



HAL
open science

**Tumeurs cérébrales et rayonnement Synchrotron.
Développement méthodologique pour la radiothérapie
par minifaisceaux et suivi du traitement par imagerie
fonctionnelle**

Pierre Deman

► **To cite this version:**

Pierre Deman. Tumeurs cérébrales et rayonnement Synchrotron. Développement méthodologique pour la radiothérapie par minifaisceaux et suivi du traitement par imagerie fonctionnelle. Autre. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENY007 . tel-00682877

HAL Id: tel-00682877

<https://theses.hal.science/tel-00682877v1>

Submitted on 27 Mar 2012

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Pierre Deman

Thèse dirigée par « **François Estève** » et
codirigée par « **Jean-François Adam** »

préparée au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences**
dans l'**École Doctorale de Physique**

Tumeurs cérébrales et rayonnement synchrotron:

Développement méthodologique pour la radiothérapie par minifaisceaux et suivi du traitement par imagerie fonctionnelle.

Thèse soutenue publiquement le « **08 février 2012** »,
devant le jury composé de :

Eric Lartigau

Professeur des universités, Université de Lille II, Rapporteur

Francis Verdun

Professeur associé, Université de Lausanne, Rapporteur

Yolanda Prezado

Chargée de recherche, CNRS, Orsay, Examineur

Alexandre Krainik

Professeur des universités / Praticien hospitalier, UJF et CHU, Grenoble,
Examineur

François Estève

Professeur des universités / Praticien hospitalier, UJF et CHU, Grenoble,
Directeur de thèse

Jean-François Adam

Maître de conférences, UJF, Grenoble, Co-Directeur de thèse



Brain tumors and synchrotron radiation: new methods for minibeam radiation therapy and treatment follow-up by functional imaging.

An innovative method of synchrotron radiation therapy, called minibeam, was proposed by A. Dilmanian *et al.* in 2006. Minibeams consists in tumor irradiation with monochromatic submillimetric x-ray beams spatially fractionated produced by a synchrotron source. To obtain a homogeneous dose in the target volume, an interleaving is realized using two orthogonal incidences. Adjacent healthy tissue is only partially irradiated by minibeam, the areas between the beams only receive scattered radiation and therefore the energy deposited is 10 to 15 times lower than on one minibeam axis, leading to a sparing effect of healthy tissue even when a high dose is deposited in the target volume.

The thesis project is the development of this experimental method of monochromatic minibeam, which involves the control of the irradiation geometry, the control of dosimetry and its modeling by Monte Carlo simulations. To evaluate the method, preclinical experiments on models of brain tumors implanted in rats (F98) are performed. Follow-up by anatomical and functional imaging is carried out to evaluate the effectiveness of the treatment. Functional imaging of cerebral perfusion (volume and cerebral blood flow, mean transit time of heavy elements) appears to be associated in the literature as a relevant method for monitoring prognostic. The key parameters of the cerebral vasculature are mainly studied in magnetic resonance imaging (MRI), because of the harmlessness of this imaging modality. The relation between MRI signal and contrast agent concentration is very complex and no quantitative relationship is well known. Synchrotron Radiation Computed Tomography (SRCT) is an imaging modality with performances to measure absolute contrast agent concentration very close to the theoretical limits and can be used as gold-standard. The used pharmacokinetic models need as input parameters a contrast agent concentration versus time. A comparison of perfusion measurements between MRI and SRCT has been done in order to calibrate MRI measurements.

Keywords: Minibeams, Radiation Therapy, Perfusion Imaging, Follow-up

Tumeurs cérébrales et rayonnement synchrotron: développement méthodologique pour la radiothérapie par minifaisceaux et suivi par imagerie fonctionnelle du traitement.

En 2006 Dilmanian *et al.* ont proposé une méthode d'irradiation par rayonnement synchrotron innovante appelée minifaisceaux. L'irradiation de tumeur par minifaisceaux monochromatiques consiste en un motif fractionné spatialement de faisceaux de rayons X submillimétriques produits par un synchrotron. Afin d'obtenir une dose homogène dans le volume cible, deux incidences orthogonales sont entrecroisées. Le tissu sain environnant ne subit que l'irradiation fractionnée, entre les faisceaux la dose n'est due qu'au diffusé et l'énergie déposée y est donc 10 à 15 fois inférieure à celle déposée sur les axes des faisceaux. Cela permet un effet protecteur des tissus sains tout en distribuant de fortes doses à la tumeur.

Cette thèse porte sur le développement de la méthode expérimentale des minifaisceaux monochromatiques, ce qui comprend le contrôle de la géométrie d'irradiation, la dosimétrie expérimentale et l'étude Monte Carlo correspondante. Afin d'évaluer son efficacité, des études précliniques ont été réalisées sur un modèle de tumeur cérébrale implantée chez le rat (F98). Un suivi de traitement est réalisé par de l'imagerie anatomique et fonctionnelle afin d'évaluer son efficacité. L'imagerie de perfusion cérébrale (menant aux volumes et débits sanguin cérébrales, au temps de transit moyen) est d'après la littérature un moyen efficace de pronostic du résultat du traitement. Les paramètres clés de la vascularisation cérébrale sont principalement étudiés par imagerie IRM, du fait de l'innocuité de ce type d'imagerie. La Synchrotron Radiation Computed Tomography (SRCT) est une modalité d'imagerie dont les performances sont proches des limites théoriques dans l'obtention de mesures absolues des concentrations d'agent de contraste et peut être utilisé en tant que gold-standard. Les modèles pharmacocinétiques utilisés nécessitent comme paramètre d'entrée des concentrations d'agent de contraste en fonction du temps. La relation entre le signal obtenu par IRM et la concentration d'agent de contraste est très complexe et difficilement quantitative. Une comparaison des mesures de perfusion effectuées par IRM et par SRCT a été effectuée afin de calibrer les mesures IRM.

Mots-Clés : Radiothérapie minifaisceaux, perfusion, imagerie, gliome

Remerciements :

Cette thèse a pris du temps et a été très pluridisciplinaire. Du coup ça m'a amené à travailler, à chaque fois dans la bonne humeur, à l'ESRF, au GIN et au CHU. Ce qu'il fait que j'ai un paquet de monde à remercier !

Je tiens tout d'abord à remercier mon jury de thèse pour avoir lu ce que j'ai fait mes trois dernières années malgré un français nordique (légèrement approximatif) ... Je remercie donc le M Lartigau, M Verdun, M Krainik et Mlle Prezado.

Je remercie aussi le Boss et Jeff pour avoir encadré ma thèse, la rédaction d'articles et de la thèse, toujours dans la bonne humeur et souvent autour d'un verre et parfois autour d'une bonne bouffe !

Je tiens aussi à remercier Hélène qui fut ma première chef et qui m'a donné le goût de la recherche. Elle m'a toujours conseillé pour les manip quand elle le pouvait. Elle a toujours le sourire et de bons conseils à donner !

Merci aussi à Emmanuel et Chantal de l'équipe 5 pour les collaborations que l'on a pu faire autour de l'IRM et de l'histologie et l'accueil très agréable dans leurs locaux !

Merci à Yolanda pour les collaborations sur les manip minibeam et les papiers qu'on a pu écrire !

Voici pour ceux qui m'ont encadré de prêt ou de loin.

Passons aux thésards maintenant. Là aussi ils sont nombreux !

Tout d'abord ceux avec qui j'ai partagé mon bureau. Merci à Seb pour les nombreuses discussions scientifiques notamment en mécanique des fluides où je ne m'y connaissais pas beaucoup, bon je n'ai pas encore de grosses connaissances mais ça a progressé !

Merci à Magouille pour les explications en interactions rayonnement matière, pour les craquages du vendredi aprem ☺ (mais pas que...). Pour la bonne humeur que tu as mise dans le bureau !

Mathias t'as remplacé par la suite, pas le même genre mais très bonne ambiance aussi, avec une version du billard français « 3D ». Merci à toi Mathias pour les sorties montagne, le monte carlo etc !

Merci à Laurinette aussi ! La biologiste du groupe, dans le bureau d'à côté quand même, ne mélangeons pas trop biologiste et physicien ☺ ! J'ai pas forcément tout compris tout ce que tu faisais mais tu me préparais les cellules à implanter et c'est déjà beaucoup ☺

Merci pour les petits séjours gastronomique à Montpellier aussi !

Merci à Flo, aussi appelé Bizuthe ou Monique pour la bonne humeur malgré les farces subies ! (je n'y suis pour rien ...).

Merci à Nicolas pour toutes les explications sur l'IRM et les discussions sur les mesures de perfusion ainsi que l'aide en matlab. Pour les soirées bières aussi !

Merci à Franck pour les explications de l'IRM de diffusion, l'aide en matlab et les soirées bières aussi !

Merci à Imma pour les pauses, et la persévérance à essayer de me faire croire que l'Espagne c'est bien (et surtout barcelone ...) ☺

Merci aux autres thésards et post-doc de l'équipe 5 pour les cafés, bières, soirées et conseils : Anaïck, Alexia, Margot, Julien, Clément, Nico, etc

Merci à Titi pour l'aide technique pour les manips, pour les blagues qu'on a faite aux autres, pour les sorties vélos, même s'il a toujours refusé de se laisser doubler

Merci à Christian pour l'aide en informatique et en pastis !

Merci à Raph pour les explications en biologies, les nombreuses soirées légèrement arrosées, les bouffes qu'on a faite (même si certaines ont été plutôt ratées).

Merci à Manu pour les conseils en traitement d'images.

Merci à Audrey pour les explications en biologies aussi et les soirées bouffes !

Merci à Dominique pour m'avoir aidé à m'occuper des mes rats !

Merci à Régine pour l'histologie !

Merci à Vasile et Hervé pour m'avoir appris à manipuler sur les IRM et pour l'aide pour les mesures sur les gels de dosimétrie !

Merci à ma Marionnette pour avoir accepté de faire son stage avec moi, pour toutes ces expériences réalisées et la bonne humeur qu'elle a eu tout au long de son stage malgré un chef comme moi !

Merci à Layal pour les études réalisées sur les patients pour son stage !

Merci à Clément pour l'aide sur certaines manips et en matlab !

Merci aux autres stagiaires passés par le labo : Julien, Baptiste, Coralie, Charline,

Merci à Julien Souvignet pour les manips qu'on a faite sur l'effet des corticoïdes.

Merci à Alexandre, Jean-Louis, et René, Cedric et Jean-François pour les acquisitions qu'on a fait au CHU !

Merci à Elke, Michel, Herwig, Géraldine et Alberto d'ID17.

Merci à tous ceux du GIN, ESRF et CHU avec qui j'ai travaillé !

Merci aux cyclistes de l'ESRF pour les sorties vélos !

Et merci aux autres aussi !!!

Nomenclature :

ADC : Apparente Diffusion Coefficient

ADN : Acide désoxyribonucléique

ASL : Arterial Spin Labelling

BHE : Barrière Hémato Encéphalique

CBF : Cerebral Blood Flow

CBV : Cerebral Blood Volume

CT : Computed Tomography, tomodensitométrie

CV : Critical Volume

DICOM : Digital Imaging and Communications in Medicine, format informatique standard pour le stockage et la manipulation de données médicales.

FSU : Functional Sub-Unit (volume élémentaire d'un organe qui peut remplir la fonction de l'organe)

HDV : Histogramme dose volume

H/E : Coloration hématoxyline érythrosine des lames histologiques

LINAC : Linear Accelerator

MRT : Microbeam Radiation Therapy

MTT : Mean Transit Time

NTCP : Normal Tissue Complication Probability

PDD : Percentage depth dose

PS : Product permeability x surface

PTV : Planning Target Volume

PVDR : Peak to valley dose ratio

SSRT : Synchrotron Stereotaxic Radiation Therapy

SRCT : Synchrotron Radiation Computed Tomography

ROI : Region of Interest

Sommaire

| | |
|--|----|
| Remerciements : | ii |
| Nomenclature : | v |
| Introduction | 1 |
| 1. La radiothérapie : | 5 |
| 1.1 Quelques notions de dosimétrie: | 5 |
| 1.1.1 Interactions rayons X/matière : | 5 |
| 1.1.2 La dose : | 5 |
| 1.1.3 La mort cellulaire liée à la radiothérapie : | 6 |
| 1.2 La radiothérapie externe: | 7 |
| 1.2.1 La radiothérapie conventionnelle : | 7 |
| 1.2.2 La radiochirurgie : | 8 |
| 1.2.3 Une rapide revue des techniques de radiochirurgies actuelles : | 10 |
| 1.3 Les techniques de radiothérapie par rayonnement synchrotron: | 12 |
| 1.3.1 Originalité du faisceau synchrotron | 12 |
| 1.3.2 Effet dose/volume : | 14 |
| 1.3.3 L'effet différentiel à la base de la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron : | 16 |
| 1.3.4 La jonction des deux effets : les minifaisceaux monochromatiques..... | 20 |
| 1.4 Etat de l'art des minifaisceaux : | 21 |
| 2. Etude dosimétrique de la radiothérapie minifaisceaux monochromatique : | 30 |
| 2.1 Géométrie d'irradiation : | 30 |
| 2.2 Dosimétrie Expérimentale : | 32 |
| 2.2.1 Etat de l'art sur la dosimétrie expérimentale : | 32 |
| 2.2.2 Etude Réalisée : | 38 |
| 2.3 Dosimétrie Monte Carlo : | 39 |
| 2.3.1 Description : | 39 |
| 2.3.2 Etude Réalisée : | 41 |
| 2.4 Résultats : | 43 |
| 2.5 Discussion : | 47 |
| 3. Essais des minifaisceaux monochromatiques sur un modèle <i>in vivo</i> : | 53 |
| 3.1 Le choix du modèle : | 53 |
| 3.1.1 Le modèle F98 : | 53 |
| 3.1.2 L'implantation : | 54 |
| 3.2 Etat de l'art de la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron du modèle F98..... | 55 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.3 | Radiochirurgie par minifaisceaux : | 59 |
| 3.3.1 | Effet protecteur sur le tissu sain : | 59 |
| 3.4 | Discussion : | 69 |
| 4. | État de l'art angiogénèse tumorale et mesure de perfusion | 74 |
| 4.1 | Les gliomes et l'angiogénèse tumorale | 74 |
| 4.2.1 | Les gliomes | 74 |
| 4.2.2 | La néoangiogénèse : | 75 |
| 4.2 | La BHE et son altération dans les tumeurs cérébrales : | 77 |
| 4.2.1 | La circulation sanguine : | 77 |
| 4.2.2 | La Barrière Hémato-Encéphalique : | 80 |
| 4.3 | Influence sur les paramètres hémodynamiques : | 82 |
| 4.4 | Les techniques d'imagerie en neuro-oncologie : | 83 |
| 4.4.1 | Le but de l'imagerie : | 83 |
| 4.4.2 | Suivi de traitement par imagerie de perfusion : | 84 |
| 4.4.3 | CT : | 87 |
| 4.4.4 | IRM : | 89 |
| 4.4.5 | TEP (Tomographie par émission de positons) : | 90 |
| 4.4.6 | Echographie : | 91 |
| 4.4.7 | Tomodensitométrie par rayonnement synchrotron : | 92 |
| 4.5 | Les modèles pharmacocinétiques pour la mesure de perfusion : | 94 |
| 4.5.1 | Rappel sur la pharmacocinétique global : | 94 |
| 4.5.2 | La pharmacocinétique locale : | 102 |
| 4.5.3 | La mesure d'une entrée artérielle, avantage et inconvénient : | 112 |
| 5. | L'aspect quantitatif des mesures de perfusion pour un suivi de traitement : | 119 |
| 5.1 | Matériel et Méthodes : | 119 |
| 5.1.1 | Protocole animal : | 119 |
| 5.1.2 | Mesures de perfusion en tomographie par rayonnement synchrotron : | 121 |
| 5.1.3 | Mesures de perfusion en IRM : | 124 |
| 5.1.4 | Le traitement des données : | 127 |
| 5.2 | Résultats : | 129 |
| 5.3 | Discussion | 140 |
| 6. | Suivi de traitement minifaisceaux par imagerie IRM: | 144 |
| 6.1 | Protocole d'imagerie pour réaliser le suivi : | 144 |
| 6.2 | Résultats du suivi de traitement : | 146 |
| 6.2.1 | Irradiation minifaisceaux 54 Gy : | 146 |
| 6.2.2 | Escalade de dose : | 149 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 6.2.3 | Irradiation « protocole clinique de radiothérapie stéréotaxique » : | 151 |
| 6.3 | Discussion :..... | 153 |
| | Conclusion et Perspectives :..... | 158 |
| | Bibliographie :..... | 162 |
| | Annexe 1: Coloration de lame histologique H/E | 175 |
| | Annexe 2 : Rapport de Master 2..... | 177 |
| | Annexe 3 : Rapport de Marion Vincent | 178 |
| | Annexe 4 : Rapport de Layal Obeid..... | 179 |
| | Communications : | 180 |
| | Publications en premier auteur : | 181 |

Introduction

Le cancer est l'une des causes de mortalité les plus importantes dans le monde (13% d'après les chiffres de l'OMS). Ces dernières années de nombreuses recherches ont porté sur le développement des techniques de radiothérapie, de chimiothérapie ou encore de traitements combinés. Elles ont permis de réaliser un progrès significatif dans le traitement curatif et palliatif d'une grande partie des cancers et ainsi d'améliorer la qualité de vie de nombreux patients (Taphoorn, van den Bent et al. 2007; Stupp, Hegi et al. 2009; Taphoorn, Sizoo et al. 2010).

