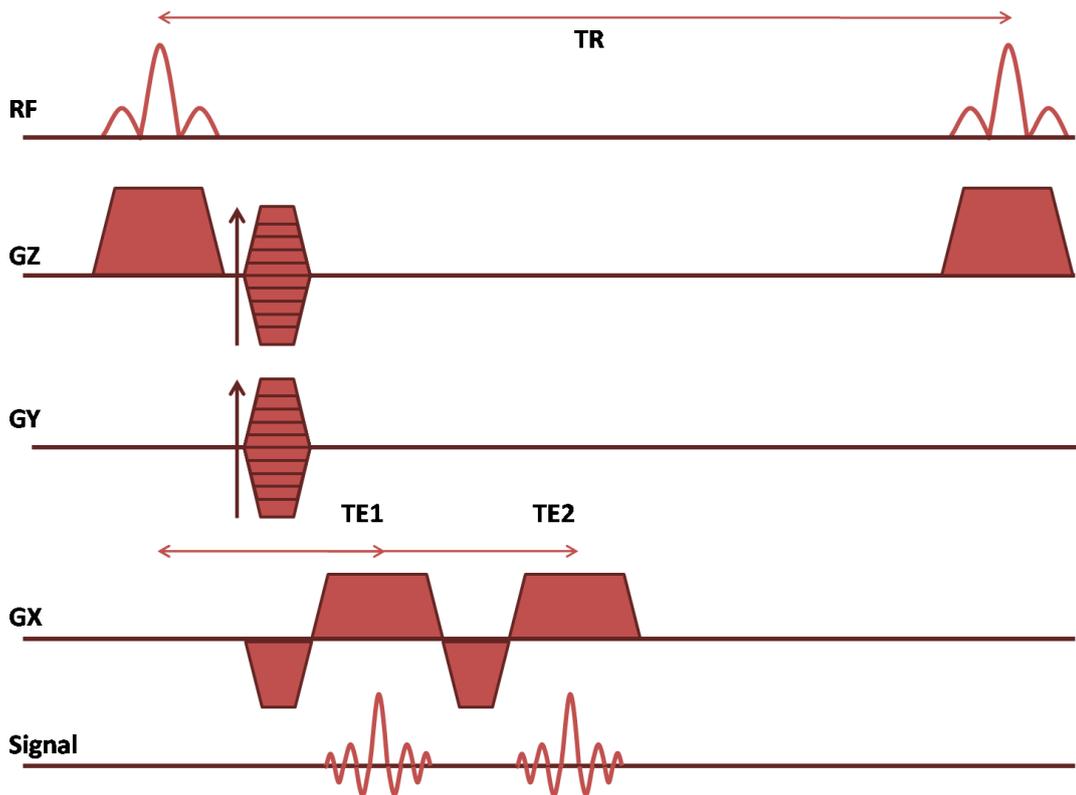


Figure 39 : Chronogramme de la séquence 2GE3D.

Le principe de la méthode de correction des inhomogénéités consiste à acquérir une carte de champ magnétique avec une résolution spatiale supérieure à celle utilisée pour mesurer l'évolution du signal RMN. Ainsi pour chaque voxel de la séquence MGE, on peut échantillonner la distribution spatiale des inhomogénéités de champ ($b_{\text{macro}}(r)$) (Figure 40A).

En intégrant ces informations conformément à l'équation 42, on obtient alors la fonction $F(t)$ qui sera prise en compte lors de l'ajustement des données de la MGE (Figure 40B).

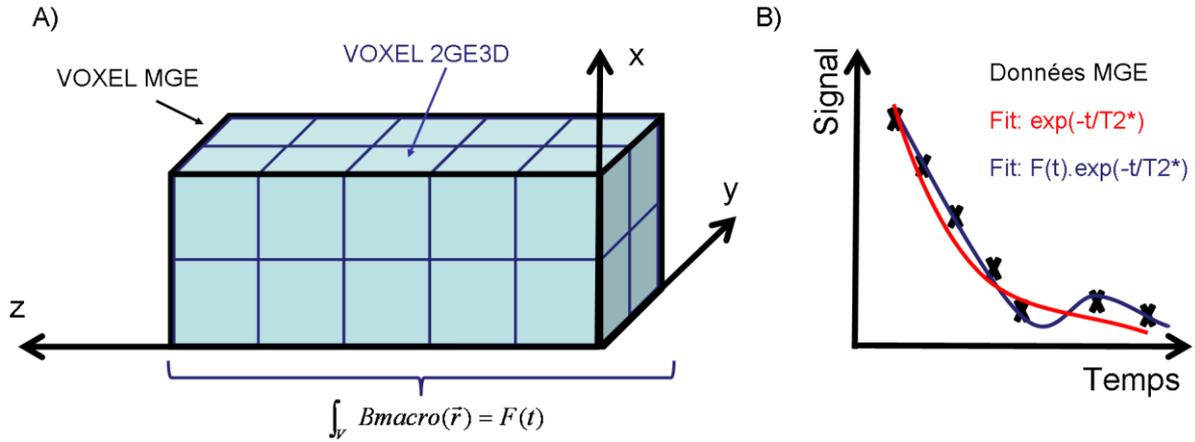


Figure 40 : Méthode de correction des inhomogénéités de champ par acquisition d'une carte de champ magnétique. A) suréchantillonnage spatial de la carte de champ et intégration des données pour obtenir $F(t)$. B) incorporation de la fonction $F(t)$ dans l'ajustement des données MGE.

Dans la pratique, pour réduire l'influence du bruit et /ou d'éventuels gros vaisseaux dans le voxel, la carte de champ acquise est d'abord lissée (ajustement polynomial). Cette méthode possède l'avantage de pouvoir corriger les effets sur toutes les acquisitions MGE suivantes, en supposant que la distribution du champ ne varie pas au cours du temps.

III.2.b. Acquisitions 3D haute résolution.

Pour comprendre pourquoi l'augmentation de la résolution spatiale permet de corriger les effets des inhomogénéités, on considère dans un premier temps que les inhomogénéités de champ sont représentées par un gradient constant le long de la direction z. A un temps TE, la distribution de l'aimantation selon z peut alors s'écrire :

$$M_{TE}(z) = M(z) \cdot e^{-i\gamma G_z TE z} \quad \text{Équation 49}$$

Si l'on considère un voxel de dimension Δz , alors le déphasage induit est :

$$\phi = \gamma \cdot G_z \cdot TE \cdot \Delta z \quad \text{Équation 50}$$

On s'aperçoit que l'amplitude du déphasage est réduite par l'utilisation d'un temps d'écho court. Cette amplitude est également réduite lorsque l'on augmente la résolution spatiale. La technique de correction des inhomogénéités utilisant une réduction de l'épaisseur de tranche en 2D se nomme SSAVE (sub-slice averaging imaging). Il est possible d'étendre ce principe aux trois directions de l'espace, mais dans cette configuration, on ne peut cependant que réduire les effets du déphasage et non pas les corriger.

Pour comprendre les effets de correction de champ magnétique lorsque l'on réalise des acquisitions 3D avec un codage de phase dans la direction de tranche, on peut regarder les effets du déphasage sur le plan de Fourier. Le signal temporel acquis est proportionnel à la transformée de Fourier de l'aimantation :

$$S(kz) = TF(M(z) \cdot e^{-i\gamma G_z TE z}) \quad \text{Équation 51}$$

Soit d'après le théorème de translation dans l'espace de Fourier :

$$S(kz) = M(kz - kz_0) \quad \text{Équation 52}$$

Ce gradient, représentant les inhomogénéités, induit donc une translation de l'espace k d'une valeur de $kz_0 = \gamma Gz TE$ (Figure 42).

Si l'on fait l'acquisition 2D du voxel, on ne considère que le point $kz=0$ de l'espace k (Figure 42). En présence du gradient de champ, le signal RMN que l'on acquiert est donc plus faible (Figure 42B).

On considère maintenant une acquisition avec échantillonnage de l'espace k dans la direction z (Figure 42). Le signal correspond à la transformée de Fourier inverse de S. D'après le théorème de la translation, l'effet du gradient n'aura donc d'impact que sur la phase du signal et non sur son amplitude. Ceci n'est cependant possible que si la largeur de la fenêtre spectrale acquise est suffisamment grande pour contenir toutes les informations du spectre translaté. Sachant que cette largeur est inversement proportionnelle à la résolution de l'image, la correction est donc favorisée par une résolution spatiale élevée.

La technique de correction des inhomogénéités utilisant une réduction de l'épaisseur de tranche en 3D se nomme GESEPI. La technique nommée ZSHIM consiste également à acquérir les données en 3D mais plutôt que de chercher à augmenter la taille de l'espace k, ce dernier est déplacé dans l'une ou l'autre des directions pour inclure la translation de kz_0 .

En considérant astucieusement ces diverses acquisitions, on peut remonter à une image débarrassée des effets des inhomogénéités de champ magnétique principal.

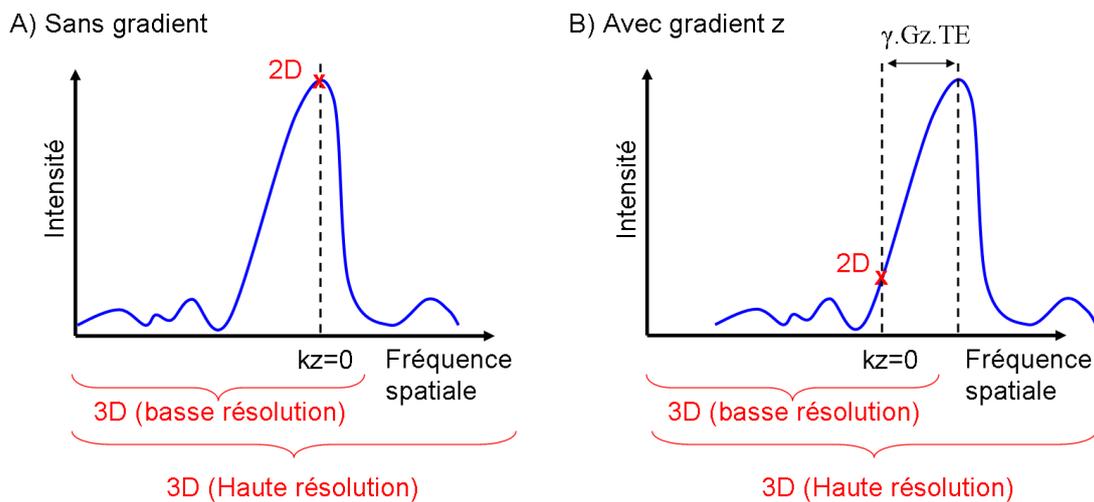


Figure 41 : Effets dans l'espace de Fourier de la présence d'un gradient de champ magnétique. A) Acquisitions d'images 2D ou 3D (basse et haute résolution spatiale) en l'absence de gradient. B) Acquisitions en présence du gradient induisant une translation du spectre. Dans ce cas, seule l'acquisition 3D haute résolution permet d'acquérir le spectre complet.

Les principes précédents sont illustrés pour un gradient constant dans une direction, ce qui peut être une bonne approximation du fait que les inhomogénéités s'étendent sur

des longueurs plus importantes que la taille du voxel. Néanmoins si les gradients ne sont plus linéaires, le facteur de phase peut être exprimé à l'aide de séries de Fourier et dans l'espace de Fourier on obtient une superposition d'échos multiples avec une amplitude et une translation donnée. Les méthodes sont alors, en théorie, encore efficaces.

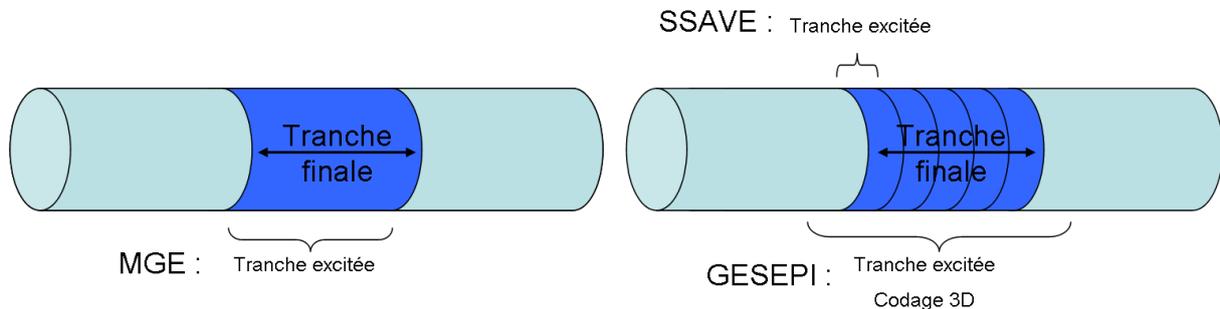


Figure 42 : Méthodes de correction des inhomogénéités de champ par acquisition haute résolution SSAVE et GESEPI.

Augmenter la résolution spatiale permet de corriger les effets des inhomogénéités mais possède l'inconvénient de réduire également le rapport signal sur bruit dans l'image. Pour récupérer du signal, les données issues de la haute résolution sont alors additionnées en amplitude pour atteindre l'épaisseur de tranche voulue (Figure 42).

Pour notre application, nous nous sommes basés sur la méthode GESEPI avec également une augmentation de la résolution spatiale dans le plan xy. Les données sont donc acquises avec une séquence MGE3D de résolution spatiale élevée et sont ensuite moyennées spatialement pour obtenir la résolution équivalente à une séquence MGE2D classique.

III.3. MESURES DU VOLUME SANGUIN

Plusieurs méthodes IRM permettent l'estimation du volume sanguin. Ces techniques reposent sur l'injection d'un agent de contraste exogène et peuvent être classées en deux catégories : les techniques de mesures à l'état stationnaire (qui s'effectuent lorsque le produit est reparti de manière uniforme dans la circulation sanguine) par opposition aux techniques de bolus d'agent de contraste [Rosen *et al* (1989)]. Pour notre méthode, nous utilisons la technique stationnaire décrite dans [Troprès *et al* (2001)].

Le principe de cette méthode repose sur le fait que l'introduction d'un agent de contraste intravasculaire dans la circulation sanguine diminue fortement le temps de relaxation transverse T_2 du sang et perturbe les T_2 et T_2^* extravasculaires. Comme pour la présence de molécules d'hémoglobine, l'agent engendre des inhomogénéités de champ autour des vaisseaux [Troprès *et al* (2001)] et le signal est proportionnel à :

$$S(t) \propto \exp(-BVf \cdot \gamma \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \Delta\chi_{USPIO} \cdot B_0 \cdot t) \quad \text{Équation 53}$$

La méthode consiste simplement à mesurer (à l'aide d'une séquence MGE) le R_2^* des tissus avant et après injection du produit de contraste dont la susceptibilité magnétique est précisément connue.

Ensuite la fraction volumique sanguine est déterminée par :

$$BVf = \frac{3}{4 \cdot \pi \cdot \gamma \cdot \Delta\chi_{USPIO} \cdot B_0} (R_2^* \text{ après} - R_2^* \text{ avant}) \quad \text{Équation 54}$$

Remarque : A partir du modèle mathématique exposé précédemment dans lequel la diffusion moléculaire a été prise en compte, une technique stationnaire a été proposée pour mesurer un index de la taille des vaisseaux sanguins à l'intérieur du voxel (VSI) [Troprès *et al* (2001)]. La méthode de mesure est similaire à celle décrite pour obtenir le BVf mais elle consiste à analyser en plus des variations de R_2^* , les variations de R_2 avant et après injection de l'agent de contraste.

Pour obtenir une mesure simultanée de BVf et VSI, on peut alors utiliser une séquence MGESE.

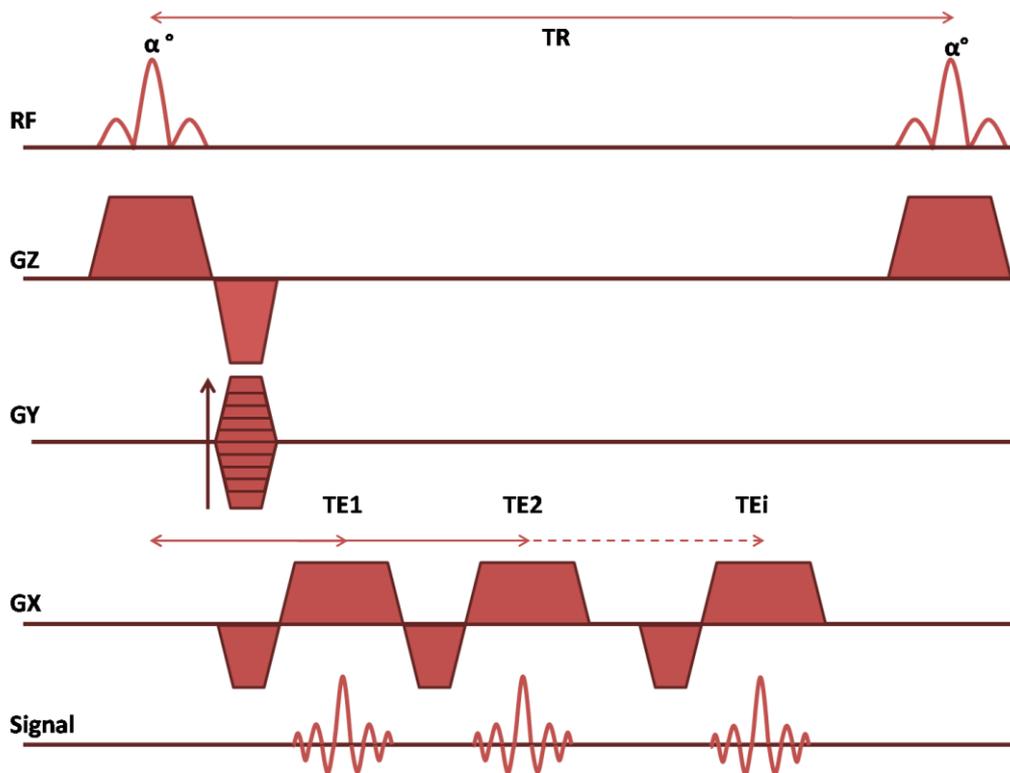


Figure 43 : Chronogramme de la séquence MGE.

III.4. MESURE DU TEMPS DE RELAXATION TRANSVERSE

Pour déterminer le temps relaxation T_2 , nous utilisons une séquence classique d'IRM de multi écho de spin dont le chronogramme est donné Figure 44. Cette séquence permet de refocaliser l'aimantation transverse à différents temps et donc d'échantillonner la courbe de décroissance du signal. En ajustant les termes d'une fonction exponentielle sur les données, on estime le T_2 .

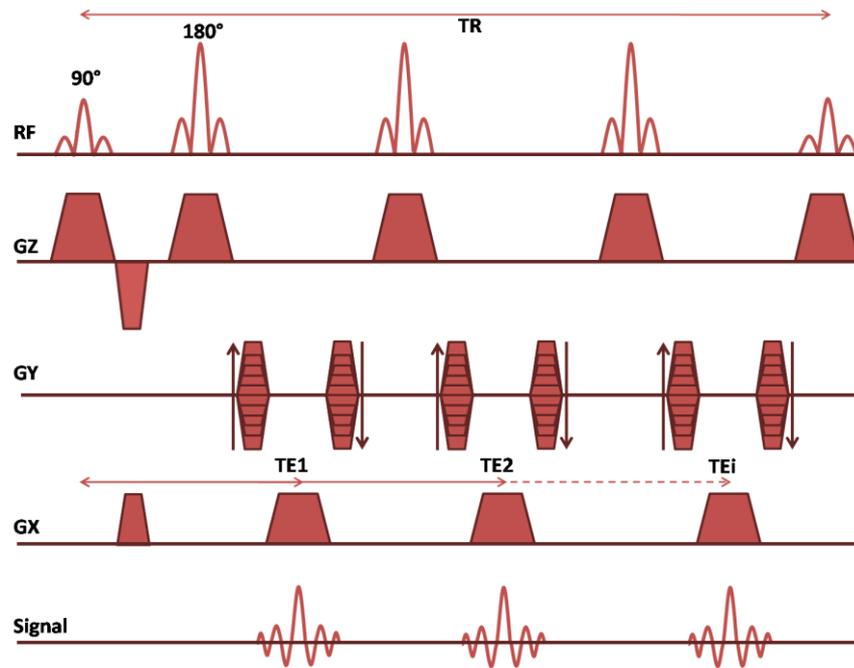


Figure 44 : Chronogramme de la séquence MSME.

III.5. PROTOCOLE D'ACQUISITION ET DE TRAITEMENT

Pour résumer, lorsque l'on se place dans un champ magnétique élevé $>3T$, on peut considérer que le système est dans le régime statique. Le modèle décrit par Haacke et Yablonskiy est donc applicable. Si l'on regarde la décroissance du signal RMN quelques millisecondes après l'excitation de spins ($t > 1,5t_c$), on peut négliger la contribution sanguine à la décroissance et le signal théorique s'écrit :

$$s(t) = Cte \cdot F(t) \cdot \exp(-R_{2i} \cdot BVf \cdot \gamma \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \Delta\chi_0 \cdot Hct \cdot (1 - ISO_2) \cdot B_0 \cdot t) \quad \text{Équation 55}$$

Dans notre protocole, la décroissance du signal dans chaque voxel est échantillonnée par une séquence de multi-écho de gradient 2D (MGE2D). Pour déterminer les différents paramètres de l'équation, on se sert de plusieurs méthodes RMN. Ici nous utilisons deux protocoles selon le type de correction des inhomogénéités du champ que l'on utilise.

Dans un premier protocole (Figure 45), on utilise la correction par mesure de la carte de champ magnétique. On réalise la carte de champ avec une séquence à double écho de gradient 3D (2GE3D). On déroule les phases des signaux, on lisse la carte de champ à l'aide d'un ajustement polynomial d'ordre 5 et on intègre les informations de la carte pour chaque voxel de la séquence MGE2D pour obtenir $F(t)$. On se sert d'une séquence de multi-écho de spin (MSME) pour obtenir le T_2 à l'aide d'un ajustement par une exponentielle décroissante. Enfin, la séquence MGE2D est répétée après l'injection d'USPIO pour déterminer le volume sanguin. Les séquences MGE2D et MSME sont réalisées à la même résolution spatiale. Pour la séquence 2GE3D, on utilise une résolution spatiale deux fois plus élevée dans le plan et 5 fois plus élevée dans la tranche.

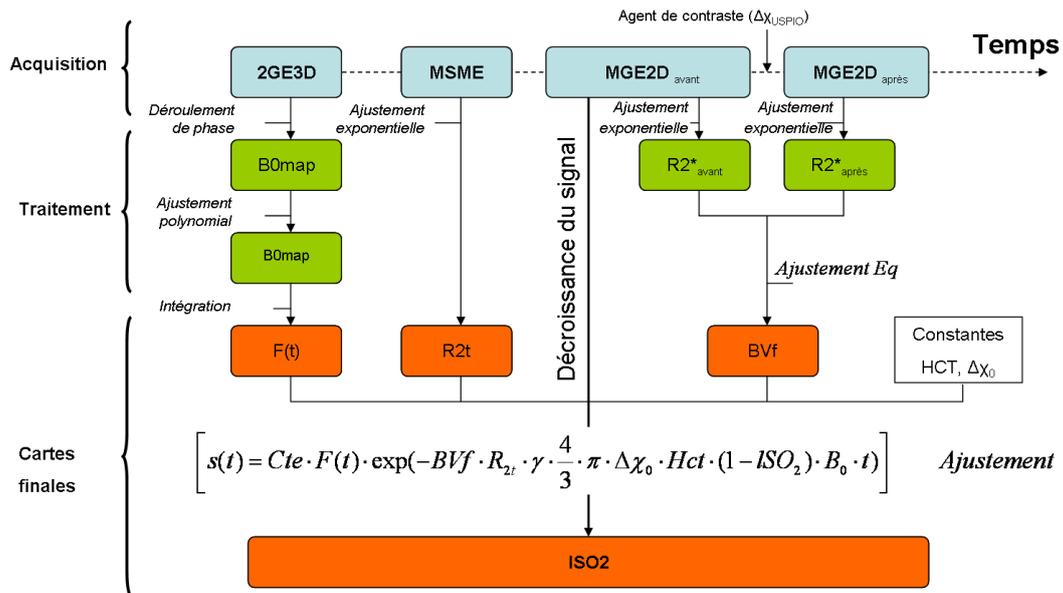


Figure 45 : Protocole 1 pour l'acquisition et le traitement des cartes de SO₂.

Connaissant les paramètres F(t), BVf et R₂, on ajuste finalement l'équation 45 sur les données recueillies à l'aide de la séquence MGE2D. On en déduit ISO₂.

- Dans le second protocole (Figure 46), on ne fait pas l'acquisition de la carte de champ. Mais les acquisitions MGE sont réalisées à hautes résolutions spatiales dans le plan et avec un codage de phase dans la direction de tranche (MGE3D). Ces données sont ensuite moyennées en amplitude pour obtenir une résolution spatiale identique à celle de la séquence MGE2D. Ceci permet de corriger les effets induits par F(t). Dans ce cas, l'ajustement de l'équation 45 ne tient donc pas en compte le terme F(t).

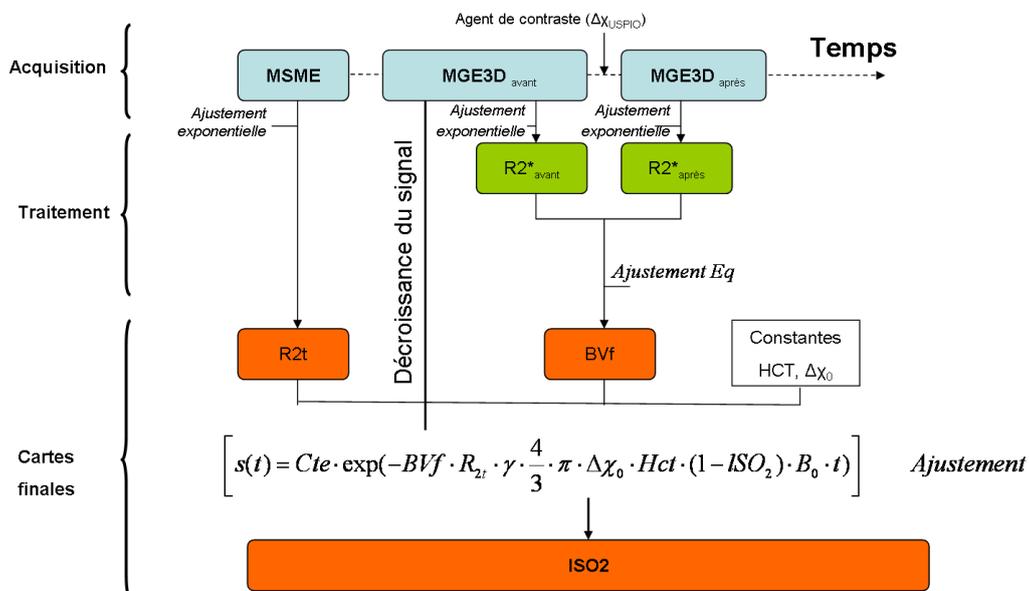


Figure 46 : Protocole 2 pour l'acquisition et le traitement des cartes de SO₂.

L'ensemble des processus d'analyse est réalisé sur le logiciel Matlab par une application que nous avons développée (Figure 47). Elle permet la visualisation des images acquises et des cartes paramétriques. La décroissance du signal et les différents ajustements sont également accessibles.

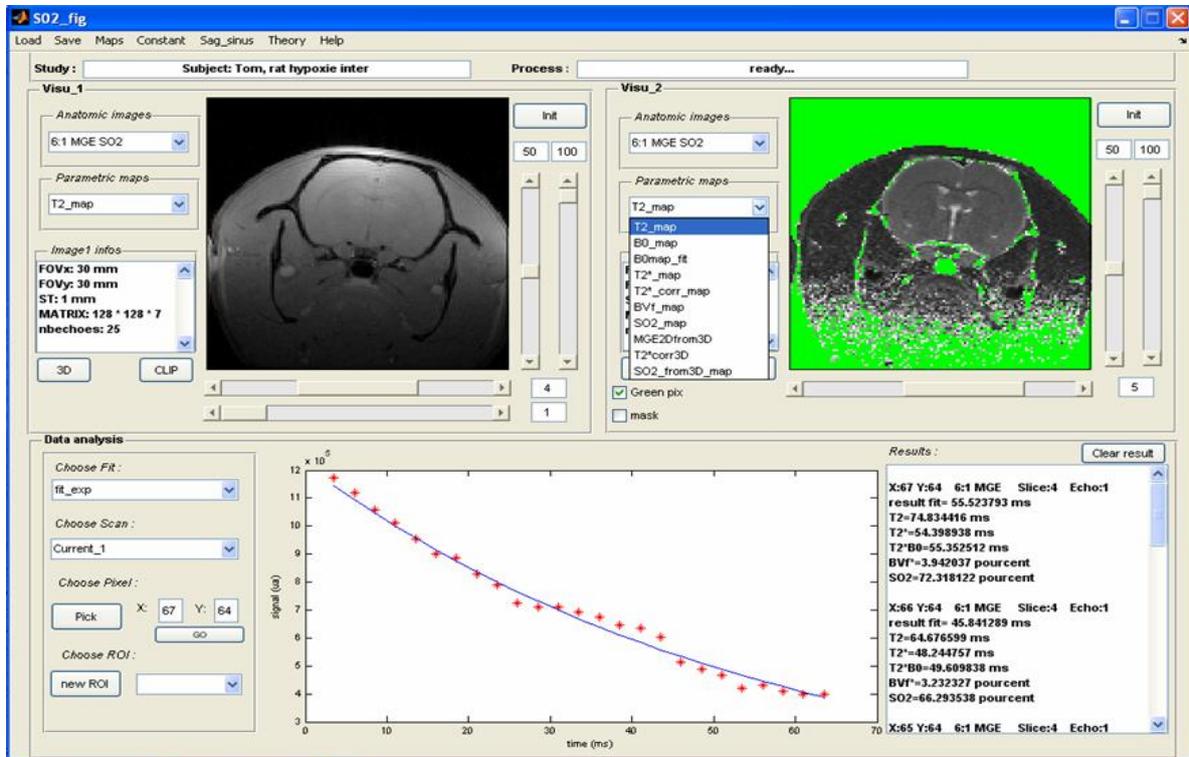


Figure 47 : Application Matlab réalisée dans le cadre de cette thèse pour le traitement et l'analyse des données.

CHAPITRE D : EVALUATION DE LA METHODE DE MESURE DE LA SO₂

Dans ce chapitre, nous présentons des résultats expérimentaux obtenus à l'aide de la méthode de mesure de la SO₂ exposée précédemment. Un des deux protocoles d'acquisition (Chapitre C.III.) implique la mesure d'une carte de champ magnétique pour la correction des effets des larges inhomogénéités de champ (Chapitre C.III.2.). Nous avons validé ces mesures de cartes de champ sur fantôme et *in vivo*. Nous avons également utilisé les informations de la carte de champ magnétique pour mesurer des susceptibilités magnétiques et estimer la SO₂ sur certains gros vaisseaux sanguins. Ce travail a fait l'objet du stage de Master de N. Pannetier.

Il est difficile de fabriquer un fantôme qui représente la microvascularisation cérébrale. Notre méthode de mesure de la SO₂ au niveau de la microvascularisation (Chapitre C) a donc été validée *in vivo* sur des rats sains et pour différentes fraction d'oxygène inspiré (normoxie FiO₂=21%, hypoxie, FiO₂=15% et hyperoxie FiO₂=100%). Nous avons ensuite appliqué notre méthode à l'étude de la SO₂ dans des tumeurs cérébrales. Ces mesures ont été comparées à une approche histologique (pimonidazole) pour évaluer comment l'oxygénation sanguine et l'hypoxie étaient reliées.

I. ACQUISITION D'UNE CARTE DE CHAMP MAGNETIQUE

Comme on l'a vu dans la partie précédente, l'acquisition d'une carte de champ magnétique par IRM requiert l'acquisition de données par une séquence à double écho de gradient et un algorithme de déballage de la phase. L'algorithme choisi est celui décrit par [Jenkinson(2003)]. Il a été implémenté sous Matlab et a été analysé puis validé sur simulations par N. Pannetier pendant son stage. La séquence 2GE3D a été implémentée sur la console SMIS à 2,35T et était déjà accessible sur la console Bruker à 4,7T.

Pour évaluer la précision des cartes de champ, nous avons utilisé un fantôme constitué d'un cylindre droit de susceptibilité magnétique différente de celle du milieu dans lequel il était plongé. Ainsi, la forme théorique du champ était connue (Chapitre C.II.2.). De plus, en mesurant le champ magnétique à l'intérieur et à l'extérieur du cylindre lorsque celui-ci est orienté parallèlement au champ B₀, il est possible de déterminer la différence de susceptibilité magnétique entre le cylindre et le milieu environnant. Nous avons appliqué ce principe pour déterminer la susceptibilité d'un agent de contraste super-paramagnétique (particules d'oxyde de fer, USPIO). Ce même principe a ensuite été appliqué à l'étude *in vivo* de la saturation en oxygène du sinus veineux chez le rat.

I.1. MESURES SUR FANTOME

Dans cette partie, les acquisitions sont réalisées avec l'aimant à 2,35T (piloté par la console SMIS) avec une configuration émission par antenne de volume et réception par antenne de surface.

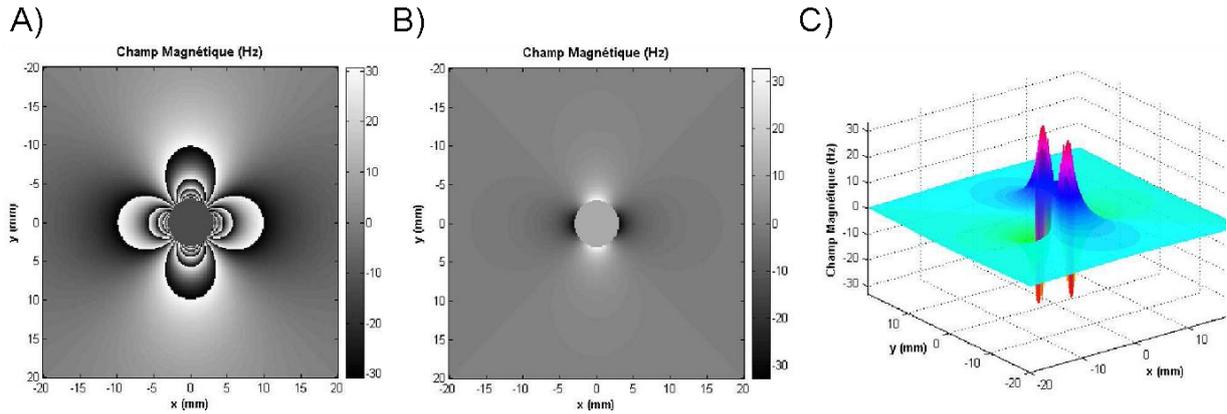


Figure 49 : Simulation Matlab des écarts au champ magnétique B_0 lorsque le fantôme (tube central rempli d'une solution d'USPIO diluée) est placé perpendiculairement au champ B_0 . A) Champ magnétique. B) et C) représentations 2D et 3D du champ magnétique après déballage de phase.

Si l'on acquiert maintenant la carte de champ lorsque le cylindre est rempli d'eau (même susceptibilité que l'agarose), on obtient une carte de référence (Figure 50D). On s'aperçoit que la différence de susceptibilité entre l'eau et le verre induit également des distorsions du champ magnétique mais que celles-ci sont peu prononcées. En soustrayant cette carte de référence à la carte obtenue en Figure 50B, on corrige alors les effets des inhomogénéités macroscopiques et on obtient bien la forme du champ magnétique attendu (Figure 50E). Notre acquisition de la carte de champ est donc satisfaisante d'un point de vue qualitatif.