Les gliomes malins sont un type de cancer pour lequel aucun nouveau traitement n'a, à ce jour, permis de dépasser le stade de soins palliatifs. L'incidence de cette forme de tumeur en France est d'environ 5 nouveaux cas pour 100 000 personnes par an (Bondy, Scheurer et al. 2008; Wen and Kesari 2008) (dont 70% de glioblastomes, le grade le plus agressif). Si cette incidence est assez faible, la survie des patients atteints de glioblastomes est très faible et n'a que peu progressé depuis plusieurs années.

Du fait de leur caractère très infiltratif et de leur localisation souvent proche de zones fonctionnelles sensibles, la chirurgie ne permet pas toujours une résection complète des cellules cancéreuses. La faible tolérance du tissu sain à l'irradiation (Emami, Lyman et al. 1991) constitue une autre limite importante pour le traitement des gliomes par radiothérapie. Ainsi, les fortes doses potentiellement curatives sont difficiles à appliquer dans la tumeur sans causer de dommages considérables au tissu environnant (Flickinger, Lunsford et al. 1992a; Niranjani and Flickinger 2008). D'autre part le cerveau est l'un des quelques organes dont le réseau vasculaire possède une membrane très peu perméable aux molécules. Cette barrière, appelée barrière hémato-encéphalique, bien que partiellement rompue dans une grande partie de la tumeur, limite considérablement la délivrance par voie systémique d'agent de chimiothérapie aux cellules cancéreuses. Elle n'est par ailleurs pas ou très peu rompue en périphérie de la tumeur et aux niveaux des cellules cancéreuses infiltrantes. Aujourd'hui le traitement standard pour le traitement des glioblastomes est la combinaison de témozolomide et de radiothérapie. La survie médiane obtenue avec ce traitement n'est que de 14.6 mois contre 12.1 dans le cas d'une radiothérapie seule (Stupp, Mason et al. 2005).

Les particularités de la vascularisation du cerveau et des tumeurs cérébrales sont bien décrites par Carmeliet *et al* (Carmeliet and Jain 2000; Carmeliet 2005). On appelle originellement perfusion cérébrale le débit sanguin cérébral mais, par extension, la perfusion cérébrale regroupe désormais l'ensemble des paramètres hémodynamiques liés aux capillaires sanguins. Parmi ces paramètres on retrouve notamment le volume sanguin cérébral, le débit sanguin cérébral et la perméabilité des vaisseaux sanguins à une molécule. D'autres paramètres dérivés ou représentant les mêmes concepts structurels existent aussi et varient selon les modèles pharmacocinétiques utilisés pour leur calcul (Miles 2004; Wintermark, Sesay et al. 2005; Wintermark, Sincic et al. 2008). Des paramètres physiologiques plus précis peuvent être aussi inclus dans la perfusion cérébrale comme l'oxygénation des tissus qui joue un rôle très important dans le développement et la radiosensibilité tumorale. D'autres encore peuvent être déduits de ces paramètres comme la pression interstitielle qui pourrait influencer la distribution des molécules dans les tumeurs (Wintermark, Chioloro et al. 2004).

La perfusion cérébrale permet ainsi d'avoir une description riche des tumeurs, à la fois à des fins diagnostiques (Roberts, Roberts et al. 2000; Di Nallo, Vidiri et al. 2009), à des fins de suivi de traitement (Cao, Tsien et al. 2006; Barajas, Chang et al. 2009), voire à des fins pronostiques mais aussi. Elle donne également des informations intéressantes pour optimiser un traitement combiné de radiothérapie et de chimiothérapie. Les mesures de perfusion cérébrale permettent en effet d'identifier le temps après irradiation pour lequel s'effectuent les dommages aux parois vasculaires. Ces dommages augmentent la perméabilité des vaisseaux et donc la quantité d'agent de chimiothérapie pouvant atteindre les cellules cancéreuses, y compris celles situées dans les zones périphériques habituellement peu perméables (van Vulpen, Kal et al. 2002; Cao, Tsien et al. 2005).

De nombreuses méthodes existent pour mesurer la perfusion (Wintermark, Sesay et al. 2005). Toutes les techniques d'imagerie macroscopique (IRM, TEP, scanner, échographie, ...) peuvent permettre de mesurer les paramètres de perfusion grâce au suivi temporel de la concentration d'un agent de contraste injecté par voie systémique (l'IRM est capable aussi de marquer les protons présents dans le sang pour les utiliser comme agent de contraste, il s'agit de l'Arterial Spin Labelling ASL). Cependant, selon la méthode d'imagerie utilisée, il y a des compromis à faire sur la résolution spatiale et temporelle, la quantification du signal en fonction de la concentration en agent de contraste, la disponibilité de la technique (notamment en termes d'application clinique), la nocivité pour le patient (rayonnement ionisant pour le Scanner et le TEP) et aussi la possibilité de faire de l'imagerie multifonctionnelle (possible notamment pour l'IRM). En plus des avantages et inconvénients intrinsèque à la modalité d'imagerie, il existe plusieurs modèles pharmacocinétiques permettant l'analyse de l'évolution temporelle de la concentration d'un agent de contraste. Ces différents modèles ne conduisent pas toujours aux mêmes résultats ni aux mêmes paramètres de perfusion. Ces modèles utilisent souvent des hypothèses différentes plus ou moins faciles à vérifier. Finalement, la diversité des résultats obtenus complique les comparaisons entre modèles, et ne permet pas de conclure sur leurs capacités à quantifier les paramètres de perfusion, ni quelles sont leurs limites (Kershaw and Buckley 2006; Goh, Halligan et al. 2007; Takasawa, Jones et al. 2008). Il n'existe d'ailleurs à ce jour aucun moyen expérimental permettant de valider les différents protocoles et modèles de mesure de la perfusion.

Le but de ce travail est de mettre en place une nouvelle méthode de radiochirurgie des tumeurs cérébrales à l'ESRF, d'en caractériser la distribution de dose et d'en évaluer l'intérêt thérapeutique. L'apport de la technique des minibeam sera présenté après un rappel des différentes techniques de radiochirurgie (cf chap 1). L'étude dosimétrique sera détaillée dans le chapitre 2 et comprendra à la fois une partie théorique (calcul de dose par méthode monte-carlo) et une partie expérimentale (gels dosimétriques). Des études *in vivo* ont été réalisées pour évaluer la faisabilité de la technique et optimiser le protocole d'irradiation (cf chap 3). En plus des études de survie, une attention particulière a pu être portée sur les modifications de la perfusion cérébrale post-traitement afin de mieux comprendre l'effet de la radiothérapie.

L'analyse du suivi de traitement par imagerie de perfusion constitue la deuxième partie de cette thèse. L'imagerie de perfusion cérébrale est présentée dans le chapitre 4. Des études portant sur la comparaison de mesure des paramètres de la perfusion réalisées en IRM et en tomographie-X sont développées dans le chapitre 5 afin de s'assurer de l'aspect quantitatif des suivis de traitement par imagerie fonctionnelle de la vascularisation cérébrale. Dans le chapitre 6, des suivis de perfusion sur les rats irradiés par minibeam sont présentés.

Ces travaux ont été réalisés sous la direction de F.Estève et de JF.Adam. Ils ont été financièrement soutenus par l'Université de Grenoble, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, l'Inserm et le Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble.

- Barajas, R. F., Jr., J. S. Chang, et al. (2009). "Differentiation of Recurrent Glioblastoma Multiforme from Radiation Necrosis after External Beam Radiation Therapy with Dynamic Susceptibility-weighted Contrast-enhanced Perfusion MR Imaging." Radiology **253**(2): 486-496.
- Bondy, M. L., M. E. Scheurer, et al. (2008). "Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium." Cancer **113**(7): 1953-1968.
- Cao, Y., C. I. Tsien, et al. (2006). "Clinical investigation survival prediction in high-grade gliomas by MRI perfusion before and during early stage of RT." International Journal Of Radiation Oncology Biology Physics **64**(3): 876-885.
- Cao, Y., C. I. Tsien, et al. (2005). "Use of magnetic resonance imaging to assess blood-brain/blood-glioma barrier opening during conformal radiotherapy." J Clin Oncol **23**(18): 4127-36.
- Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." Nature **438**(7070): 932-936.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-57.
- Di Nallo, A. M., A. Vidiri, et al. (2009). "Quantitative analysis of CT-perfusion parameters in the evaluation of brain gliomas and metastases." Journal of Experimental & Clinical Cancer Research **28**: 10.
- Emami, B., J. Lyman, et al. (1991). "Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **21**(1): 109-122.
- Flickinger, J. C., L. D. Lunsford, et al. (1992). "Dose prescription and dose-volume effects in radiosurgery." Neurosurg Clin N Am **3**(1): 51-9.
- Goh, V., S. Halligan, et al. (2007). "Quantitative tumor perfusion assessment with multidetector CT: Are measurements from two commercial software packages interchangeable?" Radiology **242**(3): 777-782.
- Kershaw, L. E. and D. L. Buckley (2006). "Precision in measurements of perfusion and microvascular permeability with T-1-weighted dynamic contrast-enhanced MRI." Magnetic Resonance In Medicine **56**(5): 986-992.
- Miles, K. A. (2004). "Brain perfusion: computed tomography applications." Neuroradiology **46**: S194-S200.
- Niranjan, A. and J. C. Flickinger (2008). "Radiobiology, principle and technique of radiosurgery." Prog Neurol Surg **21**: 32-42.
- Roberts, H. C., T. P. Roberts, et al. (2000). "Quantitative measurement of microvascular permeability in human brain tumors achieved using dynamic contrast-enhanced MR imaging: correlation with histologic grade." AJNR Am J Neuroradiol **21**(5): 891-9.
- Stupp, R., M. E. Hegi, et al. (2009). "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." Lancet Oncology **10**(5): 459-466.
- Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." New England Journal of Medicine **352**(10): 987-996.
- Takasawa, M., P. S. Jones, et al. (2008). "How reliable is perfusion MR in acute stroke? Validation and determination of the penumbra threshold against quantitative PET." Stroke **39**(3): 870-877.
- Taphoorn, M. J. B., E. M. Sizoo, et al. (2010). "Review on Quality of Life Issues in Patients with Primary Brain Tumors." Oncologist **15**(6): 618-626.
- Taphoorn, M. J. B., M. J. van den Bent, et al. (2007). "Health-related quality of life in patients treated for anaplastic oligodendroglioma with adjuvant chemotherapy: Results of a European organisation for research and treatment of cancer randomized clinical trial." Journal of Clinical Oncology **25**(36): 5723-5730.
- van Vulpen, M., H. B. Kal, et al. (2002). "Changes in blood-brain barrier permeability induced by radiotherapy: Implications for timing of chemotherapy? (Review)." Oncology Reports **9**(4): 683-688.

- Wen, P. Y. and S. Kesari (2008). "Malignant gliomas in adults." New England Journal of Medicine **359**(5): 492-507.
- Wintermark, M., R. Chioloro, et al. (2004). "Relationship between brain perfusion computed tomography variables and cerebral perfusion pressure in severe head trauma patients." Critical Care Medicine **32**(7): 1579-1587.
- Wintermark, M., M. Sesay, et al. (2005). "Comparative overview of brain perfusion imaging techniques." Stroke **36**(9): 2032-2033.
- Wintermark, M., R. Sincic, et al. (2008). "Cerebral perfusion CT: Technique and clinical applications." Journal of Neuroradiology **35**(5): 253-260.

1. La radiothérapie :

1.1 Quelques notions de dosimétrie:

1.1.1 Interactions rayons X/matière :

Il existe quatre principales interactions entre les rayons X et la matière. D'une part, la diffusion cohérente (diffusion Rayleigh principalement) qui est élastique et au cours de laquelle le photon est simplement diffusé sans perte d'énergie ; d'autre part l'effet photoélectrique, la diffusion Compton (ou incohérente) et la création de paires qui sont des interactions inélastiques, au cours desquelles le photon incident transmet une partie de son énergie à la matière. Après l'une de ces trois dernières interactions, le transfert d'énergie à la matière se fait toujours par l'intermédiaire des électrons mis en mouvement lors des interactions dites primaires.

La prédominance de ces interactions dépend de l'énergie des photons incidents et du numéro atomique du matériau traversé (cf Figure 1). Dans le cas des irradiations de radiothérapie externe conventionnelle (1 à 25 MeV), c'est l'effet Compton qui prédomine, notamment dans les tissus mous comme le cerveau. Un photon incident est diffusé et perd de l'énergie alors transmise à un électron de la matière. Le bilan énergétique est le suivant :

$$E_{\text{photon incident}} = E_{\text{photon diffusé}} + E_{\text{liaison électron}} + E_{\text{électron}}$$

L'électron va distribuer une dose plus ou moins localement en fonction de son énergie. Le photon diffusé va quant à lui avoir la possibilité d'interagir à nouveau suivant les différentes possibilités décrites ci-dessous.

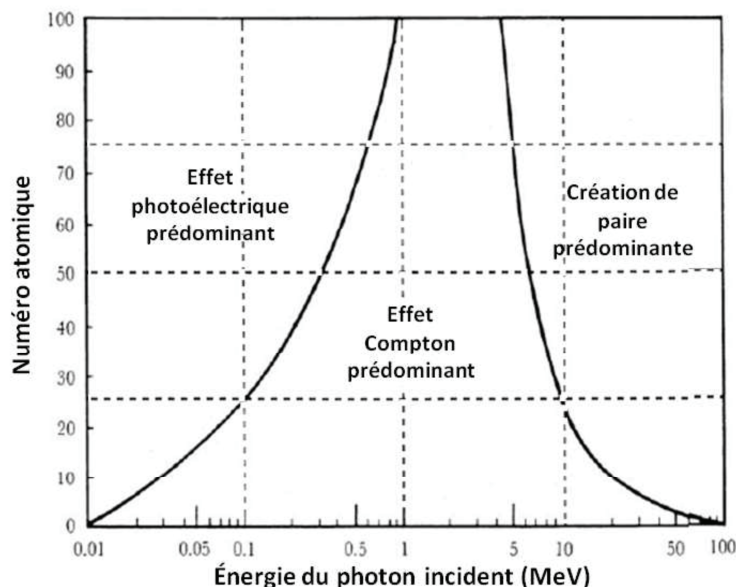


Figure 1: Zones de prédominance des interactions photon/matière en fonction de l'énergie des photons incidents et du numéro atomique de l'atome cible. Les lignes d'iso-probabilité des interactions photoélectriques, Compton et création de paire sont représentées. D'après (Podgorsak and Kainz 2006).

1.1.2 La dose :

La dose absorbée est définie comme la quantité d'énergie moyenne absorbée par un volume élémentaire (ICRU 60). En médecine, l'unité utilisée est le gray (Gy), un gray correspondant au dépôt de 1 Joule par kilogramme de matière.

$$D = \frac{\overline{dE}}{dm}$$

E étant l'énergie déposée dans le volume m.

1.1.3 La mort cellulaire liée à la radiothérapie :

La mort cellulaire induite par la radiothérapie est due principalement aux lésions de l'ADN. Cependant des dommages au cytoplasme, aux protéines et à la membrane cellulaire peuvent aussi provoquer la mort ou inactivation cellulaire (Kargiotis, Geka et al. 2010).

Les lésions de l'ADN peuvent être dues soit à des effets directs (interaction ADN/particule incidente, 15 à 20%), soit à des effets indirects (l'irradiation provoque une radiolyse de l'eau qui provoque des dommages à l'ADN, environ 80%).

L'ADN peut subir plusieurs types de dommages (Edouard 2010):

- cassures de brins (simple ou double)
- formation de pontage ADN-protéines
- création de sites abasiques
- formation d'adduits
- modifications de la structure des bases puriques et pyrimidiques

Suivant le type de lésion de l'ADN, celui-ci se répare plus ou moins facilement, suivant des procédés différents ayant des temps de réponse distincts. Les dommages les plus critiques sont les cassures double-brins. De manière générale les cellules tumorales réparent moins bien leur ADN endommagé que les cellules saines (Weichselbaum 1984; Thoms and Bristow 2010).

Un modèle, appelé linéaire quadratique, permet d'estimer la survie cellulaire en fonction de la dose reçue par les cellules. C'est un modèle *in vitro*, qui n'inclut pas de nombreux phénomènes pouvant être présents *in vivo*. Il correspond néanmoins au cas d'une irradiation uni-fractionnaire, d'un type de cellules cultivées, dans une configuration définie et irradié avec un rayonnement donné. Il s'écrit de la façon suivante :

$$S = S_0 * e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Où S est la survie cellulaire (S_0 étant la survie sans irradiation), D est la dose et α et β sont des constantes.

Ce modèle peut être étendu aux irradiations en plusieurs fractions avec la formule suivante :

$$S = S_0 * e^{-\alpha D - \beta G D^2}$$

$$G = 2/D^2 \int_{-\infty}^{+\infty} D_e(t) dt \int_{-\infty}^t e^{-\lambda(t-t')} D_e(t') dt'$$

Avec D_e représentatif de la variation du débit de dose durant la radiothérapie et λ représentant le taux de réparation (Brenner 2008).

Cependant l'une de ses limites principales concerne les fractions de fortes doses. Un modèle linéaire quadratique modifié a été proposé pour des études *in vivo* à forte dose par Guerrero *et al* (Guerrero and Li 2004). Il corrèle mieux avec les expériences, aussi pour le tissu cérébral chez le rat (figure 2). Ce modèle devrait être privilégié dans le cas d'études sur de la radiochirurgie pour la zone tumorale du fait des fortes doses utilisées par cette technique.

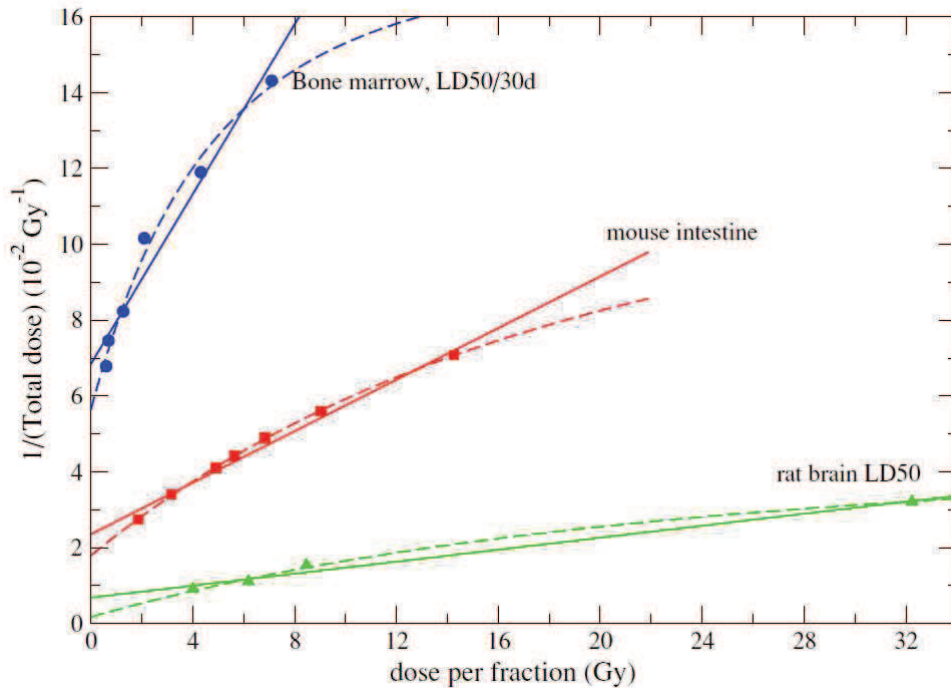


Figure 2: Comparaison du modèle linéaire quadratique de survie (trait plein) et du modèle dérivé (trait pointillé) proposé par Guerrero et al pour différentes cellules. Figure d'après l'étude de Guerrero et al. (Guerrero and Li 2004).

1.2 La radiothérapie externe:

On appelle radiothérapie externe toute forme de radiothérapie dont la source du rayonnement est à l'extérieur du patient. Différents types de rayonnement et donc de particules peuvent être utilisés (photons, électrons, ions, ..). À l'inverse, la curiethérapie consiste à placer des sources radioactives scellées à proximité ou dans la zone cible. Pour le traitement des tumeurs cérébrales, la radiothérapie externe est quasiment la seule utilisée. L'implantation de sources radioactives dans les tissus est en effet difficile pour des raisons chirurgicales. La radiothérapie externe se divise en deux sous-groupes, la radiothérapie conventionnelle et la radiochirurgie.

1.2.1 La radiothérapie conventionnelle :

Ce qu'on appelle radiothérapie conventionnelle correspond à une géométrie d'irradiation sur des volumes assez grands par rapport à la taille de la tumeur. Les volumes considérés englobent alors la tumeur ainsi que des marges conséquentes (typiquement 1 cm dans chaque direction). Deux notions importantes caractérisent ce type d'irradiation, l'effet balistique et le fractionnement temporel.

L'effet balistique : La balistique doit optimiser le nombre de ports d'entrée et leur incidence de façon à homogénéiser le plus possible la dose dans la tumeur. Elle doit également diminuer la dose dans les organes à risques aux alentours, voire à éviter « complètement » certains organes critiques. Souvent le nombre de ports est important (typiquement de 4 à 8) afin de diminuer la dose maximale que reçoit le tissu sain, quitte à augmenter le volume total irradié.

Le fractionnement temporel : Le fractionnement temporel se base sur le fait que les cellules tumorales réparent en général moins bien et moins rapidement les lésions de l'ADN sublétales que les cellules saines. Une faible dose, qui permet de ne pas saturer les mécanismes de réparations, va être déposée en plusieurs fractions, classiquement 2 Gy par jour. Ainsi les lésions sublétales de l'ADN

auront le temps d'être réparées dans les tissus sains avant l'irradiation suivante. De cette façon pour une même dose totale, la survie cellulaire est augmentée si la dose est distribuée en plusieurs fractions par rapport à une fraction unique. Ce qui peut être formulé de la façon suivante : la dose équivalente biologique d'une irradiation en plusieurs fractions est inférieure à la dose distribuée. Cette différence de dose effective biologique est importante dans le cas des cellules saines, et beaucoup moins dans le cas des cellules tumorales. D'où l'effet de protection sur le tissu sain.

La lecture de l'étude de Zach *et al*, qui ont comparé la dosimétrie de différentes méthodes de traitements des gliomes grâce aux différentes grandeurs caractéristiques de la radiothérapie (Zach, Stall et al. 2009), permet de mieux comprendre la dosimétrie clinique. Les grandeurs de référence qui permettent de caractériser une irradiation conventionnelle sont :

- Le planning target volume (PTV) qui correspond au volume que l'on souhaite irradier avec au moins 95 % de la dose prescrite. Il englobe le volume de la tumeur plus les marges et la pénombre.
- La dose par fraction et le nombre de fractions.
- l'histogramme dose volume (HDV) pour les différents organes (la tumeur et les organes environnant à risque). Il décrit le pourcentage de dose reçu par le pourcentage de l'organe. Idéalement, 100% de la tumeur reçoit 100% de la dose. 100% du tissu sain reçoit 0% de la dose.

L'homogénéité de la dose sur le volume cible (PTV) (tumeur + marge+pénombre) est aussi très importante lors de ce type de radiothérapie, le critère à respecter est que 100% du volume reçoive 95% de la dose ou plus. Il faut aussi respecter la condition : le volume de l'isodose 50% de la dose prescrite à la tumeur ne doit pas dépasser 2 fois le diamètre du PTV.

1.2.2 La radiochirurgie :

Les objectifs et limites de la radiochirurgie sont de distribuer de fortes doses sur des zones les plus précisément définies afin de détruire toutes les cellules tumorales de la zone cible, en évitant au maximum d'irradier des tissus sains. La plupart des techniques d'irradiation sont « caractérisées » par les gradients de dose qu'elles permettent d'obtenir. La radiochirurgie dans le cerveau a commencé avec le traitement de malformations artério-veineuse et de foyers d'épilepsie puisque les contours sont mieux définis dans ces pathologies (pas de cellules infiltrantes). Dans le cas des tumeurs cérébrales, la radiochirurgie peut notamment être appliquée en complément de la radiothérapie conventionnelle ou pour traiter des métastases. La radiothérapie conventionnelle est censée détruire les cellules tumorales infiltrantes, mais de fortes doses ne sont pas applicables du fait des limites du fractionnement temporel et de la tolérance du tissu sain. Le cœur de la tumeur peut être très radiorésistant. En effet il peut être hypo-oxygéné, ce qui limite la formation de radicaux libres lors de l'irradiation. Il peut également y avoir des pressions interstitielles plus élevées limitant la possibilité d'atteinte des molécules de chimiothérapie. Pour ces raisons, la radiochirurgie peut être utilisée pour appliquer un « boost » à ces parties (hypoxique, non atteignable par la chimiothérapie, ...). Les forts gradients de dose permettent aussi de limiter complications à long terme sur les tissus sains.

En radiochirurgie, c'est la dose au tissu sain qui nous intéresse le plus, notamment si elle est appliquée en plus d'une radiothérapie conventionnelle (et donc α et β du tissu sain pour le modèle de survie cellulaire linéaire quadratique valable pour les doses concernées). La dose à la zone cible

(tumeur + marge réduite) n'a pas à être aussi précise et homogène, que pour la radiothérapie conventionnelle. La présence de points chauds, c'est-à-dire de points de surdosage, n'est pas forcément problématique (Flickinger, Lunsford et al. 1992a) puisque forcément à l'intérieur du volume tumoral alors que les points chauds en radiothérapie conventionnelle sont souvent en limite du volume cible. De plus la radiochirurgie étant réalisé sur des faibles volumes, c'est dotant plus vrai pour les points chauds. Du fait d'un effet dose-volume décrit par la suite, cette sur irradiation ne conduit pas forcément à un effet biologique important. La grandeur étudiée est le *Normal Tissue Complication Probability* (NTCP) qui, en fonction des paramètres d'irradiation (notamment dose et volume) et du type de tissu sain irradié, estime la probabilité d'avoir un effet néfaste à court ou long terme. En radiochirurgie on recherche un effet dose volume maximal que l'on peut obtenir en une ou quelques fractions, limitant ainsi les erreurs de repositionnements.

L'effet « dose volume » vient à la fois de l'aspect structural et de l'aspect fonctionnel des organes (Travis 2001). Un organe peut maintenir sa fonction si seule une faible partie est endommagée structurellement. On parle alors de volume critique (*Critical volume* : CV) et de sous-unités d'organe capable de générer la fonction organique (FSU, pour *functional sub-unit*). Whitters et al. définissent le FSU comme étant le plus grand ensemble de cellules capable d'être régénéré à partir d'un seul clonogène (Withers, Taylor et al. 1988). Les principaux dommages aux tissus environnants ayant lieu après radiothérapie sont des effets à long terme (en mois et années après irradiation). L'effet le plus courant pour le cerveau est une nécrose due à la coagulation du tissu et une démyélinisation de la matière blanche. On peut en effet observer des cellules endothéliales atypiques et des nécroses fibronoïdes de petits vaisseaux après irradiation (Levegrun, Ton et al. 2001).

Le disfonctionnement d'un organe peut provenir de dommages causés aux cellules parenchymateuses, aux cellules endothéliales (permettant le fonctionnement des vaisseaux et l'apport aux cellules parenchymateuses de l'énergie nécessaire à leur fonctionnement), ou à la matrice extracellulaire. La tolérance du tissu sain à la dose va dépendre notamment de la plus sensible des causes de disfonctionnement qui dépend de l'organe étudié. Dans le cas du cerveau, ce sont les cellules endothéliales qui sont les plus sensibles (Schultheiss, Kun et al. 1995). Ces complications proviennent notamment de modifications vasculaires. Les techniques de mesure de perfusion présentées au chapitre 4 prennent alors tout leur sens pour un suivi de traitement. Les oligoendrogliocytes (produisant la myéline) sont aussi très sensibles aux radiations.

Le principe des functional subunits (FSU) repose sur deux types d'organes. Les organes dit « en série » et ceux dit « en parallèle ».

Les organes en série sont ceux pour lesquels des dommages à une faible partie de l'organe peuvent produire un disfonctionnement total de l'organe (tel que la moelle épinière, l'intestin, etc...). Les organes en parallèle sont ceux pour lesquelles une partie de l'organe fonctionne indépendamment d'une autre, et donc même si d'autres parties sont endommagées. Parmi ces organes il y a les poumons, reins, et certaines parties du cerveau (hors tronc cérébral, nerfs optiques, ...).

La figure 3 provient d'un article de Marks (Marks 1996), d'après les résultats de Niemierko et Goitein (Niemierko and Goitein 1993). La figure 3a décrit la probabilité d'avoir des complications après irradiation en fonction du nombre de cellules par FSU. Plus celui-ci est élevé, moins il y a de risques d'avoir des complications, du fait que la chance de survie au traitement d'une cellule est plus importante. La figure 3b décrit la probabilité d'avoir des complications après une irradiation à dose

constante en fonction du volume, pour des organes « en série » (*critical element*) et des organes « en parallèle » (*critical volume*). Pour les organes en série, le risque de complication croît linéairement avec le volume irradié. Pour les organes en parallèle, le risque de complication croît après la présence d'un volume seuil.