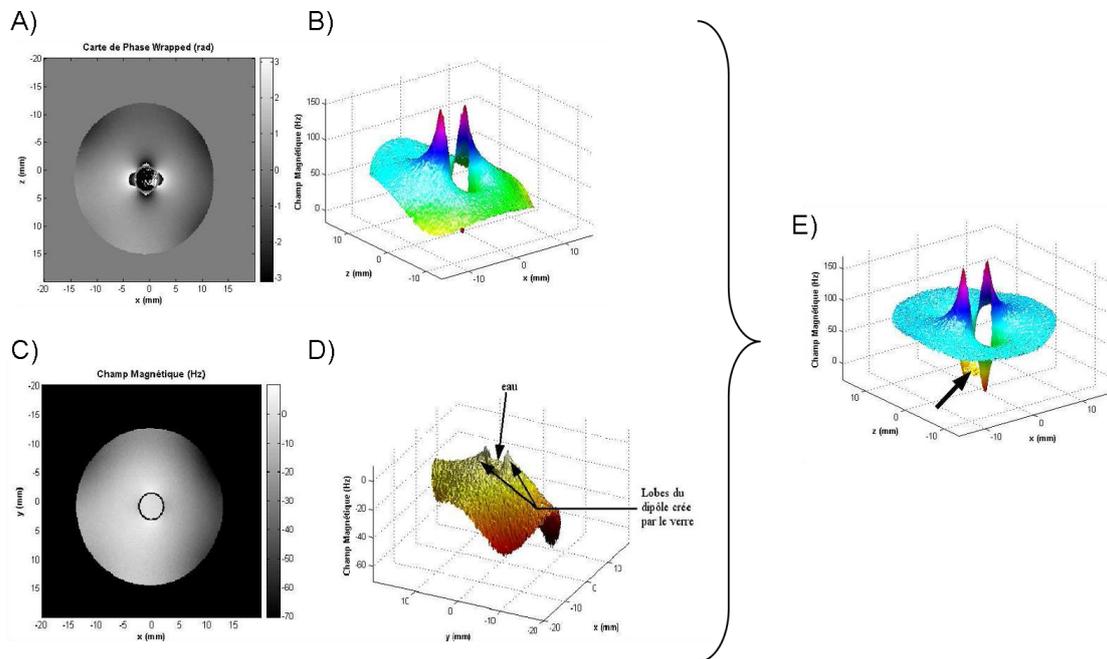


Figure 50 : Acquisitions de cartes de champ magnétique à 2,35T sur fantôme orienté perpendiculairement à B_0 . A) et B) cartes de champ 2D et 3D lorsque le cylindre est rempli d'une solution d'USPIO diluée. C) et D) cartes de champ 2D et 3D lorsque le fantôme est rempli d'eau. E) Carte de champ corrigée issue de la différence entre les acquisitions B et D.

I.1.c. Susceptibilité magnétique à partir de la carte de champ

Pour vérifier si les acquisitions sont quantitativement correctes, on place le cylindre parallèlement au champ B_0 et on acquiert des coupes transversales. Les équations décrivant le champ magnétique s'écrivent alors :

$$\Delta B_{out} = 0 \quad ; \quad \Delta B_{in} = \frac{-2\Delta\chi}{3} B_0 \quad ; \quad \Delta\chi = \frac{3}{2B_0} (\Delta B_{out} - \Delta B_{in}) \quad \text{Équation 56}$$

Dans ce cas, les champs magnétiques sont constants à l'intérieur et à l'extérieur du cylindre. On acquiert toujours une carte de référence lorsque le cylindre est rempli d'eau pour corriger les effets du shim. On acquiert ensuite 3 cartes de champ magnétique pour trois concentrations d'USPIO : $c_0/2$, c_0 et $2c_0$, (Figure 51, A, B, C). Ces différentes cartes sont recentrées en fréquence à partir d'un pixel pris dans la région périphérique proche du cylindre. La différence des artefacts (Figure 51B entre autre) provient du repositionnement légèrement différent de l'échantillon dans l'aimant.

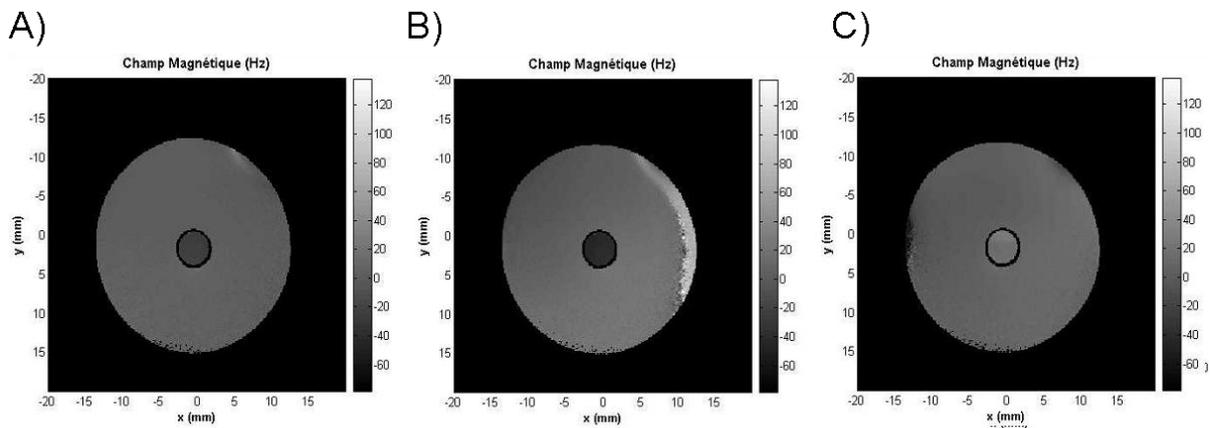


Figure 51: Cartes de champ magnétiques acquises à 2,35T sur fantôme (cylindre rempli d'une solution d'USPIO diluée avec une concentration $c_0/2$ (A), c_0 (B) et $2c_0$ (C)) placée parallèlement à B_0 .

Les mesures de ΔB sont réalisées en moyennant sur la région centrale (ΔB_{in}) et sur une région périphérique mais proche du centre (ΔB_{out}) du cylindre. On mesure les valeurs reportées dans (Tableau 3).

Concentration	$\frac{1}{2} c_0$	c_0	$2c_0$
$\Delta B_{out} - \Delta B_{in}$ (Hz)	26,8	53,3	109,9
$\Delta\chi$ (CGS)	$0,3 \cdot 10^{-7}$	$0,6 \cdot 10^{-7}$	$1,3 \cdot 10^{-7}$

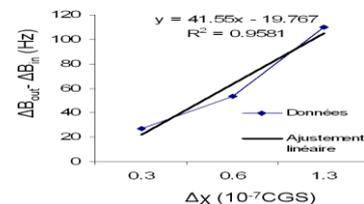


Tableau 3 : Mesures de la susceptibilité magnétique de solutions diluées d'USPIO.

On voit que l'évolution de $\Delta\chi$ est linéaire ($R^2=0,95$) avec la concentration (malgré le faible nombre de points).

Si l'on fait l'acquisition de la carte de champ lorsque le cylindre est rempli de Gd-DOTA à une concentration de $1,75 \cdot 10^{-3}$ M, et une acquisition lorsque le cylindre est

rempli d'USPIO avec une concentration classique utilisée lors des injections sur rat (i.e. $1,79 \cdot 10^{-3}$ M soit 200 μ mol de fer/kg), on obtient les résultats du Tableau 4.

	Gd-DOTA ($c=1,75 \cdot 10^{-3}$ M ⁻¹)	USPIO ($c=1,79 \cdot 10^{-3}$ M ⁻¹)
$\Delta B_{out}-\Delta B_{in}$ (Hz)	16,5	97.0
$\Delta\chi$ (CGS)	$3,9 \cdot 10^{-8}$	$2,3 \cdot 10^{-7}$

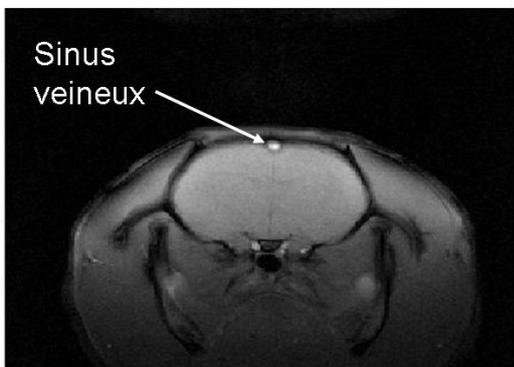
Tableau 4: Mesures de susceptibilité magnétique de solution diluées d'USPIO et Gd-DTPA.

Ces valeurs sont en accord avec celle données dans la littérature. [Boxerman *et al* (1995)] donne $\Delta\chi$ (Gd-DTPA) = $1,10^{-7}$ avec une concentration de 3,6mM, soit $5,10^{-8}$ avec 1,8mM. Ici on trouve $4,10^{-8}$ avec 1,8mM. [van Osch *et al* (2003)] trouve un $\Delta\chi_{molaire}$ (Gd-DTPA)= $2,55 \cdot 10^{-5}$ M⁻¹ pour cette concentration. Si l'on converti nos estimations, on trouve $2,25 \cdot 10^{-5}$ M⁻¹. Pour l'USPIO, la valeur de Msat molaire mesurée précédemment au laboratoire dans la thèse d'Albert Vaeth était de $3,96 \cdot 10^{-7}$ T/mM. Après conversion, nous trouvons $3,04 \cdot 10^{-7}$ T/mM.

I.2. MESURES IN-VIVO SUR SINUS VEINEUX

A l'aide du principe présenté précédemment, on peut déterminer la SO₂ *in vivo* dans des gros vaisseaux sanguins. Cette méthode, bien qu'extrêmement simple, n'a été décrite que récemment [Sedlacik *et al* (2007)]. Dans le cerveau de rat, lorsqu'il est placé dans l'IRM, le sinus veineux apparaît parallèle au champ B₀ (Figure 52A). On peut estimer que sur une distance de 1 mm ou moins, ce vaisseau sanguin est assimilable à un cylindre droit. En effectuant les mesures de champ à l'intérieur et à l'extérieur du cylindre, on obtient comme dans la partie précédente, une estimation de la différence de susceptibilité magnétique entre le sang et le tissu environnant. D'après l'équation de la susceptibilité magnétique du sang (Chapitre C.I.2.b.), on peut alors obtenir la SO₂.

A)



B)

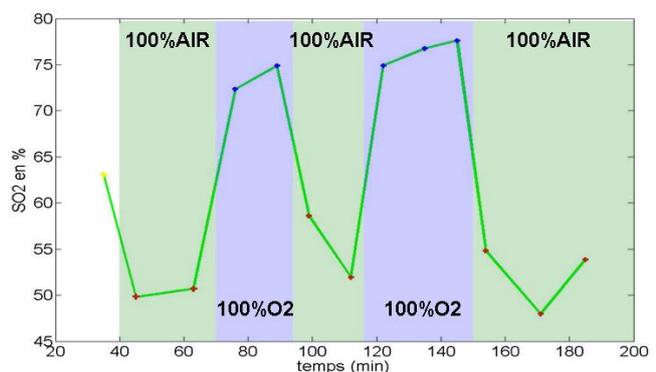


Figure 52 : A) images anatomiques pondérées T₂. B) Mesures de la SO₂ sur le sinus veineux à l'aide d'une carte de champ magnétique et pendant un challenge gazeux.

Nous avons appliqué ce principe sur plusieurs rats (n=6) à 2,35T. La Figure 52B montre l'estimation de la SO₂ dans le sinus veineux pour un rat et pendant des variations de la

FiO₂. La valeur de la SO₂ est obtenue à condition de connaître la valeur de l'hématocrite. Pour ce rat sain, l'hématocrite a été choisie égale à 42%. On s'aperçoit que les valeurs absolues de la SO₂ sous air (~50%) correspondent à l'ordre de grandeur des valeurs bibliographiques. Des variations significatives sont induites au cours du challenge gazeux. La méthode semble stable, avec un retour aux valeurs basales après variations.

I.3. CONCLUSION

L'acquisition d'une carte de champ par IRM a été implémentée sur nos appareils. Les acquisitions sur fantôme et *in vivo* ont montrées que les mesures étaient précises et reproductibles. Elle peut permettre de mesurer la SO₂ sur certains gros vaisseaux comme le sinus veineux. Pour notre méthode de mesure de la SO₂ au niveau de la microvascularisation, elle sera cependant utilisée comme outil de correction des inhomogénéités de champ magnétique.

II. VALIDATION DE LA MESURE DE LA SO₂ LOCALE SUR CERVEAU SAIN PENDANT CHALLENGE GAZEUX

Nous avons tout d'abord validé la précision de notre méthode en mesurant la SO₂ locale sur cerveaux de rat sains. Nous ne possédons pas d'appareils de mesure de la SO₂ locale comme le NIRS permettant de comparer nos mesures à une méthode de référence. Pour corrélérer nos mesures, nous avons donc décidé d'effectuer en parallèle de nos estimations IRM des mesures systémiques de la SO₂ veineuse par analyse d'échantillons de sang prélevés sur la veine fémorale. Pour induire des variations de la SO₂, nous avons varié le pourcentage d'oxygène inspiré (FiO₂).

II.1. MATERIEL ET METHODES

II.1.a. Préparation animale

Avant le protocole d'imagerie, 13 rats mâles Wistar pesant entre 250 et 350g sont anesthésiés avec 5% d'isoflurane dans de l'air pour l'induction et 1% pour le maintien. Les animaux respirent librement dans un masque et la température est maintenue à 37°C à l'aide d'une couverture chauffante.

Un cathéter est posé dans la veine fémorale pour permettre la mesure de la saturation de l'hémoglobine (SvO₂) et de l'hématocrite (Hct) dans des échantillons de sang de moins de 0,1 mL (ABL 510, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Le cathéter est également utilisé pour l'injection du produit de contraste dans l'IRM.

Dans le scanner IRM, les animaux sont maintenus à l'aide d'une barre à dent et de barres d'oreilles.

II.1.b. Groupes d'animaux

Les 13 rats sont répartis dans 3 groupes :

- Dans le groupe A (n=6), les rats sont analysés alors qu'ils ne respirent que de l'air (FiO₂=21%).
- Dans le groupe B (n=3), 3 rats sont suivis pendant un challenge gazeux. Ce dernier consiste en 35 min de respiration d'air (FiO₂=21%), une condition hyperoxique (FiO₂=100%) pendant 15min, et un retour à l'air pendant 15min. Pour vérifier si le volume sanguin varie pendant l'expérience, le challenge gazeux est répété en présence de l'agent de contraste.
- Dans le groupe C (n=4), le challenge gazeux est similaire à celui du groupe B excepté le fait que la condition hyperoxique est remplacée par une condition hypoxique (FiO₂=15%).

Pour tous les groupes, la SvO₂ et l'Hct sont mesurés à la fin de chaque condition. La FiO₂ est contrôlée à l'aide d'un oxymètre (Miniox 1 analyser ; Catalyst Research Corporation, Owings Mills, MD) placé à l'entrée du masque.

II.1.c. Protocole IRM

Les acquisitions IRM sont réalisées à 4,7T, dans une configuration émission antenne de volume et réception antenne de surface.

Après une procédure de shim automatique au deuxième ordre, le protocole IRM est le suivant :

- Séquence double écho de gradient 3D (2GE3D) à haute résolution spatiale (FOV=30x30mm², matrice=256x256x40, TR=100ms, TEs=4, 8 ms).
- Séquence multi écho de spin 2D (MSME) (7 tranches contiguës, épaisseur 1mm, FOV=30x30mm²; matrice=128x128, TR=1500ms, 20 échos de spin, ΔTE=12ms).
- Séquence multi écho de gradient 2D (MGE2D) (7 tranches contiguës, épaisseur 1mm, FOV=30x30mm²; matrice=128x128, TR=1500ms, 30 échos de gradient, ΔTE=2.5ms) ou séquence multi écho de gradient 3D (MGE3D) (FOV=30x30x4mm³, matrice=256x256x20, TR=100ms, 15 écho de gradient, ΔTE=4ms).
- Répétition de la séquence MGE (9 fois) pendant le challenge gazeux.
- Injection d'USPIO dans la veine fémorale pendant 20s à une dose de 200μmoles de fer par kg (Sinerem[®], Guerbet, Roissy, France; Combidex[®], AMAG Pharmaceuticals, Inc, MA, USA).
- Répétition de la séquence MGE (9 fois) pendant challenge gazeux en présence de l'agent de contraste.

La durée totale du protocole est de 2h20 pour chaque rat.

II.1.d. Analyse des données

L'analyse des données se fait sur le logiciel Matlab à l'aide de l'application que nous avons développée (Chapitre C.III.5.).

Les deux protocoles de corrections des inhomogénéités de champ ont été considérés :

- Pour le protocole 1, l'analyse des données est celui donné en Figure 45. La carte de T₂ est établie à partir d'un ajustement non linéaire des données de la séquence MEMS. Pour la carte de champ B₀, seul les échos positifs de la séquence 2GE3D sont utilisés pour éviter des distorsions dans les images. Un polynôme d'ordre 5 est ajusté à la carte de champ de B₀ pour réduire l'influence d'éventuels gros vaisseaux sanguins.
- Pour le protocole 2, les acquisitions MGE3D sont moyennées en amplitude selon la technique GESEPI.

Pour satisfaire aux conditions du modèle (évaluation de la décroissance du signal pour des temps supérieurs à 1,5*tc), tous les ajustements commencent à partir de 10ms. Cette valeur provient du fait que à 4,7T avec 3% de volume sanguin et des paramètres classiques de l'hémodynamique (Hct=42%, ISO₂=60%), le temps tc est égal à 4,25ms. La limite pour les temps élevés est donc 1,5*tc=6,4ms.

II.1.e. Analyses statistiques

Trois régions d'intérêt ont été délimitées manuellement sur les images pondérées T₂ : le cerveau entier, le cortex et le striatum. Des tests Student appariés ont été utilisés pour comparer les challenges à la condition contrôle. Des tests Student non appariés ont été utilisés dans les autres cas. Dans tous les cas, les valeurs sont considérées comme statistiquement différentes lorsque p<0,05.

II.2. RESULTATS

II.2.a. Evaluation de la méthode

La Figure 53A montre plusieurs images anatomiques acquises au même temps d'écho (TE=12ms) sur un rat. On observe des différences de contraste entre les images acquises en écho de spin, écho de gradient ou écho de gradient en présence d'agent de contraste dans la microvascularisation. La Figure 53B montre l'évolution du signal RMN dans un pixel indiqué par la flèche blanche dans les images anatomiques. Les données ont été normalisées au 4^{ième} temps d'écho pour illustrer les différences entre la partie réversible (échantillonnage de la séquence MEMS) et la partie irréversible (échantillonnage de la séquence MGE_{avant}) du signal. L'évolution du signal est également présentée en présence d'USPIO (échantillonnage de la séquence MGE_{après}). Dans ce voxel, les variations de T₂*_{B0corrected} ($\Delta=19$ ms) donnent une estimation du volume sanguin de 2,6%. Finalement, on trouve une SO₂ de 63% dans ce voxel. Ces deux valeurs sont en accord avec les valeurs classiques de la littérature données dans le chapitre A.

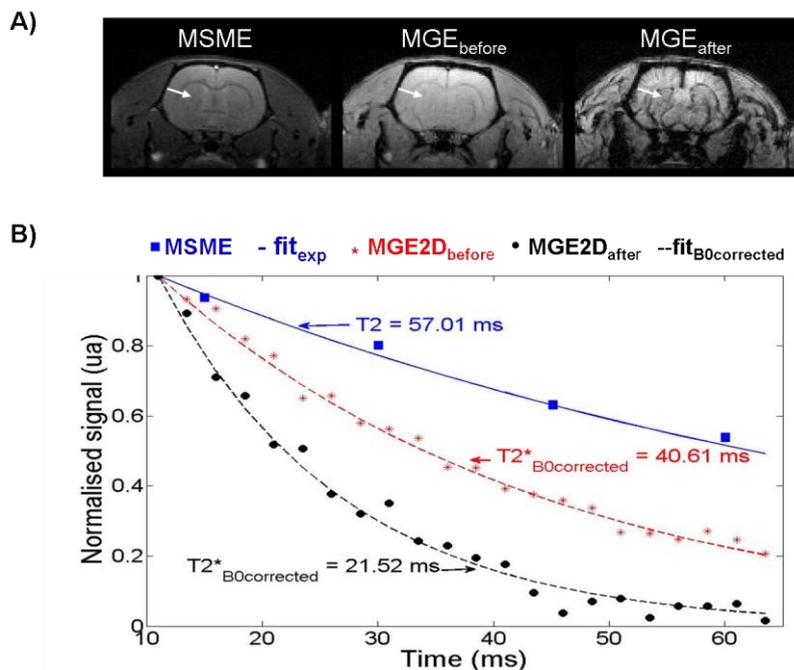


Figure 53 : Acquisitions sur un rat représentatif. A) images anatomiques d'une séquence écho de spin (MSME) et d'une séquence écho de gradient avant (MGEavant) et après (MGEaprès) injection d'USPIO au même temps d'écho. B) Evolutions temporelles et ajustements correspondants des signaux RMN dans un voxel (indiqué par la flèche blanche en (A)).

La Figure 54 présente les résultats obtenus avec les deux méthodes de correction des inhomogénéités de champ B_0 .

Le protocole 1 correspond à la correction par utilisation d'une carte de champ B_0 à haute résolution spatiale. En A, on voit l'image acquise par la séquence MGE_{avant}. L'épaisseur de tranche est donc de 1 mm et la matrice acquise de 128*128. L'évolution temporelle du signal dans un voxel (indiqué par la flèche blanche) est donnée en B. Un ajustement exponentiel sur ces données nous donne une constante T_2^* de 18 ms. Une des cinq coupes de 200 μm de la carte de champ B_0 correspondantes à la tranche de MGE avant est représentée en C.

On voit en D que si l'on combine les informations issues de la carte de champ pour ajuster le signal de la séquence MGE_{avant}, on obtient une constante de temps $T_2^{*B_0\text{corrected}}$ de 40 ms. L'ajustement des données est alors de meilleure qualité.

La méthode 2 correspond à la correction obtenue par acquisition des données à hautes résolutions spatiales. En E, on voit une des 5 tranches de la séquence MGE3D correspondant à la tranche donnée en A (obtenue avec la séquence MGE2D). La séquence MGE3D étant acquise avec une matrice 256x256x40, $2 \times 2 \times 5 = 20$ voxels de cette séquence correspondent à un voxel de la séquence en A. On voit en G la décroissance ainsi que l'ajustement exponentiel de ces 20 voxels correspondant au voxel indiqué par la flèche blanche.

Si l'on somme en amplitude les signaux acquis en E pour obtenir une résolution similaire à celle de A, on obtient l'image représentée en F. On peut alors se rendre compte de l'amélioration apportée par la méthode en comparant cette image avec celle acquise classiquement avec la séquence MGE2D en A. Ceci est particulièrement visible à la base du cerveau. Avec la méthode 2, l'évolution du signal est corrigée, et un ajustement exponentiel des données nous donne $T_2^{*HR\text{corrected}} = 41$ ms ce qui est similaire à la constante trouvée par la méthode 1 dans ce voxel.

Dans les régions d'intérêt que nous avons considérées dans cette étude, les deux protocoles de corrections des inhomogénéités de champ ont montrés des résultats similaires et ont été groupés.

On peut par contre mentionner que ce n'était pas le cas dans des régions proches de la base du cerveau ou proches de grosses veines ou le protocole 2 donne de meilleurs résultats.

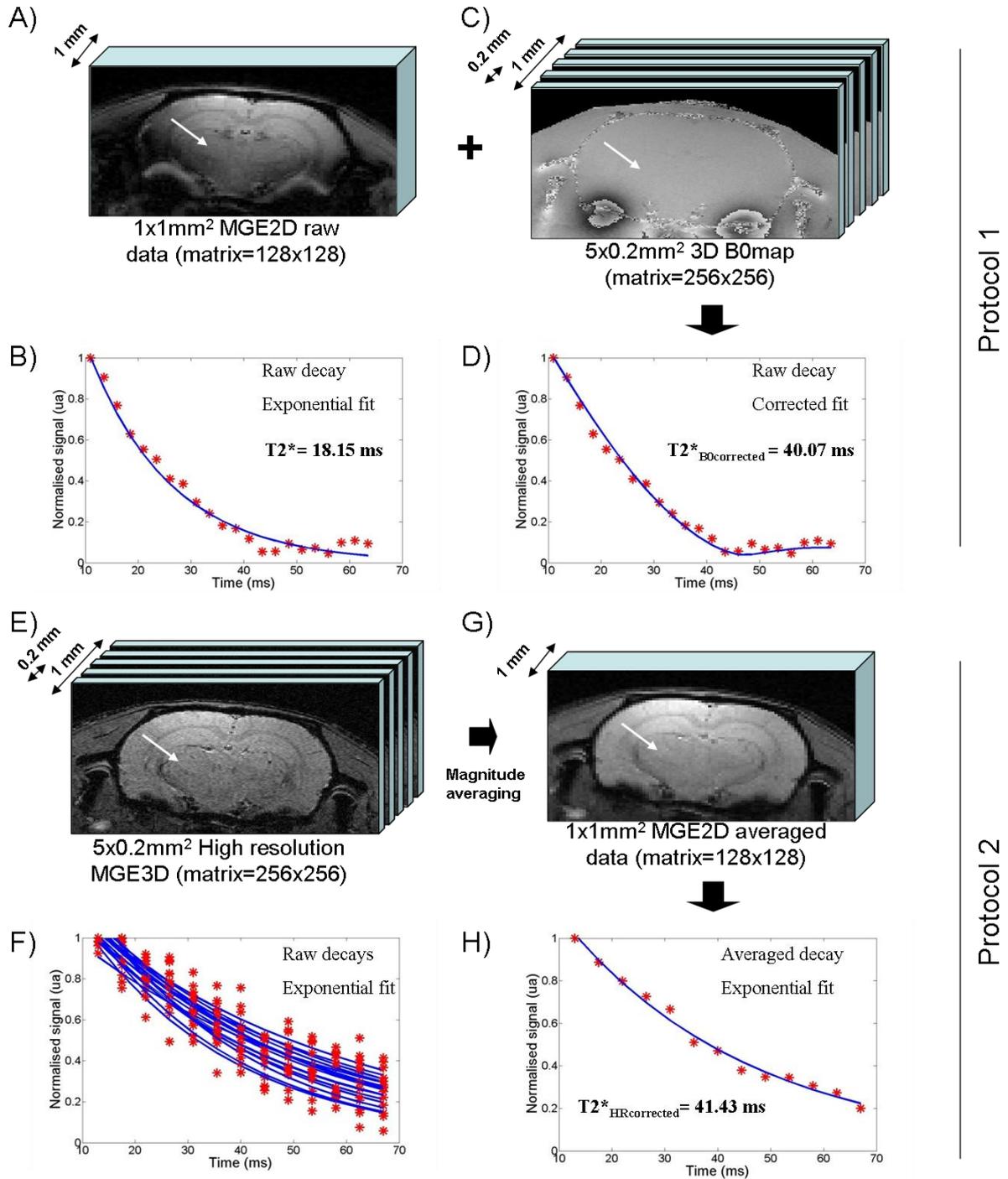


Figure 54 : Mise en oeuvre des 2 méthodes de correction des inhomogénéités de champ.

La Figure 55 montre un exemple de cartes paramétriques obtenues sur un rat. La carte de B₀ correspond à une des 5 tranches de 200 μm. Les faibles variations de B₀ indiquent une bonne homogénéité du champ dans cette tranche. La carte de SO₂ montre une bonne homogénéité. On voit par contre que la matière blanche donne des valeurs de SO₂ très faibles.

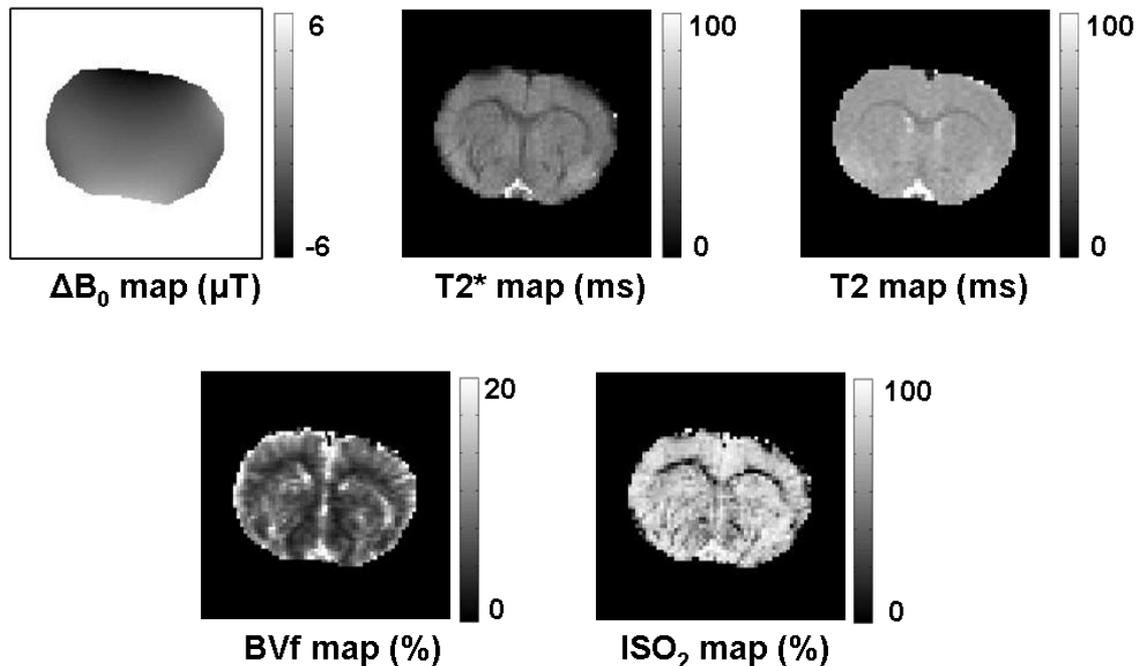


Figure 55 : Cartes paramétriques provenant d'un rat inspirant de l'air.

II.2.b. Variations avec la FiO₂

Le Tableau 5 donne les résultats obtenus par les analyses de gaz du sang dans la veine fémorale pour les 3 groupes. Sous air, on trouve une hémocrite de 42% et une SO₂ de 66,8% dans la veine fémorale. Ces valeurs correspondent à des valeurs classiques de l'hémodynamique. Pendant les challenges gazeux, la saturation veineuse de l'hémoglobine montre une augmentation de 17% pendant l'hyperoxie (P<0.001) et une baisse de 35% pendant l'hypoxie (P<0.001).

Le Tableau 5 et la Figure 56 résument également les mesures de BVf et SO₂ obtenues par IRM dans des régions d'intérêts délimitant le cortex, le striatum et le cerveau.

Pour l'ensemble des rats respirant de l'air, on trouve un volume sanguin de 3% dans le striatum. Ceci est en bon accord avec les mesures déjà réalisées avec cette approche [Valable *et al* (2008)]. Pour les groupes B et C, on ne voit pas de variations significatives du BVf pendant les challenges gazeux.

Tableau 5: Analyse des gaz du sang et estimations IRM pour les trois groupes d'animaux.

	Femoral vein blood			MRI estimates					
	Hct	SvO ₂ (%)		Air		Challenge		Variations = (Air-Challenge)/Air	
		Air	Challenge	ISO ₂ (%)	BVf (%)	ISO ₂ (%)	BVf (%)	ΔISO ₂ (%)	ΔBVf (%)
Group A (n=6)	39.6±2.9	62.6±3.9							
Brain				62.9±5.4	3.4±0.3				
Cortex				65.5±7.9	3.4±0.4				
Striatum				60.8±8.4	3.4±0.3				
Group B (n=3)	41.3±2.2	68.2±5.5	80.0±5.5						
Brain				71.8±2.0	3.7±0.4	81.9±4.1	3.5±0.6	13.9±3.3	-10.0±6.4
Cortex				78.1±3.5	4.3±1.0	86.6±3.7	3.9±1.0	11.1±6.4	-10.0±3.9
Striatum				68.1±3.7	3.3±0.6	83.2±5.7	3.2±0.7	22.1±2.0	0.0±7.2
Group C (n=4)	42.0±3.1	64.7±6.8	41.9±2.9						
Brain				62.4±6.0	2.7±0.7	51.5±0.9	2.7±0.5	-16.8±8.2	0.0±6.1
Cortex				69.8±8.9	2.6±0.6	55.7±3.4	2.7±0.5	-18.9±14.3	0.0±6.9
Striatum				56.7±9.3	2.4±0.5	48.2±2.4	2.4±0.4	-13.6±11.7	0.0±6.3
All animals Air (n=13)	41.2±2.8	66.8±6.1							
Brain				65.7±7.6	3.2±0.5				
Cortex				70.7±9.2	3.3±0.8				
Striatum				63.8±11.0	3.0±0.6				

Pendant inspiration d'air, on trouve par notre méthode IRM une SO_2 de 65% dans le cerveau et les changements de la fraction d'oxygène inspirée conduisent à des variations significatives ($P < 0.001$) de la SO_2 : +14% pendant l'hyperoxie et -17% pendant l'hypoxie.

Les mesures dans les différentes régions du cerveau présentent une différence significative entre le striatum et le cortex ($P < 0.05$).

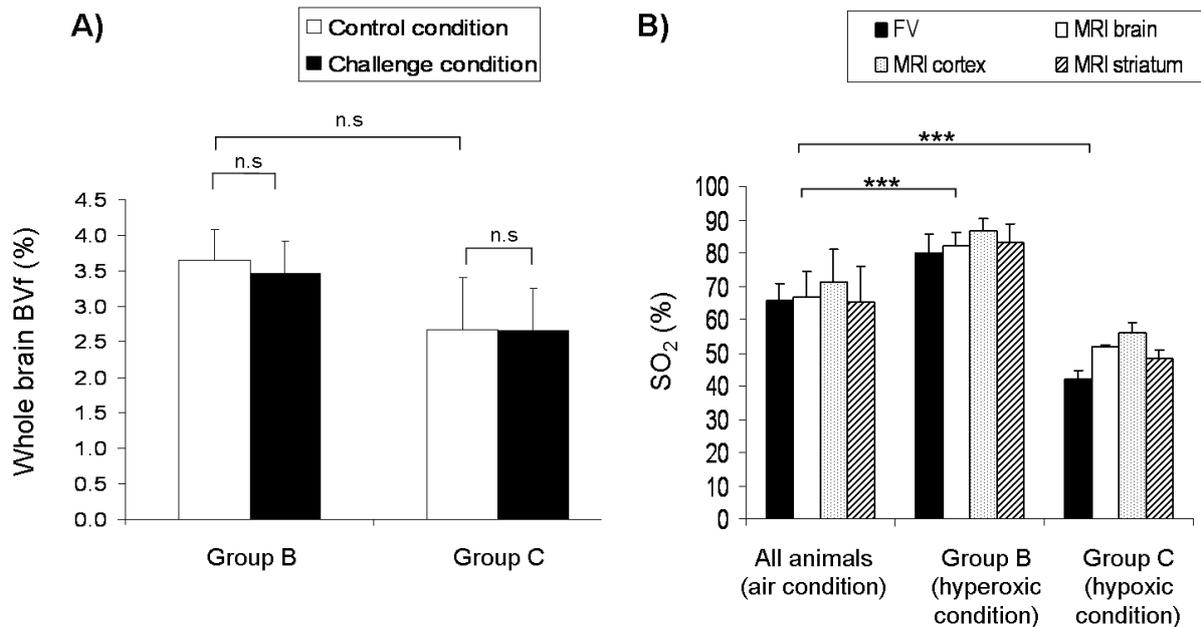


Figure 56 : A) Variations du volume sanguin (BVf) pendant le challenge gazeux. B) Evolution de la SO_2 pendant le challenge gazeux. Moyenne et écart-type mesurés dans la veine fémorale (FV) ou par IRM dans les trois régions d'intérêt (cerveau, cortex et striatum).