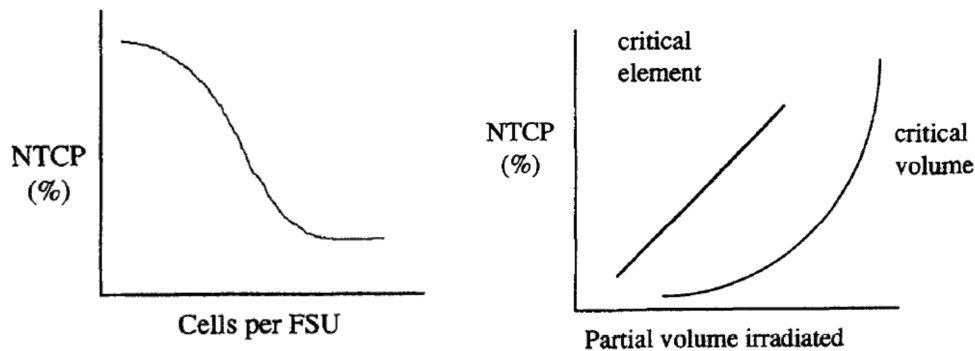


Figure 3: Risque de complication après irradiation d'après la théorie des sous unités fonctionnelles d'organe (FSU), d'après (Marks 1996). 2a) *Normal tissue complication probability* en fonction du nombre de cellule que comporte une FSU (donc de l'organe). 2b) *Normal tissue complication probability* en fonction du volume irradié pour un organe en série (*critical element*) et d'un organe en parallèle (*critical volume*).

Conformément à ces modèles, on observe en pratique que l'effet « dose volume » n'existe que jusqu'à un volume limite. De nombreux résultats sur la tolérance du tissu en fonction de la taille de la zone irradiée ont été publiés (Emami, Lyman et al. 1991; Flickinger, Lunsford et al. 1992a; Flickinger, Lunsford et al. 1992b; Hopewell and Trott 2000; Travis 2001; Lawrence, Li et al. 2010). Il en ressort qu'à partir d'un certain volume (dépendant de l'organe), la fraction d'organe endommagé est trop grande pour que la fonction de l'organe soit maintenue. Il y a trop de dommages à réparer, à compenser.

Différentes études parlent d'une dose limite au tissu sain cérébral qui doit rester inférieure à 12Gy en une fraction (source gammaknife), le volume recevant 12Gy étant alors celui de référence pour la corrélation au risque de radionécrose (lors d'une irradiation de malformation artériovéineuse) (Flickinger, Kondziolka et al. 1997; Shaw, Scott et al. 2000).

Certaines études essaient de modéliser un organe en plusieurs groupes de FSU, permettant par exemple de considérer le parenchyme comme étant un organe en parallèle, et les vaisseaux sanguins l'alimentant comme étant un organe en série. Ceci pourrait améliorer la modélisation des effets biologiques suite à une irradiation.

D'autres études veulent prendre en compte la connectivité ou non des FSU endommagés (Thames, Zhang et al. 2004). Cette méthode d'estimation de risque de complication reste en cours de développement mais semble intéressante pour les irradiations par fractionnement spatial comme certaines proposées en utilisant le rayonnement synchrotron et décrites dans les paragraphes suivants. L'histogramme dose volume ne peut en effet pas être utilisé pour ces techniques, puisque l'effet protecteur du tissu sain des ces techniques d'irradiations ne serait pas pris en compte. L'histogramme dose volume n'est alors pas représentatif des conséquences biologiques.

1.2.3 Une rapide revue des techniques de radiochirurgies actuelles :

La radiochirurgie a besoin de créer de très petits faisceaux qui convergeront vers la tumeur afin d'avoir un effet dose volume optimal. Les différentes techniques de radiochirurgie conventionnelles sont :

- La tomothérapie : Un accélérateur linéaire souvent mégavolt (typiquement 6 MV) peut être utilisé grâce à l'ajout d'un système de collimation appelé multi leaf collimator (MLC). Le collimateur multi lames est employé pour faire des petits champs irréguliers, l'intensité du faisceau peut donc varier suivant la position géométrique irradiée. La table où se trouve le patient se déplace de la même façon que celle d'un scanner et permet donc une irradiation continue axiale ou hélicoïdale.

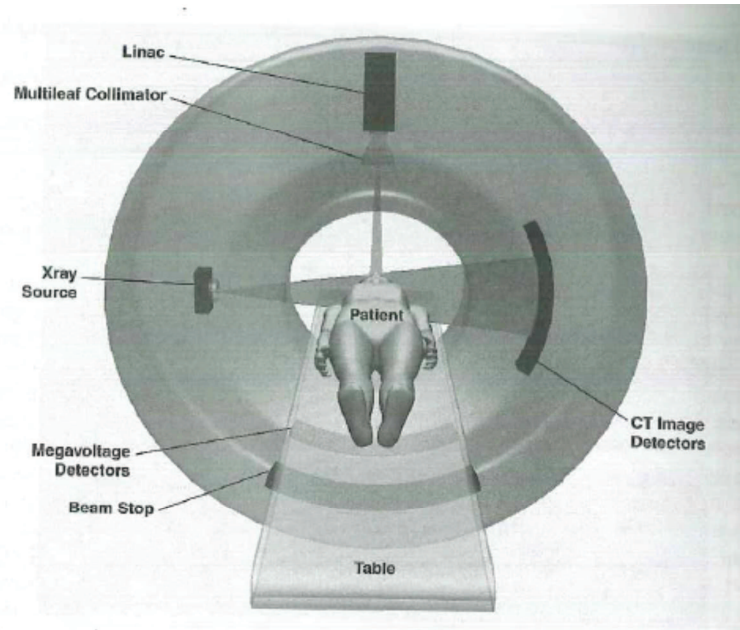


Figure 4: Schéma de principe de la tomothérapie (figure de (Van Dyk 1999)).

- L'arc thérapie : Un accélérateur linéaire mégavolt est couplé à un système de collimation MLC de la même façon que la tomothérapie. La source et le patient peuvent bouger dans l'espace de façon à définir un nombre fini d'incidences par lesquels l'irradiation se fera (Yu and Tang 2011).

- Le Gammaknife® (Elekta®, Stockholm, Suède) comprend environ 200 sources de cobalt 60 dont l'émission est collimatée (jeu de collimateur : 4 mm, 8 mm, 12 mm et 16 mm de diamètre). Les émissions sont focalisées en un petit volume, voir schéma de principe ci-dessous.

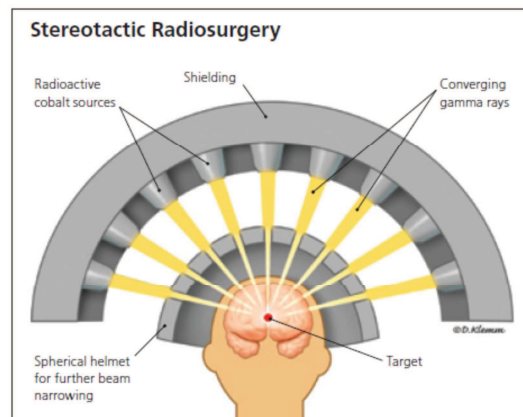


Figure 5 : Schéma présentant le fonctionnement du GammaKnife® d'après (Gerber and Chan 2008)

- Le cyberknife® Accuray : Un bras articulé permet de déplacer un Linac dans l'espace autour du patient afin d'avoir les meilleures incidences possibles. Le faisceau est collimaté de façon circulaire par un jeu de fente de 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 et 60 mm de diamètre.

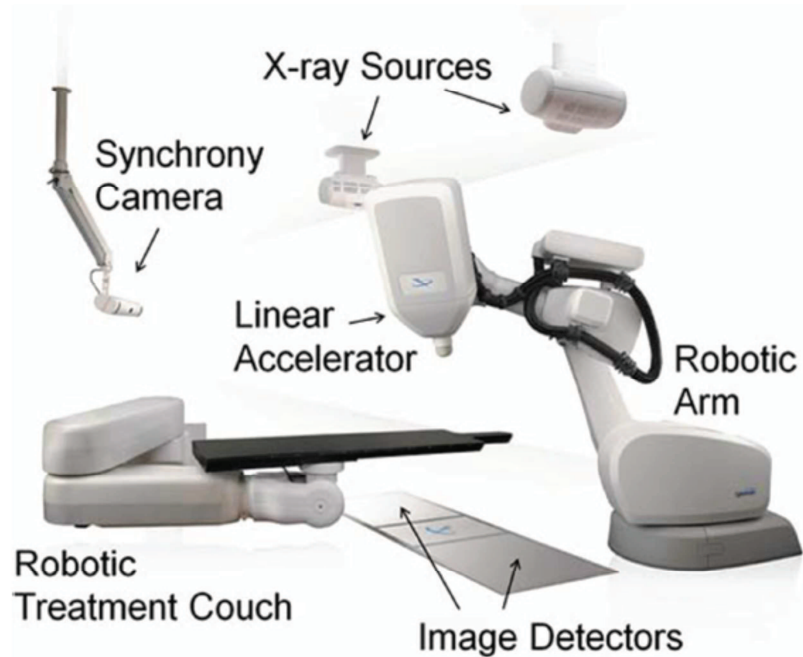


Figure 6: Schéma présentant le fonctionnement du CyberKnife®

Une comparaison entre la dosimétrie du gammaknife et la tomothérapie a été faite par Kumar *et al.*, (Kumar, Rakowski et al. 2010). Ils concluent en faveur du gammaknife, notamment pour la dose au tissu sain plus faible avec cette technique. Une comparaison entre la dosimétrie de l'arc thérapie et de la tomothérapie hélicoïdale a été effectuée par Rong *et al.* (Rong, Tang et al. 2011). Ils concluent que la tomothérapie hélicoïdale permet une meilleure homogénéité de dose.

1.3 Les techniques de radiothérapie par rayonnement synchrotron:

1.3.1 Originalité du faisceau synchrotron

Le rayonnement synchrotron est un faisceau de rayons X de basse énergie (énergie proche de celles de radiologie, le spectre de l'ESRF sur la ligne médicale s'étend environ de 10 keV à 350 keV, après le monochromateur de tomographie on peut disposer d'une énergie entre 10 et 120 keV). La figure suivante (figure 7) représente les différents constituants d'un synchrotron dont le fonctionnement est décrit rapidement dans la thèse de Sébastien Besse et celle de Caroline Boudou. Des électrons sont générés par un canon à électron puis accélérés par un accélérateur linéaire (LINAC) jusqu'à une énergie de 200 MeV. Ensuite ils sont insérés dans un accélérateur circulaire (booster) jusqu'à une énergie de 6 GeV. Ils sont alors insérés dans un anneau de stockage chargé de maintenir le flux d'électrons stable sur la totalité de l'anneau. Des éléments d'insertions répartis tout le long permettent de générer le flux de photons (par exemple grâce à un wiggler comme sur la ligne médicale ID17. Les wigglers sont constitués d'une succession périodique d'aimants bipolaires générant des déflexions des électrons, générant ainsi le faisceau synchrotron. Les wigglers sont notamment caractérisés par leur champ magnétique, la périodicité des aimants et le gap entre les pôles des aimants.

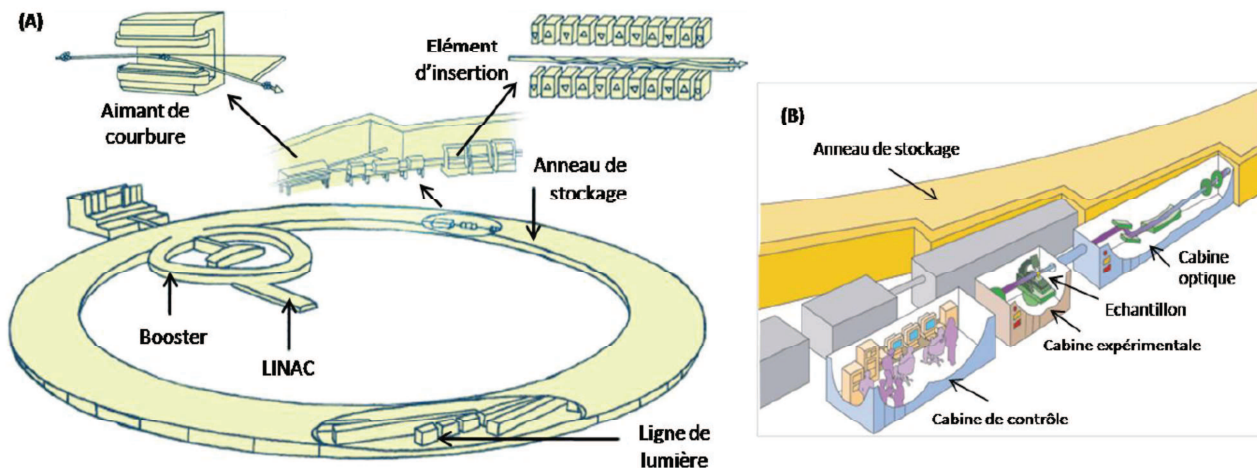


Figure 7: A) Schéma global de l'ESRF. B) Schéma d'une ligne de lumière à l'ESRF. Extrait de www.esrf.fr

La brillance est très importantes (10^4 fois plus grande qu'un tube à rayons-X conventionnel, figure 8). Le faisceau est très faiblement divergent et la source est quasi ponctuelle. Ces caractéristiques permettent d'utiliser un monochromateur pour sélectionner une énergie spécifique en conservant une intensité de faisceau élevée pour l'irradiation ou l'imagerie.

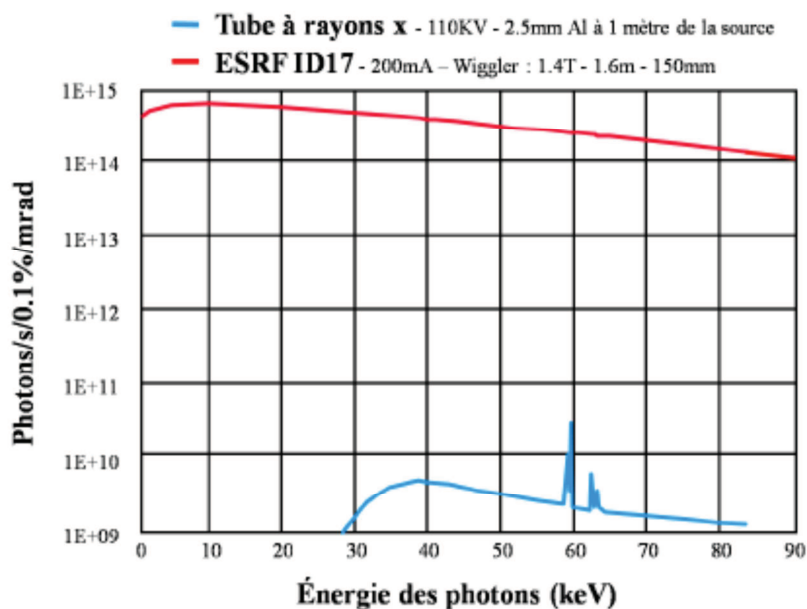


Figure 8: En noir : Brillance en fonction de l'énergie des photons disponible sur ID17 (la ligne médicale) avec un des wigglers. En gris : Brillance en fonction de l'énergie des photons en sortie d'un tube rayon X conventionnel. Figure provenant de la thèse de Mathias Vautrin (Vautrin 2011).

Sur la ligne médicale de l'ESRF (ID17), le faisceau est généré par deux wigglers (de longueur 1.6m, de période 125 et 150 mm, et de champ magnétique à 20 mm 1.25 et 1.9 T). Le monochromateur utilisé pour la technique de radiothérapie présenté dans cette thèse est constitué de deux cristaux (l'angle d'asymétrie pour les cristaux est de 7.5 degrés sur le plan 111.) et permet de sélectionner une énergie dans l'intervalle 25 à 96 keV. Les échantillons sont situés à environ 150m de la source pour les techniques considérées ici. Les cristaux permettent d'obtenir un faisceau de 15 cm de large et d'environ 1 à 3 mm de haut (du fait de la faible divergence des rayons).

Une rapide introduction aux techniques de radiothérapies synchrotron a été faite par Deman *et al.* (Deman, Edouard *et al.* 2010) et est présenté en fin de thèse.

1.3.2 Effet dose/volume :

L'effet dose/volume décrit dans le paragraphe 1.2.2 pour la radiochirurgie peut être poussé encore plus loin. En effet, dans le cas de la radiochirurgie classique les plus petits volumes dont il est question sont en millimètres cube, voir dizaine de millimètres cube. On peut s'intéresser à ce qui se passe pour des volumes irradiés plus petits encore.

L'effet est en effet existant et encore plus important à plus petite échelle, c'est-à-dire submillimétrique ou micrométrique. Dans les années 1961 Zeman *et al* (Zeman, Baker et al. 1961) ont étudié cet effet dose volume à l'échelle micrométrique pour une irradiation avec des particules de hautes énergies sur des souris (figure 9). Les tailles de champ utilisées par Zeman *et al* dans cette étude sont de 1 mm, 250 μm , 75 μm et 25 μm . Plus la taille de champ est faible, plus la dose à déposer pour détruire la plupart des cellules nerveuses du tissu est importante. On parle d'effet protecteur. Les dommages observés par histologie ont été principalement lié aux cellules endothéliales et aux cellules nerveuses qui sont les éléments les plus radiosensibles comme précisé dans le paragraphe précédent (1.3.1).

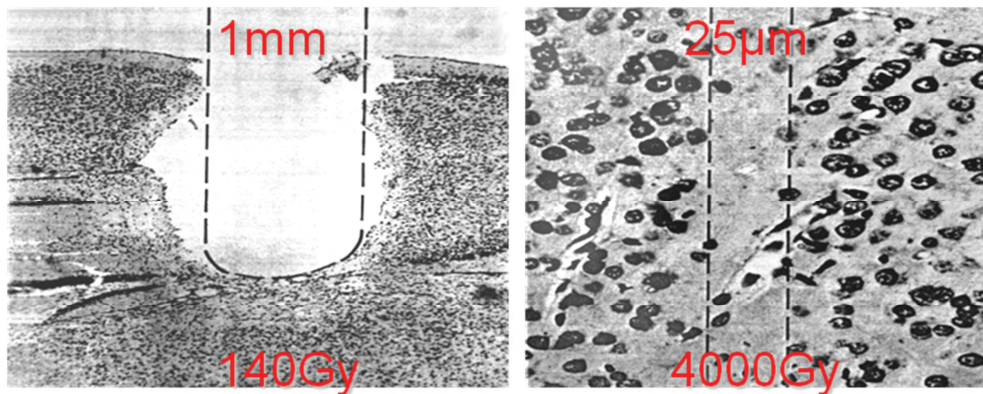


Figure 9: A gauche, irradiation sur 1 mm de large, 140 Gy suffisent à détruire tout le tissu. A droite, irradiation sur 25 μm de large, 4000 Gy détruisent la plupart des cellules nerveuses, des dommages aux vaisseaux sanguins sont observés mais pas de nécrose du tissu. D'après des figures de Zeman *et al.* (1961).

Ils ont observé aussi que seul le faisceau de 25 μm n'endommageait pas la myéline et provoquait moins de dommages aux vaisseaux sanguins, peut être à cause du fait que la distance moyenne entre deux vaisseaux chez la souris est de 40 μm . Les vaisseaux sanguins semblent être capable de se régénérer assez bien après une irradiation sur un faible volume, ils n'ont en effet constaté aucune hémorragie, aucune nécrose due à l'arrêt de la vascularisation d'une zone.

L'effet dose volume à cette échelle s'appuie d'avantage sur la communication inter cellule et possible migration cellulaire que sur l'aspect fonctionnel « global » d'une structure, d'un organe. Lors d'une irradiation sur une faible distance il n'y a en effet à priori pas de rupture de la communication inter cellulaire. Des migrations cellulaires entre zone saine et zone irradiée peuvent aussi avoir lieu sur des faibles distances pour compenser les dommages à la zone irradiée. Ceci ne peut avoir de véritable importance que pour des volumes irradiés micrométriques. La zone saine sert alors de « réservoir » de cellules intactes et ce serait notamment le cas pour les cellules endothéliales du tissu sain (Weichselbaum 1984; Thoms and Bristow 2010).

Ces propriétés sont utilisées pour des irradiations par microfaisceaux synchrotron polychromatiques (MRT pour *Microbeam Radiation Therapy*). Une géométrie fractionnée avec des faisceaux de l'ordre de quelques dizaines de micromètres, espacés d'environ cent micromètres ou

plus, est utilisée. Ce peut être appliqué sur une ou plusieurs directions d'irradiation (figure 10). Les débits de doses sont de plusieurs milliers de grays par secondes.

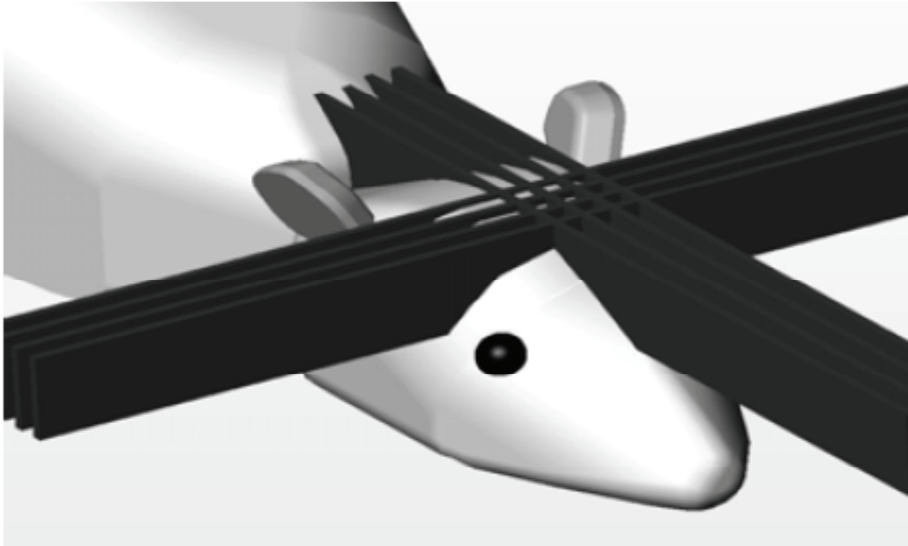


Figure 10: Schéma de principe d'irradiation MRT avec 2 incidences croisées. Figure d'après Serduc *et al.* (Serduc, Christen *et al.* 2008)

Cet effet dose volume observé dans le tissu sain n'existe par contre pas dans le tissu tumoral. C'est ce qui a été observé lors d'études sur le traitement des tumeurs cérébrales. En 1998, Laissue *et al.* (Laissue, Geiser *et al.* 1998) ont irradié des rats porteurs de gliosarcomes 9L avec des irradiations unidirectionnelles (1 incidence) ou bidirectionnelle (deux incidences, croisement orthogonal). Les faisceaux étaient de 25 μm espacés de 100 μm avec des doses au pic de 625 Gy (unidirectionnel et bidirectionnelle) ou 312 Gy (bidirectionnelle). La médiane de survie de tous les groupes de rats irradiés a augmenté significativement par rapport au groupe témoin non irradié. Il y a en effet une différence de 139, 96 et 24 jours par rapport au groupe témoin pour les groupes 625 Gy croisé, 312 Gy croisé et 625 unidirectionnels respectivement. Cette nette augmentation de survie est d'autant plus intéressante que cette technique laisse des zones non irradiées dans la tumeur (ou tout du moins des zones où seul le diffusé est à l'origine du dépôt de dose). Il y a donc un effet supplémentaire aux dégâts faits directement par l'irradiation. La principale hypothèse est que les vaisseaux sanguins tumoraux (de la néo-angiogénèse) régénèrent moins facilement que les vaisseaux sanguins du tissu sain. Les vaisseaux tumoraux comportent en effet moins de cellules endothéliales que les sains, il y a donc moins de migration possible de cellules endothéliales pour compenser celles endommagées. Il y aurait alors une nécrose ischémique de la zone irradiée, tuant du même coup les cellules tumorales (Dilmanian, Button *et al.* 2002). Cependant aucune étude n'a encore permis d'expliquer exactement les phénomènes physiologiques et biologiques en jeu conduisant réellement à l'efficacité de ce traitement. L'étude la plus complète de l'effet des microfaisceaux sur la vascularisation dans la zone saine subissant une partie de l'irradiation et dans la zone tumorale est celle de Bouchet *et al.* (Bouchet, Lemasson *et al.* 2010). La figure 11 reprend le tableau récapitulatif de cet article. Les conditions d'irradiation sont les suivantes : microfaisceaux de 50 μm d'épaisseur et 8 mm de large, distants de 200 μm , la dose en entrée était de 400 Gy (débit d'environ 16 000 Gy/s), deux directions d'irradiations orthogonales, 40 faisceaux par irradiation.

Table 1. Microbeam radiation therapy (MRT) effects on blood vessels located either in a 9LGS ("tumor") or in normal brain tissue

| Parameter | Location of Blood vessels | Irradiation | Observations |
|-------------------------|---------------------------|-------------|--|
| Blood vessel morphology | Normal brain | Uni | No changes; endothelial cells and vascular basal membranes are immunolabeled |
| | | Cross | Long-term changes (D ₅₅ T ₄₅) and increased tortuosity; narrow channels without endothelia; reduced RECA reactivity |
| | Tumor | Cross | Short-term changes (D ₁₂ T ₂); gradual decrease of RECA reactivity; loss of tumor endothelia (denudation) |
| Blood volume fraction | Normal brain | Uni | No changes |
| | Tumor | Cross | No changes |
| Vessel size index | Normal brain | Cross | Significant decrease from D ₁₈ T ₈ |
| | | Uni | No changes |
| Vessel permeability | Normal Brain | Cross | Significant increase at D ₅₅ T ₄₅ |
| | | Uni | Significant decrease from D ₁₈ T ₈ |
| | Tumor | Cross | No changes |
| | | Cross | No changes |
| | | Cross | Short-term increase at D ₁₂ T ₂ and D ₁₅ T ₅ |

Figure 11: Résumé des résultats obtenus par Bouchet *et al.* lors d'une étude d'irradiation MRT bidirectionnelle. Trois zones sont définies : controlatéral ayant reçu une seule incidence, ipsilatéral ayant reçu les deux incidences et tumoral ayant reçu les deux incidences. Les abréviations DxTy signifient x jours après implantations et y jours après traitement. RECA = rat endothelial cell antigen. D'après Bouchet *et al.* (Bouchet, Lemasson *et al.* 2010)

L'effet dose volume est fractionné. C'est-à-dire qu'il faut prendre en compte à la fois le volume irradié, et le volume total, notamment parce que le tissu « non irradié » reçoit de la dose par le rayonnement diffusé dans les minifaisceaux. On parle alors de *Peak to Valley Dose Ratio* (PVDR), c'est le ratio entre la dose dans un microfaisceau (au centre du faisceau), et la dose dans un espace inter microfaisceau (au centre de cette espace ne recevant pas de photons primaires). Il y a un volume qui subit au moins la dose minimale (la dose à la vallée), et un volume plus faible qui subit de très forte dose (dose au pic). La dose à la vallée doit être la plus faible possible, en dessous de la tolérance du tissu sain, qui elle est dépendante du volume irradié. La dose au pic peut être très élevée, plusieurs centaines de grays. Les résultats obtenus par cette méthode sont très prometteurs, des essais sur des chiens ayant des tumeurs cérébrales spontanées sont en préparation. La nécessité d'utiliser le rayonnement synchrotron vient du débit de dose nécessaire à limiter les effets indésirables des mouvements du patient et de la finesse des faisceaux, nécessitant une source très faiblement divergente.

1.3.3 L'effet différentiel à la base de la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron :

L'effet prédominant d'interaction entre les photons de cette gamme d'énergie (30 - 100 keV) et le tissu cérébral reste la diffusion Compton. Cependant si l'on charge la tumeur avec un élément lourd, la probabilité de l'effet photoélectrique augmente significativement. La distribution de dose devient plus forte autour des atomes lourds à cause des photoélectrons et du rayonnement caractéristique. Les sections efficaces d'absorption sont en effet plus importantes dans la tumeur et il y a un effet différentiel important avec le tissu sain. Le choix de l'énergie d'irradiation devient alors un compromis entre la pénétration des photons dans le tissu et l'augmentation de la section efficace due à l'élément lourd injecté. La localisation des atomes lourds par rapport à l'ADN des cellules est aussi primordiale (Edouard, Broggio *et al.* 2010). En effet, si l'élément reste extracellulaire, alors les photoélectrons générés doivent avoir un parcours dans le tissu cérébral suffisamment long pour atteindre l'ADN. Si l'élément lourd est proche de l'ADN, un parcours de l'ordre de quelques micromètres suffit.

Cet effet différentiel a été observé en premier lieu (vers les années 1977) lors d'examen radiologiques combinés à l'utilisation d'un agent de contraste iodé, des angiographies notamment (Adams, Norman et al. 1977; Norman, Adams et al. 1978). Des aberrations chromosomiques ont été observées sur des prélèvements sanguins de patients ayant subi une angiographie. Différentes études ont comparé la présence ou non de cette augmentation d'aberrations chromosomiques selon le type d'irradiation, et donc d'augmentation de dose puisque l'agent de contraste utilisé n'en provoque pas. Avec des rayons gamma (source de Cobalt), il n'y a pas eu d'augmentation de dose. Cela a prouvé que c'était bien l'effet photoélectrique qui était responsable de cette augmentation de dose (Mello, Callisen et al. 1983).

L'intérêt radiothérapeutique provient du fait qu'il est possible de charger la tumeur, et quasiment uniquement la tumeur, avec un élément lourd. Ainsi le renforcement par effet photoélectrique lors d'une irradiation à basse énergie est spécifique à la tumeur, et permet donc d'avoir un effet différentiel entre la tumeur et les tissus sains environnants (figure 12).