Les faibles écarts-types sur les mesures de la SO_2 suggèrent une bonne robustesse de nos mesures. Nous avons également remarqué que si l'on suivait l'évolution de la SO_2 pendant 40 min sur 4 rats, l'écart-type sur la déviation temporelle était inférieur à 3%.

Enfin, bien que la SO_2 dans la veine fémorale ne soit pas une représentation exacte de la SO_2 dans le cerveau, nos mesures dans les trois régions d'intérêts (cerveau, cortex, striatum) montrent une bonne corrélation ($R^2=0,82, 0,74, 0,73$) avec l'analyse des gaz du sang (Figure 57A,B,C).

Nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les estimations de SO_2 sur le cerveau par IRM et la SvO_2 dans la veine fémorale pendant la normoxie ou l'hyperoxie. Pendant l'hypoxie, les estimations IRM sont plus hautes que celles des gaz du sang. Ceci pourrait être attribué à une différence de vasorégulation entre le cerveau et les pattes.

Des images en écho de spin ainsi que des cartes de SO_2 pendant les challenges hyperoxiques et hypoxiques sont également représentées Figure 57D. on peut voir une bonne homogénéité des cartes de SO_2 dans le cerveau excepté dans le corps calleux.

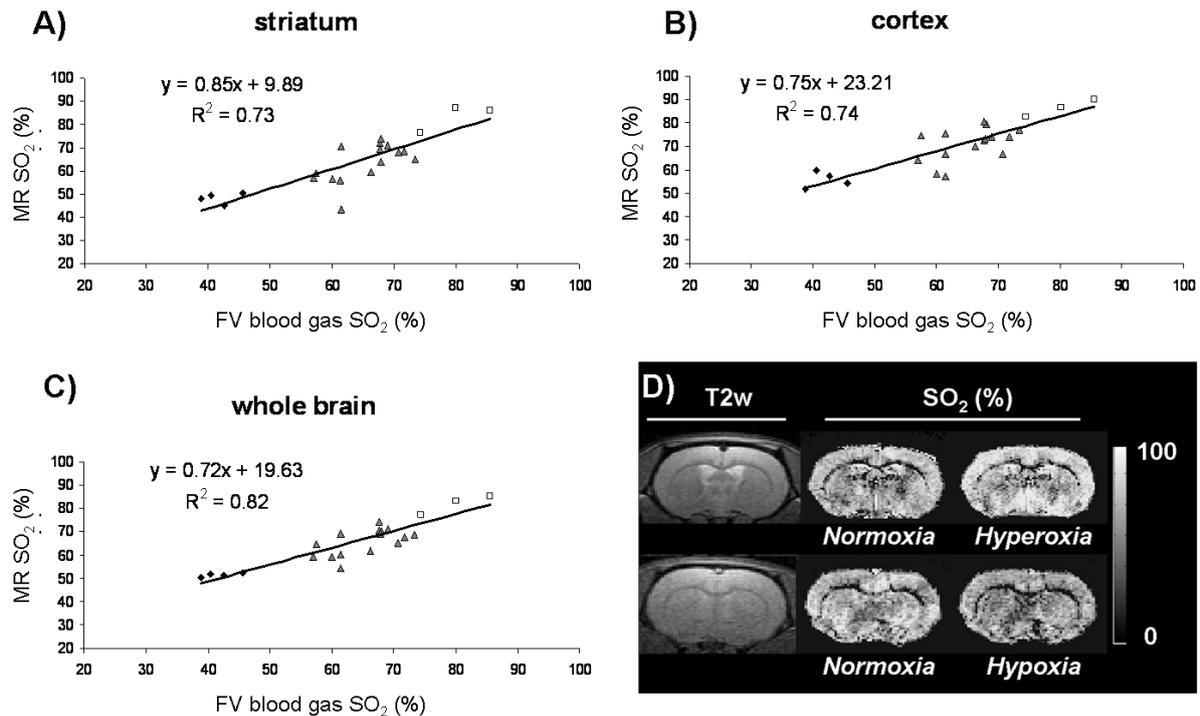


Figure 57: Régression linéaire entre les mesures de SO₂ sur la veine fémorale (FV) et les estimations IRM dans le cerveau (A), le striatum (B) et le cortex (C). D) images représentatives de deux rats en écho de spin (TE=10ms) et cartes de SO₂ correspondantes pendant les challenge gazeux.

II.3. CONCLUSION

En utilisant un protocole qui combine des estimations du BVf, du T₂ tissulaire et de corrections de B₀ avec la mesure de la FID, nous avons dérivé des cartes quantitatives de la SO₂. Ce nouveau protocole peut être appliqué en un temps raisonnable (30 min), et donne des cartes de résolution spatiale de 234*234*1000 μm dans le cerveau de rat. Les estimations de la SO₂ sous anesthésie et dans des conditions normales de respiration sont reproductibles (moins de 5% de variabilité) et sont bien corrélées avec la FiO₂ et l'analyse des gaz du sang.

Comme pour les autres méthodes IRM qui estiment la SO₂, notre protocole est extrêmement sensible aux méthodes de correction des inhomogénéités de champ. La méthode introduite par He qui consiste à utiliser l'acquisition d'une carte de champ magnétique pour corriger l'ajustement des données donne de bons résultats. Mais lorsque les inhomogénéités sont trop fortes, le signal disparaît trop rapidement et la correction ne peut pas s'appliquer. La seconde méthode de correction qui consiste à moyenner en amplitude des acquisitions hautes résolutions donne de bons résultats dans plus de cas mais l'acquisition demande alors plus de temps. Pour réduire le temps d'acquisition en gardant une bonne efficacité de traitement, on pourrait envisager de mettre en place des techniques comme la bmGESEPI [Truong *et al* (2006)] ou le z-slice shimming [Glover(1999)].

Deux autres sources d'erreur peuvent introduire un biais dans nos mesures. Premièrement, l'hématocrite a été déterminée ici dans le sang veineux. Or le taux d'hématocrite peut être plus faible dans la microvascularisation [Troprès *et al* (2004)]. Il peut aussi varier dans des conditions pathologiques comme les tumeurs cérébrales [Vaupel *et al* (2001)]. L'influence de l'hématocrite devrait donc être plus amplement analysée.

Deuxièmement, notre méthode est basée sur la fonction mathématique décrite dans le Chapitre C.II. Or cette fonction pourrait devenir obsolète lorsque les caractéristiques tissulaires s'éloignent des hypothèses du modèle. Il est possible que nous ayons déjà observé un exemple de cette limitation. En effet, dans le corps calleux, nous avons trouvé plusieurs voxels présentant des valeurs de SO₂ négatives. Ces estimations, qui ne présentent pas de signification physiologiques, pourraient être expliquées par une différence de susceptibilité magnétique entre la matière blanche et la matière grise d'origine non vasculaire [Marques *et al* (2009)]. Plusieurs études récentes ont proposé d'autres sources de différences de susceptibilité comme le contenu en myéline des tissus [Duyn *et al* (2007)], le contenu en métaux [Haacke *et al* (2005)] ou des échanges entre l'eau et des macromolécules [Zhong *et al* (2008)] et aucun de ces facteurs n'est pour l'instant pris en compte dans le modèle. Dans le cas des pathologies, des variations dans le coefficient de diffusion de l'eau, le diamètre des vaisseaux, la distance intervaisseaux et l'orientation des vaisseaux pourrait également avoir un impact sur la précision de nos mesures.

III. ETUDE DE LA RELATION HYPOXIE / SO₂ SUR TUMEURS

Dans l'étude précédente, nous avons validé notre technique de mesure de la SO₂ sur animaux sains. Or, même si la technique nous informe correctement sur l'oxygénation sanguine, il n'est pas évident de relier cette information à la notion d'hypoxie tumorale. En effet, la relation entre la pO₂, la SO₂ et l'hypoxie est mal connue dans la littérature. Dans l'étude suivante, nous avons donc comparé nos estimations de la SO₂ avec les indications données par un marqueur pimonidazole de l'hypoxie. Pour obtenir une large gamme de valeurs de la SO₂ ainsi que des zones hypoxiques, nous avons étudié un modèle de tumeur cérébrale à différents temps de la croissance tumorale. De plus, nous avons comparé les informations données par la mesure de la SO₂ à celles données par la mesure du BVf pour estimer l'indépendance de ces deux mesures.

Dans cette étude, les mesures réalisées à différents temps au cours de la croissance tumorale ont été regroupées puisque seules les valeurs absolues de la SO₂ nous intéressaient. On pourra cependant trouver dans le Chapitre E.III. , l'étude détaillée de l'évolution temporelle de la SO₂ tumorale ainsi que l'évolution d'autres paramètres vasculaires.

III.1. MATERIEL ET METHODES

Ici, nous ne présentons qu'une partie du protocole de l'étude. Pour les détails de l'étude complète, on se référera au Chapitre E.III.

Des rats Fisher (n=12), ayant reçu une injection de cellules tumorales de la lignée 9L intracérébrale, sont imaged et sacrifiés à différent temps (J9, J11, J13, J15 et J18) de la croissance tumorale.

III.1.a. Protocole d'IRM

Les expériences IRM sont réalisées sur l'imageur horizontal à 4,7 T. Chaque animal est anesthésié à l'isoflurane 5% dans de l'air lors de l'induction puis maintenu à 2%. Un cathéter est placé dans la veine de la queue pour l'injection d'agent de contraste dans l'IRM. Le rat est placé dans un berceau, sur une couverture chauffante dont la température est maintenue à 38°C. La tête est maintenue avec une barre à dents et des barres d'oreilles. La respiration est suivie par un monitoring physiologique. Le protocole de mesure de la SO₂ est le protocole 2 (ChapitreC.III.5.) qui requiert l'acquisition des séquences MGE avec une résolution spatiale élevée. Pour toutes les séquences, les caractéristiques géométriques des images sont : 7 tranches contiguës de 1mm, FOV=30x30mm²; matrice=128x128, sauf pour la séquence MGE3D : FOV=30x30x8mm³, matrice=256x256x40, TR=100ms, 15 échos, ΔTE=4ms.

III.1.b. Traitement des données IRM

Après traitement des données IRM à l'aide du logiciel Matlab, des régions d'intérêts (ROI) sont tracées sur l'image anatomique, délimitant la tumeur, la périphérie tumorale (3 pixels soit 350 μm autour de la ROI « tumeur ») et le striatum controlatéral à la tumeur. Pour chaque rat, les ROI sont tracées sur toutes les coupes où la tumeur est présente. Les ROI sont ensuite reportées sur les cartes de SO₂ et de BVf.

III.1.c. Sacrifices des rats et prélèvements

Une dose de 1 ml/kg de pimonidazole (Hypoxyprobe-1, Chemicon) à 100 mg/ml est injectée en intraveineuse 1h avant le sacrifice de l'animal.

Les rats sont euthanasiés avec une dose de Dolethal® (Vétoquinol) de 150 mg/kg injecté en intrapéritonéale. Le cerveau est prélevé et congelé dans l'isopentane puis conservé à -80°C. Au moment de l'immunohistologie, des coupes coronales de 10 µm d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un cryotome (Microm). Les coupes sont fixées 10 min dans de l'acétone froid, puis incubées avec l'anticorps anti-pimonidazole (Hypoxyprobe-1, Chemicon) au 1/10^{ème} dans du PBS-BSA 3%.

Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps secondaire anti-souris biotinylé (B7151, Sigma) dilué au 1/200^{ème}, puis avec une extravidine peroxidase au 1/500^{ème}. Le signal est révélé par de la diaminobenzidine (DAB) en présence de H₂O₂ 1%. Une contre coloration est ensuite effectuée en plongeant les lames dans un bain d'hématoxyline, puis 3 passages dans de l'éthanol à 100% et 3 passages dans du toluène. Le montage s'effectue avec du Pertex.

III.1.d. Analyse d'image

Les coupes marquées au pimonidazole sont scannées. A l'aide du logiciel imageJ, 2 ROI sont tracées en délimitant d'une part la zone tumorale et d'autre part la zone marquée au pimonidazole et/ou nécrotique.

A partir de ces 2 régions d'intérêt, on calcule le pourcentage de surface hypoxique/nécrotique dans chaque tumeur. Cette surface est ensuite comparée au pourcentage de la surface de la tumeur dont la SO₂ est inférieure à 40% (les valeurs négatives sont aussi prises en compte), déterminée sur l'image IRM correspondant à la coupe histologique.

Cette valeur seuil de 40% provient du fait que lorsque la SO₂ est inférieure à 40% environ, les cellules sont mal approvisionnées en oxygène et se retrouvent en situation hypoxique (Kurth, 2002 ; Merritt, 2003). Les résultats obtenus pour les différentes coupes d'un même rat sont moyennés.

III.2. RESULTATS

III.2.a. Corrélation SO₂ et pimonidazole

On observe Figure 58 le marquage au pimonidazole sur trois coupes provenant de rats différents et à trois temps différents. On s'aperçoit que la tumeur peut contenir des zones hypoxiques (en brun).

En comparaison, on voit figure les cartes de SO₂ correspondantes. On observe une répartition spatiale des zones de faibles SO₂ (zones sombres) qui semble correspondre à celle des zones hypoxiques.

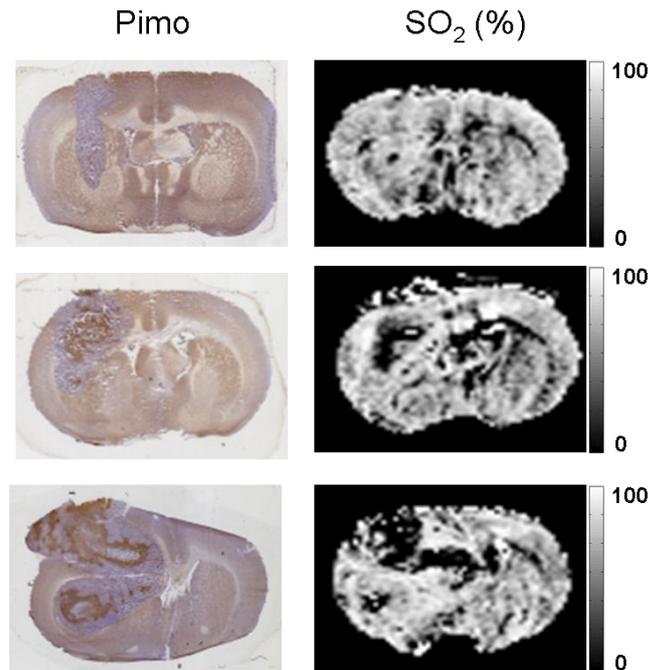


Figure 58 : Marquage au pimonidazole à différents temps (3 rats) et cartes de SO₂ correspondantes. Les zones marron dans les images histologiques correspondent aux zones hypoxiques.

Sur le graphique de la Figure 59, est représenté le pourcentage de la surface de la tumeur dont la SO₂ est inférieure à 40% en fonction du pourcentage de surface nécrotico-hypoxique dans la tumeur obtenue à partir du marquage du pimonidazole. Nous avons évalué que la surface nécrotico-hypoxique mesurée par le pimonidazole ou par IRM augmente au cours de l'évolution tumorale. Les données montrent une bonne corrélation entre les deux approches ($R^2 = 0,8122$).

Les zones de faibles valeurs de SO₂ pourraient donc indiquer des zones en état hypoxique.

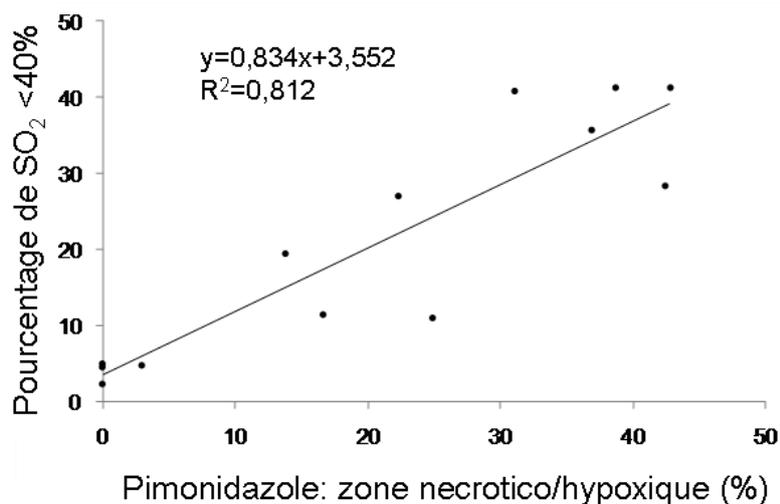


Figure 59 : Corrélation du pourcentage de surface de la tumeur dont la SO₂ est inférieure à 40% avec le pourcentage de surface nécrotico-hypoxique déterminé par immunohistochimie du pimonidazole.

III.2.b. Corrélation SO₂ et BVf

Sur le graphique de la Figure 60, nous avons tracé, pour 1000 voxels tirés aléatoirement dans les ROI de 4 rats et à un temps tardif (J18), les valeurs de SO₂ obtenues en fonction du BVf :

En jaune, on observe la corrélation entre les deux mesures pour les voxels provenant de la ROI controlatérale. On observe une répartition étalée des valeurs de SO₂ sur la gamme 1-4% de BVf. La plupart des valeurs de SO₂ se situent entre 40 et 90%. Dans ce cas nous avons trouvé une corrélation de $R^2=0,021$. Quelques pixels présentent une SO₂ négative. Ceci n'a pas de signification physiologique mais il a été vu dans le chapitre C que ces estimations pouvaient provenir du contraste accentué entre la matière grise et la matière blanche. Les quelques voxels (<1%) qui présentent une SO₂>100% pourraient être attribués à des erreurs de mesures.

En rouge, on observe les voxels provenant de la ROI tumeur. Dans ce cas nous avons trouvé une corrélation de $R^2=0,021$. On observe ici des volumes sanguins plus importants que dans le coté controlatéral. Pour ces valeurs, on ne mesure que des SO₂ élevées. Ces valeurs paraissent cohérentes puisque étant donné un apport élevé en oxygène, le tissu a besoin d'extraire moins d'oxygène de chaque globule rouge. Dans la tumeur, on observe également des SO₂ négatives. Ici il s'agit probablement de zones nécrotiques (BVf très faible<1%).

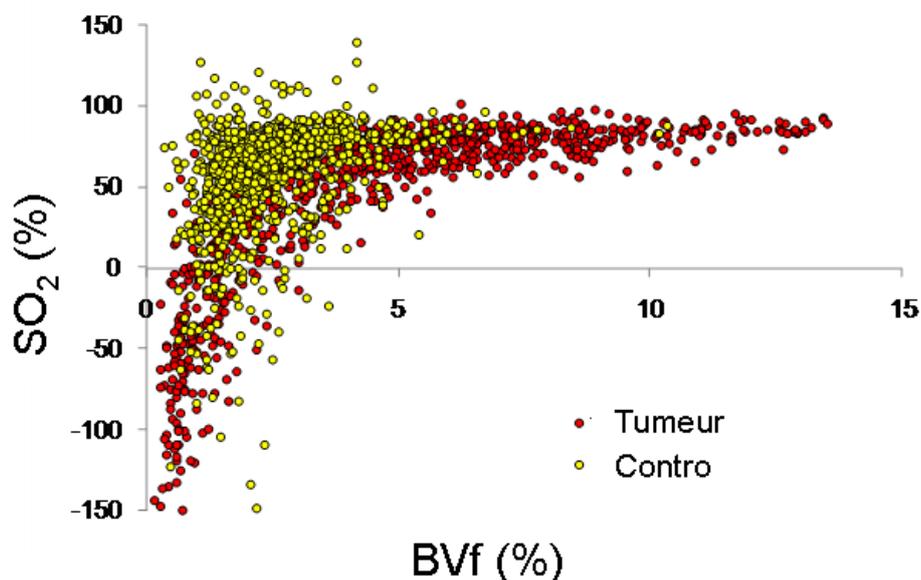


Figure 60 : Corrélation BVf/SO₂

Il existe bien une faible corrélation entre les deux mesures. Mais étant donné que le BVf intervient dans la formule de calcul de la SO₂ cette observation était attendue. Par contre ces informations sont loin d'être redondantes puisque l'on peut mesurer pour un même volume sanguin différentes SO₂ et inversement.

IV. CONCLUSIONS SUR LA METHODE

Nous avons développé une méthode IRM simple pour mesurer la SO₂ en utilisant des séquences classiques de l'IRM. Les résultats obtenus expérimentalement sur des rats sains ont montré de bonnes corrélations avec les mesures classiques de gaz du sang pendant des challenges hyperoxiques et hypoxiques. Les mesures sont reproductibles et nous avons montré que les informations sur la SO₂ n'étaient pas redondantes avec celles du BVf.

On peut noter que des cartes d'OEF peuvent être estimées à partir de nos estimations de SO₂ si le volume veineux est connu. Or notre approche à l'équilibre nous donne des informations sur l'ensemble du volume sanguin. Pour des cerveaux sains, des valeurs de volume sanguin veineux pourraient être tirés de la littérature [van Zijl *et al* (1998)]. On pourrait également utiliser une approche similaire à celle décrite par An et Lin [An and Lin(2000)]. Une fois le OEF connu, il est également possible d'estimer le CMRO₂ en effectuant une mesure complémentaire du débit sanguin cérébral.

D'autre part, ce protocole de mesure de la SO₂ a clairement un potentiel clinique. Même si notre approche à l'équilibre ne peut pas être appliquée tout de suite (les USPIO ne sont pas approuvés pour utilisation chez l'homme), des techniques dynamiques de mesure du BVf qui sont utilisées en routine en clinique ou des techniques comme VERVE [Stefanovic and Pike(2005)] où il n'y a pas besoin d'agent de contraste pourraient être utilisées à la place.

Dans un type de tumeur cérébrale, nous avons établi une bonne corrélation entre les zones de faibles valeurs de SO₂ et les zones hypoxiques marquées par un pimonidazole. Même si d'autres expériences sont requises pour comprendre la relation SO₂/pO₂/hypoxie, cette approche pourrait être utilisée pour suivre le développement de pathologies et l'efficacité de nouvelles thérapies. Elle pourrait également être combinée à une caractérisation plus complète de la microvascularisation. Dans ce cas, elle serait bien appropriée à l'étude des effets de médicaments antiangiogéniques qui placent les tumeurs en conditions hypoxiques en détruisant la vascularisation tumorale. Ces mesures font l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE E : QUELQUES DONNEES COLLECTEES EN SITUATIONS PATHOLOGIQUES

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats obtenus avec notre méthode de mesure de la SO_2 sur différentes pathologies. Dans ces études, dont la portée va au delà de notre travail doctoral (thèse de B. Lemasson au laboratoire), nous avons essentiellement participé à la définition du protocole de mesure de la SO_2 et à l'analyse des données de SO_2 .

Dans une première étude, nous avons évalué la SO_2 sur deux modèles de tumeurs (C6 et U87-MG) et un modèle d'ischémie cérébrale. Les mesures ont été réalisées à un temps donné. Dans une seconde étude, nous avons évalué la SO_2 sur le modèle de tumeur U87-MG à un temps donné après un traitement de chimiothérapie et/ou un traitement antiangiogénique. Dans la troisième étude, nous avons effectué un suivi longitudinal de la SO_2 sur un modèle de tumeur 9L pendant 9 jours. Ce suivi a été réalisé sur des animaux non traité et des animaux sous thérapie antiangiogénique.

On peut ajouter qu'ici nous ne souhaitons pas nous étendre sur l'efficacité de certains traitements mais simplement évaluer si notre approche de mesure de la SO_2 est sensible à différentes conditions pathologiques ou traitements.

Pour toutes les études présentées ici, les acquisitions IRM ont été réalisées sur l'aimant horizontal opérant à 4,7T en utilisant la configuration émission antenne de volume réception antenne de surface. Les pixels présentant des SO_2 inférieures à 0% ou supérieures à 100% sont rejetés de l'étude puisqu'ils ne présentent pas de signification physique. Pour les mêmes raisons, nous avons également rejeté les pixels présentant des BVf et VSI en dehors des intervalles [0%, 15%] et [0 μ m, 50 μ m] respectivement [Troprès *et al* (2004)].

I. MESURES DE LA SO₂ SUR DEUX MODELES DE TUMEURS ET UN MODELE D'ISCHEMIE CEREBRALE

Dans cette étude, nous avons évalué la méthode de mesure de la SO₂ sur deux modèles de tumeurs cérébrales et un modèle d'ischémie cérébrale sur le rat. Cette étude pilote a été réalisée chez les animaux disponibles au moment de l'étude. Elle n'a donc pas été construite pour traiter une question biologique mais simplement pour apprécier le sens des mesures de la SO₂ dans des conditions variées.

I.1. MATERIEL ET METHODES

Les animaux (n=23) sont anesthésiés sous isoflurane (2%). La queue est équipée d'un cathéter pour l'injection de l'agent de contraste. Pour tous les rats la FiO₂ pendant l'expérience est de 21%. Quatre groupes d'animaux ont été étudiés :

- Dans le groupe contrôle : 12 rats Wistar sains ont été imagés.
- Dans le groupe C6 : 10⁵ cellules de gliomes C6 ont été implantées dans le striatum de rat Wistar (n=4). L'imagerie IRM a été réalisée 18 jours après l'implantation des tumeurs.
- Dans le groupe U87-MG : 10⁵ cellules de gliomes ont été implantées dans le striatum de rat nude (n=4). L'imagerie a été réalisée 34 jours après l'implantation des tumeurs.
- Dans le groupe ischémie : une ischémie focale transitoire de 90 min a été induite par occlusion de l'artère cérébrale moyenne droite en utilisant le modèle décrit dans [Longa *et al* (1989)]. L'ischémie a été réalisée sur des rats mâles Sprague-Dawley (n=3) et l'imagerie a été réalisée 2 jours après l'ischémie.

Les séquences utilisées pour la mesure de la SO₂ sont celles décrites dans le (ChapitreC.III.). Le protocole utilisé est le protocole 1 impliquant l'acquisition d'une carte de champ magnétique. Pour toutes les séquences, les caractéristiques des images sont : 7 tranches contiguës de 1 mm, FOV=30x30mm²; matrice=64x64 ou 128x128, sauf pour la carte de champ : séquence 2GE3D, FOV=30x30x8mm³, matrice=128x128x40, TR=100ms TEs=4 et 12ms.

Le protocole complet dure 45 min par animal.

Le traitement des données est similaire à celui décrit (ChapitreC.III.5.). Les données sont moyennées entre les rats d'un même groupe et sont présentées pour deux régions d'intérêts (striatum sain et tumeur ou ischémie). Des tests de Student sont utilisés pour évaluer les différences (**:p<0,01, ***:p<0,001).

I.2. RESULTATS

Les valeurs de SO₂ estimées dans le striatum controlatéral des groupes tumeurs et ischémie ne sont pas significativement différentes de celles trouvées dans le striatum des rats contrôle (SO₂=61,0±1,2%; Figure 61B). Dans la tumeur C6, la SO₂ ne diffère pas

de celle trouvée dans le striatum contrôle ($SO_2=57,2\pm 4,3\%$; Figure 61B). Dans la tumeur U87-MG et dans la région ischémique, la SO_2 est plus élevée que dans le striatum contrôle ($SO_2=74,1\pm 2,5$ et $SO_2=83,0\pm 4,5\%$ respectivement; Figure 61B).

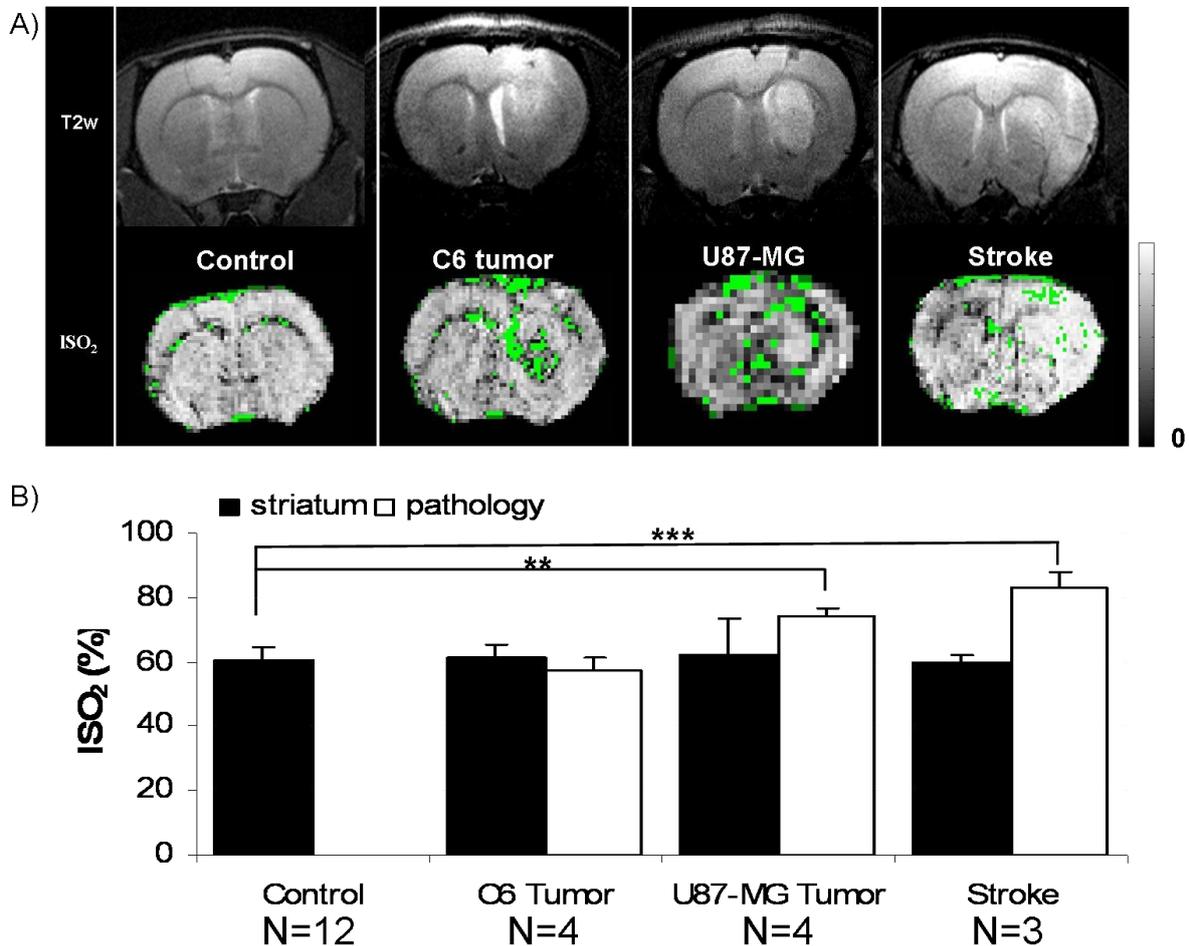


Figure 61 : A) Images représentatives pondérées T_2 et cartes de SO_2 pour les 4 groupes. Les pixels verts correspondent aux pixels rejetés de l'étude. B) Mesures de la SO_2 moyennées sur deux régions d'intérêts : striatum sain et tissu pathologique.

I.3. DISCUSSION

Comme pour l'étude Chapitre D.II. , les valeurs de la SO_2 mesurées dans le striatum controlatéral à la lésion ou sur rats sains sont en accord avec les données de la littérature. On trouve également un faible écart type sur les mesures qui suggère une bonne reproductibilité de la méthode. Nous avons trouvé des différences significatives entre les valeurs trouvées dans les tumeurs C6 et U87-MG et une modification dans le cas du modèle d'ischémie focale.

Dans ce dernier cas, la SO_2 élevée dans le côté lésé pourrait être en bon accord avec l'idée d'une perfusion de luxe décrite dans les travaux de [Lin *et al* (2002)].

II. MESURE DE LA SO₂ APRES UN TRAITEMENT DE CHIMIOThERAPIE ET/OU UN TRAITEMENT ANTIANGIOGENIQUE

Dans cette étude, nous avons évalué la SO₂ ainsi que d'autres paramètres vasculaires dans un modèle de glioblastome humain (U87-MG) après traitement par chimiothérapie et/ou traitement antiangiogénique.

II.1. MATERIEL ET METHODES

Les rats nude (n=16) ont reçu une injection de 10⁵ cellules U87-MG au jour 0 (J0). A J16, des images pondérées T₂ ont été réalisées pour évaluer la taille des tumeurs. A J17, les rats ont alors été repartis en 4 groupes (n=4 par groupe) présentant une taille tumorale moyenne équivalente (7±4mm³). Les traitements ont commencés à J18.

- Dans le premier groupe (groupe contrôle), les animaux n'ont reçu aucun traitement.
- Dans le second groupe (Groupe Av), les animaux ont reçu 4 injections de 5 mg/kg de traitement antiangiogénique par voie intraveineuse tous les 4 jours (J18, J22, J26 et J30). Le médicament administré est l'Avastin® (Bevacizumab, Roche), ciblant le VEGF.
- Dans le troisième groupe (Groupe Cam), les animaux ont reçu 3 injections de 40 mg/kg de chimiothérapie tous les 7 jours (J18, J25 et J32). Le médicament administré est le Campto® (Pfizer), un inhibiteur de la topo-isomérase1.
- Dans le dernier groupe (groupe Av-Cam), les rats ont reçu les deux traitements (Avastin et Campto) en suivant le même planning que pour les groupes séparés. Dans ce groupe, un rat est mort avant la session IRM.

Comme pour l'étude précédente, les animaux sont anesthésiés sous isoflurane (2%). La queue est équipée d'un cathéter pour l'injection de l'agent de contraste et pour tous les rats, la FiO₂ pendant l'expérience est de 21%.

Les acquisitions IRM ont été réalisées à la fin des deux traitements (J34). Le protocole d'acquisition est similaire à celui de l'étude précédente (Chapitre E.I.). Nous avons cependant ajouté une séquence MGESE (TR=6000ms; ΔTEGE=3ms; TESE=60ms) avant et après l'injection d'USPIO pour obtenir le VSI (Chapitre C.III.3.) et une séquence de diffusion pour obtenir des cartes d'ADC (3 images EPI de diffusion en écho de spin (directions orthogonales avec $b = 800 \text{ s} \cdot \mu\text{m}^{-2}$) et une image de référence ($b \approx 0 \text{ s} \cdot \text{mm}^{-2}$)). Des acquisitions pondérées T₂ ont également été utilisées pour mesurer le volume tumoral. Pour toutes les séquences, les caractéristiques géométriques des images sont : 7 tranches contiguës de 1 mm, FOV=30x30mm²; matrice=128x128, sauf pour les cartes de SO₂ : 7 tranches contiguës de 1 mm, FOV=30x30mm²; matrice=64x64.

Le protocole complet dure 1h15min par animal. Les données ont été moyennées entre les rats d'un même groupe et sont présentées pour deux régions d'intérêt (tumeur et striatum controlatéral) et pour chaque groupe. Des tests Student sont utilisés pour évaluer les différences (*:p<0,05, **:p<0,01, ***:p<0,001).

II.2. RESULTATS

La Figure 62 représente des images pondérées T₂ et des cartes d'ADC, BVf, VSI et SO₂ dans les groupes Contrôle et Av-Cam.

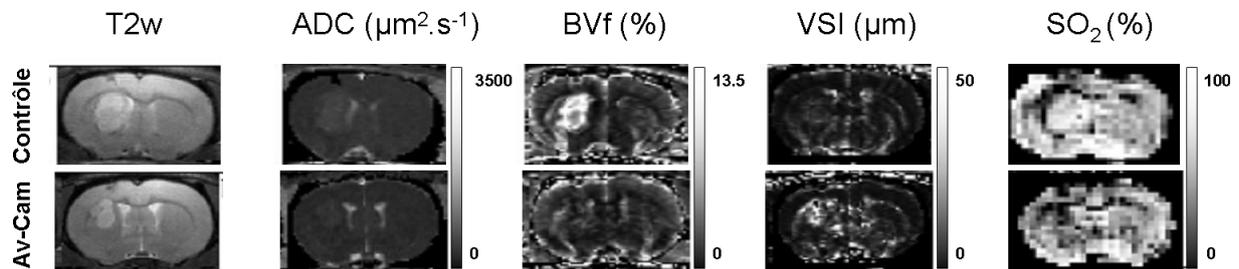
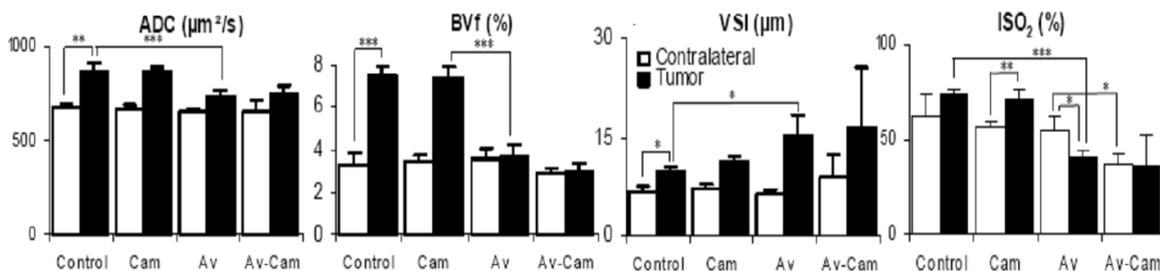


Figure 62 : Images anatomiques et cartes paramétriques acquises sur deux rats des groupes contrôle et Av-Cam.

La Figure 63 représente les résultats numériques obtenus pour tous les groupes. On voit que la croissance tumorale dans les groupes Av et Av-Cam a été significativement réduite en comparaison avec le groupe contrôle.

Dans le striatum controlatéral, il n'y a pas de variations significatives de l'ADC, du VSI ou du BVf entre les groupes. La SO₂ dans le côté controlatéral est similaire entre les groupes Contrôle, Cam et Av mais est significativement réduite dans le groupe Av-Cam.

L'ADC, le BVf, le VSI et la SO₂ dans les tumeurs sont similaires entre les groupes Contrôle et Cam. Pour ces deux groupes, ces valeurs sont plus élevées que dans le striatum controlatéral. L'ADC, le BVf et la SO₂ dans les tumeurs des groupes Av et Av-Cam sont significativement plus bas que dans le groupe contrôle. Dans ces groupes, le VSI est à l'inverse plus élevé que dans le groupe contrôle.



(mean ±SD)	Control (n=4)		Cam (n=4)		Av (n=4)		Av-Cam (n=3)	
	Contra	Tumor	Contra	Tumor	Contra	Tumor	Contra	Tumor
Volume (mm ³)	-	264±249	-	119±73	-	78±58	-	38±10
ADC (µm ² /s)	682±7	870±40	665±22	862±27	654±10	739±24	652±60	748±43
BVf (%)	3.3±0.6	7.5±0.5	3.4±0.3	7.4±0.5	3.5±0.5	3.6±0.6	2.8±0.4	2.9±0.4
VSI (µm)	6.5±1.2	9.6±0.7	7.3±0.4	11.3±0.8	6.3±0.5	15.0±3.4	9.0±3.2	16.4±9.1
ISO ₂ (%)	62.2±11.1	74.1±2.5	57.4±2.3	71.8±4.6	55.3±6.7	40.1±3.4	36.7±5.6	35.2±17.3

Figure 63 : Mesures du volume tumoral, ADC, VSI, BVf et SO₂ dans le groupe contrôle, ou les groupes ayant reçu de l'Avastin seul (Av), du Campto seul (Cam) ou une combinaison d'Avastin et de Campto (Av-Cam). Les données, moyennées entre les rats d'un même groupe (moyenne et écart-type), sont présentées pour 2 régions d'intérêt (tumeur et striatum controlatéral).

II.3. DISCUSSION

Le traitement par chimiothérapie n'a pas d'effets significatifs sur la croissance tumorale, l'ADC, le BVf, le VSI ou la SO₂ en comparaison avec le groupe contrôle. Les groupes Cam et contrôle montrent un BVf et une SO₂ plus grands que le côté controlatéral. L'Avastin utilisé seul ou en combinaison avec le Campto a des effets significatifs sur la croissance tumorale et sur la microvascularisation tumorale. Dans les groupes Av et AV-cam, le BVf est équivalent dans le côté controlatéral et dans la tumeur alors que le VSI est plus élevé dans la tumeur. Ceci suggère une densité plus faible de vaisseaux dans la tumeur. Dans le groupe Av, cette densité de vaisseaux est associée à une SO₂ plus faible. Dans le groupe Av-Cam, la SO₂ dans le côté controlatéral est également plus petite que celle du groupe contrôle. Cette réduction pourrait être expliquée par l'effet toxique de la combinaison des traitements. En effet, dans ce groupe, le volume tumoral est réduit après l'application des traitements mais nous avons trouvé une moyenne de survie des animaux similaire à celle du groupe contrôle.

Ces résultats suggèrent que le suivi des modifications des paramètres microvasculaires (BVf, VSI, ADC et SO₂) permet de monitorer les effets d'un traitement antiangiogénique seul ou combiné à de la chimiothérapie sur des gliomes. La mesure de la SO₂ pourrait être sensible à l'effet thérapeutique de l'antiangiogénique et semble fournir une information indépendante de celle donnée par le BVf et le VSI.

III. SUIVI LONGITUDINAL DE LA SO₂ TUMORALE PENDANT UN TRAITEMENT ANTIANGIOGENIQUE

Dans cette étude, nous avons testé une thérapie antiangiogénique, le Sorafenib, sur un modèle orthotopique de glioblastome chez le rat (modèle 9L). Deux groupes d'animaux, un groupe non traité et un groupe traité au Sorafenib, sont imagés à différents temps pour effectuer un suivi thérapeutique. Plusieurs paramètres de la microvascularisation (BV, VSI, ADC et AUC (status of the vessel wall)) ont été évalués en plus de l'information de la SO₂. Pour chaque groupe, des rats supplémentaires sont imagés, puis sacrifiés à chaque temps. Le cerveau est prélevé pour être étudié par des techniques de biologie. Une partie de cette étude a été utilisée (chapitre D) pour évaluer comment les mesures de la SO₂ corrélaient avec des informations données par un marquage au pimonidazole. Cette étude a été pilotée par B. Lemasson et a fait l'objet d'un stage de Master (C. Maisin) encadré par B. Lemasson.

III.1. MATERIEL ET METHODES

L'implantation des cellules de la lignée 9L est effectuée à J0 sous anesthésie générale avec un mélange xylazine/kétamine (64,5/5,4 mg/kg) injecté par voie intrapéritonéale. Les rats sont placés sur une couverture chauffante afin de réguler leur température corporelle. Les cellules sont injectées en se servant d'un cadre stéréotaxique, au niveau du noyau caudé droit (10⁴ cellules dans 1 µl de milieu de culture sans antibiotiques).

III.1.a. Traitement des rats

Deux groupes d'animaux, un groupe non traité (groupe contrôle) et un groupe traité (groupe SORA) avec une thérapie antiangiogénique ont été suivis. Les animaux du groupe traités ont reçu 8 administrations de Sorafenib par voie orale (100mg/kg) entre le 10^{ème} et le 18^{ème} jour après l'implantation des cellules tumorales (J10T0 et J18T+8, respectivement) (Figure 64). Le médicament se présente sous forme de comprimés qui sont broyés puis repris avec du DMSO (5%), du Tween (5%) et du sérum physiologique (90%) pour être administré à l'animal.

III.1.b. Protocole d'IRM

Les rats sont imagés à J9T-1, J11T+1, J13T+3, J15T+5 et J18T+8 (Figure 64). Chaque animal est anesthésié à l'isoflurane (5% dans de l'air) lors de l'induction puis maintenu à 2%. Un cathéter est placé dans la veine de la queue pour l'injection d'agents de contraste dans l'IRM. Le rat est placé dans un berceau, sur une couverture chauffante dont la température est maintenue à 37°C. La tête est maintenue avec une barre à dents et des barres d'oreilles. La respiration est suivie par un monitoring physiologique.

Les séquences utilisées pour la mesure de la SO₂ sont celles décrites dans le Chapitre C. Le protocole de correction des inhomogénéités macroscopiques de champ utilisé ici est le protocole 2 impliquant les acquisitions de la séquence MGE avec une résolution spatiale élevée. Pour toutes les séquences, les caractéristiques géométriques des images sont : 7 tranches contiguës de 1 mm, FOV=30x30mm²; matrice=128x128, sauf pour la séquence MGE3D : FOV=30x30x8mm³, matrice=256x256x40, TR=100ms, 15 échos, ΔTE=4ms. Nous avons, comme pour l'étude précédente, ajouté une séquence MGESE

(TR=6000ms; ΔTEGE=3ms; TESE=60ms) avant et après l'injection d'USPIO (200μmol/kg) pour obtenir le VSI et une séquence de diffusion pour obtenir des cartes d'ADC (3 images EPI de diffusion en écho de spin (directions orthogonales avec $b = 800 \text{ s.}\mu\text{m}^{-2}$) + une image de référence ($b \approx 0 \text{ s.mm}^{-2}$)). Après l'injection d'USPIO, un autre agent de contraste (P846) est injecté en bolus et la perméabilité des vaisseaux sanguin est analysée par une approche DCE (Dynamic Contrats Enhanced) (Plusieurs images pondérées T₁ (n=14, 15,6 sec par acquisition) acquises en utilisant une séquence RARE (TR/TE = 800/4,2 ms)).

Le protocole complet dure 1h30 par animal.

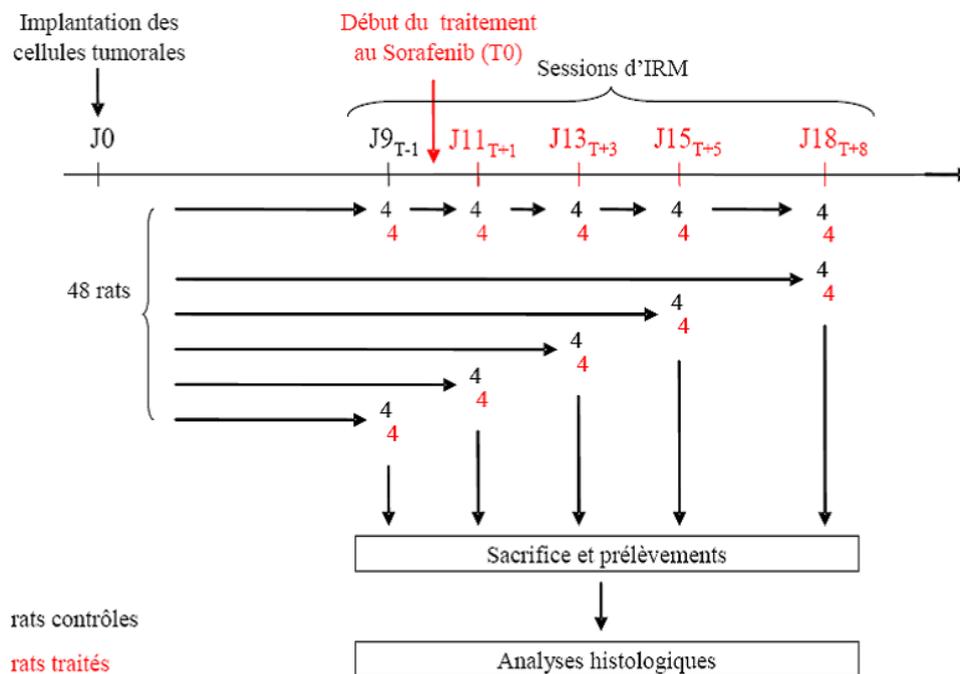


Figure 64 : Protocole de suivi des rats.

Après traitement des données IRM à l'aide de l'application Matlab que nous avons développée pour l'étude de la SO₂ et de celle développée par E.Barbier pour le traitement du VSI, ADC et AUC, des régions d'intérêts (ROI) sont tracées manuellement sur l'image anatomique, pour délimiter la tumeur et le striatum controlatéral à la tumeur. Les résultats IRM présentés sont des moyennes par groupe, par jour d'observation et par ROI.

III.1.c. Sacrifices des rats et prélèvements

Une dose de 1 ml/kg de pimonidazole (Hypoxyprobe-1, Chemicon) à 100 mg/ml est injectée en intraveineuse 1h avant le sacrifice de l'animal. Les rats sont euthanasiés avec une dose de Dolethal® (Vétoquinol) de 150 mg/kg injecté en intrapéritonéale. Le cerveau est prélevé et congelé dans l'isopentane puis conservé à -80°C. Sur chacun des rats, des études immunohistologiques sont effectuées. Pour cela, des coupes coronales de 10 μm d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un cryotome (Microm). Les marquages sont effectués sur des lames différentes contenant chacune 4 coupes d'un même cerveau, espacées d'environ 1 mm.

- Coloration Hématoxyline Erythrosine

Les coupes sont fixées dans une solution de Méthanol/acétone (1:1) pendant 2 min. Puis les lames sont plongées dans différents bains afin de colorer les noyaux et le cytoplasme des cellules : hématoxyline (coloration des noyaux), solution H₂O – HCl 0,5%, eau ammoniacquée, Erythrosine (coloration des cytoplasmes) puis 3 passages à l'éthanol et 3 passages au Toluène. Le montage entre lame et lamelle est réalisé avec du Pertex.

- Caractérisation de l'hypoxie : Le pimonidazole, injecté avant sacrifice de l'animal, est un composé nitroimidazole qui est distribué dans tous les tissus. Il est réduit par les cellules hypoxiques viables dont la pression partielle pO₂ est inférieure à 10 mm Hg à 37°C, lui permettant ainsi de former des liaisons covalentes avec les protéines cellulaires. Les coupes sont fixées 10 min dans de l'acétone froid, puis incubées avec l'anticorps antipimonidazole (Hypoxyprobe-1, Chemicon) au 1/10^{ème} dans du PBS-BSA 3%. Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps secondaire anti-souris biotinylé (B7151, Sigma) dilué au 1/200^{ème}, puis avec une extravidine peroxydase au 1/500^{ème}. Le signal est révélé par de la diaminobenzidine (DAB) en présence de H₂O₂ 1%. Une contre coloration est effectuée ensuite en plongeant les lames dans un bain d'hématoxyline, puis 3 passages dans de l'éthanol à 100% et 3 passages dans du toluène. Le montage s'effectue avec du Pertex.

III.2. RESULTATS

Dans les Figure 65 et Figure 66, nous présentons des cartes paramétriques et coupes histologiques acquises au cours du temps sur un rat du groupe non traité et un rat du groupe SORA respectivement. On retrouve, comme dans le chapitre D.III.2.a. , la corrélation entre les zones hypoxiques et nécrotiques marquées au pimonidazole et les faibles valeurs de SO₂ (<40%).

III.2.a. Volume sanguin et index de taille des vaisseaux

Dans le tissu controlatéral, le BVf et le VSI ne varient pas au cours du temps ni dans le groupe non traité ($2,8 \pm 0,5\%$ pour le BVf et $5,3 \pm 0,7 \mu\text{m}$ pour le VSI ; moyennes des différents temps) ni dans le groupe traité ($3,0 \pm 0,4\%$ pour le BVf et $5,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$ pour le VSI ; moyennes des différents temps) (Figure 67).

Dans le groupe non traité, le BVf ne varie pas au cours du temps dans la tumeur, mais le BVf y est plus élevé ($5,1 \pm 0,5\%$ dans la tumeur; moyenne des différents temps) que dans le tissu controlatéral ($2,8 \pm 0,5\%$; moyenne des différents temps) (Figure 67). Le VSI est deux fois plus important à J9T-1 dans la tumeur ($10,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$, respectivement) que dans le tissu controlatéral ($5,3 \pm 1,1 \mu\text{m}$). Dans la tumeur, le VSI augmente au cours du temps jusqu'à des valeurs 3 fois plus importantes à J18T+8 que celle du tissu controlatéral ($17,0 \pm 3,9 \mu\text{m}$ dans la tumeur contre $5,1 \pm 0,6 \mu\text{m}$ dans le tissu controlatéral) (Figure 67).

Dans le groupe traité, le BVf dans la tumeur varie au cours du traitement. A J9T-1, le BVf est élevé ($5,5 \pm 0,6\%$). Sa valeur est similaire à celle du groupe non traité à J9T-1 ($5,6 \pm 0,3\%$). Le BVf diminue ensuite jusqu'à une valeur similaire à celle mesurée dans le tissu controlatéral J15T+5 ($3,2 \pm 0,7\%$), puis se stabilise autour de cette valeur (Figure 67). Dans le groupe traité, les variations du VSI sont similaires à celles observées dans le groupe non traité (Figure 67).

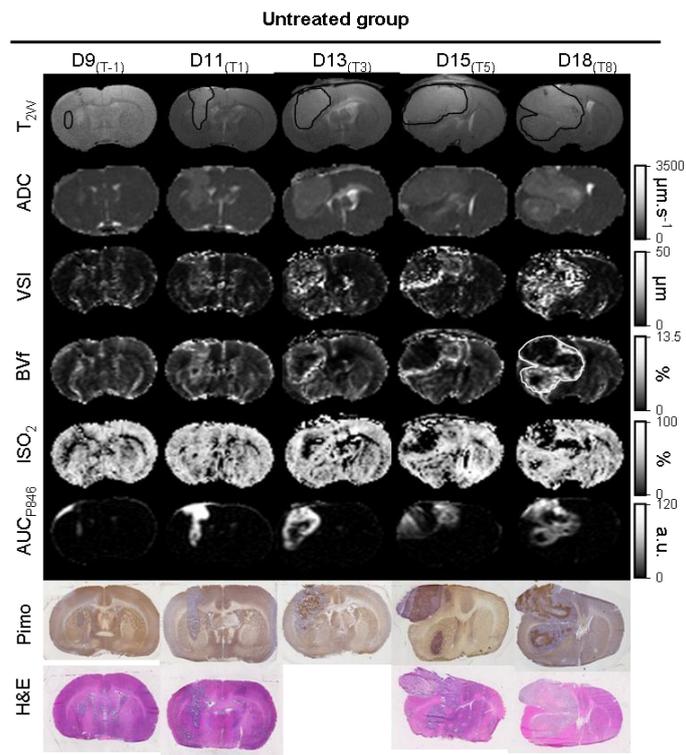


Figure 65 : Cartes paramétriques et coupes histologiques acquises à différents temps sur un rat du groupe non traité. Le trait noir sur les images pondérées T_2 correspond aux ROI utilisées.

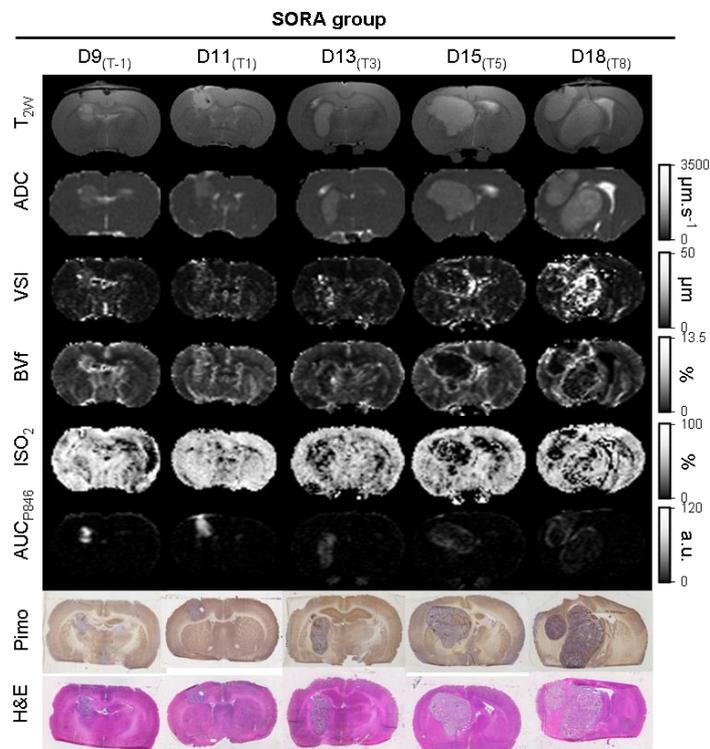


Figure 66 : Cartes paramétriques et coupes histologiques acquises à différents temps sur un rat traité au Sorafenib.

III.2.a. Saturation en oxygène et marquage des zones hypoxiques

Dans le groupe non traité, la SO_2 est d'environ 70% et ne varie pas au cours du temps dans les différentes ROI (Figure 67).

Dans le groupe traité au Sorafenib, la SO_2 ne varie pas dans le tissu controlatéral ($69,9 \pm 5,7\%$ en moyenne) (Figure 67). Dans la tumeur, la SO_2 a une valeur similaire au tissu controlatéral à J9T-1 ($70,9 \pm 5,4\%$) puis diminue jusqu'à J15T+5 ($54,6 \pm 4,8\%$).

Si l'on observe le pourcentage de pixels présentant une SO_2 inférieure à 40% (Figure 67), on observe une stabilité dans le côté controlatéral et une augmentation du pourcentage dans la tumeur non traitée. Dans la tumeur traitée, on observe une augmentation plus importante de ce pourcentage au cours du temps.

III.2.b. Coefficient de diffusion et perméabilité.

Pour les trois régions d'intérêt, l'ADC ne varie pas au cours du temps. On observe cependant une valeur (équivalente pour les groupe traités ou non) plus importante dans la tumeur ($1011 \pm 26 \mu m^2.s^{-1}$, moyenne des différents temps) que dans le côté controlatéral ($738 \pm 15 \mu m^2.s^{-1}$, moyenne des différents temps).

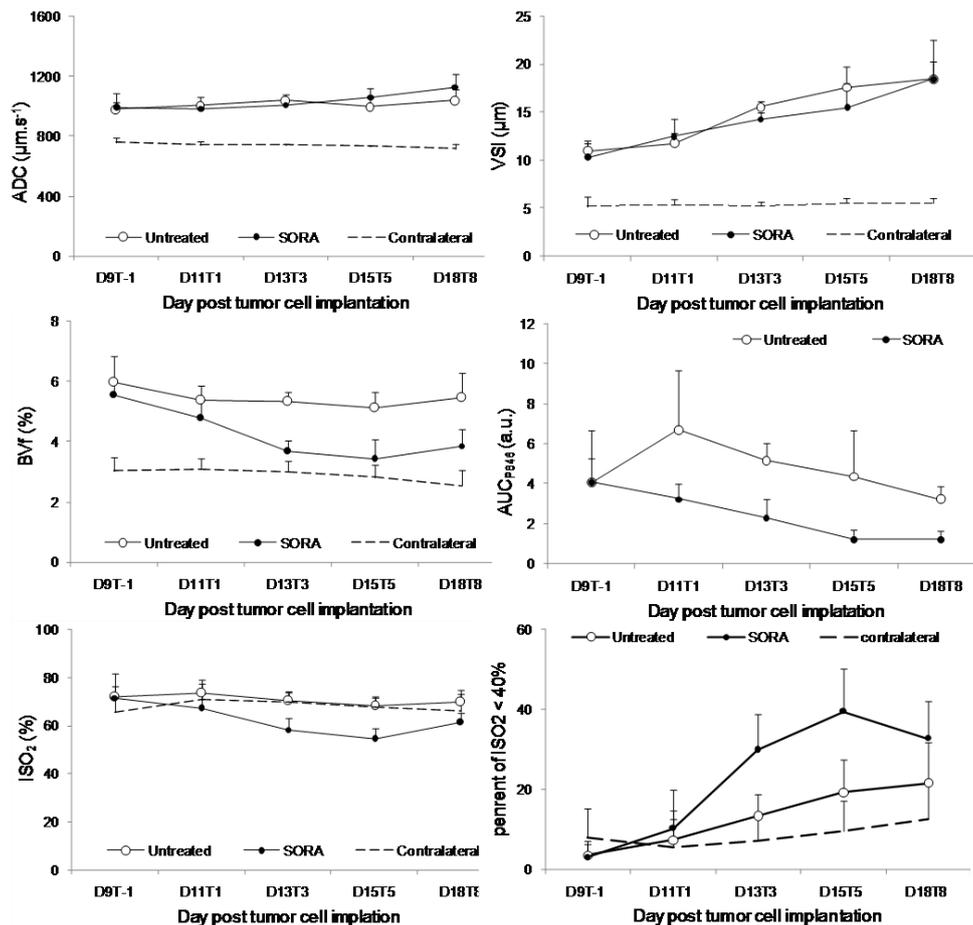


Figure 67 : Résultats numériques des différents paramètres de la microvascularisation acquis par IRM. Les résultats sont présentés pour les ROI tumeurs des groupes non traité et traité et pour la ROI striatum controlatérale moyennée sur les deux groupes.

III.3. DISCUSSION

Dans cette étude, la SO₂ moyenne mesurée par IRM dans le tissu controlatéral (environ 70%) correspond bien à une SO₂ normale. La SO₂ intra-tumorale du groupe non traité est identique à celle du tissu controlatéral et reste stable au cours du temps. Cependant on peut observer une très grande hétérogénéité des valeurs de la SO₂ dans la tumeur, surtout aux temps tardifs. Cette hétérogénéité pourrait être masquée dans les valeurs moyennes.

Nous n'avons pas trouvé d'impact du traitement sur le VSI ou l'ADC. Le BVf dans le groupe traité initialement élevé tend à retrouver la valeur du tissu controlatéral. Cette information pourrait laisser penser à une normalisation des vaisseaux par le Sorafenib.

IV. CONCLUSION

Ces études ont permis de confronter les mesures de la SO_2 à d'autres paramètres vasculaires. Les résultats montrent que le paramètre de la SO_2 peut apporter des résultats indépendants et complémentaires à ceux déjà accessibles au laboratoire. Dans ce cas, il est possible d'obtenir une vision plus claire de la microvascularisation et du développement de la tumeur. Ces études montrent également qu'il est possible de mesurer les différents paramètres vasculaires en un temps raisonnable (<1h). Cette durée pourrait être encore réduite par des améliorations techniques comme l'utilisation de séquences combinant des échos de gradient et de spin et des mesures du BVf et VSI à l'aide d'approches dynamiques.

Dans le côté controlatéral, nous avons trouvé des valeurs stables et reproductibles de la SO_2 . Ces valeurs sont en accord avec celles trouvées dans le chapitre précédent. Nous avons constaté des valeurs différentes de la SO_2 dans les tumeurs par rapport au côté sain. La distribution de la SO_2 dans les tumeurs est hétérogène et les valeurs moyennes dépendent du modèle de tumeur utilisé. Une SO_2 élevée (>70%) pourrait correspondre à une vascularisation abondante due au phénomène d'angiogénèse. Dans le cas de l'ischémie cérébrale, elle pourrait également correspondre à une incapacité des cellules traumatisées à extraire l' O_2 du sang. La comparaison avec le pimonidazole a suggéré que les régions présentant de faibles valeurs de la SO_2 (<40%) correspondaient avec les zones nécrotico-hypoxiques. Mais d'autres étapes de validations sont requises pour comprendre la signification biologique de notre paramètre et établir un lien clair avec l'hypoxie.

Nous avons finalement vu que notre paramètre était sensible à l'application de traitements anti-néoplasiques. Dans la dernière étude de ce chapitre, nous avons constaté que la SO_2 était sensible à l'application du traitement anti-angiogénique alors que l'ADC et le VSI ne l'étaient pas.

CHAPITRE F : INFLUENCE DES CARACTERISTIQUES DU RESEAU VASCULAIRE SUR LES ESTIMATIONS RMN

Que ce soit pour la mesure du volume sanguin, de l'index de taille des vaisseaux ou pour la méthode de la SO_2 , les méthodes que nous avons présentées dans les parties précédentes reposent sur des modèles mathématiques de l'évolution du signal RMN en présence d'inhomogénéités magnétiques (Chapitre C.II.). Dans plusieurs études [Valable *et al* (2008)] [Troprès *et al* (2004)] [Ungersma *et al* (2008)], ces méthodes de mesures ont montré de bonnes corrélations avec d'autres approches comme la tomographie X ou l'histologie pour le BVf ou VSI. Dans le cas de la mesure de la SO_2 , nous avons également trouvé une bonne corrélation avec les gaz du sang (Chapitre D.II.). Mais certaines de ces études ont aussi montré que les valeurs absolues obtenues par les mesures de BVf et VSI pouvaient présenter un écart de 20% avec les résultats trouvés par l'histologie [Valable *et al* (2008)] [Troprès *et al* (2004)].

Cette différence peut être attribuée à des erreurs commises en IRM, en l'histologie ou simplement à la colocalisation des deux méthodes. Mais il est également possible qu'en IRM, l'utilisation des modèles mathématiques qui reposent sur des hypothèses fortes concernant l'environnement microvasculaire (comme la représentation des vaisseaux par des cylindres, l'isotropie des directions des vaisseaux ou une densité relativement faible des vaisseaux dans le cerveau) conduise à des erreurs de mesure. En situation pathologique, où l'on sait que la vascularisation peut être chaotique, les modèles pourraient également induire des erreurs d'estimation.

Dans cette partie, nous avons donc développé une approche *in silico* de la décroissance du signal RMN pour évaluer le comportement des estimations fournies par le modèle lorsque certaines hypothèses étaient modifiées. Cette approche permet entre autre de s'affranchir d'éventuelles erreurs de manipulations expérimentales.

Dans un premier temps, nous avons estimé comment la densité, la forme et la direction des vaisseaux influençaient la précision des mesures (Cette étude a fait l'objet d'un stage de Master de 3 mois réalisé par N. Joudiou). Puis nous avons analysé les résultats des simulations lorsque le réseau vasculaire considéré provenait de données acquises au microscope intravital.

Enfin, les modèles faisant l'hypothèse que les vaisseaux sanguins sont homogènes du point de vue de la susceptibilité magnétique, nous avons étudié l'influence de la présence de globules rouges dans les vaisseaux sur le résultat des mesures. Pour cette dernière étude, nous avons également conduit une expérimentation *in vivo* sur rats sains présentant différents niveaux d'hématocrite.

I. SIMULATIONS INFORMATIQUES

Depuis les années 90, plusieurs études ont simulé la décroissance du signal RMN en présence de réseau vasculaire [Boxerman *et al* (1995)] [Kiselev and Posse(1999)] [Bue *et al* (1997)]. Ces méthodes considèrent toutes le réseau microvasculaire comme un ensemble de cylindres droits. Le champ magnétique est estimé en sommant la contribution de tous les cylindres dont l'équation de la perturbation du champ est connue (Chapitre C.II.2. Pour prendre en compte la diffusion de l'eau autour des cylindres et calculer le signal RMN, elles utilisent une approche Monté-Carlo.

Pour notre étude, nous voulions pouvoir réaliser des simulations incluant n'importe quelle géométrie vasculaire. Il n'était donc pas envisageable d'utiliser le principe des méthodes précédentes puisque l'on sait d'après les chapitres précédents, que les équations analytiques ne sont pas accessibles en dehors de la géométrie des ellipsoïdes. Dans un premier temps, nous avons donc tenté d'utiliser la méthode des éléments finis (sous le logiciel commercial Comsol) pour simuler le distribution du champ magnétique. Cette méthode permet théoriquement le calcul du champ pour toutes sortes de géométries mais nous avons constaté que les calculs deviennent extrêmement lourds dans le cas de géométries compliquées comme le réseau microvasculaire.

L'approche que nous avons finalement retenue est une méthode basée sur l'utilisation de la transformée de Fourier, originellement décrite par [Salomir *et al* (2003)] et plus amplement détaillée par [Marques and Bowtell (2005)]. Dans notre cas, le signal RMN (FID et écho de spin) est calculé en présence de diffusion selon la méthode déterministe proposée par [Klassen and Menon(2007)]. Dans cette partie, nous décrivons le principe des simulations. Nous avons validé l'approche sur des géométries simples. Pour évaluer les erreurs commises en utilisant les hypothèses du modèle, nous avons simulé la méthode de mesure du volume sanguin à l'équilibre (Chapitre C.III.3.). Nous nous sommes concentrés sur cette méthode car il était simple de comparer les résultats obtenus par les simulations aux valeurs de BVf réelles introduites en entrée des simulations. On peut néanmoins ajouter que le principe des calculs permet de simuler la méthode de mesure du VSI et de la SO₂ (décrite dans le chapitre C).

Les simulations ont été réalisées sur un PC possédant quatre processeurs double cœurs IntelXeonrE5345 (2,33Ghz, 1333MHz, 2*4M₀ de cache) et muni d'une mémoire de 8*1024MB. Elles ont été réalisées sur le logiciel Matlab.

I.1. CALCUL DU CHAMP MAGNETIQUE DANS LE VOXEL

Nous avons choisi la méthode décrite par [Marques and Bowtell (2005)] et [Salomir *et al* (2003)] car elle permet le calcul du champ magnétique induit par une distribution de susceptibilité magnétique quelconque. Cette méthode nous permettra donc d'étudier n'importe quel réseau vasculaire. On peut mentionner qu'une autre méthode a été proposée récemment par Pathak [Pathak *et al* (2008)].

1.1.a. Principe

Cette méthode repose une approximation dipolaire de l'induction magnétique résultant d'une distribution d'aimantation quelconque. Si, dans le domaine spatial, cette expression n'est pas évidente à calculer [Koch *et al* (2006)], elle se simplifie dans le domaine de Fourier. En considérant un voxel dont on connaît en chaque point la susceptibilité magnétique et qui est plongé dans un champ magnétique B_0 , l'approximation dipolaire donne :

$$B_z(\vec{k}) = B_0 \cdot \left(\frac{1}{3} - \frac{k_z^2}{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2} \right) \cdot \chi(\vec{k}) \quad \text{Équation 57}$$

avec $\chi(k)$ la distribution de la susceptibilité magnétique dans l'espace réciproque. k_x , k_y , k_z représentent les coordonnées du vecteur k . Dans cette formule, il est supposé que le champ magnétique statique est appliqué selon la direction z , une expression plus générale peut être trouvée dans [Koch *et al* (2006)].

Ici, l'induction magnétique est donc proportionnelle à χ dans l'espace réciproque. En effectuant la transformée de Fourier inverse de $B_z(k)$, on obtient la distribution du champ magnétique dans le voxel.

Cette méthode est simple à implémenter et les calculs sont extrêmement rapides. D'un point de vue pratique, on utilise les algorithmes de transformation de Fourier rapide. Du fait de la discrétisation de l'espace, des effets de repliement peuvent apparaître aux bords de l'image. Pour éviter ces erreurs, les simulations sont donc réalisées sur des grilles qui s'étendent au delà des limites du voxel et dont seule la partie centrale est analysée. Pour nos calculs, nous avons travaillé sur une grille 308^3 points à laquelle on enlève environ 10% de chaque côté ; soit une grille finale de 256^3 points.

Enfin, on remarque une divergence de l'équation 57 au point central de l'espace k . Pour des raisons pratiques de calcul, on fait l'approximation que le voxel est entouré d'une région infiniment grande de susceptibilité magnétique χ_e . Dans ce cas, la valeur de $B_z(k)$ en $k=0$ vaut $-B_0\chi_e/3$.

1.1.b. Validation sur un cylindre droit

Pour valider cette approche, nous avons évalué la perturbation du champ magnétique engendrée par un cylindre placé au centre d'un voxel. Le cylindre droit de rayon $6 \mu\text{m}$ est placé perpendiculairement (axe x) au champ magnétique $B_0=4,7\text{T}$ (axe z) et au centre d'un voxel de $125 \mu\text{m}$ de côté. La différence de susceptibilité magnétique entre l'intérieur du cylindre et l'extérieur est de $\Delta\chi=0,231\text{ppm}$ (CGS).

La composante selon z de l'induction magnétique B_z dans le voxel est déterminée à l'aide de l'équation 57 et comparée à la formule théorique connue (Chapitre C.II.2.).