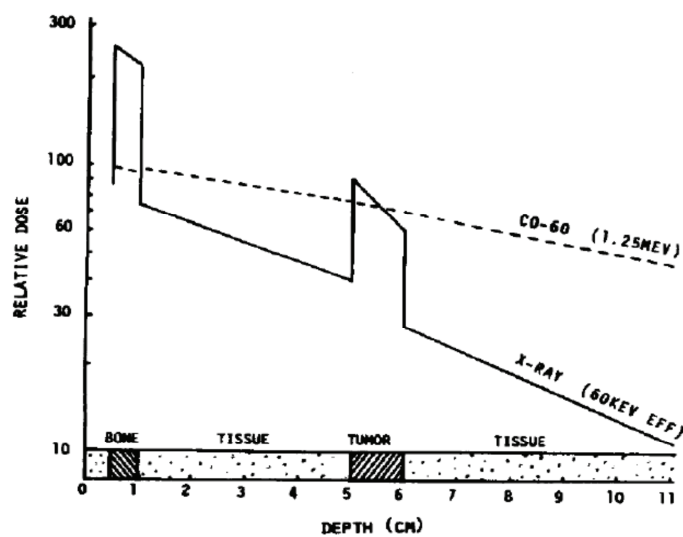


Figure 12: Rendement de dose en profondeur dans un cerveau avec une tumeur chargée en iode à 4 mg/ml pour deux types de rayonnements : en pointillé des photons à 1.25 MeV (source de cobalt 60) et en trait plein des photons à 60 keV. L'effet différentiel dû à la présence d'iode n'est visible qu'avec les photons de basse énergie. Cependant l'os reçoit aussi une dose plus importante. Figure provenant de Mello *et al.*, 1983.

Des essais précliniques, utilisant comme élément lourd un agent de contraste iodé clinique, ont donné des résultats encourageants (Mello, Callisen et al. 1983; Iwamoto, Cochran et al. 1987). Ainsi des essais sur des tumeurs spontanées chez le chien (Iwamoto, Norman et al. 1993; Norman, Ingram et al. 1997) puis des essais cliniques (Rose, Norman et al. 1999) ont été conduits. L'irradiation (appelée CTRx) a été réalisée par un scanner modifié servant également au diagnostique et à la quantification de la concentration d'iode dans la tumeur. L'irradiation se fait alors comme de l'arc-thérapie dynamique avec un scanner modifié (Iwamoto, Norman et al. 1990).

Les résultats obtenus sont les suivants :

Chez le chien : Les essais précliniques, avec renforcement de dose sur l'iode, ont abouti au même résultat qu'un traitement au Cobalt 60 appliquant la même dose à la tumeur (et donc plus de dose au tissu environnant), en terme de survie moyenne. La technique n'a eu aucune incidence sur le volume extratumoral (tissu sain, peau et os) d'après les autopsies effectuées. La concentration d'iode dans la tumeur lors de l'irradiation a été évaluée à 3-4 mg/ml.

Chez l'homme : Les essais cliniques se sont déroulés avec le scanner modifié dans l'équipe de Norman *et al.* (tension d'anode de 140 kVp) à la fin des années 90. Avec ce faisceau ils ont estimé que la dose à la tumeur chargée de 5 mg/ml d'iode est de 1.83 fois la dose à la tumeur sans iode. Alors que le tissu sain reçoit quasiment la même dose dans les deux cas (gradient de dose très resserré). L'essai clinique a comporté 8 patients atteints de métastases multiples au cerveau. Une irradiation cérébrale totale a été pratiquée dans tous les cas (40 Gy, en 4 semaines, avec un accélérateur linéaire 6 MV). Un boost de 25 Gy a été pratiqué sur une des métastases de chaque patient par fraction de 5 Gy. Le volume de la tumeur recevant le boost et d'une tumeur contrôle pour chaque patient est reporté ci-dessous (figure 13).

Table 2. Tumor and control tumor volumes before and after CTRx therapy

| Pt. no. | Initial tumor volume (cc) | Post-CTRx tumor volume (cc) | Initial control tumor volume (cc) | Final control tumor volume (cc) |
|---------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 2.73 | 2.67 | 2.74 | 0.66 |
| 2 | 4.88 | 2.87 | 3.30 | 2.20 |
| 3 | 4.92 | 3.16 | 0.47 | 0.20 |
| 4 | 0.03 | 0.04 | — | — |
| 5 | 1.34 | 0.04 | 0.27 | 1.50 |
| 6 | 1.96 | 2.67 | 0.19 | 1.05 |
| 7 | 4.18 | 0.00 | 0.08 | 0.08 |
| 8 | 1.23 | 0.90 | 12.89 | 9.20 |

Figure 13: Volume avant et après traitement pour la métastase contrôle et la métastase ayant eu un boost par CTRx. D'après Rose *et al.*, 1999.

Solberg *et al* et Mesa *et al* ont proposé d'améliorer la technique par l'utilisation d'un faisceau monochromatique (Solberg, Iwamoto *et al.* 1992; Mesa, Norman *et al.* 1999).

En effet grâce à un faisceau monochromatique (tel que celui dont on peut disposer avec un synchrotron), on peut choisir l'énergie la plus adaptée à l'élément lourd chargé dans la tumeur, et permettant d'optimiser le compromis entre les points suivants :

- Pénétration des photons dans la matière (diminuant du même coup la dose à l'os)
- Optimisation du facteur d'augmentation de dose (énergie des photons par rapport au ratio des coefficients massiques d'absorption en énergie entre un tissu seul et un mélange tissus/élément lourd).

Il y a également une absence d'effet de durcissement de faisceau, ainsi la dose est plus homogène dans le volume cible, indépendamment de sa position.

Les scientifiques de l'équipe 6 de l'institut des neurosciences ont développé à l'ESRF une technique d'irradiation appelée *Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy* (SSRT) (Adam, Elleaume *et al.* 2003a) afin de poursuivre les recherches dans ce sens.

Le principe est à nouveau de charger préalablement la tumeur grâce à un élément lourd. Puis le volume tumoral est irradié par un faisceau monochromatique conformationnel (dont l'énergie a été choisie suivant les compromis cités ci-dessus). Le sujet à irradier tourne alors sur lui-même avec le centre de rotation définit comme l'isocentre de la tumeur, afin d'avoir la dose à la tumeur la plus homogène possible et de diminuer la dose à l'os. Etant donné que sur la ligne médicale de l'ESRF, il n'est pas possible d'avoir un faisceau de plus de 2 mm de haut de façon homogène, pour couvrir toute la hauteur de la tumeur, le sujet doit être déplacé verticalement de la hauteur du faisceau à chaque fois que la dose a été distribuée sur une coupe. Les gradients de dose obtenus sont très

resserrés autour de la tumeur, et plus la concentration en élément lourd est élevée, plus ils le seront. La figure 14 décrit le principe de l'irradiation SSRT et la figure 15 les dépôts de dose en cas de présence d'iode ou non.

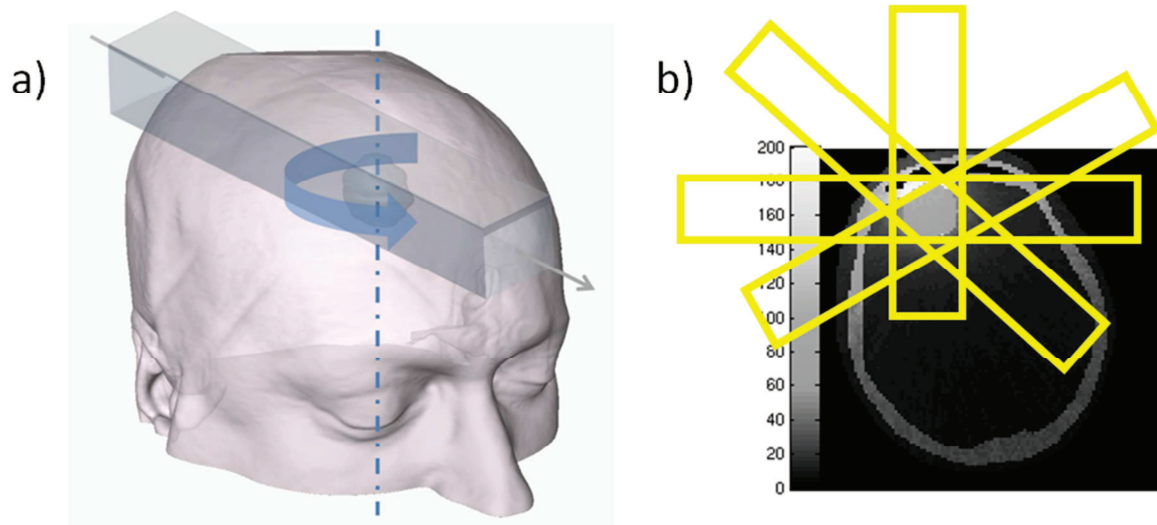


Figure 14: a) Schéma de principe d'une irradiation SSRT. Volume d'iode après injection systémique segmenté et représenté en bleu. En gris le faisceau d'une largeur égale à la tumeur plus les marges, effectuant une rotation autour de l'isocentre de la tumeur et se déplaçant en z pour couvrir toute la hauteur. b) carte de dose calculée par simulation Monte Carlo (code MCNPX), normalisée au centre de la tumeur dans laquelle la concentration en iode a été définie égale à 10mg/ml. En jaune une représentation du faisceau tournant autour de la tumeur.

Des essais cliniques pour cette technique sont en cours de préparation. Le compromis à faire quant à l'énergie du faisceau a été étudié par Edouard *et al* (Edouard, Broggio et al. 2010), pour une irradiation SSRT tel que prévu pour les essais cliniques en développement. Il est ressorti de cette étude qu'une irradiation à 80 keV était un optimal entre un facteur d'augmentation de dose suffisant (10%/mg/ml) et une dose à l'os acceptable.

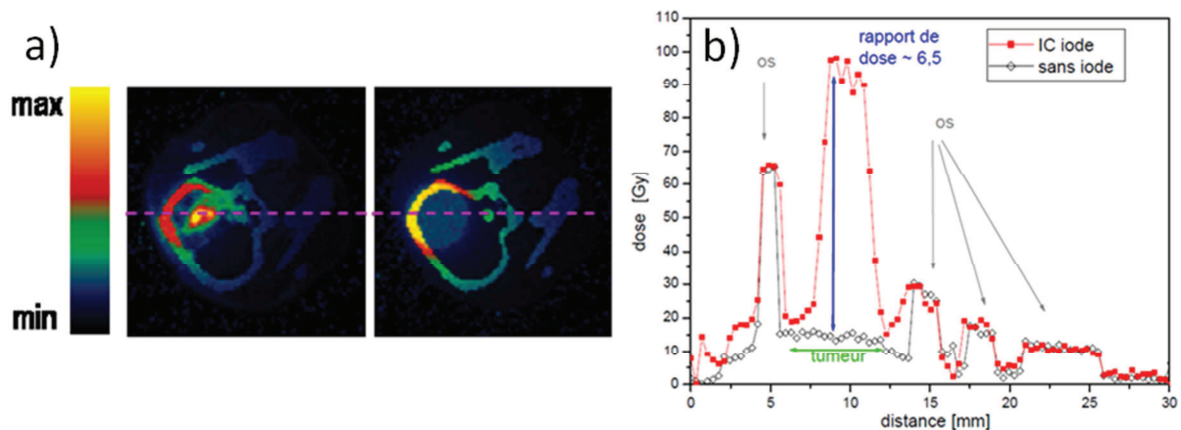


Figure 15: a) Comparaison d'une dosimétrie en condition stéréotaxique synchrotron (SSRT) avec présence d'iode dans la tumeur (10.13 ± 7.79 mg/ml) (figure a) gauche, figure b) courbe rouge) et sans iode (figure a) droite, figure b) courbe grise). L'énergie du faisceau est de 50 keV dans cette simulation. D'après la thèse de Caroline Boudou (2006).

Le faisceau synchrotron est nécessaire car il est la seule source de photons suffisamment intense pour pouvoir obtenir un faisceau monochromatique en conservant un flux suffisamment intense en sortie pour pratiquer des irradiations sur des volumes importants en un temps raisonnable (quelques minutes). La difficulté de ce type de traitement est d'incorporer suffisamment d'élément lourd à la tumeur. En effet, l'effet différentiel (ou dose enhancement) est lié la concentration en élément lourd dans le tissu. Deux principaux moyens d'injection de l'élément lourd sont possibles (Bidros and Vogelbaum 2009).

- Injection systémique : Une injection systémique est une injection dans le système sanguin, elle peut être intra-veineuse ou intra-artérielle. L'agent de contraste est alors présent dans le sang et circule dans tout le corps. Dans le cerveau, il y a la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui limite les échanges entre le sang et le tissu cérébral. Cette barrière est lésée dans le cas des tumeurs cérébrales. Ainsi l'agent de contraste ne peut s'extravaser uniquement qu'au niveau de la tumeur. Ceci est décrit plus précisément dans le chapitre 4 introduisant les mesures de perfusions. Les injections intra-veineuses sont les plus courantes (injections classiques lors d'un scanner ou IRM avec agent de contraste en clinique). Les injections intra-artérielles sont moins courantes mais permettent d'avoir de plus importante concentration d'agent de contraste dans la tumeur. Il est également possible d'utiliser des agents chimiques (ex mannitol) (Adam, Joubert et al. 2006), biologiques, ou même d'irradier le volume cible, afin de mieux ouvrir la BHE et ainsi augmenter la concentration de la drogue dans la région d'intérêt (Cao, Tsien et al. 2005).
- Injection par *Convection Enhanced Delivery* (CED) : L'injection par CED est une injection *in situ*, en intracérébrale (Bobo, Laske et al. 1994; Richardson, Gimenez et al. 2011), dans notre cas au niveau de la tumeur. Le produit se distribue alors par convection et diffusion dans un volume à partir de lieux d'injection ponctuels. Même si les paramètres de distribution du produit vont dépendre de la tumeur (pression osmotique, diffusion dans la tumeur différente de celle du tissu sain), caractéristique du fluide (quantité, viscosité, ...) et de la molécule injectée (taille,...), il est possible, et même probable, que le volume de distribution du produit n'englobe pas totalement, ou plus que la tumeur. Des études doivent être menées pour améliorer cette technique. L'intervention chirurgicale nécessaire à ce type d'injection est bien sûr un autre facteur limitant. Par contre, les concentrations en produit injecté dans le volume sont beaucoup plus importantes que lors d'une injection par voie systémique (Rousseau, Boudou et al. 2007b).

Des premiers essais cliniques de SSRT sur des patients atteints de métastase cérébrale sont en cours de préparation, avec une injection d'un agent de contraste iodé par voie systémique.

1.3.4 La jonction des deux effets : les minifaisceaux monochromatiques.

Une autre technique de radiothérapie synchrotron a été proposé récemment par Dilmanian et al (Dilmanian, Zhong et al. 2006b). Cette technique appelée minifaisceaux utilise des géométries de faisceaux fractionnés spatialement d'épaisseurs submillimétriques (sur le même principe que la MRT avec des faisceaux un ordre de grandeur plus épais). La distance inter faisceaux est cette fois ci égale à l'épaisseur d'un faisceau ou un multiple de celle-ci. Le principe de l'irradiation minifaisceaux est d'entrelacer les faisceaux dans une zone cible afin que celle-ci voie une distribution de dose continue et la plus homogène possible. Deux incidences au moins sont ainsi nécessaire (figure 16). Cela permet de garder un fractionnement spatial dans le tissu sain environnant, afin d'obtenir un effet protecteur du tissu grâce à l'effet dose volume.