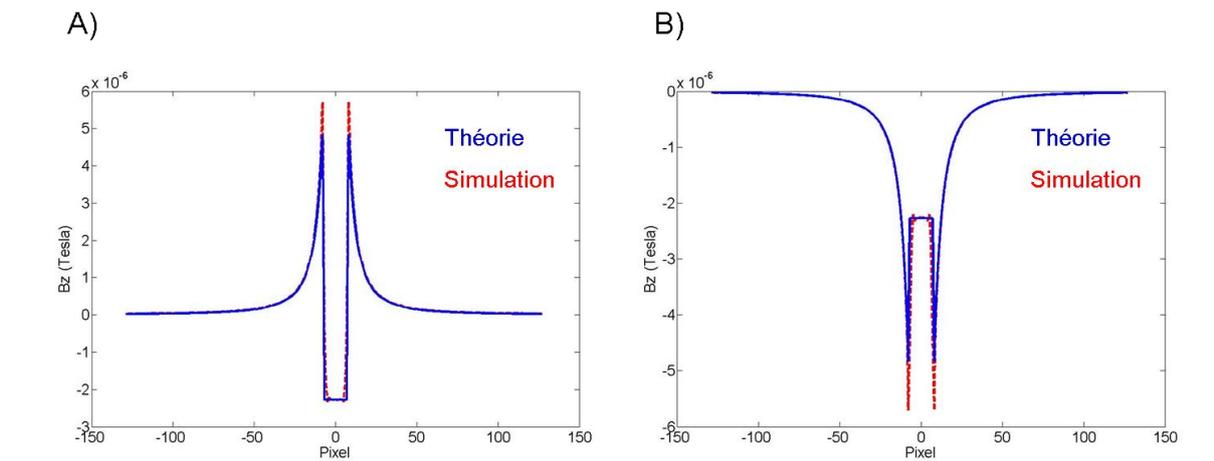


Figure 68 : Simulation du champ magnétique à l'aide de l'équation 57 (simulation) et de l'équation 36 (théorie) dans le cas d'une géométrie cylindrique.

Les résultats sont représentés Figure 68. On observe le profil de B_z selon une droite passant par le centre du cylindre et d'axe y (Figure 68A) ou z (Figure 68B).

On constate que la méthode permet d'estimer correctement la perturbation du champ. On observe par contre un écart avec la théorie sur les bords du cylindre. Cette erreur est en fait inhérente à la méthode et a déjà été mentionnée par [Marques and Bowtell (2005)]. On verra que ces différences n'ont cependant pas d'impact significatif sur les résultats des simulations.

I.2. CALCUL DU SIGNAL RMN

Plutôt que d'utiliser une approche Monté Carlo, nous avons choisi de calculer le signal RMN en présence de diffusion moléculaire à l'aide d'une méthode déterministe. Cette approche a été introduite par [Bandettini and Wong (1995)] et développée dans le cas 3D par [Klassen and Menon(2007)].

1.2.a. Principe

L'évolution temporelle du signal dans le voxel considéré est déterminée à l'aide de matrices tri dimensionnelles représentant : l'aimantation transverse complexe (M), la relaxation et la précession (R), et un noyau de diffusion (D). La multiplication (\times) et la convolution ($*$) de ces matrices de façon itérative permettent de déterminer l'aimantation et donc le signal issu du voxel à chaque instant t selon :

$$M_{xyz,t} = (M_{xyz,t-\delta t} \times R_{xyz}) * D_{xyz} \quad \text{Équation 58}$$

et

$$S_t = \sum_{xyz} M_{xyz,t} \quad \text{Équation 59}$$

- Le noyau de diffusion D représente la probabilité qu'a une particule placée sur un point de la grille de se déplacer sur n'importe quel autre point pendant le temps dt et

selon un coefficient de diffusion D. Dans le cas d'une diffusion non restreinte (les vaisseaux sont perméables à l'eau) et isotrope, la résolution de l'équation d'Einstein donne :

$$D_{.xyz} = \left(\frac{1}{4\pi D \delta t}\right)^{\frac{3}{2}} e^{-(x^2+y^2+z^2)/4D\delta t} \quad \text{Équation 60}$$

Avec x, y et z coordonnées cartésiennes de chaque élément de la matrice.

- La matrice de rotation **R** est définie par :

$$R_{.xyz} = e^{-i\Delta\omega_{.xyz}\delta t} \begin{cases} e^{-\delta t/T_{2,\text{tissu}}} & \text{pour } P_{.xyz} = 0 \\ e^{-\delta t/T_{2,\text{sang}}} & \text{pour } P_{.xyz} = 1 \end{cases} \quad \text{Équation 61}$$

où $\Delta\omega_{.xyz}$ représente la fréquence de précession en chaque point. Celle-ci dépend du champ statique B_0 et du champ induit par les différences de susceptibilité magnétique entre les milieux. P est une matrice binaire représentant la géométrie à l'intérieur du voxel. Dans notre cas elle vaut 1 pour les vaisseaux sanguins et 0 dans le tissu.

Dans nos simulations, on considère au début de l'expérience une répartition homogène de l'aimantation dans le voxel. La valeur de cette aimantation est arbitrairement fixée à 1. L'emploi des équations 58 à 61 permet d'évaluer la FID provenant du voxel.

Il est également possible de simuler un écho de spin (au temps TE) en inversant au temps TE/2 le signe de la partie imaginaire de l'aimantation.

Remarques :

Pour un calcul pratique de l'opération de convolution, c'est la transformée de Fourier de l'aimantation qui est calculée. Comme pour la méthode de calcul du champ magnétique, il est donc nécessaire de travailler sur des matrices plus larges pour éviter les effets de bords.

Dans les simulations de type Monté Carlo, on déplace les protons à chaque pas de temps dans une direction aléatoire. Pendant leur trajet, les spins accumulent de la phase en fonction de leur position. On obtient à la fin de l'expérience un chemin de phase particulier pour chaque paquet de spin et il est nécessaire de répéter ce calcul un grand nombre de fois pour obtenir un comportement moyen de l'évolution du signal. Contrairement à cette approche Monté Carlo, la méthode déterministe permet d'obtenir la moyenne de tous les chemins de phase possibles en un seul calcul. Cependant, un des inconvénients de cette méthode est qu'elle ne permet le calcul du signal que dans le cas où la diffusion des spins est libre. Pour une diffusion restreinte par la présence d'objets, l'équation analytique du noyau de diffusion D n'est pas accessible. Cette méthode permet toutefois l'emploi de noyaux de diffusion non isotropiques.

1.2.b. Validation en présence d'un gradient de champ constant

Pour évaluer la précision de la méthode déterministe, des simulations ont été effectuées dans un voxel ne contenant que du tissu et placé dans un gradient de champ constant G_x . Dans ce cas, les équations analytiques décrivant la FID sont connues. Pour un voxel isotropique de côté Δx et considérant un coefficient de diffusion isotrope D , la FID s'écrit à l'instant t :

$$S(t) = e^{-\gamma^2 G_x^2 D t^3 / 3} \cdot \text{sinc}\left(\frac{\gamma}{2} G_x \Delta x t\right) \cdot e^{-t/T_2} \quad \text{Équation 62}$$

L'écho de spin s'écrit :

$$S(t) = e^{-\gamma^2 G_x^2 D t^3 / 12} \cdot e^{-t/T_2} \quad \text{Équation 63}$$

On effectue la simulation dans un voxel décrit par une matrice de 320^3 points réduit à 256^3 points avec $G_x=0,02\text{T/m}$, $T_2=60\text{ms}$, $\delta t=1\text{ms}$, $D=1\mu\text{m}^2/\text{ms}$ et $TE=60\text{ms}$.

La Figure 69 représente le comportement du signal dans le cas d'une expérience d'écho de spin. En rouge, on représente la décroissance exponentielle correspondant au cas où le gradient est nul. En bleu, on représente la simulation du signal dans le cas où $D=0$. En vert, on peut voir la simulation du signal en présence de diffusion et en noir, la valeur théorique de l'écho de spin en présence de diffusion (Equation 63).

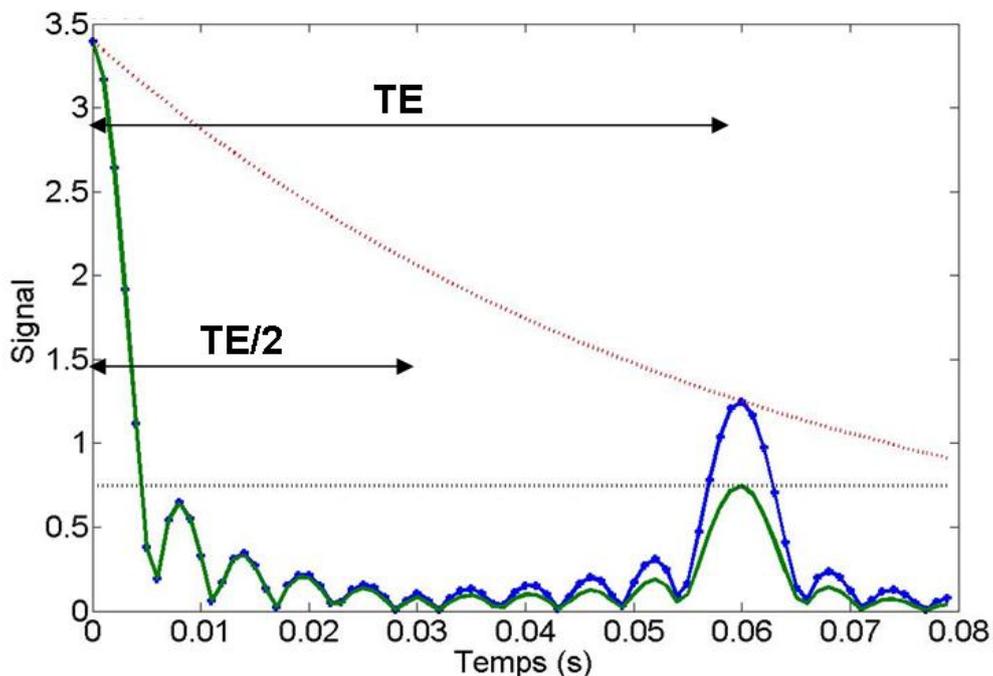


Figure 69 : Simulation déterministe du signal RMN en présence d'un gradient de champ magnétique avec (courbe verte) ou sans (courbe bleue) prise en compte de la diffusion. Comparaison avec le signal théorique à l'écho de spin (courbe noire) et le signal en absence de gradient (courbe rouge).

On s'aperçoit que l'on obtient une évolution temporelle du signal simulé de forme sinus cardinal pour $t < TE/2$. A l'écho de spin, le signal simulé en absence de diffusion (en bleu)

atteint la valeur du signal dans le cas où le gradient est nul (en rouge). Dans le cas de la simulation en présence de diffusion (en vert), le signal au temps d'écho TE atteint bien la valeur théorique (noir). Nous avons également calculé l'atténuation d'un signal en écho de spin causée par la diffusion des spins dans différents gradients et pour différents temps d'échos. Pour toutes ces conditions, nous n'avons pas trouvé d'écart significatif entre les simulations numériques et l'approche analytique.

I.3. ESTIMATIONS DE LA FRACTION VOLUMIQUE SANGUINE

Après avoir simulée la FID provenant du voxel, on peut estimer le BVf avec la méthode à l'équilibre décrite dans le Chapitre C.III.3. Ainsi à partir de l'estimation de R_2^* (issu de l'ajustement à la FID d'une fonction exponentielle) en présence et en absence d'un agent de contraste dans la vascularisation, on utilise la formule suivante :

$$\Delta R_2^* = \frac{4}{3} \gamma \Delta \chi B_0 BVf \quad \text{Équation 64}$$

On sait d'après le Chapitre C qu'aux temps courts (<10 ms), le signal n'est pas forcément exponentiel. Comme pour la méthode de mesure de la SO_2 , l'ajustement des données simulées se fait donc sur les temps d'écho >10 ms.

I.4. VALIDATION SUR UN ENSEMBLE DE CYLINDRES DROITS

Pour estimer les erreurs commises par les modèles, on compare l'estimation de BVf issue de la simulation (BVf,MR) à un BVf de référence (BVf,ref) issu de l'image support de la simulation. Ce protocole est représenté Figure 70.

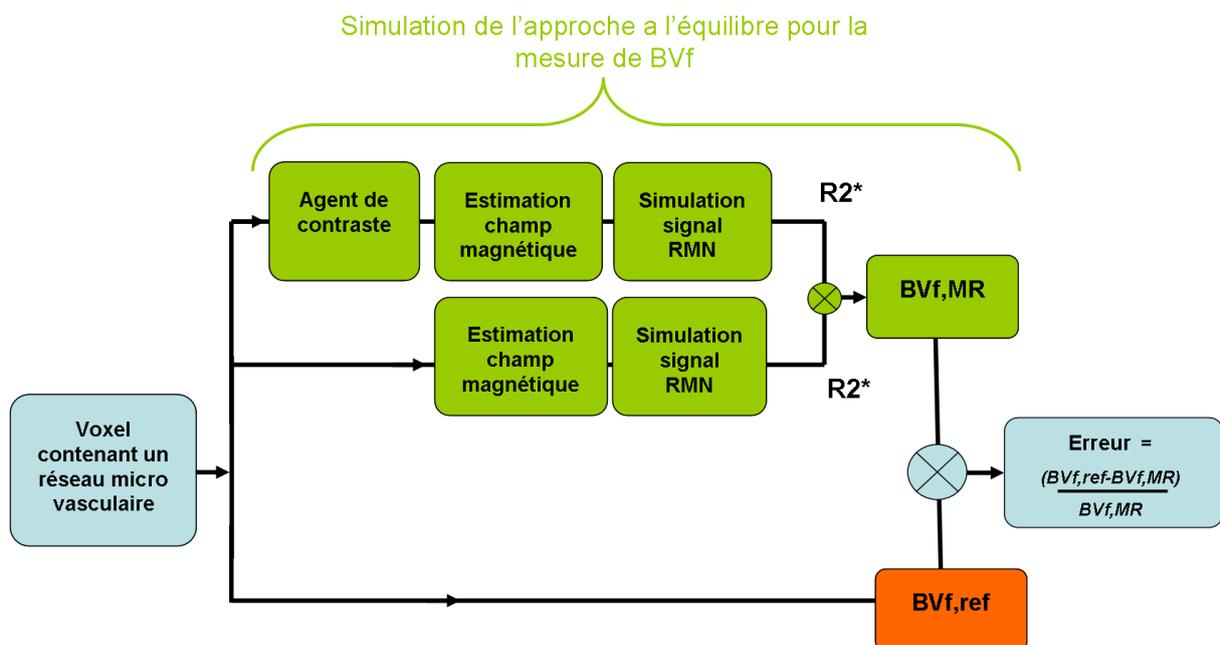


Figure 70 : Protocole d'estimation de l'erreur de la mesure par IRM du BVf.

On part d'une matrice binaire qui représente un voxel contenant un réseau microvasculaire (0 : extérieur du vaisseau, 1 : intérieur du vaisseau). Après avoir attribué une susceptibilité magnétique à chaque point du voxel, on calcule le paysage magnétique obtenu si l'on place ce voxel dans un champ extérieur B_0 . Puis on détermine le signal RMN (FID) provenant de ce voxel en présence de diffusion et on estime $T2^*$ par ajustement d'une fonction exponentielle à la FID simulée. Cette opération est réalisée pour deux valeurs de susceptibilité magnétique du sang : celle de l'agent de contraste USPIO et celle du tissu. On estime alors le BVf,MR selon l'équation 64.

Le BVf,ref de référence est obtenu en calculant la fraction des points de la matrice situés à l'intérieur des vaisseaux. On compare enfin BVf,MR et BVf,ref pour estimer l'erreur commise.

Nous avons validé ce protocole sur des voxels présentant un réseau microvasculaire conforme aux hypothèses du modèle mathématique. Les vaisseaux sont donc représentés par un grand nombre de cylindres droits occupant une faible fraction volumique. La distribution est homogène et présente une isotropie des directions. Dans ce cas, on s'attend à une erreur nulle. Le voxel considéré a une taille de côté de $356 \mu m$. Pour obtenir des longueurs de capillaires conformes à la réalité, ce voxel est découpé en plusieurs sous-voxels de côté $100 \mu m$ dans lesquels nous tirons aléatoirement les cylindres. Le nombre de cylindres est choisi pour obtenir le volume sanguin désiré. Le voxel final est donc composé de 45 sous-voxels. Dans le cas d'un BVf,ref de 3%, on y trouve environ 900 cylindres.

Pour cette étude, le signal RMN est estimé pendant 80ms après l'impulsion RF avec un pas de temps de 1 ms. On considère la diffusion de l'eau ($D=10^{-9} m^2s^{-1}$) isotrope et un champ statique $B_0=4,7 T$. Les T_2 du sang et du tissu sont respectivement de 5 ms et 60 ms. La susceptibilité magnétique des cylindres est homogène (pas de globules rouges). En présence de l'agent de contraste, elle vaut $\chi=0,231 ppm$ unité CGS (ce qui correspond à la dose d'USPIO de $200 \mu mol Fe/kg$ utilisée dans les expériences des chapitres D et E). En absence d'agent de contraste elle vaut 0 (On fait ici l'hypothèse que l'oxygénation des vaisseaux ne varie pas au cours de l'expérience et donc que la susceptibilité magnétique du sang n'intervient pas dans les calculs).

La Figure 71 représente les résultats d'une simulation sur un sous-voxel contenant des cylindres de rayon $3 \mu m$ et de BVf 3%.

On observe en Figure 71A la géométrie vasculaire dans le sous voxel. Le champ magnétique (1 coupe) induit lorsque les vaisseaux sont remplis de l'agent de contraste est représenté en Figure 71B. On remarque la forme caractéristique du champ induit par un cylindre (ChapitreC.II.2.).

Sur la Figure 71C, on peut voir l'évolution de la FID simulée provenant du voxel complet avec ou sans agent de contraste.

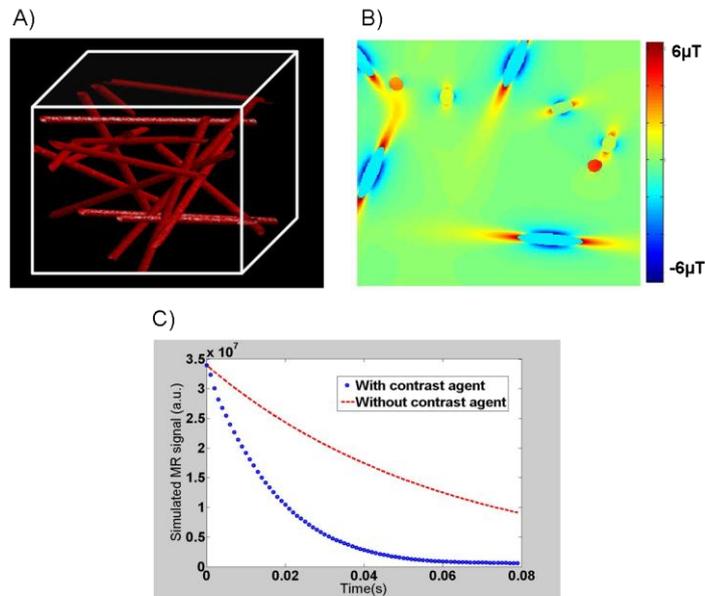


Figure 71 : Simulations réalisées dans le cas d'un voxel contenant des cylindres droits. A) Représentation d'un sous-voxel. B) Simulation de la perturbation du champ magnétique (1 tranche). C) Simulation du signal RMN en présence ou en absence d'agent de contraste dans les cylindres.

Nous avons étudié l'erreur commise dans l'estimation du BVf lorsque le voxel était rempli par des cylindres de différents rayons (1 à 5 μm) et avec un BVf,ref de 3% environ. Les résultats sont résumés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Comparaison des estimations de BVf,MR et BVf,ref sur des voxels contenant des cylindres de différents rayons.

Rayon (μm)	01	02	03	04	05
BVf,ref (%)	3,29	2,63	3,27	2,77	2,93
BVf,MR(%)	3,32	2,69	3,36	2,85	3,01
Erreur (%)	0,84	2,23	2,96	2,80	2,60

On s'aperçoit que l'erreur commise lors de l'estimation du BVf,MR par la simulation est inférieure à 3% dans tous les cas. Cette erreur pourrait provenir de l'approximation dipolaire faite dans la technique de calcul du champ magnétique. Cette faible erreur ne doit cependant pas empêcher les études ultérieures.

I.5. CONCLUSIONS

Nous avons mis en place une méthode de simulation de la mesure RMN du BVf à l'équilibre. Les différentes étapes ont été validées de façon indépendante et l'approche a donné de bons résultats sur des géométries simples. La comparaison des estimations issues des simulations avec celles de référence sur des voxels respectant toutes les hypothèses du modèle a donné de faibles erreurs (<3%). On peut donc utiliser cet outil pour étudier l'influence de la géométrie microvasculaire sur le signal RMN.

II. INFLUENCE DE LA GEOMETRIE VASCULAIRE

Pour toutes les simulations des parties II et III, le signal RMN est estimé sur une durée de 80 ms après l'impulsion RF avec un pas de temps de 1 ms. On considère la diffusion de l'eau ($D=10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) isotrope et un champ statique $B_0=4,7\text{T}$. Les T_2 du sang et du tissu sont respectivement de 5 ms et 60 ms. La susceptibilité magnétique des cylindres est homogène (pas de globules rouges). En présence de l'agent de contraste, elle vaut $\chi=0,231\text{ppm}$ unité CGS (ce qui correspond à la dose d'USPIO de 200 $\mu\text{mol Fe/kg}$ utilisée dans les expériences des chapitres D et E). En absence d'agent de contraste elle vaut 0 (On fait ici l'hypothèse que l'oxygénation des vaisseaux ne varie pas au cours de l'expérience et donc que la susceptibilité magnétique du sang n'intervient pas dans les calculs). Ces valeurs correspondent aux valeurs classiques déterminées expérimentalement sur rat à 4,7T.

II.1. ETUDE SUR DONNEES BI-PHOTON

Dans cette étude, nous avons analysé l'erreur commise sur l'estimation du BVf si la géométrie vasculaire utilisée provenait de données réalistes sur la géométrie microvasculaire. Pour ce faire, nous avons digitalisé des données de microscopie à 2 photons acquises sur cerveaux sains de souris. Cette étude a été réalisée en collaboration avec R. Serduc et la plate forme d'optique non linéaire du GIN.

II.1.a. Matériels et méthode

- Préparation animale : les souris ($n=11$) sont anesthésiées avec un mélange de xylazine/kétamine et placées sur un cadre stéréotaxique. Puis une craniotomie de 3 mm de diamètre est réalisée au dessus du cortex pariétal gauche. L'os est retiré et le cortex est protégé avec du gel d'agarose. Une solution de dextran fluorescent (70 kD, molécule intravasculaire pour le cerveau sain) est ensuite injectée dans la veine de la queue.
- Microscopie bi-photon *in vivo* : la microscopie à 2 photons est réalisée sur un microscope confocal constitué d'un Biorad (MRC 1024) Scanhead et d'un microscope Olympus BX50WI. Le faisceau balaie le plan x-y pour acquérir une image 512*512 à raison d'une image toute les 0,9s. La variation de la profondeur de l'observation est réalisée par un mouvement vertical de l'objectif motorisé. La résolution spatiale dans la direction z est de 5 μm . Le champ de vue choisi est de 600*600*300 μm , une taille proche de celle d'un voxel IRM.
- Traitement des images : Les images sont analysées sous Matlab. En premier lieu, un filtre Gaussien est appliqué pour retirer les pixels isolés des images. Puis des traitements morphologiques classiques (3 érosions et 3 dilatations) sont utilisés pour combler les trous dans les vaisseaux et supprimer les petits objets. Enfin, un filtre semi-automatique 3D est utilisé pour établir la segmentation vaisseaux/tissu.

La Figure 72 montre des acquisitions et des images traitées acquises sur une souris.

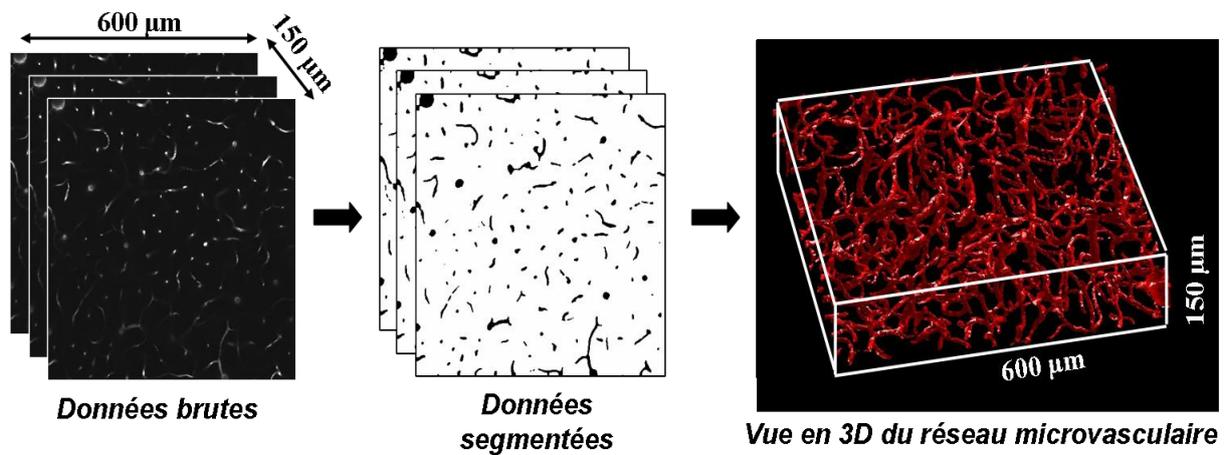


Figure 72 : Traitement d'image réalisé sur les acquisitions au microscope bi-photon.

II.1.b. Résultats

Une fois segmentées, les images précédentes sont utilisées comme entrées dans le programme de simulation donné Figure 70.

La Figure 73B montre l'estimation du champ magnétique dans une coupe du voxel. Les profils des perturbations du champ magnétique autour de chaque vaisseau ressemblent à ceux décrits dans le cas des cylindres droits (Chapitre C.II.2.).

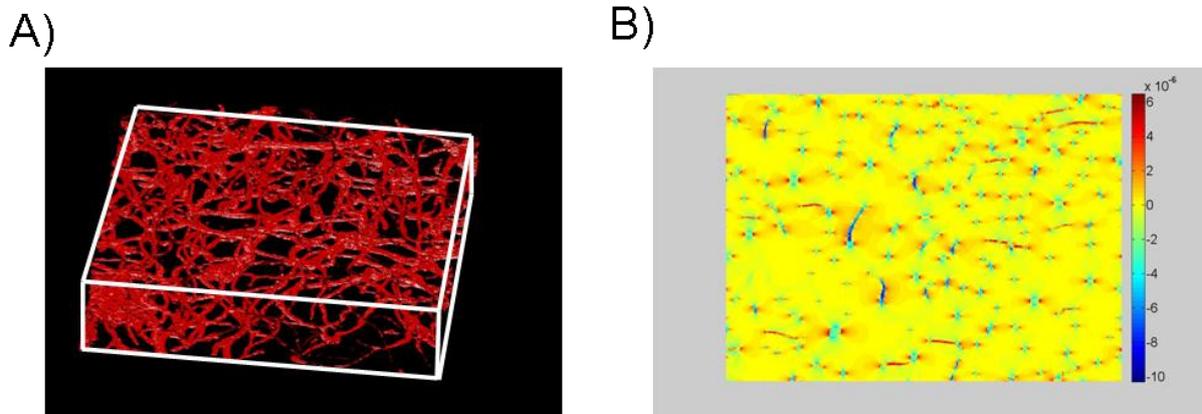


Figure 73 : Simulations sur données bi-photon. A) représentation d'un voxel. B) Simulation des perturbations du champ magnétique lorsque les vaisseaux contiennent un agent de contraste (1 tranche du voxel présenté en A).

Comme pour la validation sur un ensemble de cylindres, nous avons évalué le volume sanguin dans les 11 échantillons par simulation du signal RMN (BVf,MR) et comparé aux résultats de références (BVf,2hv).

Les valeurs sont présentées dans le tableau de la Figure 74.

A)

Souris n°	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14
BVf,2hv (%)	6.5	5.9	6.6	6.7	3.1	3.6	3.0	5.1	4.1	2.1	2.9	11.4	12.9	8.9
BVf,MR(%)	8.5	5.1	5.6	5.8	4.2	4.9	3.2	7.7	6.6	2.6	2.6	13.7	12.4	9.9
Erreur (%)	31.3	12.4	15.9	12.7	36.9	38.2	5.9	52.5	60.6	26.4	9.6	16.5	4.5	10.6

B)

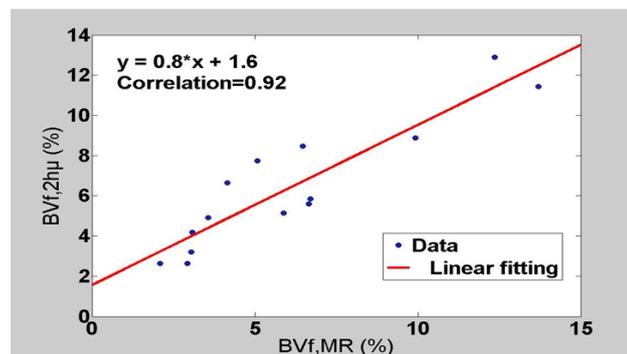


Figure 74 : Estimations du BVf réalisées à l'aide des simulations de la méthode à l'équilibre (BVf,MR) ou du BVf de référence obtenu par traitement d'image (BVf,2hv). A) Tableau des valeurs et erreur (en %). B) Corrélation entre les deux estimations.

On s'aperçoit que les valeurs de BVf,MR sont du même ordre de grandeur que celles de BVf,2hv. Par contre on observe que l'IRM surestime en moyenne de $23,8 \pm 17,6\%$ le BVf. Le coefficient de corrélation entre les deux mesures (Figure 74B) vaut 0,92. Etant donné que notre approche numérique a donné moins de 3% d'erreur sur l'estimation du BVf lorsque la géométrie vasculaire respectait les hypothèses du modèle, l'erreur de 20% trouvée ici doit provenir de la modélisation de la géométrie vasculaire.

Remarque: On peut préciser que pour ces simulations, le calcul de l'induction magnétique par méthode TF pour un échantillon prend environ 20s. Le calcul du signal RMN par la méthode déterministe et l'ajustement des données demandent 36min.

II.2. INFLUENCE DES PARAMETRES VASCULAIRES

Dans cette partie, nous avons évalué indépendamment l'influence de différentes caractéristiques de la géométrie microvasculaire. Nous avons réalisé des voxels présentant des distributions particulières de la vascularisation pour étudier l'influence de la direction, de la forme et de la densité des vaisseaux.

II.2.a. Direction des vaisseaux

- Toutes directions vs 3 directions

Dans un premier temps, nous avons comparé les résultats obtenus sur des voxels contenant soit des cylindres tirés dans toutes les directions de l'espace (900 cylindres de rayons $3\mu\text{m}$ repartis en 45 sous-voxels (Figure 75A)), soit des cylindres tirés dans les trois directions x, y et z (Figure 75B)).

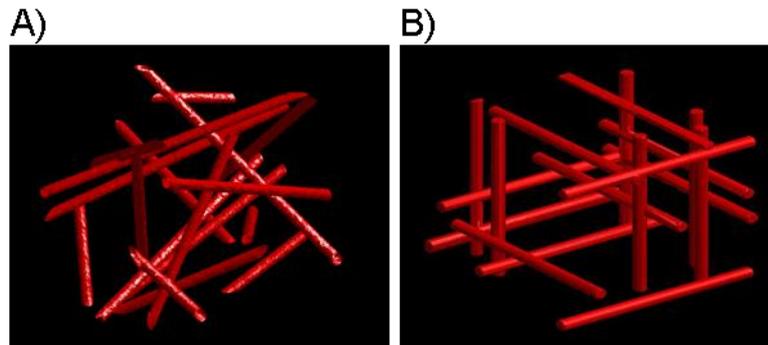


Figure 75 : Représentations de sous-voxels contenant des cylindres droits tirés dans des directions aléatoires (A) ou uniquement dans les trois directions principales x, y et z de l'espace (B).

Les deux distributions de cylindres ont données des estimations du BVf similaires (écart $<3\%$). Cette étude montre qu'il est possible d'obtenir des résultats précis avec plusieurs types de distributions tant que l'isotropie des directions est respectée. Dans la pratique, on préférera donc utiliser la distribution sur les trois directions majoritaires de l'espace puisqu'elle permet d'obtenir une isotropie des directions avec moins de cylindres.

- Anisotropie des directions

Pour évaluer l'impact d'une possible anisotropie des directions à l'intérieur du voxel, nous avons simulé 6 voxels contenant chacun 45 sous-voxels. Les différents sous-voxels contiennent tous 16 cylindres de rayons égaux ce qui implique que le VSC est égal d'un voxel à l'autre. Mais au sein des voxels, le nombre de cylindres pour chacune des directions n'est pas constant. Etant donné x, y et z les directions de l'espace, la répartition des 16 cylindres dans les sous-voxels s'écrit $2x12y2z$; $3x10y3z$; $4x8y4z$; $12x2y2z$; $10x3y3z$ et $8x4y4z$. Pour toutes les simulations le champ est appliqué selon l'axe y. Ainsi pour 3 séries le champ est appliqué perpendiculairement à la direction d'orientation majoritaire des cylindres, pour les 3 autres le champ est appliqué parallèlement à cette direction. Pour caractériser l'anisotropie, on définit l'index d'orientation préférentiel POi (égal au nombre de vaisseaux parallèle à B_0 / (nombre de vaisseaux perpendiculaire à $B_0/2$). Cet indice vaut 0 lorsque tous les cylindres sont orientés perpendiculairement à B, l'infini lorsqu'ils sont tous orientés parallèlement à B_0 et 1 lorsqu'il n'y a pas de direction privilégiée. Les résultats sont présentés Figure 76. On observe un sous-voxel présentant une isotropie des directions (Figure 76A) et un sous voxel $12x2y2z$ (Figure 76B). Les résultats numériques présentant l'erreur commise sur le BVf en fonction de l'index d'orientation préférentiel sont présentés (Figure 76C).

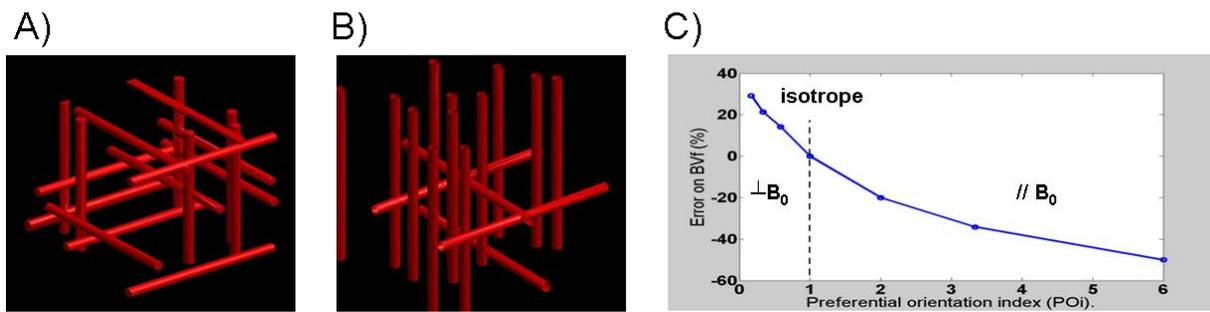


Figure 76 : Représentations de sous-voxels contenant des cylindres droits tirés de manière isotrope (A) ou anisotrope (B). C) Erreur (en %) commise sur l'estimation du BVf en fonction de l'index d'orientation préférentiel POI.

En observant les résultats, il ressort deux points importants. Lorsque la direction majoritaire des vaisseaux est selon la direction d'application du champ le BVf est toujours surestimé ; lorsque la direction majoritaire des vaisseaux est perpendiculaire à la direction d'application du champ le BVf est toujours sous-estimé. Entre les deux, on observe une évolution continue de l'erreur.

Des études sur des voxels contenant des vaisseaux de différents rayons devraient néanmoins être conduites pour analyser plus précisément les effets d'une éventuelle anisotropie.

II.2.b. Influence de la forme des vaisseaux

Pour tester l'influence de la forme des vaisseaux, nous avons utilisé une distribution de 12 cylindres répartis sur les arrêtes d'un cube. Cette distribution permet de respecter les hypothèses d'une distribution homogène et isotrope des vaisseaux dans le voxel. La forme des vaisseaux a ensuite été changée pour passer des cylindres à des ellipsoïdes (Figure 77A) puis à des sphères (Figure 77B). Le rayon des objets a été ajusté pour obtenir un BVf de 3% à l'intérieur des voxels.

Les résultats des simulations ont montrés que la forme des vaisseaux avait une influence faible sur l'estimation du volume sanguin. Les résultats montrent en effet une erreur moyenne inférieure à 6%.

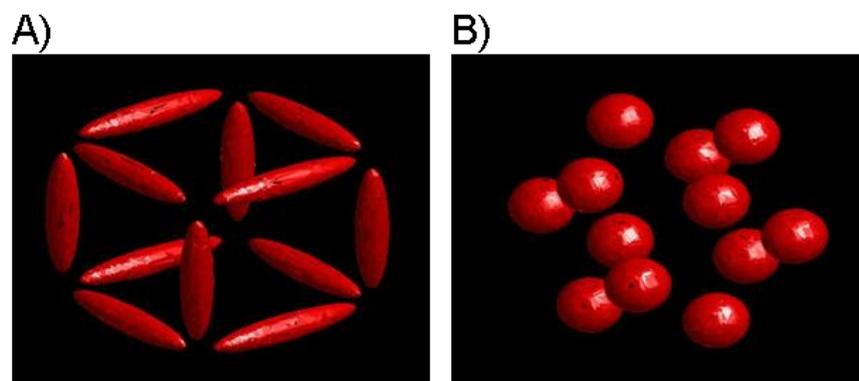


Figure 77 : Représentations de sous-voxels contenant des ellipsoïdes (A) ou des sphères (B) tirés sur les arrêtes d'un cube.

Ce résultat était attendu puisque Yablonskiy avait déjà montré dans la théorie que les variations de R_2^* induites par une distribution de sphère était seulement 1,21 fois plus grandes que pour une distribution de cylindres. Comme les vaisseaux, en général, ressemblent beaucoup plus à un cylindre qu'à une sphère, on peut admettre que le modèle constitue ici une bonne approximation.

II.2.c. Influence du rayon de courbure

Dans le modèle utilisé, les vaisseaux sont considérés comme des cylindres infiniment longs. En réalité, les vaisseaux sont courbés et limités en longueur. Pour les capillaires [Pawlik *et al* (1981)] ont reporté longueur moyenne de 108 μm et un rayon de courbure d'environ 57 μm .

Pour étudier l'impact de la courbure de vaisseaux, nous avons réalisé une simulation sur un voxel contenant environ 900 cylindres (répartis dans 45 sous-voxels de 100 μm de côté). Les cylindres sont courbés et repartis sur les trois directions principales de l'espace. Les résultats ont été comparés avec les données obtenues pour les mêmes voxels contenant des cylindres droits (Figure 78).

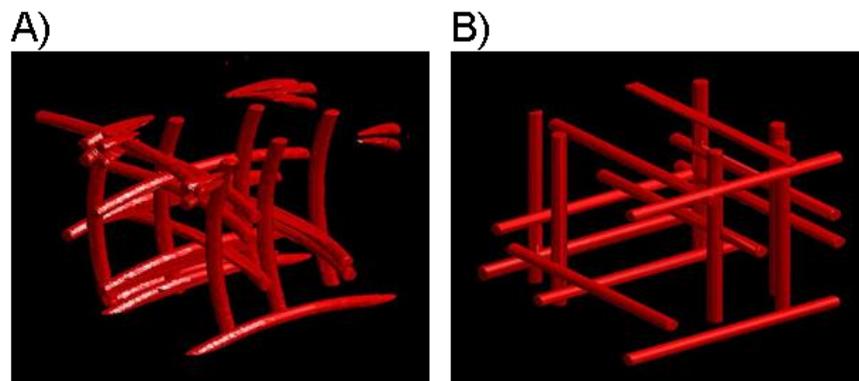


Figure 78 : Représentations de sous-voxels contenant des cylindres courbes (A) ou droits (B) tirés dans les trois directions x , y et z de l'espace.

Les deux séries de simulations ont été réalisées avec des paramètres identiques, hormis le profil des cylindres. Elles donnent des résultats très proches. La courbure des vaisseaux n'induit qu'une erreur supplémentaire de 3,5% sur l'estimation du BVf. Ainsi, la courbure des vaisseaux ne devrait pas être un facteur déterminant sur la précision des mesures.

II.2.d. Densité des vaisseaux

Pour évaluer l'influence de la densité, nous avons utilisé une distribution de 12 cylindres repartis sur les arêtes d'un cube. La densité des vaisseaux a ensuite été changée en variant la distance intervaisseaux (distance vaisseaux centre du voxel) de 22 à 43 μm (Figure 79A,B).

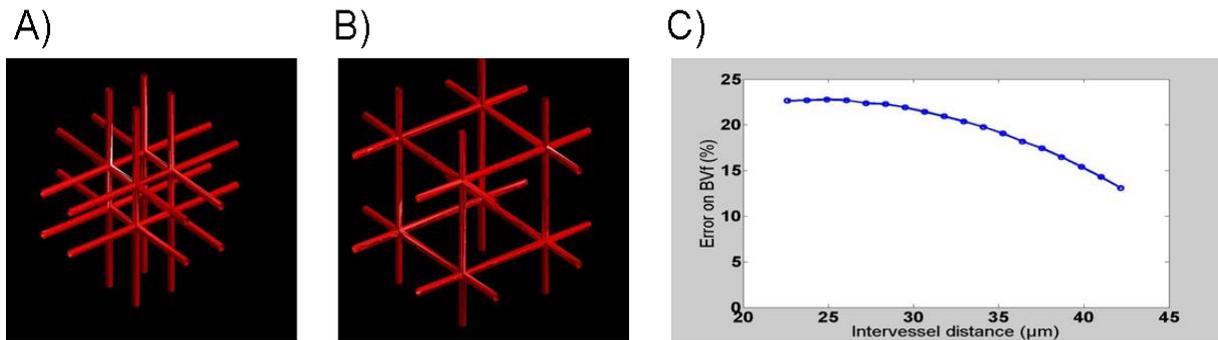


Figure 79 : Représentations de sous-voxels contenant des cylindres tirés sur les arrêtes d'un cube et présentant une densité forte (A) ou faible (B). C) Erreur (en %) commise sur l'estimation du BVf en fonction de la distance inter vaisseaux.

Les résultats numériques sont indiqués Figure 79C. Pour une distance inter vaisseaux d'environ 30μm (qui correspond à la distance moyenne trouvée dans la matière grise saine) on trouve une surestimation du BVf de 20% environ. Lorsque la distance inter-vaisseaux augmente de 22 à 43μm, on observe une erreur allant de 23 à 14%.

II.3. CONCLUSIONS

Cette étude suggère que la méthode de simulation proposée ici permet d'obtenir des estimations du BVf *in silico*. Les estimations du BVf ne semblent pas être affectées par la forme ou la courbure des vaisseaux. L'impact d'une direction privilégiée sur les estimations IRM suggère par contre que l'orientation des vaisseaux devrait être caractérisée *in vivo*. Ceci est spécialement vrai dans les tissus pathologiques comme les tumeurs cérébrales. Finalement cette étude indique que l'on pourrait surestimer le BVf d'environ 20% lorsqu'il existe une interaction entre les cylindres et pour des distances inter vaisseaux proches de celles rencontrées dans la matière grise.

III. INFLUENCE DU TAUX D'HEMATOCRITE

Dans la technique de mesure à l'équilibre du volume sanguin et d'index de taille de vaisseaux, l'influence du taux d'hématocrite (Hct) n'a pas été évaluée. Or les globules rouges occupent en moyenne 40% du volume sanguin et leur taille est comparable à celle des capillaires sanguins. Leur présence pourrait donc entraîner une répartition non homogène du produit de contraste dans les vaisseaux, altérer le paysage magnétique et *in fine* les estimations du BVf et du VSI.

Dans notre méthode de mesure de la SO_2 , ce sont les globules rouges qui sont à l'origine des perturbations magnétiques. On sait qu'il existe une relation linéaire entre Hct et SO_2 (Chapitre C.I.2.b.). Mais il est également possible que des différences de taux d'hématocrite entraînent des effets non linéaires sur nos estimations.

L'objectif de l'étude suivante est donc d'estimer l'impact de l'hématocrite sur nos mesures. Ce travail comprend une partie de simulation sur la relation Hct/BVf et une partie expérimentale sur rats *in vivo* incluant des mesures de BVf, VSI et SO_2 .

III.1. SIMULATIONS INFORMATIQUES

L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence de Hct sur l'estimation IRM de BVf. A l'intérieur d'un voxel élémentaire ($100*100*100 \mu m$), plusieurs cylindres droits de rayon $3 \mu m$ représentant les capillaires sont tirés aléatoirement (position et orientation). Le nombre de cylindres dans le voxel est choisi pour obtenir le volume sanguin désiré (de 1% à 5%). Le voxel considéré a une taille finale de ($250*250*250 \mu m$) et contient entre 300 et 1500 vaisseaux sanguins. Pour simuler l'hématocrite, des sphéroïdes (taille = $6*6*3 \mu m$) sont positionnés de façon aléatoire dans les cylindres. Le nombre de sphéroïdes est choisi pour obtenir l'hématocrite désirée (Hct=10% à 45%). Pour la mesure du BVf, on estime que l'agent de contraste n'est présent que dans le compartiment plasmatique.

La Figure 80 représente des vues sagittales de la distribution du champ magnétique à l'intérieur du voxel lorsque ce dernier contient un cylindre homogène (Figure 80A) ou un cylindre avec Hct=15,6% (Figure 80B).

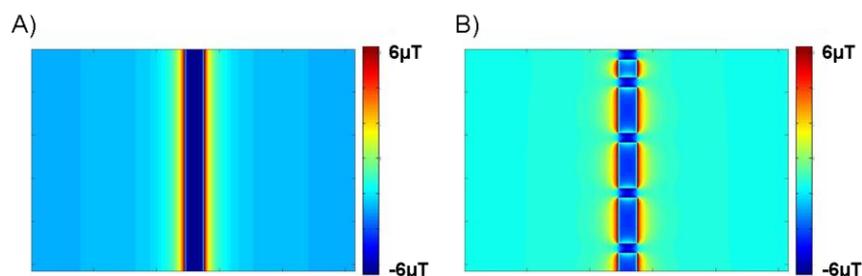


Figure 80 : Représentations de la distribution du champ magnétique dans un voxel (1 tranche) contenant un vaisseau sanguin (cylindre) avec un taux d'hématocrite nul (A) ou de 15.6% (B).

On remarque que l'intensité du champ au niveau des hématies prend une valeur intermédiaire entre celle du plasma et celle du tissu.

La Figure 81 représente le volume sanguin estimé par la simulation lorsque le taux d'hématocrite varie dans les vaisseaux sanguins (courbe rouge). On s'aperçoit que l'évolution est linéaire. L'extrapolation de l'ajustement linéaire (courbe rouge pointillée) de la courbe au taux d'hématocrite nul correspond bien au volume sanguin mesuré lorsque les cylindres ne contiennent aucune hématie (croix bleue).

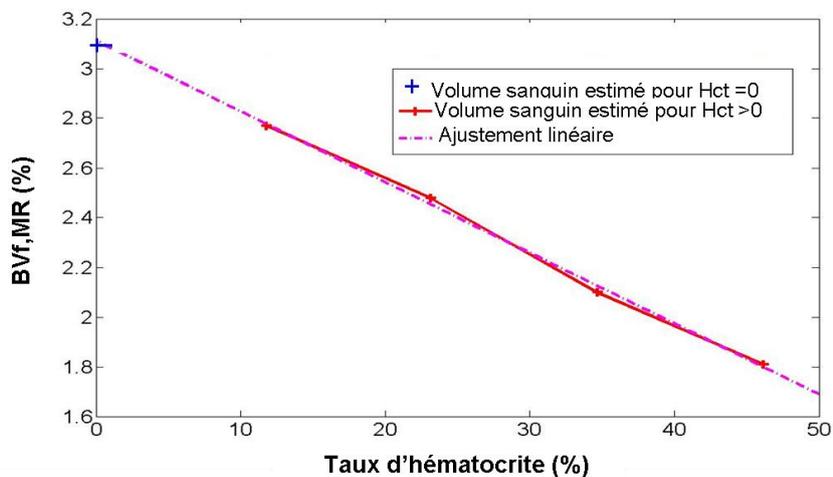


Figure 81 : Evolution du BVf,MR estimé (en %) avec le taux d'hématocrite (en %).

La Figure 82 représente les variations de l'estimation du volume sanguin par la simulation lorsque :

- Le volume plasmatique dans le voxel varie du fait de la présence d'un plus grand nombre de vaisseaux sanguins à l'intérieur du voxel (courbe bleue).
- Le volume plasmatique dans le voxel varie du fait de la seule présence d'hématies dans les vaisseaux (à nombre de vaisseaux égal) (courbe rouge).

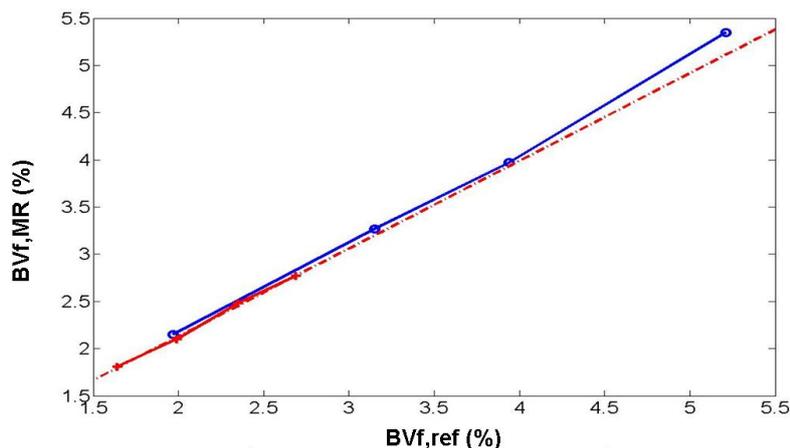


Figure 82 : Variations de l'estimation du BVf lors que le volume plasmatique varie dans le voxel en raison d'un recrutement de vaisseaux (bleu) ou lorsque le volume plasmatique varie avec le taux d'hématocrite dans les vaisseaux (à nb de vaisseau égal).

Les deux courbes (rouge et bleue) sont bien linéaires. On peut remarquer que les pentes des droites sont quasi équivalentes. Cette observation laisse supposer que la prise en

compte de l'hématocrite dans les mesures de BVf se limite à une correction du volume occupé par les hématies.

III.1.a. Conclusion

Cette étude montre l'importance de la prise en compte du taux d'hématocrite sur les mesures de volume sanguin à l'équilibre dans le cas où le voxel ne contient que des capillaires. Les résultats présentés Figure 82 suggèrent que la mesure de BVf par IRM ne donne des informations que sur le volume plasmatique.

Cependant, plusieurs remarques peuvent être faites sur les simulations précédentes. Les simulations ne permettent en effet pas de prendre en compte le mouvement des hématies à l'intérieur des capillaires. Or il a été montré [Boxerman *et al* (1995)] que plus la vitesse des globules rouges était grande, moins celles-ci avaient d'effets sur le T_2^* . De plus, l'influence de Hct dans les gros vaisseaux n'a pas été estimée.

En complément aux résultats préliminaires issus des simulations, nous avons conduit une étude *in vivo*.

III.2. ETUDE EXPÉRIMENTALE IN-VIVO

Dans cette étude, nous avons mesuré les BVf, VSI et SO_2 par IRM sur des cerveaux de rats sains chez lesquels nous avons fait varier le taux d'hématocrite. Une méthode d'hémodilution a permis de faire baisser le taux d'hématocrite alors que le placement des rats sous une hypoxie intermittente a permis de l'augmenter. Les mesures de la SO_2 ont été comparées aux estimations données par des mesures des gaz du sang réalisées sur la veine et l'artère fémorale.

III.2.a. Matériels et méthodes

- Groupes d'animaux

Dix sept rats mâles Wistar pesant entre 250 et 350g sont séparés en trois groupes :

- Dans le groupe *hypoxie intermittente* (n=5), une augmentation de l'hématocrite est induite selon le protocole décrit dans [Joyeux-Faure *et al* (2005)]. Pendant les 21 jours précédant le protocole d'imagerie, les rats sont placés dans des chambres cylindriques à hypoxie (longueur 28 cm, diamètre 10 cm, volume 2.2 L). Des valves sont utilisées pour distribuer de l'azote dans chaque chambre à un débit ajusté pour réduire la FiO_2 à 5% pendant 40s. Ceci est suivi par une injection rapide d'air comprimé pendant 20s pour établir un retour à une FiO_2 normale de 21%. Ce cycle de 1 min est répété tous les jours pendant 8 heures. La FiO_2 dans les chambres est contrôlée pendant le protocole d'hypoxie par un oxymètre (Beckman OM11 O_2 analyzer, Fullerton, CA). Cette étude a été réalisée en collaboration avec C. Ribuo et le laboratoire HP2 de Grenoble.

- Dans le groupe *hémodilution isovolumique* (n=4), une diminution de l'hématocrite est induite par une dilution du sang. L'hémodilution est réalisée juste avant le protocole d'imagerie en prélevant 5mL de sang de l'artère fémorale (~30% du volume sanguin circulant) à un débit de 1mL/min. Parallèlement, 5mL d'une solution saline d'albumine à 5% sont injectés dans la veine fémorale avec le même débit.

- Dans le groupe *contrôle* (n=8), aucune modification de l'hématocrite n'est effectuée.

Pour tous les animaux, une analyse des gaz du sang est effectuée juste avant le passage dans l'IRM.

- Protocole IRM

Avant le protocole d'imagerie, les rats sont anesthésiés avec 5% d'isoflurane dans de l'air pour l'induction et 1% pour le maintien. La température rectale est maintenue à 37° à l'aide d'une couverture chauffante. Pour tous les rats, la FiO₂ pendant l'expérience est de 21%. Un cathéter est introduit dans la veine et dans l'artère fémorale pour permettre l'analyse des gaz du sang : saturation de l'hémoglobine (FvSO₂ et FaSO₂) et hématocrite dans des échantillons de sang de moins de 0,1 mL (ABL 510, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Le cathéter veineux est également utilisé pour l'injection du produit de contraste.

Dans le scanner IRM, les animaux sont maintenus à l'aide d'une barre à dents et de barres d'oreilles. L'imagerie IRM est réalisée sur l'aimant à 4,7T en utilisant la configuration émission par antenne de volume réception par antenne de surface. Les séquences utilisées sont celles décrites dans la partie (Chapitre E.II.). Le protocole utilisé pour la mesure de la SO₂ est donc le protocole 1 impliquant l'acquisition d'une carte de champ magnétique. Pour toutes les séquences, les caractéristiques géométriques des images sont : 7 tranches contiguës de 1mm, FOV=30x30mm²; matrice=128x128, sauf pour la carte de champ : séquence 2GE3D, FOV=30x30x8mm³, matrice=256x256x40, TR=100 ms TEs=4 et 12 ms. La séquence MGESE (TR=6000 ms; ΔTEGE=3 ms; TESE=60 ms) et la séquence de diffusion permettent d'obtenir le BVf et le VSI.

Le protocole complet dure 1h15 par animal.

Les données sont moyennées entre les rats de chaque groupe et présentées pour trois régions d'intérêts (striatum, cortex et cerveau). Des tests de Student sont utilisés pour évaluer les différences (*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001).

III.2.b. Résultats

Les résultats de l'analyse biologique du sang sont représentés sur les graphiques de la Figure 83. On remarque que les trois groupes possèdent des taux d'hématocrite différents. On retrouve pour le groupe *contrôle* une hématocrite proche de 40% (39,5±2,6%). Pour le groupe *hémodilution* Hct= (30,9±2,9%) alors que dans le cas de l'*hypoxie intermittente* Hct= (51,4±2,6%).

On observe également des variations de la SO₂ veineuse dans les trois groupes. Ce constat peut s'expliquer par le fait qu'un manque de globules rouges entraîne une baisse de la saturation pour maintenir un niveau d'oxygénation constant dans les tissus.

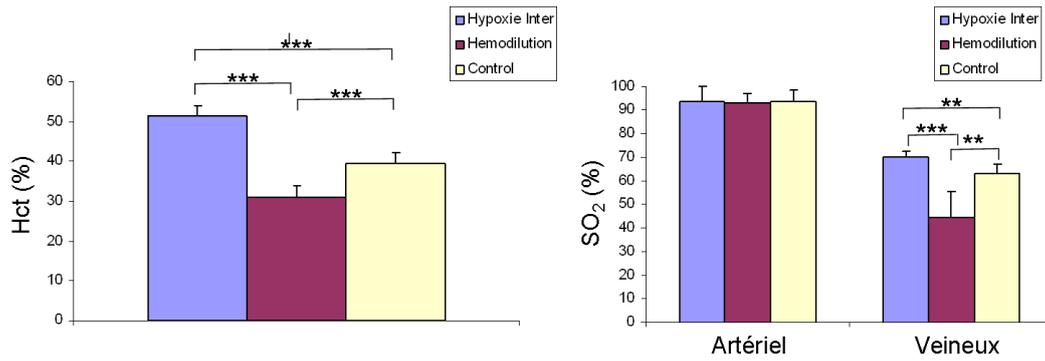


Figure 83 : Mesures (moyenne et écart-type) par analyses des gaz du sang dans la veine et l'artère fémorale du taux d'hématocrite, de la SaO₂ et de la SvO₂ dans les trois groupes d'animaux (hypoxie intermittente, hémodilution, contrôle).

Les résultats IRM sont présentés Figure 84. Pour les mesures du BVf, on trouve dans les trois régions d'intérêts des valeurs plus élevées dans les groupes hypoxie intermittente et hémodilution ($4,8 \pm 0,3\%$ et $4,1 \pm 0,3\%$ dans le cerveau, respectivement) que dans le groupe contrôle ($3,4 \pm 0,3\%$ dans le cerveau). Les valeurs sont également plus élevées dans le groupe hémodilution que dans le groupe contrôle pour le striatum et le cerveau.

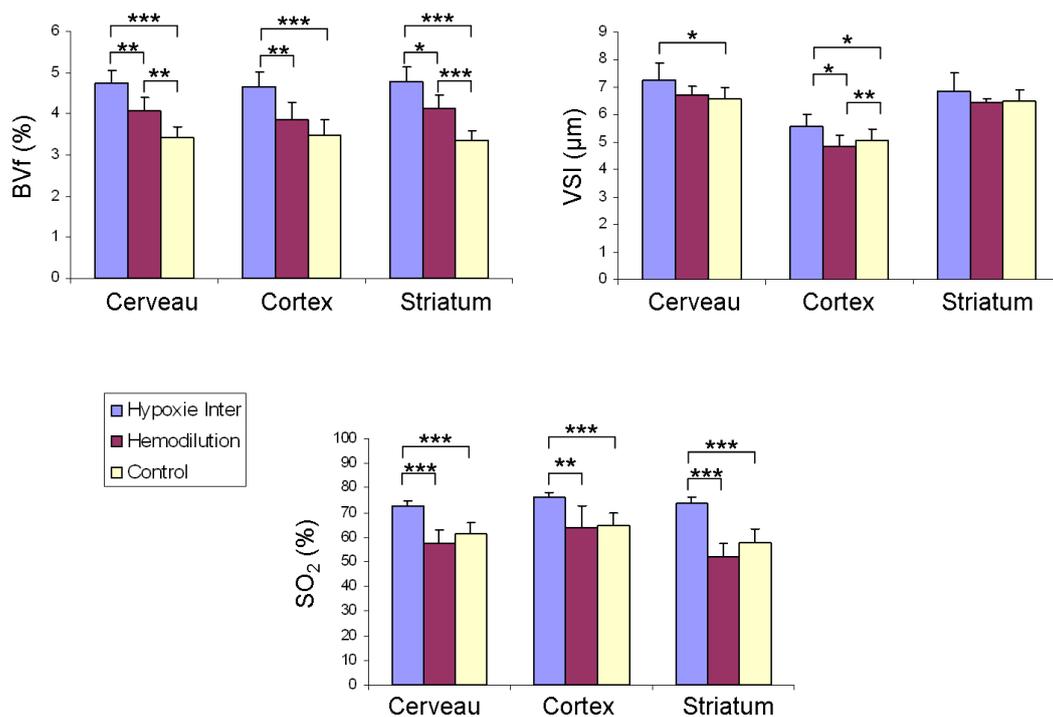


Figure 84 : Mesures par IRM des paramètres BVf, VSI et SO₂ dans les trois groupes d'animaux (Hypoxie intermittente, hémodilution, contrôle). Moyenne et écart-type mesurés dans les trois régions d'intérêt (cerveau, cortex et striatum)

Les résultats des mesures de VSI montrent peu de différence entre les trois groupes pour le cerveau et le striatum ($6,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$ et $6,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ respectivement, moyenne des trois groupes). Dans le cortex, on observe un VSI plus faible dans le groupe contrôle ($5,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$) que dans le groupe hypoxie intermittente ($5,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$). Le VSI du groupe hémodilution ($4,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$) est également plus faible que celui du groupe contrôle. On

peut noter également que pour les trois groupes, le VSI dans le cortex est plus faible que celui dans le striatum. Les valeurs de SO_2 mesurées sont, dans les trois régions d'intérêt, plus faibles dans les groupes contrôle et hémodilution ($61,6 \pm 4,3\%$ et $57,4 \pm 5,7\%$ dans le cerveau respectivement) que dans le groupe hypoxie intermittente ($72,7 \pm 2,0\%$ dans le cerveau). On ne mesure pas de différences significatives entre les groupes contrôle et hémodilution.

III.3. CONCLUSIONS PROVISOIRES

Les protocoles expérimentaux ont permis d'induire des différences de taux d'hématocrite entre les trois groupes de rats étudiés. Parallèlement, la saturation en oxygène de l'hémoglobine a été modifiée.

Nous avons constaté que nos mesures de la SO_2 (après correction du taux d'hématocrite mesuré par les analyses sanguines) donnent des valeurs proches de celles mesurées dans la veine fémorale. Ce constat laisse supposer que le taux d'hématocrite affecte linéairement nos mesures de SO_2 . On peut tout de même remarquer que les valeurs de la SO_2 mesurées dans le groupe hémodilution sont plus élevées que celles trouvées dans la veine fémorale. Comme pour l'étude de validation de la méthode (chapitre D), il est possible que cet écart provienne d'une tendance de l'organisme à préserver le cerveau.

Pour les mesures de BVf, nous avons trouvé dans le groupe contrôle des valeurs classiques de la microvascularisation. Dans le groupe hypoxie intermittente, les valeurs plus élevées de BVf trouvées dans les trois régions d'intérêt peuvent s'expliquer par un phénomène d'angiogénèse. La valeur de BVf plus élevée dans le groupe hémodilution que dans le groupe contrôle n'était par contre pas attendue. L'hémodilution s'étant effectuée de façon isovolumique, le BVf devrait être semblable à celui du groupe contrôle. Il est possible que ces valeurs confirment les résultats des simulations de la partie précédente. En effet, à volume sanguin égal, l'hématocrite du groupe hémodilution étant plus faible que celle du groupe contrôle, le volume plasmatique est plus important. Notre méthode de mesure du BVf pourrait donc donner des informations sur le volume plasmatique uniquement. Nous ne pouvons cependant pas établir ces conclusions tant qu'une méthode indépendante de l'IRM ne nous fournit une estimation du volume sanguin total. Pour conclure, des études d'histologies quantitatives du BVf et VSI sont en cours.

IV. CONCLUSION DU CHAPITRE

Pour évaluer la précision de nos mesures des paramètres de la microvascularisation, nous avons mis en place des outils de simulations informatiques. Les méthodes que nous avons implémentées permettent d'estimer l'évolution temporelle du signal RMN provenant d'un voxel contenant tous types de réseaux vasculaires. Nous avons montré que les résultats étaient précis et que le temps requis pour effectuer les calculs était acceptable (<40 min pour l'ensemble des calculs sur un voxel). Par contre, pour éviter des effets de bords, les matrices utilisées doivent contenir un grand nombre de points et les simulations demandent une grande mémoire vive.

A l'aide de ces outils informatiques, nous avons pu simuler la méthode de mesure du BVf par RMN. Nous avons montré que pour des voxels contenant un réseau microvasculaire présentant toutes les caractéristiques requises par le modèle mathématique, les simulations donnent une erreur d'estimation du BVf de moins de 3%. Par contre, pour des voxels présentant un réseau microvasculaire provenant de données réalistes acquises au microscope sur cortex de souris saines, nous avons trouvé une surestimation du BVf de 20% en moyenne. Ce résultat pourrait être en accord avec les différences trouvées lors de la comparaison entre les estimations du BVf réalisées par IRM et par histologie quantitative. Aucune erreur de manipulation n'intervenant dans le cas de nos simulations, il est possible que ce biais sur les mesures de BVf soit induit par certaines hypothèses du modèle mathématique.

Nous avons testé l'influence de certaines hypothèses du modèle de façon indépendante en créant des voxels contenant des réseaux microvasculaires particuliers. Il a été montré que les hypothèses concernant la forme des vaisseaux n'influençaient que légèrement les résultats. Par contre, la direction et la densité des vaisseaux peuvent entraîner des erreurs d'estimations importantes. Nous avons, entre autre, trouvé une erreur de 20% lorsqu'il existe une interaction entre les vaisseaux et lorsque la distance moyenne entre les vaisseaux est proche de celle rencontrée dans la matière grise.

Des études sur des géométries provenant d'autres régions du cerveau et de tissus pathologiques devraient être réalisées pour confirmer les résultats obtenus sur le cortex. Il faudrait également analyser la géométrie vasculaire de ces voxels en terme de densité, isotropie, longueur et largeur des vaisseaux pour relier ces informations aux résultats obtenus sur les voxels particuliers que nous avons créés. Des développements théoriques sur le modèle pourraient alors être incorporés pour réduire ces erreurs [He and Sukstanskii (2006)].

Des résultats préliminaires de simulations suggèrent que le taux d'hématocrite pourrait également influencer nos estimations du BVf. Dans ce cas, les valeurs de BVf trouvées par IRM ne seraient que le reflet de la fraction volumique occupée par le plasma uniquement. D'autres simulations incluant des vaisseaux de rayons plus importants et un mouvement des érythrocytes devraient être conduites pour analyser plus précisément cette relation. L'étude *in vivo* menée pendant la thèse tend à confirmer cette tendance mais une validation histologique est requise pour confirmer les résultats.

Conclusion du chapitre

Enfin, même si nous nous sommes concentrés sur la méthode de mesure du BVf, les outils développés peuvent permettre d'analyser d'autres méthodes comme le VSI ou la SO_2 . D'autres processus biologiques comme la perméabilité des vaisseaux ou le débit sanguin pourraient également être incorporés dans les simulations.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail, essentiellement méthodologique a consisté à mettre en place deux méthodes de mesure de l'oxygénation cérébrale par IRM. L'objectif était de pouvoir fournir des informations sur l'état d'oxygénation des tumeurs en complément de l'ensemble des paramètres microvasculaires déjà accessibles au laboratoire.

Dans un premier temps, nous avons mis en place une méthode de type FREDOM sur l'aimant à 2,35T. Après avoir réalisé une antenne dédiée à l'IRM du ^{19}F , nous avons pu établir la courbe de calibration de l'héxafluorobenzène. Comme attendu, nous avons trouvé une relation linéaire entre la $p\text{O}_2$ et le R_1 . Après injection intracérébrale du perfluorocarbène, nous avons évalué la $p\text{O}_2$ dans des tissus sains et tumoraux de cerveaux de rats. Les valeurs trouvées sont en accord avec celles de la littérature et varient avec la FiO_2 . Il semble tout de même nécessaire de valider notre approche en la comparant à d'autres méthodes de mesure de la $p\text{O}_2$. Une antenne commerciale acquise en fin de thèse, devrait permettre de transférer la méthode sur l'imageur 4,7T. En utilisant le champ plus élevé de l'aimant et le système de gradients, il devrait être plus facile de détecter le fluor et de réaliser des acquisitions combinées ^1H et ^{19}F . De plus, il devrait être également possible de placer une électrode de type Oxylite à travers l'antenne de surface ^{19}F pour obtenir des comparaisons entre les deux approches. Pour l'instant, la principale difficulté liée à la méthode reste l'injection du produit. Pour notre approche, nous avons choisi d'injecter le HFB pur directement dans les tissus à interroger. Cette approche est simple et donne un RSB important. Mais elle implique une chirurgie importante avant l'imagerie RMN et nous avons constaté que les injections étaient peu reproductibles et pouvaient endommager les tissus. En optimisant les paramètres de l'injection comme le débit ou la taille de l'aiguille, il pourrait être possible d'améliorer la précision de l'approche. Mais dans cette configuration, il reste tout de même peu envisageable d'effectuer des suivis longitudinaux. Une autre solution serait d'injecter des émulsions lipidiques de PFC en intraveineuse. Comme indiqué dans la littérature, cette approche nécessite des compétences de chimistes et peut poser des problèmes de biodistribution. Enfin, les développements méthodologiques que nous avons réalisés pour l'imagerie du ^{19}F peuvent également être utilisés pour d'autres applications comme la détection de fluoromidazole ou de cellules marquées au ^{19}F .

Dans un second temps, nous avons mis en place une méthode de mesure de l'oxygénation sanguine. En intégrant des mesures de BVf , T_2 , B_0 et T_2^* dans un modèle mathématique de la décroissance du signal RMN, nous avons obtenu des cartes de SO_2 locales. Les résultats sur cerveaux sains de rats ont montré que nos estimations corrélaient avec des mesures de SO_2 systémiques obtenues par analyse des gaz du sang dans la veine fémorale. Les cartes sont homogènes et reproductibles et les valeurs varient avec la FiO_2 . Il reste néanmoins une interrogation sur les valeurs obtenues dans le corps calleux. Pour valider plus précisément notre approche, il serait intéressant d'effectuer les mesures de SO_2 systémiques dans des vaisseaux plus proches du cerveau. En analysant les versants veineux et artériel du sang, il devrait être également possible d'obtenir une meilleure idée de la signification de notre mesure de la SO_2 locale. Il serait

aussi intéressant de comparer notre approche à la méthode NIRS. Dans des tumeurs cérébrales, nous avons montré une plus grande hétérogénéité des valeurs de SO_2 . La valeur moyenne de la SO_2 dépend du modèle de tumeur et évolue au cours de la croissance tumorale et sous l'influence de traitements anti-cancéreux. Nous avons corrélé les faibles valeurs de SO_2 (<40%) trouvées dans les tumeurs aux zones marquées en histologie par un pimonidazole. Cette étape préliminaire devrait être plus amplement analysée. En mesurant la pO_2 et SO_2 sur les mêmes animaux, on pourrait également accéder à une meilleure compréhension des phénomènes liés à l'hypoxie. En couplant nos mesures de la SO_2 à des mesures du débit sanguin, il serait également possible d'obtenir des informations sur la $CMRO_2$.