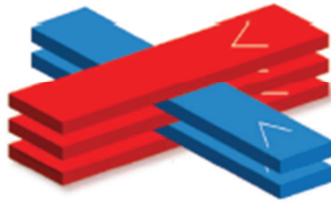
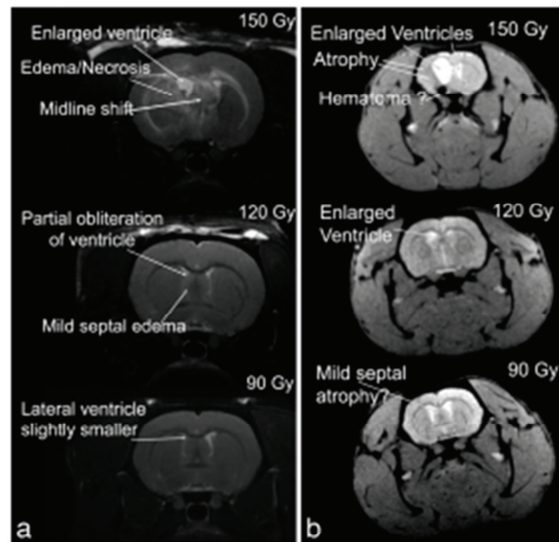


Figure 16: Exemple de géométrie d'irradiation minifaisceaux avec deux incidences. L'entrelacement se fait au niveau de la zone cible. Figure tirée de (Dilmanian, Zhong et al. 2006b).

Dilmanian *et al.* ont proposé cette technique avec des faisceaux polychromatiques mais elle peut aussi être réalisée avec des faisceaux monochromatiques. L'énergie serait alors choisie de la même façon que pour la SSRT, c'est-à-dire en réalisant un compromis entre l'augmentation de dose due à l'élément lourd, l'atténuation des photons par l'os et le tissu sain à traverser, voir le PVDR. Le volume généré par l'entrelacement doit correspondre au mieux à la tumeur, de la même façon que dans tout type de radiochirurgie. C'est pourquoi, à terme, l'utilisation de plus de deux incidences serait intéressante pour une meilleure adéquation entre le volume irradié et la tumeur. C'est cette technique dont l'état de l'art est introduit ci-dessous qui sera évaluée dans ce travail de doctorat.

1.4 Etat de l'art des minifaisceaux :

Peu d'études ont été réalisées sur les minifaisceaux avec un faisceau synchrotron polychromatiques. Cette modalité est décrite comme étant une nouvelle modalité d'irradiation microfaisceaux. La première étude est celle de Dilmanian *et al.* (Dilmanian, Zhong et al. 2006b). L'intérêt est d'avoir des tailles de faisceau plus importantes, afin d'être plus facile à réaliser techniquement, et de pouvoir plus facilement faire des géométries combinant plusieurs incidences. En effet, avec des faisceaux de l'ordre de quelques dizaines de micromètres, réaliser l'entrelacement afin d'avoir une zone cible homogène est un défi technologique majeur. Une incertitude de positionnement des moteurs, un mouvement de l'animal, même celui provoqué par le battement cardiaque, peut avoir des conséquences importantes sur la distribution de dose. Dans son étude, Dilmanian *et al.* ont montré qu'avec une épaisseur de faisceau de 680 μm , l'effet dose volume est encore suffisamment important pour préserver le tissu sain. Cet effet est sans doute plus dû à des effets macroscopiques (tel que la théorie des FSU) plutôt qu'aux effets biologiques de la MRT. En effet les faisceaux de plusieurs centaines de microns sont suffisamment grands pour rompre la communication intercellulaire a priori. Dilmanian *et al.* ont déposé de fortes doses (dans la centaine de Gy à 1 cm de profondeur) sans pour autant observer des dommages importants au tissu à moyen terme pour la dose de 90 Gy entrelacée sur un volume de $3.4 \times 3.4 \times 3.4 \text{ mm}^3$ dans le striatum de rats sains (figure suivante).



| Dose, Gy | Early effects* | | Late effects† | |
|----------|---|---|--|-------------------------------------|
| | Target region | Contralateral hemisphere | Target region | Contralateral hemisphere |
| 150 | Edema with midline shift; parenchymal damage; enlarged ventricles | Edema tracking along the corpus callosum; septal damage; slightly enlarged ventricles | Atrophy of the neocortex, striatum and septum; enlarged ventricles/hydrocephalus; small low-signal intensity area suggestive of hematoma "Nearly perfect" microlesion | Septal atrophy; enlarged ventricles |
| 120 | Mild septal edema; partial obliteration of lateral ventricle | No apparent changes | | No apparent changes |
| 90 | Lateral ventricular space slightly reduced | No apparent changes | No apparent changes | No apparent changes |

Figure 17: a) = effet précoce = 3 semaines après irradiation. Images pondérées T2 de trois rats irradiés avec entrelacement à 150 Gy, 120 et 90 (dose à 1 cm de profondeur), b) = effet tardif = 6 mois après irradiation Images pondérées T2* de trois rats irradié avec entrelacement à 150 Gy, 120 et 90 (dose à 1 cm de profondeur). D'après Dilmanian *et al.* (2006b).

En unidirectionnel ils ont irradié des rats sur un hémisphère en direction antéropostérieure avec 8 minifaisceaux larges de 8 mm et épais de 680 μm , donc obtient une irradiation fractionnée sur 10.2 mm de haut. Les doses distribuées ont été de 110, 130, 150 et 170 Gy à l'entrée. Ces rats ont été observés 7 mois et n'ont montré aucun signe clinique majeur (seuls deux des quatre des rats irradiés à 170 Gy ont eu un comportement et déplacement anormal momentané quelques heures après l'irradiation) et ont pris du poids normalement. Il s'agissait de la seule étude d'irradiation *in vivo* par minifaisceaux publiée avant ce travail de doctorat.

D'autres études ont par contre porté sur l'aspect dosimétrique des minifaisceaux. C'est le cas de celles de Dilmanian *et al.* (Dilmanian, Zhong *et al.* 2006a; Dilmanian, Romanelli *et al.* 2008), Prezado *et al.* (Prezado, Renier *et al.* 2009; Prezado, Thengumpallil *et al.* 2009) et Gokeri *et al.* (Gokeri, Kocar *et al.* 2010).

Ces études portent principalement sur l'estimation du PVDR par simulations Monte Carlo. Ce paramètre est l'un des points clés de cette technique d'irradiation puisque la dose à la vallée doit être en dessous du seuil de tolérance du tissu sain, et la dose au pic doit être la plus élevée possible afin de détruire le plus possible les cellules tumorales et des cellules endothéliales des vaisseaux de la néo-angiogénèse. La dose à la vallée dans le tissu tumoral n'est par contre pas contraignante.

La dose au pic dépend à la fois des photons primaires et secondaires, alors que la dose dans la vallée ne dépend que des photons secondaires. Une haute énergie permet aussi au photon de mieux traverser la matière et notamment d'être moins atténué par l'os, comme cela a été dit dans le paragraphe précédent. Une dose importante à la tumeur sera donc plus facilement réalisable. Par

contre plus l'énergie du photon est élevée, plus le rapport effet photo-électrique/effet Compton va être faible (figure 1). L'interaction par effet photo-électrique va principalement déposer de l'énergie dans le faisceau ou interfaisceau. L'interaction par diffusion (Rayleigh (négligeable) ou Compton) par contre peut être responsable d'un dépôt à distance du faisceau. L'angle de diffusion des photons dépend de leur énergie (figure 18). Plus l'énergie est élevée, plus l'angle de déviation est faible. Cependant les photons diffusés (de plus faible énergie) ont plus de chance de subir un effet photo-électrique et donc de déposer de forte dose dans la vallée. Il faut réaliser un compromis entre tous ces phénomènes influants sur la valeur du PVDR. Prezado *et al* ont étudié la dépendance du PVDR en fonction de l'énergie (Prezado, Fois et al. 2009b; Prezado, Thengumpallil et al. 2009).

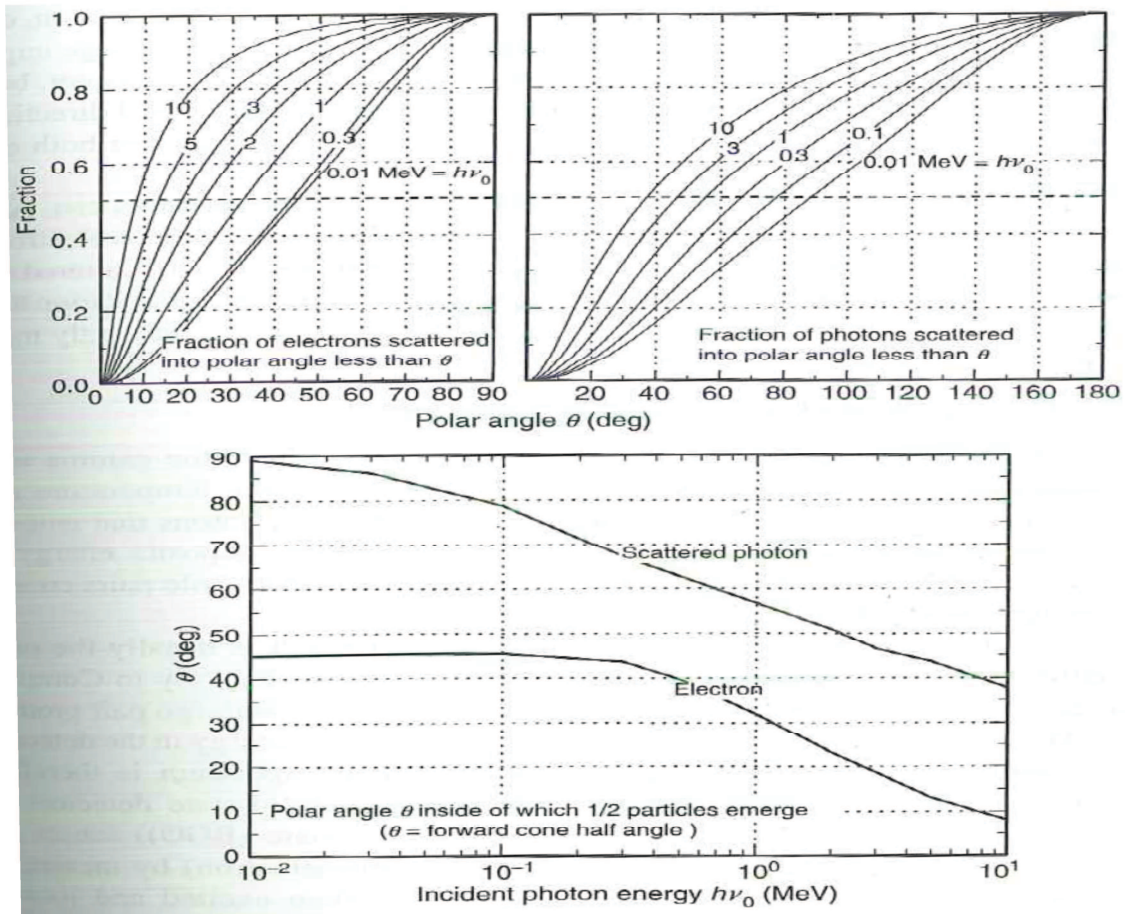


Figure 18: angle de diffusion suivant l'énergie de la particule incidente. Plus l'énergie est grande, moins l'angle est important. D'après (Podgorsak and Kainz 2006)

Dans le cas d'un fantôme de tête humaine dans l'étude de Prezado *et al* (Prezado, Thengumpallil et al. 2009), avec 17 faisceaux de 600 μm et 2 cm de haut et espacé de 1200 μm , les résultats obtenus sont les suivants :

| PVDR | 100 keV | MRT spectrum | 200 keV | 250 keV | 300 keV | 325 keV | 350 keV | 375 keV | 400 keV | 450 keV | 500 keV |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Tumor | 9.1 \pm 0.3 | 10.0 \pm 0.3 | 13.7 \pm 0.4 | 15.3 \pm 0.5 | 16.6 \pm 0.5 | 16.7 \pm 0.5 | 17.3 \pm 0.5 | 16.6 \pm 0.5 | 16.2 \pm 0.5 | 11.5 \pm 0.3 | 7.8 \pm 0.2 |
| Brain | 9.7 \pm 0.3 | 10.7 \pm 0.3 | 14.7 \pm 0.4 | 16.4 \pm 0.5 | 17.9 \pm 0.5 | 18.0 \pm 0.5 | 18.8 \pm 0.6 | 18.4 \pm 0.6 | 17.2 \pm 0.5 | 11.9 \pm 0.4 | 8.1 \pm 0.2 |
| Skull | 10.6 \pm 0.3 | 11.7 \pm 0.4 | 20.1 \pm 0.6 | 24.3 \pm 0.7 | 27.9 \pm 0.8 | 30.0 \pm 0.9 | 31.9 \pm 1.0 | 32.1 \pm 1.0 | 34.0 \pm 1.0 | 33.0 \pm 1.0 | 24.0 \pm 0.7 |

| VD | 100 keV | MRT spectrum | 200 keV | 250 keV | 300 keV | 325 keV | 350 keV | 375 keV | 400 keV | 450 keV | 500 keV |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Brain | 16.4 \pm 0.3 | 16.5 \pm 0.3 | 14.9 \pm 0.3 | 14.5 \pm 0.3 | 14.0 \pm 0.3 | 13.6 \pm 0.3 | 13.5 \pm 0.3 | 13.2 \pm 0.3 | 13.5 \pm 0.3 | 13.6 \pm 0.3 | 13.6 \pm 0.3 |
| Skull | 76.9 \pm 1.5 | 76.9 \pm 1.5 | 29.1 \pm 0.6 | 24.0 \pm 0.5 | 20.8 \pm 0.4 | 19.0 \pm 0.4 | 18.0 \pm 0.4 | 16.9 \pm 0.3 | 15.3 \pm 0.3 | 11.0 \pm 0.2 | 10.2 \pm 0.2 |

Figure 19: En haut : tableau répertoriant les PVDR au centre de la tumeur et les PVDR moyens dans le cerveau sain et le crâne en fonction de l'énergie des photons incidents. En bas : tableau répertoriant les doses moyennes dans les vallées dans le cerveau sain et le crâne en fonction de l'énergie des photons incidents dans le cas où la dose dans la vallée au niveau de la tumeur est de 10 Gy. D'après Prezado *et al.*, 2009c.

L'énergie optimale est alors entre 350 et 375 keV. Le paramètre clé est la dose à la vallée, car celle-ci doit être faible, en dessous de la tolérance du tissu sain (cerveau, et dans une moindre mesure l'os). La dose au pic dans le tissu sain peut être très importante grâce à l'effet dose volume. Un PVDR important permet d'avoir une dose au pic dans la tumeur élevée, et donc grâce à l'entrelacement, une distribution de dose homogène et élevée dans la tumeur. La dose à la vallée dans la tumeur n'a pas d'importance si ce n'est pour calculer la dose exacte qu'elle a reçu (addition de la dose à la vallée d'une incidence et de la dose au pic de l'autre incidence).

La présence d'un élément lourd dans la tumeur permettrait d'augmenter la dose dans la tumeur sans pour autant modifier la dose à la vallée dans les autres régions. Ceci améliorerait du même coup l'efficacité du traitement. Ceci a été étudié pour la MRT, sans entrelacement, dans la publication de Prezado *et al.* (Prezado, Fois et al. 2009b). Et c'est notamment en SSRT que l'ajout d'élément lourd est utilisé, avec des géométries d'irradiation dans la tumeur plus proche de ce que l'on peut avoir en minifaisceaux monochromatiques entrelacés. Dans l'étude d'Edouard *et al.*, (Edouard, Broggio et al. 2010), les facteurs d'augmentation de dose (ou DEF pour *Dose Enhancement Factor*) dus à la présence d'un élément lourd (iode, gadolinium, or) sont étudiés en condition SSRT avec différents éléments lourds et pour des faisceaux monochromatiques de différentes énergies. Une concentration en élément lourd de 10 mg/ml dans la tumeur est utilisée.

| Beam quality | Monochromatic beams | | | | |
|--------------------|---------------------|--------|--------|-------------------|----------|
| | 37 keV | 43 keV | 58 keV | 80 keV | 1.66 MeV |
| DEF for iodine | 1.93 | 2.23 | 2.37 | 1.96 | 1.01 |
| DEF for gadolinium | 1.69 | 1.71 | 2.27 | 2.14 | 1.01 |
| DEF for gold | 2.23 | 2.30 | 2.15 | 1.71 ^a | 1.01 |

Figure 20: Facteurs d'augmentation de dose pour différentes énergies pour trois éléments lourds : iode (K-Edge : 33.2 keV), Gadolinium (K-Edge : 50.24 keV) et or (K-Edge : 80.72 keV). D'après Edouard *et al.*, 2010.