Dans l'optique d'analyser la précision de nos mesures de la microvascularisation, nous avons mis en place des simulations informatiques. Une combinaison efficace de méthodes récentes utilisant la transformée de Fourier nous a permis d'analyser la décroissance du signal RMN provenant de voxel contenant des géométries vasculaires quelconques. Des résultats sur cortex de souris digitalisés suggèrent que nous pourrions surestimer le BVf en IRM. Des données sur d'autres parties du cerveau comme le striatum et surtout des données sur tumeurs où la microvascularisation est altérée pourraient permettre de confirmer ces résultats préliminaires. En utilisant des géométries particulières de la microvascularisation, nous avons également montré que la modélisation des vaisseaux sous forme de cylindres était appropriée. En revanche, la densité et l'anisotropie des directions des vaisseaux peuvent être des sources d'erreurs sur nos estimations du BVf et par extension aux estimations du VSI et SO_2 . Il pourrait être possible de relier ces résultats à ceux obtenus par microscopie en analysant les réseaux vasculaires à l'aide d'outils de traitement d'images adaptés. Nous pourrions alors estimer la source possible d'erreur et utiliser des modèles théoriques plus avancés pour la corriger. Enfin, des expériences *in vivo* pourraient permettre de valider les simulations comme il a été fait pour l'étude sur l'influence du taux d'hématocrite.

On peut finalement ajouter que les outils de mesures de l'oxygénation développés pendant cette thèse pourraient être utilisés pour étudier l'oxygénation sur d'autres pathologies. Des résultats préliminaires nous ont montré que la SO_2 variait dans le cas de l'ischémie cérébrale. Des applications à l'étude de pathologies aiguës comme le traumatisme crânien, des maladies neurodégénératives ou des mesures dans d'autres organes que le cerveau sont également envisageables.

RÉFÉRENCES

- [Ahrens *et al* (2005)] Ahrens ET, Flores R, Xu H, Morel PA. 2005. In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nat Biotechnol* 23:983–987.
- [An and Lin(2000)] An H, Lin W. 2000. Quantitative measurements of cerebral blood oxygen saturation using magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1225–1236.
- [An and Lin(2002a)] An H, Lin W. 2002. Cerebral oxygen extraction fraction and cerebral venous blood volume measurements using mri: effects of magnetic field variation. *Magn Reson Med* 47:958–966.
- [An and Lin(2002b)] An H, Lin W. 2002. Cerebral venous and arterial blood volumes can be estimated separately in humans using magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 48:583–588.
- [An and Lin(2003)] An H, Lin W. 2003. Impact of intravascular signal on quantitative measures of cerebral oxygen extraction and blood volume under normo- and hypercapnic conditions using an asymmetric spin echo approach. *Magn Reson Med* 50:708–716.
- [An *et al* (2009)] An H, Liu Q, Chen Y, Lin W. 2009. Evaluation of mr-derived cerebral oxygen metabolic index in experimental hyperoxic hypercapnia, hypoxia, and ischemia. *Stroke* 40:2165–2172.
- [Austin *et al* (2006)] Austin T, Gibson AP, Branco G, Yusof RM, Arridge SR, Meek JH, Wyatt JS, Delpy DT, Hebden JC. 2006. Three dimensional optical imaging of blood volume and oxygenation in the neonatal brain. *Neuroimage* 31:1426–1433.
- [Bandettini and Wong (1995)] Bandettini PA and Wong EC. 1995. Effects of biophysical and physiological parameters on brain activation-induced R2* and R2 changes: simulations using a deterministic diffusion model. *Int. J. Imag. Syst. Tech.* 6:133–152.
- [Barker *et al* (1994)] Barker BR, Mason RP, Bansal N, Peshock RM. 1994. Oxygen tension mapping with f-19 echo-planar mr imaging of sequestered perfluorocarbon. *J Magn Reson Imaging* 4:595–602.
- [Barker *et al* (1993)] Barker BR, Mason RP, Peshock RM. 1993. Echo planar imaging of perfluorocarbons. *Magn Reson Imaging* 11:1165–1173.
- [Barthel *et al* (2004)] Barthel H, Wilson H, Collingridge DR, Brown G, Osman S, Luthra SK, Brady F, Workman P, Price PM, Aboagye EO. 2004. In vivo evaluation of [18f]fluoroetanidazole as a new marker for imaging tumour hypoxia with positron emission tomography. *Br J Cancer* 90:2232–2242.

- [Baudelet and Gallez (2002)] Baudelet C, Gallez B. 2002. How does blood oxygen level-dependent (bold) contrast correlate with oxygen partial pressure (po₂) inside tumors? *Magn Reson Med* 48:980–986.
- [Baudelet and Gallez (2005)] Baudelet C, Gallez B. 2005. Current issues in the utility of blood oxygen level dependent MRI for the assessment of modulations in tumor oxygenation. *Current medical imaging reviews* 1:229-243.
- [Benaron *et al* (2000)] Benaron DA, Hintz SR, Villringer A, Boas D, Kleinschmidt A, Frahm J, Hirth C, Obrig H, van Houten JC, Kermit EL, Cheong WF, Stevenson DK. 2000. Noninvasive functional imaging of human brain using light. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:469–477.
- [Bertout *et al* (2008)] Bertout JA, Patel SA, Simon MC. 2008. The impact of o₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 8:967–975.
- [Boxerman *et al* (1995)] Boxerman JL, Hamberg LM, Rosen BR, Weisskoff RM. 1995. Mr contrast due to intravascular magnetic susceptibility perturbations. *Magn Reson Med* 34:555–566.
- [Brahimi-Horn *et al* (2007)] Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouysségur J. 2007. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 85:1301–1307.
- [Brizel *et al* (1996)] Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW. 1996. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56:941–943.
- [Brown and Wilson(2004)] Brown JM, Wilson WR. 2004. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 4:437–447.
- [Bue *et al* (1997)] Bue FL, Moiny F, Gillis P. 1997. Magnetic resonance susceptibility contrast induced by capillaries: a numerical comparison of two models. *MAGMA* 5:39–44.
- [Bulte(2005)] Bulte JWM. 2005. Hot spot mri emerges from the background. *Nat Biotechnol* 23:945–946.
- [Cairns *et al* (2001)] Cairns RA, Kalliomaki T, Hill RP. 2001. Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of kht murine tumors. *Cancer Res* 61:8903–8908.
- [Cerdonio *et al* (1977)] Cerdonio M, Congiu-Castellano A, Mogno F, Pispisa B, Romani GL, Vitale S. 1977. Magnetic properties of oxyhemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:398–400.
- [Chen and Wyrwicz(1999)] Chen N, Wyrwicz AM. 1999. Removal of intravoxel dephasing artifact in gradient-echo images using a field-map based rf refocusing technique. *Magn Reson Med* 42:807–812.

- [Chen *et al* (2003)] Chen Y, Taylor DR, Intes X, Chance B. 2003. Correlation between near-infrared spectroscopy and magnetic resonance imaging of rat brain oxygenation modulation. *Phys Med Biol* 48:417–427.
- [Chiarelli *et al* (2007)] Chiarelli PA, Bulte DP, Wise R, Gallichan D, Jezard P. 2007. A calibration method for quantitative bold fmri based on hyperoxia. *Neuroimage* 37:808–820.
- [Dardzinski and Sotak(1994)] Dardzinski BJ, Sotak CH. 1994. Rapid tissue oxygen tension mapping using 19f inversion-recovery echo-planar imaging of perfluoro-15-crown-5-ether. *Magn Reson Med* 32:88–97.
- [Davda and Bezabeh(2006)] Davda S, Bezabeh T. 2006. Advances in methods for assessing tumor hypoxia in vivo: implications for treatment planning. *Cancer Metastasis Rev* 25:469–480.
- [Davis *et al* (1998)] Davis TL, Kwong KK, Weisskoff RM, Rosen BR. 1998. Calibrated functional mri: mapping the dynamics of oxidative metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1834–1839.
- [Dewhirst *et al* (1996a)] Dewhirst MW, Kimura H, Rehmus SW, Braun RD, Papahadjopoulos D, Hong K, Secomb TW. 1996. Microvascular studies on the origins of perfusion-limited hypoxia. *Br J Cancer Suppl* 27:S247–S251.
- [Dewhirst *et al* (2000)] Dewhirst MW, Klitzman B, Braun RD, Brizel DM, Haroon ZA, Secomb TW. 2000. Review of methods used to study oxygen transport at the microcirculatory level. *Int J Cancer* 90:237–255.
- [Dewhirst *et al* (1996b)] Dewhirst MW, Ong ET, Rosner GL, Rehmus SW, Shan S, Braun RD, Brizel DM, Secomb TW. 1996. Arteriolar oxygenation in tumour and subcutaneous arterioles: effects of inspired air oxygen content. *Br J Cancer Suppl* 27:S241–S246.
- [Dewhirst *et al* (1994)] Dewhirst MW, Secomb TW, Ong ET, Hsu R, Gross JF. 1994. Determination of local oxygen consumption rates in tumors. *Cancer Res* 54:3333–3336.
- [Dunn *et al* (2002)] Dunn JF, O'Hara JA, Zaim-Wadghiri Y, Lei H, Meyerand ME, Grinberg OY, Hou H, Hoopes PJ, Demidenko E, Swartz HM. 2002. Changes in oxygenation of intracranial tumors with carbogen: a bold mri and epr oximetry study. *J Magn Reson Imaging* 16:511–521.
- [Durand(1994)] Durand RE. 1994. The influence of microenvironmental factors during cancer therapy. *In Vivo* 8:691–702.
- [Duyn *et al* (2007)] Duyn JH, van Gelderen P, Li TQ, de Zwart JA, Koretsky AP, Fukunaga M. 2007. High-field mri of brain cortical substructure based on signal phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11796–11801.

- [Edwards(1993)] Edwards DI. 1993. Nitroimidazole drugs–action and resistance mechanisms. ii. mechanisms of resistance. *J Antimicrob Chemother* 31:201–210.
- [Eidelberg *et al* (1988)] Eidelberg D, Johnson G, Barnes D, Tofts PS, Delpy D, Plummer D, McDonald WI. 1988. 19f nmr imaging of blood oxygenation in the brain. *Magn Reson Med* 6:344–352.
- [Elas *et al* (2006)] Elas M, Ahn KH, Parasca A, Barth ED, Lee D, Haney C, Halpern HJ. 2006. Electron paramagnetic resonance oxygen images correlate spatially and quantitatively with oxyLite oxygen measurements. *Clin Cancer Res* 12:4209–4217.
- [Fan *et al* (2002)] Fan X, River JN, Zamora M, Al-Hallaq HA, Karczmar GS. 2002. Effect of carbogen on tumor oxygenation: combined fluorine-19 and proton mri measurements. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54:1202–1209.
- [Fenton *et al* (1999)] Fenton BM, Paoni SF, Lee J, Koch CJ, Lord EM. 1999. Quantification of tumour vasculature and hypoxia by immunohistochemical staining and hbo2 saturation measurements. *Br J Cancer* 79:464–471.
- [Fernández-Seara and Wehrli(2000)] Fernández-Seara MA, Wehrli FW. 2000. Postprocessing technique to correct for background gradients in image-based $r^*(2)$ measurements. *Magn Reson Med* 44:358–366.
- [Ferrara(2002)] Ferrara N. 2002. Vegf and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2:795–803.
- [Fiat *et al* (1993)] Fiat D, Dolinsek J, Hankiewicz J, Dujovny M, Ausman J. 1993. Determination of regional cerebral oxygen consumption in the human: 17o natural abundance cerebral magnetic resonance imaging and spectroscopy in a whole body system. *Neurol Res* 15:237–248.
- [Franceschini *et al* (2002)] Franceschini MA, Boas DA, Zourabian A, Diamond SG, Nadgir S, Lin DW, Moore JB, Fantini S. 2002. Near-infrared spirometry: noninvasive measurements of venous saturation in piglets and human subjects. *J Appl Physiol* 92:372–384.
- [Franceschini *et al* (1997)] Franceschini MA, Moesta KT, Fantini S, Gaida G, Gratton E, Jess H, Mantulin WW, Seeber M, Schlag PM, Kaschke M. 1997. Frequency-domain techniques enhance optical mammography: initial clinical results. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6468–6473.
- [Franconi *et al* (2006)] Franconi F, Mowat P, Lemaire L, Richomme P, Jeune JLL. 2006. Single-scan quantitative t_2^* methods with susceptibility artifact reduction. *NMR Biomed* 19:527–534.
- [Gallez *et al* (2004)] Gallez B, Baudelet C, Jordan BF. 2004. Assessment of tumor oxygenation by electron paramagnetic resonance: principles and applications. *NMR Biomed* 17:240–262.

- [Gatenby *et al* (1988)] Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, Coia LR, Moldofsky PJ, Hartz WH, Broder GJ. 1988. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14:831–838.
- [Glover(1999)] Glover GH. 1999. 3d z-shim method for reduction of susceptibility effects in bold fmri. *Magn Reson Med* 42:290–299.
- [Goda *et al* (1997)] Goda F, O'Hara JA, Liu KJ, Rhodes ES, Dunn JF, Swartz HM. 1997. Comparisons of measurements of po₂ in tissue in vivo by epr oximetry and microelectrodes. *Adv Exp Med Biol* 411:543–549.
- [Graeber *et al* (1996)] Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. 1996. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379:88–91.
- [GRAY *et al* (1953)] GRAY LH, CONGER AD, EBERT M, HORNSEY S, SCOTT OC. 1953. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26:638–648.
- [Gruetter(1993)] Gruetter R. 1993. Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils. *Magn Reson Med* 29:804–811.
- [Gulliksrud *et al* (2008)] Gulliksrud K, Vestvik IK, Galappathi K, Mathiesen B, Rofstad EK. 2008. Detection of different hypoxic cell subpopulations in human melanoma xenografts by pimonidazole immunohistochemistry. *Radiat Res* 170:638–650.
- [Haacke *et al* (2005)] Haacke EM, Cheng NYC, House MJ, Liu Q, Neelavalli J, Ogg RJ, Khan A, Ayaz M, Kirsch W, Obenaus A. 2005. Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 23:1–25.
- [Höckel and Vaupel(2001)] Höckel M, Vaupel P. 2001. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93:266–276.
- [He and Sukstanskii (2006)] He X, Sukstanskii AL. 2006. Correction on FID NMR signal induced by Mesoscopic Magnetic Field Inhomogeneities at High Volume Fraction. *Proc ISMRM*. Seattle.
- [He and Yablonskiy(2007)] He X, Yablonskiy DA. 2007. Quantitative bold: mapping of human cerebral deoxygenated blood volume and oxygen extraction fraction: default state. *Magn Reson Med* 57:115–126.
- [He *et al* (2008)] He X, Zhu M, Yablonskiy DA. 2008. Validation of oxygen extraction fraction measurement by qbold technique. *Magn Reson Med* 60:882–888.
- [Hermán *et al* (2006)] Hermán P, Trübel HKF, Hyder F. 2006. A multiparametric assessment of oxygen efflux from the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:79–91.
- [Hill *et al* (2001)] Hill RP, Jaeger KD, Jang A, Cairns R. 2001. ph, hypoxia and metastasis. *Novartis Found Symp* 240:154–65; discussion 165–8.

- [Hockel *et al* (1996)] Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. 1996. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 56:4509–4515.
- [Hoge *et al* (1999)] Hoge RD, Atkinson J, Gill B, Crelier GR, Marrett S, Pike GB. 1999. Linear coupling between cerebral blood flow and oxygen consumption in activated human cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9403–9408.
- [Hoskin *et al* (2003)] Hoskin PJ, Sibtain A, Daley FM, Wilson GD. 2003. Glut1 and caix as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of arcon. *Br J Cancer* 89:1290–1297.
- [Hou *et al* (2003)] Hou H, Grinberg OY, Taie S, Leichtweis S, Miyake M, Grinberg S, Xie H, Csete M, Swartz HM. 2003. Electron paramagnetic resonance assessment of brain tissue oxygen tension in anesthetized rats. *Anesth Analg* 96:1467–72, table of contents.
- [Hueber *et al* (2001)] Hueber DM, Franceschini MA, Ma HY, Zhang Q, Ballesteros JR, Fantini S, Wallace D, Ntziachristos V, Chance B. 2001. Non-invasive and quantitative near-infrared haemoglobin spectrometry in the piglet brain during hypoxic stress, using a frequency-domain multidistance instrument. *Phys Med Biol* 46:41–62.
- [Intaglietta *et al* (1977)] Intaglietta M, Myers RR, Gross JF, Reinhold HS. 1977. Dynamics of microvascular flow in implanted mouse mammary tumours. *Bibl Anat* 273–276.
- [Jenkinson(2003)] Jenkinson M. 2003. Fast, automated, n-dimensional phase-unwrapping algorithm. *Magn Reson Med* 49:193–197.
- [Jordan *et al* (2009)] Jordan BF, Cron GO, Gallez B. 2009. Rapid monitoring of oxygenation by 19f magnetic resonance imaging: Simultaneous comparison with fluorescence quenching. *Magn Reson Med* 61:634–638.
- [Jordan *et al* (2002)] Jordan BF, Grégoire V, Demeure RJ, Sonveaux P, Feron O, O'Hara J, Vanhulle VP, Delzenne N, Gallez B. 2002. Insulin increases the sensitivity of tumors to irradiation: involvement of an increase in tumor oxygenation mediated by a nitric oxide-dependent decrease of the tumor cells oxygen consumption. *Cancer Res* 62:3555–3561.
- [Josse *et al* (2001)] Josse O, Labar D, Georges B, Grégoire V, Marchand-Brynaert J. 2001. Synthesis of [18f]-labeled ef3 [2-(2-nitroimidazol-1-yl)-n-(3,3,3-trifluoropropyl)-acetamide], a marker for pet detection of hypoxia. *Bioorg Med Chem* 9:665–675.
- [Joyeux-Faure *et al* (2005)] Joyeux-Faure M, Stanke-Labesque F, Lefebvre B, Béguin P, Godin-Ribuot D, Ribouot C, Launois SH, Bessard G, Lévy P. 2005. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol* 98:1691–1696.

- [Kedderis and Miwa(1988)] Kedderis GL, Miwa GT. 1988. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. *Drug Metab Rev* 19:33–62.
- [Kimura *et al* (1996)] Kimura H, Braun RD, Ong ET, Hsu R, Secomb TW, Papahadjopoulos D, Hong K, Dewhirst MW. 1996. Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer Res* 56:5522–5528.
- [Kiselev and Posse(1999)] Kiselev VG, Posse S. 1999. Analytical model of susceptibility-induced mr signal dephasing: effect of diffusion in a microvascular network. *Magn Reson Med* 41:499–509.
- [Klassen and Menon(2007)] Klassen LM, Menon RS. 2007. Nmr simulation analysis of statistical effects on quantifying cerebrovascular parameters. *Biophys J* 92:1014–1021.
- [Koch *et al* (2006)] Koch KM, Papademetris X, Rothman DL, de Graaf RA. 2006. Rapid calculations of susceptibility-induced magnetostatic field perturbations for in vivo magnetic resonance. *Phys Med Biol* 51:6381–6402.
- [Kodibagkar *et al* (2006)] Kodibagkar VD, Cui W, Merritt ME, Mason RP. 2006. Novel 1h nmr approach to quantitative tissue oximetry using hexamethyldisiloxane. *Magn Reson Med* 55:743–748.
- [Krishna *et al* (2002)] Krishna MC, English S, Yamada K, Yoo J, Murugesan R, Devasahayam N, Cook JA, Golman K, Ardenkjaer-Larsen JH, Subramanian S, Mitchell JB. 2002. Overhauser enhanced magnetic resonance imaging for tumor oximetry: coregistration of tumor anatomy and tissue oxygen concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2216–2221.
- [Lehtiö *et al* (2001)] Lehtiö K, Oikonen V, Grönroos T, Eskola O, Kalliokoski K, Bergman J, Solin O, Grénman R, Nuutila P, Minn H. 2001. Imaging of blood flow and hypoxia in head and neck cancer: initial evaluation with $[(15)\text{o}]\text{h}(2)\text{o}$ and $[(18)\text{f}]\text{fluoroerythronitroimidazole}$ pet. *J Nucl Med* 42:1643–1652.
- [Li *et al* (2008)] Li ML, Oh JT, Xie X, Ku G, Wang W, Li C, Lungu G, Stoica G, Wang LV. *Proc IEEE*. Vol 96, No 3.
- [Lin *et al* (2002)] Lin TN, Sun SW, Cheung WM, Li F, Chang C. 2002. Dynamic changes in cerebral blood flow and angiogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats. evaluation with serial magnetic resonance imaging. *Stroke* 33:2985–2991.
- [Longa *et al* (1989)] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84–91.
- [Lungu *et al* (2007)] Lungu GF, Li ML, Xie X, Wang LV, Stoica G. 2007. In vivo imaging and characterization of hypoxia-induced neovascularization and tumor invasion. *Int J Oncol* 30:45–54.

[Marques and Bowtell (2005)] Marques JP, Bowtell. 2005. Concepts in Magnetic Resonance Part B, vol. 25B(1) 65-78.

[Marques *et al* (2009)] Marques JP, Maddage R, Mlynarik V, Gruetter R. 2009. On the origin of the mr image phase contrast: an in vivo mr microscopy study of the rat brain at 14.1 t. *Neuroimage* 46:345–352.

[Mason *et al* (1990)] Mason RP, Bansal N, Babcock EE, Nunnally RL, Antich PP. 1990. A novel editing technique for 19f mri: molecule-specific imaging. *Magn Reson Imaging* 8:729–736.

[Mason *et al* (1999)] Mason RP, Constantinescu A, Hunjan S, Le D, Hahn EW, Antich PP, Blum C, Peschke P. 1999. Regional tumor oxygenation and measurement of dynamic changes. *Radiat Res* 152:239–249.

[Mason *et al* (2003a)] Mason RP, Constantinescu A, Ran S, Thorpe PE. 2003. Oxygenation in a human tumor xenograft: manipulation through respiratory challenge and antibody-directed infarction. *Adv Exp Med Biol* 530:197–204.

[Mason *et al* (2003b)] Mason RP, Hunjan S, Constantinescu A, Song Y, Zhao D, Hahn EW, Antich PP, Peschke P. 2003. Tumor oximetry: comparison of 19f mr epi and electrodes. *Adv Exp Med Biol* 530:19–27.

[Mason *et al* (2002)] Mason RP, Ran S, Thorpe PE. 2002. Quantitative assessment of tumor oxygen dynamics: molecular imaging for prognostic radiology. *J Cell Biochem Suppl* 39:45–53.

[ichiro Matsumoto *et al* (2006)] ichiro Matsumoto K, Bernardo M, Subramanian S, Choyke P, Mitchell JB, Krishna MC, Lizak MJ. 2006. Mr assessment of changes of tumor in response to hyperbaric oxygen treatment. *Magn Reson Med* 56:240–246.

[Matsumoto *et al* (2008)] Matsumoto S, Hyodo F, Subramanian S, Devasahayam N, Munasinghe J, Hyodo E, Gadiseti C, Cook JA, Mitchell JB, Krishna MC. 2008. Low-field paramagnetic resonance imaging of tumor oxygenation and glycolytic activity in mice. *J Clin Invest* 118:1965–1973.

[McNab *et al* (2004)] McNab JA, Yung AC, Kozlowski P. 2004. Tissue oxygen tension measurements in the shionogi model of prostate cancer using 19f mrs and mri. *MAGMA* 17:288–295.

[Merboldt *et al* (2000)] Merboldt KD, Finsterbusch J, Frahm J. 2000. Reducing inhomogeneity artifacts in functional mri of human brain activation-thin sections vs gradient compensation. *J Magn Reson* 145:184–191.

[Nöth *et al* (1995)] Nöth U, Morrissey SP, Deichmann R, Adolf H, Schwarzbauer C, Lutz J, Haase A. 1995. In vivo measurement of partial oxygen pressure in large vessels and in the reticuloendothelial system using fast 19f-mri. *Magn Reson Med* 34:738–745.

[Nöth *et al* (2004)] Nöth U, Rodrigues LM, Robinson SP, Jork A, Zimmermann U, Newell B, Griffiths JR. 2004. In vivo determination of tumor oxygenation during growth

and in response to carbogen breathing using ^{15}C -loaded alginate capsules as fluorine-19 magnetic resonance imaging oxygen sensors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60:909–919.

[O'Connor *et al* (2007)] O'Connor JPB, Jackson A, Buonaccorsi GA, Buckley DL, Roberts C, Watson Y, Cheung S, McGrath DM, Naish JH, Rose CJ, Dark PM, Jayson GC, Parker GJM. 2007. Organ-specific effects of oxygen and carbogen gas inhalation on tissue longitudinal relaxation times. *Magn Reson Med* 58:490–496.

[O'Connor *et al* (2009)] O'Connor JPB, Naish JH, Parker GJM, Waterton JC, Watson Y, Jayson GC, Buonaccorsi GA, Cheung S, Buckley DL, McGrath DM, West CML, Davidson SE, Roberts C, Mills SJ, Mitchell CL, Hope L, Ton NC, Jackson A. 2009. Preliminary study of oxygen-enhanced longitudinal relaxation in mri: A potential novel biomarker of oxygenation changes in solid tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* .

[Okunieff *et al* (1993)] Okunieff P, Hoeckel M, Dunphy EP, Schlenger K, Knoop C, Vaupel P. 1993. Oxygen tension distributions are sufficient to explain the local response of human breast tumors treated with radiation alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26:631–636.

[van Osch *et al* (2003)] van Osch MJP, van P A Vonken E, Viergever MA, van der Grond J, Bakker CJG. 2003. Measuring the arterial input function with gradient echo sequences. *Magn Reson Med* 49:1067–1076.

[Pathak *et al* (2008)] Pathak AP, Ward BD, Schmainda KM. 2008. A novel technique for modeling susceptibility-based contrast mechanisms for arbitrary microvascular geometries: The finite perturber method. *Neuroimage* .

[Pauling and Coryell(1936)] Pauling L, Coryell CD. 1936. The magnetic properties and structure of hemoglobin, oxyhemoglobin and carbonmonoxyhemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22:210–216.

[Pawlik *et al* (1981)] Pawlik G, Backl A, Bing RJ. 1981. Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. *Brain research* 208, 35-58.

[Procissi *et al* (2007)] Procissi D, Claus F, Burgman P, Kozirowski J, Chapman JD, Thakur SB, Matei C, Ling CC, Koutcher JA. 2007. In vivo ^{19}F magnetic resonance spectroscopy and chemical shift imaging of tri-fluoro-nitroimidazole as a potential hypoxia reporter in solid tumors. *Clin Cancer Res* 13:3738–3747.

[Quaresima and Ferrari(1998)] Quaresima V, Ferrari M. 1998. Assessment of quadriceps oxygenation in patients with myopathies by near infrared spectroscopy. *Neurology* 51:1238–1239.

[Rasey *et al* (1987)] Rasey JS, Grunbaum Z, Magee S, Nelson NJ, Olive PL, Durand RE, Krohn KA. 1987. Characterization of radiolabeled fluoromisonidazole as a probe for hypoxic cells. *Radiat Res* 111:292–304.

- [Reichenbach *et al* (1997)] Reichenbach JR, Venkatesan R, Yablonskiy DA, Thompson MR, Lai S, Haacke EM. 1997. Theory and application of static field inhomogeneity effects in gradient-echo imaging. *J Magn Reson Imaging* 7:266–279.
- [Restom *et al* (2007)] Restom K, Bangen KJ, Bondi MW, Perthen JE, Liu TT. 2007. Cerebral blood flow and bold responses to a memory encoding task: a comparison between healthy young and elderly adults. *Neuroimage* 37:430–439.
- [Rofstad(2000)] Rofstad EK. 2000. Microenvironment-induced cancer metastasis. *Int J Radiat Biol* 76:589–605.
- [Ronen *et al* (1998)] Ronen I, Merkle H, Ugurbil K, Navon G. 1998. Imaging of h217o distribution in the brain of a live rat by using proton-detected 17o mri. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12934–12939.
- [Rosen *et al* (1989)] Rosen BR, Belliveau JW, Chien D. 1989. Perfusion imaging by nuclear magnetic resonance. *Magn Reson Q* 5:263–281.
- [Rousseau *et al* (2007a)] Rousseau J, Boudou C, Barth RF, Balosso J, Estève F, Elleaume H. 2007. Enhanced survival and cure of f98 glioma-bearing rats following intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation. *Clin Cancer Res* 13:5195–5201.
- [Rousseau *et al* (2007b)] Rousseau J, Boudou C, Estève F, Elleaume H. 2007. Convection-enhanced delivery of an iodine tracer into rat brain for synchrotron stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68:943–951.
- [Salomir *et al* (2003)] Salomir R, Senneville BD, Moonen CTW. (2003). Concepts in magnetic resonance Part B, Vol. 19B(1) 26-34.
- [Schenck(1996)] Schenck JF. 1996. The role of magnetic susceptibility in magnetic resonance imaging: Mri magnetic compatibility of the first and second kinds. *Med Phys* 23:815–850.
- [Seddon *et al* (2001)] Seddon BM, Honess DJ, Vojnovic B, Tozer GM, Workman P. 2001. Measurement of tumor oxygenation: in vivo comparison of a luminescence fiber-optic sensor and a polarographic electrode in the p22 tumor. *Radiat Res* 155:837–846.
- [Sedlacik *et al* (2007)] Sedlacik J, Rauscher A, Reichenbach JR. 2007. Obtaining blood oxygenation levels from mr signal behavior in the presence of single venous vessels. *Magn Reson Med* 58:1035–1044.
- [Shannon *et al* (2003)] Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D. 2003. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 29:297–307.
- [Shchors and Evan(2007)] Shchors K, Evan G. 2007. Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res* 67:7059–7061.

- [Shui and Beebe(2008)] Shui YB, Beebe DC. 2008. Age-dependent control of lens growth by hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1023–1029.
- [Silvennoinen *et al* (2003)] Silvennoinen MJ, Clingman CS, Golay X, Kauppinen RA, van Zijl PCM. 2003. Comparison of the dependence of blood r_2 and r_2^* on oxygen saturation at 1.5 and 4.7 tesla. *Magn Reson Med* 49:47–60.
- [Spees *et al* (2001)] Spees WM, Yablonskiy DA, Oswald MC, Ackerman JJ. 2001. Water proton mr properties of human blood at 1.5 tesla: magnetic susceptibility, $t(1)$, $t(2)$, $t^*(2)$, and non-lorentzian signal behavior. *Magn Reson Med* 45:533–542.
- [Stefanovic and Pike(2005)] Stefanovic B, Pike GB. 2005. Venous refocusing for volume estimation: Verve functional magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 53:339–347.
- [Stefanovic *et al* (2005)] Stefanovic B, Warnking JM, Kobayashi E, Bagshaw AP, Hawco C, Dubeau F, Gotman J, Pike GB. 2005. Hemodynamic and metabolic responses to activation, deactivation and epileptic discharges. *Neuroimage* 28:205–215.
- [Stefanovic *et al* (2006)] Stefanovic B, Warnking JM, Rylander KM, Pike GB. 2006. The effect of global cerebral vasodilation on focal activation hemodynamics. *Neuroimage* 30:726–734.
- [Subarsky and Hill(2008)] Subarsky P, Hill RP. 2008. Graded hypoxia modulates the invasive potential of ht1080 fibrosarcoma and mda mb231 carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 25:253–264.
- [Tatum *et al* (2006)] Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, Arbeit JM, Brown JM, Chao KSC, Chapman JD, Eckelman WC, Fyles AW, Giaccia AJ, Hill RP, Koch CJ, Krishna MC, Krohn KA, Lewis JS, Mason RP, Melillo G, Padhani AR, Powis G, Rajendran JG, Reba R, Robinson SP, Semenza GL, Swartz HM, Vaupel P, Yang D, Croft B, Hoffman J, Liu G, Stone H, Sullivan D. 2006. Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *Int J Radiat Biol* 82:699–757.
- [Teicher(1994)] Teicher BA. 1994. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 13:139–168.
- [THOMLINSON and GRAY(1955)] THOMLINSON RH, GRAY LH. 1955. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 9:539–549.
- [Thulborn *et al* (1982)] Thulborn KR, Waterton JC, Matthews PM, Radda GK. 1982. Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in whole blood at high field. *Biochim Biophys Acta* 714:265–270.
- [Troprès *et al* (2001)] Troprès I, Grimault S, Vaeth A, Grillon E, Julien C, Payen JF, Lamalle L, Décorps M. 2001. Vessel size imaging. *Magn Reson Med* 45:397–408.

- [Troprès *et al* (2004)] Troprès I, Lamalle L, Péoc'h M, Farion R, Usson Y, Décorps M, Rémy C. 2004. In vivo assessment of tumoral angiogenesis. *Magn Reson Med* 51:533–541.
- [Truong *et al* (2006)] Truong TK, Chakeres DW, Scharre DW, Beversdorf DQ, Schmalbrock P. 2006. Blipped multi gradient-echo slice excitation profile imaging (bmgesepe) for fast t2 * measurements with macroscopic b0 inhomogeneity compensation. *Magn Reson Med* 55:1390–1395.
- [Turner *et al* (2002)] Turner KJ, Crew JP, Wykoff CC, Watson PH, Poulsom R, Pastorek J, Ratcliffe PJ, Cranston D, Harris AL. 2002. The hypoxia-inducible genes vegf and ca9 are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 86:1276–1282.
- [Valable *et al* (2008)] Valable S, Lemasson B, Farion R, Beaumont M, Segebarth C, Remy C, Barbier EL. 2008. Assessment of blood volume, vessel size, and the expression of angiogenic factors in two rat glioma models: a longitudinal in vivo and ex vivo study. *NMR Biomed* 21:1043–1056.
- [Vaupel and Mayer(2005)] Vaupel P, Mayer A. 2005. Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus Clin Biol* 12:5–10.
- [Vaupel *et al* (2001)] Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. 2001. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 18:243–259.
- [Vazquez *et al* (2006)] Vazquez AL, Cohen ER, Gulani V, Hernandez-Garcia L, Zheng Y, Lee GR, Kim SG, Grotberg JB, Noll DC. 2006. Vascular dynamics and bold fmri: Cbf level effects and analysis considerations. *Neuroimage* 32:1642–1655.
- [Wadghiri *et al* (2001)] Wadghiri YZ, Johnson G, Turnbull DH. 2001. Sensitivity and performance time in mri dephasing artifact reduction methods. *Magn Reson Med* 45:470–476.
- [Wang *et al* (2003)] Wang X, Pang Y, Ku G, Xie X, Stoica G, Wang LV. 2003. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat Biotechnol* 21:803–806.
- [Wang *et al* (2006)] Wang X, Xie X, Ku G, Wang LV, Stoica G. 2006. Noninvasive imaging of hemoglobin concentration and oxygenation in the rat brain using high-resolution photoacoustic tomography. *J Biomed Opt* 11:024015.
- [Weisskoff and Kiihne(1992)] Weisskoff RM, Kiihne S. 1992. Mri susceptometry: image-based measurement of absolute susceptibility of mr contrast agents and human blood. *Magn Reson Med* 24:375–383.
- [Wen *et al* (2008)] Wen B, Urano M, Humm JL, Seshan VE, Li GC, Ling CC. 2008. Comparison of helzel and oxylite systems in the measurements of tumor partial oxygen pressure (po2). *Radiat Res* 169:67–75.

- [Wenger(2002)] Wenger RH. 2002. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and o₂-regulated gene expression. *FASEB J* 16:1151–1162.
- [Wion *et al* (2009)] Wion D, Christen T, Barbier EL, Coles JA. 2009. Po(2) matters in stem cell culture. *Cell Stem Cell* 5:242–243.
- [Wykoff *et al* (2000)] Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. 2000. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 60:7075–7083.
- [Yablonskiy and Haacke(1994)] Yablonskiy DA, Haacke EM. 1994. Theory of nmr signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime. *Magn Reson Med* 32:749–763.
- [Yablonskiy and Haacke(1997)] Yablonskiy DA, Haacke EM. 1997. An mri method for measuring t₂ in the presence of static and rf magnetic field inhomogeneities. *Magn Reson Med* 37:872–876.
- [Yang *et al* (1995)] Yang DJ, Wallace S, Cherif A, Li C, Gretzer MB, Kim EE, Podoloff DA. 1995. Development of f-18-labeled fluoroerythronitroimidazole as a pet agent for imaging tumor hypoxia. *Radiology* 194:795–800.
- [Yang *et al* (1998)] Yang QX, Williams GD, Demeure RJ, Mosher TJ, Smith MB. 1998. Removal of local field gradient artifacts in t₂*-weighted images at high fields by gradient-echo slice excitation profile imaging. *Magn Reson Med* 39:402–409.
- [Young *et al* (1988)] Young SD, Marshall RS, Hill RP. 1988. Hypoxia induces dna overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9533–9537.
- [xin Yu *et al* (2005)] xin Yu J, Kodibagkar VD, Cui W, Mason RP. 2005. 19f: a versatile reporter for non-invasive physiology and pharmacology using magnetic resonance. *Curr Med Chem* 12:819–848.
- [Zaharchuk *et al* (2006)] Zaharchuk G, Busse RF, Rosenthal G, Manley GT, Glenn OA, Dillon WP. 2006. Noninvasive oxygen partial pressure measurement of human body fluids in vivo using magnetic resonance imaging. *Acad Radiol* 13:1016–1024.
- [Zhang *et al* (2006)] Zhang HF, Maslov K, Stoica G, Wang LV. 2006. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 24:848–851.
- [Zhang *et al* (2004)] Zhang N, Zhu XH, Lei H, Ugurbil K, Chen W. 2004. Simplified methods for calculating cerebral metabolic rate of oxygen based on 17o magnetic resonance spectroscopic imaging measurement during a short 17o₂ inhalation. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:840–848.

- [Zhao *et al* (2003)] Zhao D, Constantinescu A, Chang CH, Hahn EW, Mason RP. 2003. Correlation of tumor oxygen dynamics with radiation response of the dunning prostate r3327-hi tumor. *Radiat Res* 159:621–631.
- [Zhao *et al* (2004)] Zhao D, Jiang L, Mason RP. 2004. Measuring changes in tumor oxygenation. *Methods Enzymol* 386:378–418.
- [Zhong *et al* (2008)] Zhong K, Leupold J, von Elverfeldt D, Speck O. 2008. The molecular basis for gray and white matter contrast in phase imaging. *Neuroimage* 40:1561–1566.
- [Zhu *et al* (2006)] Zhu XH, Zhang Y, Zhang N, Ugurbil K, Chen W. 2008. *J Cereb Blood Flow Metab*.
- [Zhu *et al* (2005)] Zhu XH, Zhang N, Zhang Y, Zhang X, Ugurbil K, Chen W. 2005. In vivo ^{17}O nmr approaches for brain study at high field. *NMR Biomed* 18:83–103.
- [Zhu *et al* (2002)] Zhu XH, Zhang Y, Tian RX, Lei H, Zhang N, Zhang X, Merkle H, Ugurbil K, Chen W. 2002. Development of ^{17}O nmr approach for fast imaging of cerebral metabolic rate of oxygen in rat brain at high field. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13194–13199.
- [Ziemer *et al* (2003)] Ziemer LS, Evans SM, Kachur AV, Shuman AL, Cardi CA, Jenkins WT, Karp JS, Alavi A, Dolbier WR, Koch CJ. 2003. Noninvasive imaging of tumor hypoxia in rats using the 2-nitroimidazole 18f-ef5. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30:259–266.
- [van Zijl *et al* (1998)] van Zijl PC, Eleff SM, Ulatowski JA, Oja JM, Ulu? AM, Traystman RJ, Kauppinen RA. 1998. Quantitative assessment of blood flow, blood volume and blood oxygenation effects in functional magnetic resonance imaging. *Nat Med* 4:159–167.

ANNEXES

I. LA PLATE-FORME IRM DE GRENOBLE

Le début de la thèse s'est déroulé au sein de l'unité 594 de l'INSERM. La plate forme IRM petit animal était alors composée de :

- Un aimant horizontal Bruker à 2,35T installé en 1990. Le diamètre interne de l'aimant est de 400 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient de 200 mm et la capacité du système de gradient de 96 mT/m. Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation SMIS/MRRS.
- Un aimant horizontal Magnex à 7,0T installé en 1998. Le diamètre externe de l'aimant est de 400 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient de 200 mm et la capacité du système de gradient de 200 mT/m. Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation SMIS/MRRS.
- Un aimant vertical Bruker à 4,7T installé en 1984. Le diamètre interne de l'aimant est de 98 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient de 62 mm et la capacité du système de gradient de 110 mT/m. Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation SMIS/MRRS.

A la fin de la première année de thèse (2008), l'équipe a déménagé au sein du GIN. La plate forme s'est alors équipée de deux nouveaux instruments :

- Un aimant horizontal 4,7T Bruker Biospec 47/40 USR AV III system. Le diamètre interne de l'aimant est de 400 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient de 120 mm et la capacité du système de gradient de 600 mT/m. Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation Bruker Avance III.
- Un aimant horizontal 7,0T Bruker Biospec 70/20 USR AV III system. Le diamètre interne de l'aimant est de 200 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient de 120 mm et la capacité du système de gradient de 600 mT/m. Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation Bruker Avance III.

Au cours de ce déménagement, l'ancien système à 7,0T n'a pas été remis en champ. Après remise en champ de l'aimant à 2,35T, il s'est avéré que le champ statique n'était plus stable. Après quelques mois, alors qu'il n'était plus possible de l'utiliser, celui-ci a été mis hors service. L'aimant à 4,7T vertical a également été mis hors service.

II. DONNEES ACQUISES A L'AIDE DE L'OXYLITE®

Dans le cadre de cette thèse, nous avons fait l'acquisition d'un appareil Oxylite®. Cette méthode reconnue a permis de se familiariser avec la notion de pO_2 et d'évaluer la gamme de pO_2 dans les cerveaux des rats sains et porteurs de tumeurs cérébrales (modèle C6) que nous avons utilisés pour nos études. Compatible IRM, l'appareil permettra de valider les mesures réalisées avec les méthodes développées. Elle a permis aussi la calibration de la méthode IRM ^{19}F pour la mesure de la pO_2 décrite dans le chapitre B.III. Enfin, nous avons également effectué des mesures sur des cultures cellulaires afin d'évaluer l'impact de la pO_2 lors de la croissance de lignées de cellules tumorales [Wion *et al* (2009)].

La Figure 85A représente un exemple de mesures de la pO_2 effectuées dans les cerveaux de 2 rats (côté sain et tumoral). Le protocole expérimental pour l'implantation des tumeurs est similaire à celui décrit chapitre B.IV.1.b. L'implantation des électrodes se fait de la même manière que celle de l'héxafluorobenzène (chapitre B.IV.1.c.). Les données sont collectées grâce à une application Labview développée au laboratoire par O. Montigon et calibrée pour l'Oxylite. On constate que, pour les tissus interrogés, la pO_2 est plus importante dans l'hémisphère controlatéral que dans la tumeur. Les valeurs mesurées (35-40mmHg) pour le controlatéral et <10mmHg pour la tumeur sont en accord avec les données de la littérature. Une montée lente des électrodes le long du trajet d'implantation des tumeurs (Figure 85B) permet également d'interroger différentes régions de la tumeur. On observe Figure 86 les mesures de la pO_2 sous différentes conditions physiologiques. Une augmentation de la pO_2 est visible lors de l'inspiration d'oxygène pur avec un retour à l'état basal après retour à l'inspiration d'air. On peut néanmoins constater que l'adaptation aux changements de FiO_2 est différente pour le côté controlatéral et la tumeur. La pO_2 nulle dans la tumeur et le côté sain après sacrifice de l'animal représente un contrôle satisfaisant.

Quelques conclusions peuvent être faites sur l'utilisation de l'appareil. Il apparaît que les mesures sont simples à réaliser et précises lorsque la zone de tissu à analyser est peu profonde et facilement accessible. Dans le cas de tumeurs intracérébrales, un couplage avec l'imagerie est cependant conseillé pour visualiser la zone échantillonnée (étant donné l'inhomogénéité spatiale de l'hypoxie) ou simplement pour s'assurer d'avoir placé l'électrode dans la tumeur. De plus, l'insertion des sondes peut poser des problèmes hémorragiques qui induisent des biais dans les mesures. Il est donc conseillé d'attendre quelques dizaines de minutes avant d'acquérir les données. Enfin même si les sondes ne consomment pas d'oxygène, une étude longitudinale sur plusieurs jours paraît difficile à mener.

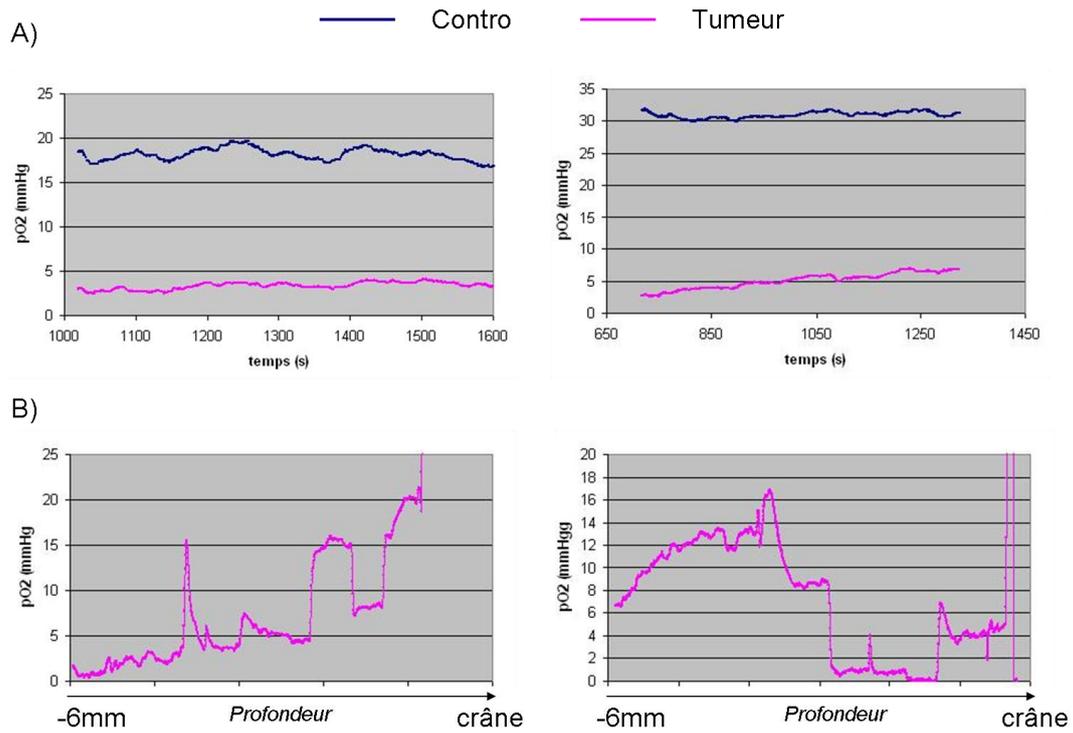


Figure 85 : Acquisition de la pO_2 avec Oxylite. A) acquisitions in vivo sur 2 rats dans le côté tumoral et le côté controlatéral. B) Acquisitions in vivo sur 2 rats dans le côté tumoral à différentes profondeurs le long du tracé d'injection.

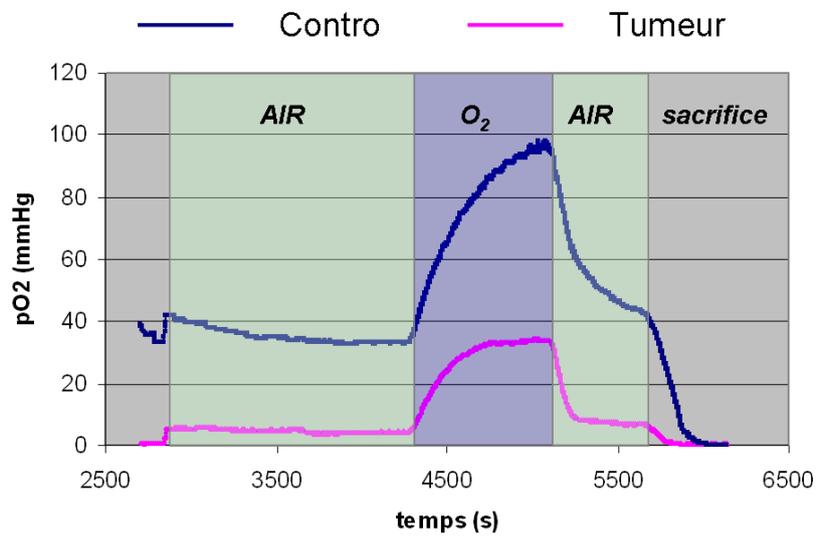


Figure 86 : Acquisitions de la pO_2 avec Oxylite sur un rat dans le côté tumoral et controlatéral pendant un challenge gazeux AIR/O₂/AIR et sacrifice de l'animal.

 III. PUBLICATIONS REALISEES PENDANT LA THESE

- **Articles**

Christen T, Lemasson B, Pannetier N, Farion R, Segebarth C, Rémy C, Barbier EL. *Evaluation of a quantitative bold approach to map local blood oxygen saturation*. (soumis à JCBFM).

Lemasson B, Christen T, Tizon X, Farion R, Fondraz N, Provent P, Segebarth C, Barbier EL, Genne P, Rémy C, Duchamp O. *Evaluation of five MRI biomarkers in a human glioma model under cytotoxic and antiangiogenic therapies*. (soumis à JCBFM).

Wion D, Christen T, Barbier EL, Coles JA. *PO₂ Matters in Stem Cell Culture*. Cell Stem Cell. 2009, 5, 242-243.

Serduc R, Christen T, Laissue J, Farion R, Bouchet A, Sanden B, Segebarth C, Bräuer-Krisch E, Le Duc G, Bravin A, Rémy C, Barbier EL. *Brain tumor vessel response to synchrotron microbeam radiation therapy: a short-term in vivo study*. Phys Med Biol. 2008 Jul 7;53(13):3609-22.

- **Articles en preparation**

Lemasson B, Christen T, Serduc R, Maisin C, Bouchet A, Segebarth C, Coquery N, Rémy C, Barbier EL. *Quantitative MR estimates of blood oxygenation in a glioma model under an antiangiogenic therapy*.

T. Christen, N. Joudiou, R.Serduc, G.Malandain, N. Pannetier, J.C.Vial, C. Segebarth, C.Remy and E.L. Barbier. *Blood volume fraction measurements using MRI: a correlation between two-photon and in silico MR estimates*.

- **Communications orales**

T. Christen, N. Joudiou, R.Serduc, G.Malandain, N. Pannetier, J.C.Vial, C. Segebarth, C.Remy and E.L. Barbier (2009). *Blood volume fraction measurements using MRI: a correlation between two-photon and in silico MR estimates*. ISMRM, Honolulu, USA.

T. Christen, B. Lemasson, N. Pannetier, R.Farion, C. Segebarth, C.Remy and E.L. Barbier (2009). *Evaluation of a new quantitative bold approach to map local blood oxygen saturation*. ISMRM, Honolulu, USA.

N. Pannetier, B. Lemasson, T. Christen, R. Farion, C. Segebarth, C. Remy, and E. L. Barbier (2009). *Vessel Size Imaging with iron oxide and with gadolinium: a comparative study in rodent*. ISMRM, Honolulu, USA.

- **Communications écrites**

T. Christen, B. Lemasson, N. Pannetier, O. Detante, R.Farion, E. Grillon, C. Segebarth, C.Remy and E.L. Barbier (2009). *Application of a modified quantitative BOLD approach to monitor local Blood Oxygen Saturation in two glioma models and a stroke model in rat*. ISMRM, Honolulu, USA.

T. Christen, N. Joudiou, S.Reyt, N. Pannetier, C. Segebarth, C.Remy and E.L. Barbier (2009). *Assesment of blood volume fraction using MRI: characterization in silico of possible bias*. ISMRM, Honolulu, USA.

T.Christen, C.Segebarth, C.Remy, E.L.Barbier (2008). *Numerical simulations on the influence of hematocrit in MR blood volume measurements*. GRAMM, Lyon, France. **1st place poster award in the methodology category** (french).

B. Lemasson, T. Christen, N. Pannetier, R. Farion, C. Segebarth, X. Tizon, P. Provent, P. Genne, E. L. Barbier O. Duchamp, and C. Rémy (2009). *Avastin alone or combined to Campto® reduces local Blood Oxygen Saturation in an orthotopic human glioblastoma model (U87-MG) in nude rats*. ISMRM, Honolulu, USA.

B. Lemasson, T. Christen, R.Farion, E.L. Barbier, X. Tizon, C. Segebarth, P.Genne, O.Duchamp, and C.Remy (2008). *Evaluation of tumor response to Carmustine and Sorafenib with MRI in an orthotopic human glioblastoma model xenografted in nude rats*. ISMRM, Toronto, Canada.

Serduc R, Christen T, Laissue J, Farion R, Bouchet A, Sanden B, Segebarth C, Bräuer-Krisch E, Le Duc G, Bravin A, Rémy C, Barbier EL (2007). *Vascular tumor response to synchrotron microbeam radiation therapy. A short term in vivo study*. ISMRM, Berlin, Germany. **3rd place poster award in the cancer category**.

B. Lemasson, N. Pannetier, T. Christen, J. Warnking, A. Krainik, R. Farion, C. Segebarth, O. Duchamp, C. Rémy, and E. L. Barbier (2009). *Assessment of vascular reactivity in two rat brain gliomas (C6 and RG2) by Blood Volume fraction MRI during CO2 challenge and correlation to mature vessels*. ISMRM, Honolulu, USA.

R. Serduc, N. Pannetier, A. Bouchet, T. Brochard, T. Christen, G. Berruyer, J. Laissue, F. Esteve, C. Remy, E. Barbier, A. Bravin, G. Le Duc and E. Brauer (2009). *MRI characterization of a focal rat brain necrosis induced by interlaced microbeam radiation therapy*. ISMRM, Honolulu, USA.

IV. TABLE DES FIGURES

Figure 1: Schéma du système respiratoire. D'après www.sanofi-aventis.fr	18
Figure 2 : Cascade de l'oxygène (a)=artériel, (v)=veineux. D'après www.md.ucl.ac.be/virtanes/oxy.PDF	20
Figure 3 : Courbe de dissociation de l'hémoglobine. D'après www.md.ucl.ac.be/virtanes/oxy.PDF	22
Figure 4 : Modifications de la courbe de dissociation de l'hémoglobine. D'après http://www.ednes.com	23
Figure 5 : Causes de l'hypoxie. A) hypoxie limitée par la diffusion d'après www.icr.ac.uk . B) hypoxie induite par des anomalies dans la vascularisation d'après [Brown and Wilson(2004)]......	26
Figure 6 : Répartition des niveaux de pO ₂ dans le col de l'utérus en condition normale (A) et en condition tumorale (B). N=nombre de patients, n=nombre de mesures de pO ₂ . D'après [Vaupel et al (2001)]......	27
Figure 7 : Gènes activés par les facteurs HIF et qui sont impliqués dans la progression des tumeurs. D'après [Bertout et al (2008)]......	29
Figure 8: Sonde optique (A) et appareil Oxylite® (B).....	32
Figure 9 : Imagerie de l'oxygénation par RPE sur muscle de souris A) image anatomique IRM de la patte d'une souris saine et carte de pO ₂ RPE correspondante (b). Image anatomique (C) et carte de pO ₂ (D) en présence d'une tumeur. E) Comparaison des pO ₂ mesurées sur patte normale, controlatérale et tumeur. D'après [Matsumoto et al (2008)]......	33
Figure 10 : Mesures de la pO ₂ par IRM. A) Méthode IRM ¹⁹ F FREDOM ; molécule d'héxafluorobenzène, calibration R1/pO ₂ et carte de pO ₂ sur une tumeur de rat. D'après [Mason et al (2002)]. B) méthode ¹ H . répartition de l'hexamethyldisiloxane (HDMSO) dans une tumeur de rat et mesures des variations de la pO ₂ pendant un challenge gazeux air/oxygène/air. D'après [Kodibagkar et al (2006)]. C) Mesures de la pO ₂ dans les liquides cérébraux D'après [Zaharchuk et al (2006)]......	34
Figure 11: A) Coupes histologiques avec marquage du pimonidazole, GLUT1 et CAIX d'une tumeur de la vessie. D'après [Hoskin et al (2003)]. B) Superposition d'une image IRM anatomique d'une tumeur de pied avec une carte de distribution du TFMISO (200mg/kg) 1 h, 3h et 6h après injection. D'après [Procissi et al (2007)]......	36
Figure 12 : Coupes histologiques d'adénocarcinome humain montrant à droite les zones hypoxiques (marqueur HIF1a) et nécrotiques ; à gauche visualisation par marquage avec l'anhydrase carbonique IX, (CAIX), un marqueur induit par l'hypoxie via HIF-1. D'après www.academie-sciences.fr	37

Figure 13 : A) Cartes de SO_2 acquises par NIRS sur un cerveau de nouveau né. B) et C) photographies du nouveau né et du casque supportant les capteurs. D'après [Austin et al (2006)].	38
Figure 14 : Acquisitions TAP sur cerveau de souris nude porteuse d'un glioblastome U87. a) Carte de SO_2 . b) Carte de HCT. C) Comparaison entre les SO_2 obtenues dans des vaisseaux normaux et tumoraux de trois souris (moyenne et écart type). D) SO_2 vs HCT pour les trois animaux représentés en c. D'après Li et al 2008.	39
Figure 15 : Cartes de SO_2 obtenues par IRM sur cerveau de rat sous différentes conditions physiologiques et images anatomiques correspondantes. Cartes acquises par méthode He et Yablonskiy(A) et An et Lin (B).	40
Figure 16 : Cartes de $CMRO_2$ obtenues sur un rat par IRM ^{17}O . A) en normothermie et C en hypothermie ($32^\circ C$) ainsi que les images anatomiques correspondantes (B). D'après Zhu (2006).	41
Figure 17 : Photo et schéma électrique de l'antenne de surface ^{19}F .	51
Figure 18 : Courbe de réflexion à -3dB de l'antenne ^{19}F .	52
Figure 19 : A) Spectre ^{19}F acquis sur un fantôme d'HFB pur (2mL) à 2,35T. B) Images 1H et ^{19}F acquises par une séquence écho de gradient sur fantôme seringue à 2,35T.	53
Figure 20 : Chronogramme de la séquence IR-FLASH.	54
Figure 21 : Carte de T_1 sur fantôme HFB et évolution temporelle du signal pour un voxel (indiqué par la flèche sur la carte T_1).	55
Figure 22 : Photo et plan du fantôme. Tuyau d'injection du mélange gazeux (1), tuyau d'échappement (2), trous servant à faire serpenter le tuyau d'eau thermostatée (3) et connectiques des sondes d'oxymétrie et de température (4).	57
Figure 23 : Evolution de la pO_{2liqu} dans le fantôme. Les rectangles symbolisent les périodes d'injection d'un mélange gazeux (largeur=durée, hauteur = pO_{2inj} mesurée). Air (rectangle rouge), mélange air 50%-azote 50% (rectangle violet), etc.). Les chutes brutales de pO_{2liqu} sont produites par l'injection d'azote dans le fantôme.	58
Figure 24 : Evolution de la température dans le fantôme en fonction du temps. La courbe indique la valeur de la température mesurée dans le fantôme. Les différentes couleurs sur le graphique correspondent à la température de consigne du bain-marie. Les quatre rectangles bleus correspondent aux périodes d'injection de gaz.	59
Figure 25 : A) Image anatomique en écho de gradient et cartographie T_1 du fantôme rempli de HFB. Le cercle bleu délimite une région d'intérêt. B) Tableau récapitulatif des valeurs de T_1 HFB en fonction de la pO_{2inj} lors de la mesure.	60
Figure 26 : Courbe de calibration de HFB à 2,35T. En bleu: valeurs de la vitesse de relaxation en fonction de la pO_{2inj} . En rouge: ajustement linéaire des données.	61
Figure 27 : Détection du fluor in vivo.	63

Figure 28 : Mesures in vivo de la pO_2 sous air. A) Suivi temporel de la pO_2 sur rat sain. B) Carte de pO_2 sur tumeur.	64
Figure 29 : Variations de la pO_2 avec un challenge gazeux. A) Variations avec un challenge AIR/ O_2 /AIR sur rat sain. B) Variations avec un challenge 50%AIR50% O_2 /AIR/ O_2 sur rat sain et tumeur.	64
Figure 30 : A) Reflux de l'HFB dans les ventricules. Superpositions images $^1H/^{19}F$ acquises à 2,35T B) Acquisition IRM et image histologique correspondante d'une tumeur après injection intracérébrale de l'HFB.	66
Figure 31 : A) Représentation d'une molécule d'hémoglobine. B) Répartition des niveaux d'énergie des électrons de la dernière couche de l'atome de fer pour la désoxyhémoglobine (Hb) et l'oxyhémoglobine (HbO_2).	68
Figure 32 : Représentation du voxel IRM théorique.	73
Figure 33 : Représentation du cylindre.....	76
Figure 34 : Perturbations du champ magnétique $B_0=4.7T$ par un cylindre présentant une différence de susceptibilité magnétique $\Delta\chi=0.264$ ppm par rapport au milieu dans lequel il est placé. A) cylindre placé parallèlement à B_0 . B) cylindre placé perpendiculairement à B_0	77
Figure 35 : Fonction de déphasage f_t du tissu et ses deux asymptotes obtenues pour $t < 1,5t_c$ et $t > 1,5t_c$	78
Figure 36 : Fonction de déphasage f_b du sang et ses deux asymptotes obtenues pour $t < 1,5t_c$ et $t > 1,5t_c$	79
Figure 37 : Fonction $F(t)$ en présence de différents gradients de champ.	80
Figure 38 : Analyse de données acquises à l'aide d'une séquence GESSE sur un rat par méthode [He et al (2008)]. A) signal (carrés) et ajustement du modèle (pointillés) provenant d'un voxel indiqué par un rectangle sur l'image pondérée T_1 (B). C) contribution extravasculaire au signal après soustraction des contributions intravasculaire (F), du CSF (E), et du R_2 . D) résidus de l'ajustement.	82
Figure 39 : Chronogramme de la séquence 2GE3D.....	84
Figure 40 : Méthode de correction des inhomogénéités de champ par acquisition d'une carte de champ magnétique. A) suréchantillonnage spatial de la carte de champ et intégration des données pour obtenir $F(t)$. B) incorporation de la fonction $F(t)$ dans l'ajustement des données MGE.	85
Figure 41 : Effets dans l'espace de Fourier de la présence d'un gradient de champ magnétique. A) Acquisitions d'images 2D ou 3D (basse et haute résolution spatiale) en l'absence de gradient. B) Acquisitions en présence du gradient induisant une translation du spectre. Dans ce cas, seule l'acquisition 3D haute résolution permet d'acquérir le spectre complet.	86

Figure 42 : Méthodes de correction des inhomogénéités de champ par acquisition haute résolution SSAVE et GESEPI.	87
Figure 43 : Chronogramme de la séquence MGE.	88
Figure 44 : Chronogramme de la séquence MSME.	89
Figure 45 : Protocole 1 pour l'acquisition et le traitement des cartes de SO ₂	90
Figure 46 : Protocole 2 pour l'acquisition et le traitement des cartes de SO ₂	90
Figure 47 : Application Matlab réalisée dans le cadre de cette thèse pour le traitement et l'analyse des données.	91
Figure 48 : Fantôme cylindrique pour évaluer la mesure du champ magnétique.	94
Figure 49 : Simulation Matlab des écarts au champ magnétique B ₀ lorsque le fantôme (tube central rempli d'une solution d'USPIO diluée) est placé perpendiculairement au champ B ₀ . A) Champ magnétique. B) et C) représentations 2D et 3D du champ magnétique après déballage de phase.	95
Figure 50 : Acquisitions de cartes de champ magnétique à 2,35T sur fantôme orienté perpendiculairement à B ₀ . A) et B) cartes de champ 2D et 3D lorsque le cylindre est rempli d'une solution d'USPIO diluée. C) et D) cartes de champ 2D et 3D lorsque le fantôme est rempli d'eau. E) Carte de champ corrigée issue de la différence entre les acquisitions B et D.	95
Figure 51: Cartes de champ magnétiques acquises à 2,35T sur fantôme (cylindre rempli d'une solution d' USPIO diluée avec une concentration c ₀ /2 (A), c ₀ (B) et 2c ₀ (C)) placé parallèlement à B ₀	96
Figure 52 : A) images anatomiques pondérées T ₂ . B) Mesures de la SO ₂ sur le sinus veineux à l'aide d'une carte de champ magnétique et pendant un challenge gazeux.	97
Figure 53 : Acquisitions sur un rat représentatif. A) images anatomiques d'une séquence écho de spin (MSME) et d'une séquence écho de gradient avant (MGEavant) et après (MGEapres) injection d'USPIO au même temps d'écho. B) Evolutions temporelles et ajustements correspondants des signaux RMN dans un voxel (indiqué par la flèche blanche en (A)).	101
Figure 54 : Mise en oeuvre des 2 méthodes de correction des inhomogénéités de champ.	103
Figure 55 : Cartes paramétriques provenant d'un rat inspirant de l'air.	104
Figure 56 : A) Variations du volume sanguin (BVf) pendant le challenge gazeux. B) Evolution de la SO ₂ pendant le challenge gazeux. Moyenne et écart-type mesurés dans la veine fémorale (FV) ou par IRM dans les trois régions d'intérêt (cerveau, cortex et striatum).	106

Figure 57: Régression linéaire entre les mesures de SO_2 sur la veine fémorale (FV) et les estimations IRM dans le cerveau (A), le striatum (B) et le cortex (C). D) images représentatives de deux rats en écho de spin (TE=10ms) et cartes de SO_2 correspondantes pendant les challenge gazeux.....	107
Figure 58 : Marquage au pimonidazole à différents temps (3 rats) et cartes de SO_2 correspondantes. Les zones marron dans les images histologiques correspondent aux zones hypoxiques.....	111
Figure 59 : Corrélation du pourcentage de surface de la tumeur dont la SO_2 est inférieure à 40% avec le pourcentage de surface necrotico-hypoxique déterminé par immunohistochimie du pimonidazole.....	111
Figure 60 : Correlation BVf/ SO_2	112
Figure 61 : A) Images représentatives pondérées T_2 et cartes de SO_2 pour les 4 groupes. Les pixels verts correspondent aux pixels rejetés de l'étude. B) Mesures de la SO_2 moyennées sur deux régions d'intérêts : striatum sain et tissu pathologique.	117
Figure 62 : Images anatomiques et cartes paramétriques acquises sur deux rats des groupes contrôle et Av-Cam.....	119
Figure 63 : Mesures du volume tumoral, ADC, VSI, BVf et SO_2 dans le groupe contrôle, ou les groupes ayant reçu de l'Avastin seul (Av), du Campto seul (Cam) ou une combinaison d'Avastin et de Campto (Av-Cam). Les données, moyennées entre les rats d'un même groupe (moyenne et écart-type), sont présentées pour 2 régions d'intérêt (tumeur et striatum controlatéral).....	119
Figure 64 : Protocole de suivi des rats.....	122
Figure 65 : Cartes paramétriques et coupes histologiques acquises à différents temps sur un rat du groupe non traité. Le trait noir sur les images pondérées T_2 correspond aux ROI utilisées.	124
Figure 66 : Cartes paramétriques et coupes histologiques acquises à différents temps sur un rat traité au Sorafenib.	124
Figure 67 : Résultats numériques des différents paramètres de la microvascularisation acquis par IRM. Les résultats sont présentés pour les ROI tumeurs des groupes non traité et traité et pour la ROI striatum controlatéral moyennée sur les deux groupes..	125
Figure 68 : Simulation du champ magnétique à l'aide de l'équation 57 (simulation) et de l'équation 36 (théorie) dans le cas d'une géométrie cylindrique.	132
Figure 69 : Simulation déterministe du signal RMN en présence d'un gradient de champ magnétique avec (courbe verte) ou sans (courbe bleue) prise en compte de la diffusion. Comparaison avec le signal théorique à l'écho de spin (courbe noire) et le signal en absence de gradient (courbe rouge).....	134
Figure 70 : Protocole d'estimation de l'erreur de la mesure par IRM du BVf.....	135

Figure 71 : Simulations réalisées dans le cas d'un voxel contenant des cylindres droits. A) Représentation d'un sous-voxel. B) Simulation de la perturbation du champ magnétique (1 tranche). C) Simulation du signal RMN en présence ou en absence d'agent de contraste dans les cylindres.....	137
Figure 72 : Traitement d'image réalisé sur les acquisitions au microscope bi-photon.	139
Figure 73 : Simulations sur données bi-photon. A) représentation d'un voxel. B) Simulation des perturbations du champ magnétique lorsque les vaisseaux contiennent un agent de contraste (1 tranche du voxel présenté en A).....	139
Figure 74 : Estimations du BVf réalisées à l'aide des simulations de la méthode à l'équilibre (Bvf,MR) ou du BVf de référence obtenu par traitement d'image (Bvf,2hu). A) Tableau des valeurs et erreur (en %). B) Corrélacion entre les deux estimations.....	140
Figure 75 : Représentations de sous-voxels contenant des cylindres droits tirés dans des directions aléatoires (A) ou uniquement dans les trois directions principales x, y et z de l'espace (B).	141
Figure 76 : Représentations de sous-voxels contenant des cylindres droits tirés de manière isotrope (A) ou anisotrope (B). C) Erreur (en %) commise sur l'estimation du BVf en fonction de l'index d'orientation préférentiel POi.	142
Figure 77 : Représentations de sous-voxels contenant des ellipsoïdes (A) ou des sphères (B) tirés sur les arrêtes d'un cube.	142
Figure 78 : Représentations de sous-voxels contenant des cylindres courbes (A) ou droits (B) tirés dans les trois directions x, y et z de l'espace.	143
Figure 79 : Représentations de sous-voxels contenant des cylindres tirés sur les arrêtes d'un cube et présentant une densité forte (A) ou faible (B). C) Erreur (en %) commise sur l'estimation du BVf en fonction de la distance inter vaisseaux.	144
Figure 80 : Représentations de la distribution du champ magnétique dans un voxel (1 tranche) contenant un vaisseau sanguin (cylindre) avec un taux d'hématocrite nul (A) ou de 15.6% (B).	145
Figure 81 : Evolution du BVf,MR estimé (en %) avec le taux d'hématocrite (en %).	146
Figure 82 : Variations de l'estimation du BVf lorsque le volume plasmatique varie dans le voxel en raison d'un recrutement de vaisseaux (bleu) ou lorsque le volume plasmatique varie avec le taux d'hématocrite dans les vaisseaux (à nb de vaisseau égal).	146
Figure 83 : Mesures (moyenne et écart-type) par analyses des gaz du sang dans la veine et l'artère fémorale du taux d'hématocrite, de la SaO ₂ et de la SvO ₂ dans les trois groupes d'animaux (hypoxie intermittente, hémomodilution, contrôle).	149
Figure 84 : Mesures par IRM des paramètres BVF, VSI et SO ₂ dans les trois groupes d'animaux (Hypoxie intermittente, hémomodilution, contrôle). Moyenne et écart-type mesurés dans les trois régions d'intérêt (cerveau, cortex et striatum)	149

Figure 85 : Acquisition de la pO_2 avec Oxylite. A) acquisitions in vivo sur 2 rats dans le côté tumoral et le côté controlatéral. B) Acquisitions in vivo sur 2 rats dans le côté tumoral à différentes profondeurs le long du tracé d'injection..... 174

Figure 86 : Acquisitions de la pO_2 avec Oxylite sur un rat dans le côté tumoral et controlatéral pendant un challenge gazeux AIR/ O_2 /AIR et sacrifice de l'animal..... 174