La relation entre le facteur d'augmentation de dose et la concentration en élément lourd est linéaire jusqu'à 20 mg/ml (Figure 20). Les gradients de concentrations sont de plus en plus resserrés suivant la concentration en élément lourd, voir figure 22.

| [I] (mg/ml) | DEF |
|----------------|-------------|
| 1 | 1.10 ± 0.01 |
| 5 | 1.47 ± 0.01 |
| 8 | 1.74 ± 0.02 |
| 9 | 1.84 ± 0.02 |
| 10 | 1.93 ± 0.02 |
| 15 | 2.37 ± 0.02 |
| 20 | 2.80 ± 0.03 |

Figure 21: Facteurs d'augmentation de dose du à l'iode lors d'une irradiation SSRT à 80 keV suivant la concentration dans la tumeur. La relation entre le DEF et [I] est linéaire, $R^2 > 0.99$. D'après (Prezado, Fois et al. 2009a).

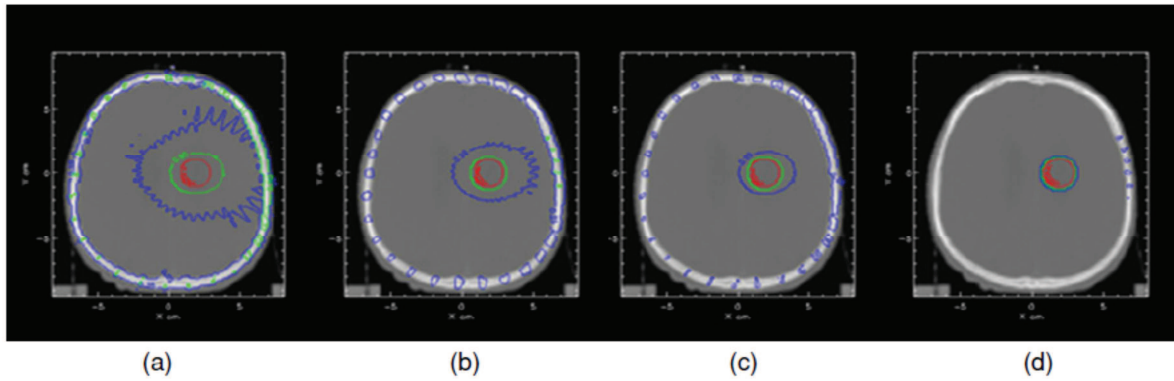


Figure 22: Distribution de dose lors d'une irradiation SSRT à 85 keV lors que la tumeur est charge avec: 0 5 10 et 20 mg/ml (respectivement figure a,b,c et d). Les courbes de couleurs représentent les isodoses à : 90% en rouge, 50% en vert et 25% en bleu. D'après (Boudou, Balosso et al. 2005).

Dans l'étude dosimétrique de Gokeri *et al* (Gokeri, Kocar et al. 2010), un fantôme tête humaine a été modélisée, avec la présence ou non d'élément lourd dans la tumeur (or) lors d'une irradiation minifaisceau avec le spectre blanc de la ligne médicale de l'ESRF. Ils ont principalement montré que les PVDR dépendent du champ utilisé (donc du nombre de minifaisceaux) (figure 23) et que la présence de l'agent de contraste dans la tumeur augmente la dose à la tumeur mais ne modifie pas les PVDR des tissus aux alentours validant ainsi l'emploi d'agent de contraste pour les minifaisceaux (figure 24).

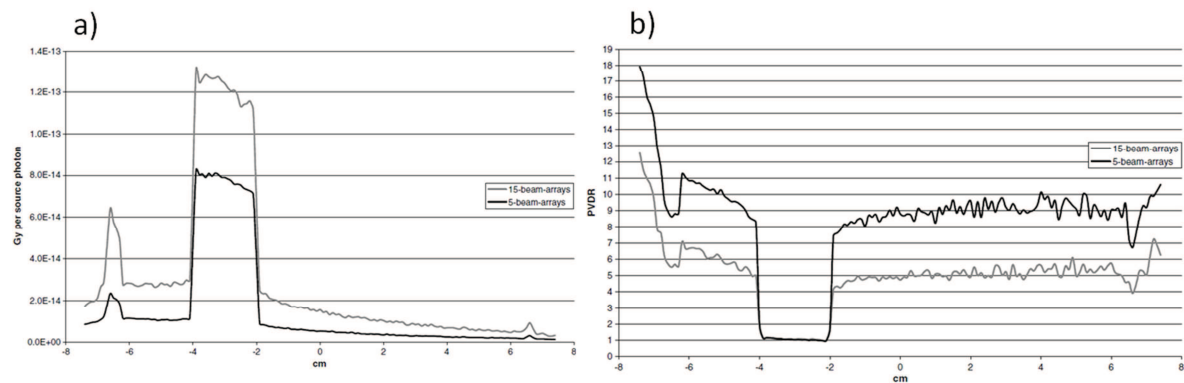


Figure 23: a) Dose dans la vallée en fonction de la profondeur lors d'une irradiation avec 15 minifaisceaux par incidence (en gris) ou 5 minifaisceaux (en noir) b) PVDR en fonction de la profondeur lors d'une irradiation avec 15 minifaisceaux par incidence (en gris) ou 5 minifaisceaux (en noir). D'après Gokeri et al., 2010.

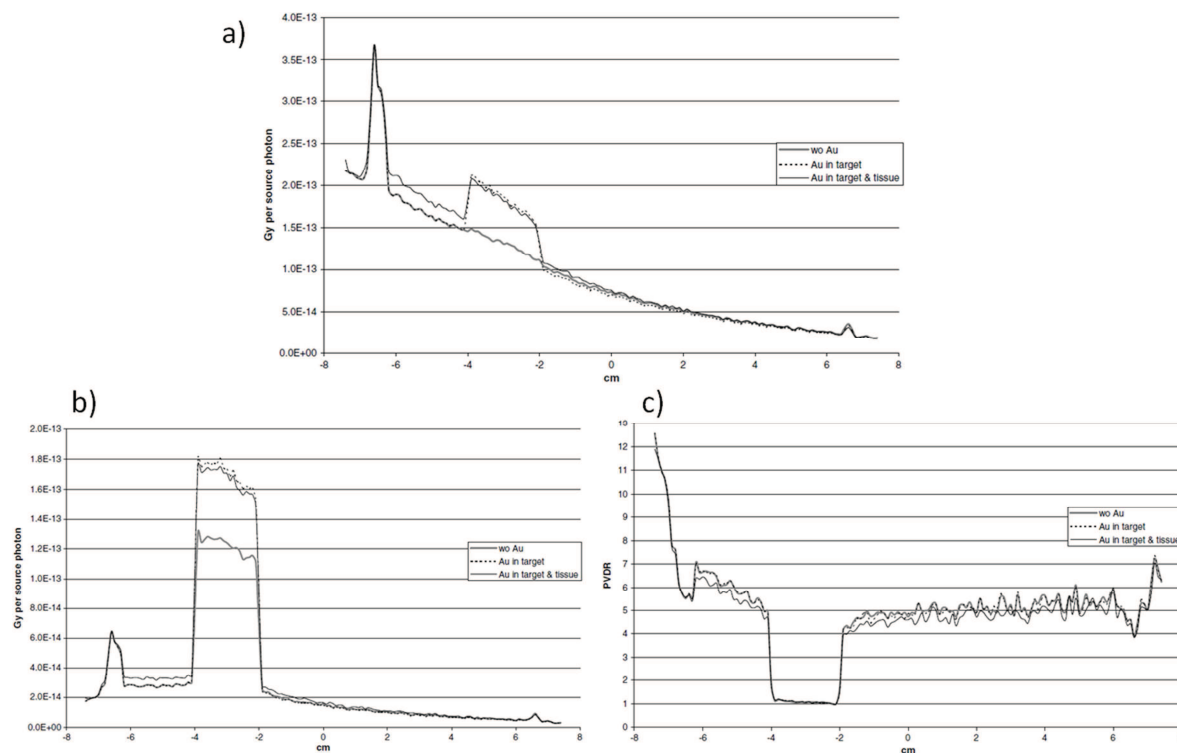


Figure 24: a) Dose dans les pics en fonction de la profondeur lors d'une irradiation avec 15 minifaisceaux sans agent de contraste (en gris), avec de l'or dans la tumeur (en pointillé), avec de l'or partout (en noir) b) Dose dans la vallée en fonction de la profondeur dans les mêmes conditions et c) PVDR en fonction de la profondeur dans les mêmes conditions. D'après Gokeri et al., 2010.

- Adam, J. F., H. Elleaume, et al. (2003). "Synchrotron radiation therapy of malignant brain glioma loaded with an iodinated contrast agent: First trial on rats bearing F98 gliomas." International Journal Of Radiation Oncology Biology Physics **57**(5): 1413-1426.
- Adam, J. F., A. Joubert, et al. (2006). "Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy." International Journal Of Radiation Oncology Biology Physics **64**(2): 603-611.
- Adams, F. H., A. Norman, et al. (1977). "Effect of radiation and contrast-media on chromosomes - preliminary report." Radiology **124**(3): 823-826.
- Bidros, D. S. and M. A. Vogelbaum (2009). "Novel Drug Delivery Strategies in Neuro-Oncology." Neurotherapeutics **6**(3): 539-546.
- Bobo, R. H., D. W. Laske, et al. (1994). "Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(6): 2076-2080.
- Bouchet, A., B. Lemasson, et al. (2010). "Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy on intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **78**(5): 1503-1512.
- Brenner, D. J. (2008). "The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining isoeffective doses at large doses per fraction." Seminars in Radiation Oncology **18**(4): 234-239.
- Cao, Y., C. I. Tsien, et al. (2005). "Use of magnetic resonance imaging to assess blood-brain/blood-glioma barrier opening during conformal radiotherapy." J Clin Oncol **23**(18): 4127-36.
- Demant, P., M. Edouard, et al. (2010). "[Synchrotron radiotherapy.]." Rev Med Interne **31**: 586-589.
- Dilmanian, F. A., T. M. Button, et al. (2002). "Response of rat intracranial 9L gliosarcoma to microbeam radiation therapy." Neuro-Oncology **4**(1): 26-38.
- Dilmanian, F. A., P. Romanelli, et al. (2008). "Microbeam radiation therapy: Tissue dose penetration and BANG-gel dosimetry of thick-beams' array interlacing." European Journal of Radiology **68**(3): S129-S136.

- Dilmanian, F. A., Z. Zhong, et al. (2006). "Microbeam radiation therapy in an interlaced geometry: Potential applicability to neuro-oncology and radiosurgery." Neuro-Oncology **8**(4): 484-485.
- Dilmanian, F. A., Z. Zhong, et al. (2006). "Interlaced x-ray microplanar beams: A radiosurgery approach with clinical potential." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(25): 9709-9714.
- Edouard, M. (2010). *Dosimétrie pour la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron : d'une vision macroscopique aux considérations microscopiques des dépôts d'énergie.* Grenoble, Université de Grenoble.
- Edouard, M., D. Broggio, et al. (2010). "Treatment plans optimization for contrast-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy." Medical Physics **37**(6): 2445-2456.
- Emami, B., J. Lyman, et al. (1991). "Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **21**(1): 109-122.
- Flickinger, J. C., D. Kondziolka, et al. (1997). "Complications from arteriovenous malformation radiosurgery: Multivariate analysis and risk modeling." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **38**(3): 485-490.
- Flickinger, J. C., L. D. Lunsford, et al. (1992). "Dose prescription and dose-volume effects in radiosurgery." Neurosurg Clin N Am **3**(1): 51-9.
- Flickinger, J. C., L. D. Lunsford, et al. (1992). "Radiosurgery and brain tolerance - an analysis of neurodiagnostic imaging changes after gamma-knife radiosurgery for arterio-venous malformations." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **23**(1): 19-26.
- Gerber, D. E. and T. A. Chan (2008). "Recent advances in radiation therapy." Am Fam Physician **78**(11): 1254-62.
- Gokeri, G., C. Kocar, et al. (2010). "Monte Carlo simulation of microbeam radiation therapy with an interlaced irradiation geometry and an Au contrast agent in a realistic head phantom." Phys Med Biol **55**(24): 7469-87.
- Guerrero, M. and X. A. Li (2004). "Extending the linear-quadratic model for large fraction doses pertinent to stereotactic radiotherapy." Physics in Medicine and Biology **49**(20): 4825-4835.
- Hopewell, J. W. and K. R. Trott (2000). "Volume effects in radiobiology as applied to radiotherapy." Radiotherapy and Oncology **56**(3): 283-288.
- Iwamoto, K. S., S. T. Cochran, et al. (1987). "Radiation-dose enhancement therapy with iodine in rabbit vx-2 brain-tumors." Radiotherapy and Oncology **8**(2): 161-170.
- Iwamoto, K. S., A. Norman, et al. (1993). "Diagnosis and treatment of spontaneous canine brain-tumors with a ct scanner." Radiotherapy and Oncology **26**(1): 76-78.
- Iwamoto, K. S., A. Norman, et al. (1990). "The CT scanner as a therapy machine." Radiotherapy and Oncology **19**(4): 337-343.
- Kargiotis, O., A. Geka, et al. (2010). "Effects of irradiation on tumor cell survival, invasion and angiogenesis." Journal of Neuro-Oncology **100**(3): 323-338.
- Kumar, T., J. Rakowski, et al. (2010). "Helical TomoTherapy versus stereotactic Gamma Knife radiosurgery in the treatment of single and multiple brain tumors: a dosimetric comparison." Journal of Applied Clinical Medical Physics **11**(4): 27-41.
- Laissue, J. A., G. Geiser, et al. (1998). "Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays." International Journal of Cancer **78**(5): 654-660.
- Lawrence, Y. R., X. A. Li, et al. (2010). "Radiation dose-volume effects in the brain." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **76**(3): S20-S27.
- Levegrun, S., L. Ton, et al. (2001). "Partial irradiation of the brain." Seminars in Radiation Oncology **11**(3): 259-267.
- Marks, L. B. (1996). "The impact of organ structure on radiation response." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **34**(5): 1165-1171.
- Mello, R. S., H. Callisen, et al. (1983). "Radiation-dose enhancement in tumors with iodine." Medical Physics **10**(1): 75-78.

- Mesa, A. V., A. Norman, et al. (1999). "Dose distributions using kilovoltage x-rays and dose enhancement from iodine contrast agents." Physics in Medicine and Biology **44**(8): 1955-1968.
- Niemierko, A. and M. Goitein (1993). "Modeling of normal tissue-response to radiation - the critical volume model." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **25**(1): 135-145.
- Norman, A., F. H. Adams, et al. (1978). "Cytogenetic effects of contrast-media and triiodobenzoic acid-derivatives in human lymphocytes." Radiology **129**(1): 199-203.
- Norman, A., M. Ingram, et al. (1997). "X-ray phototherapy for canine brain masses." Radiat Oncol Investig **5**(1): 8-14.
- Podgorsak, E. B. and K. Kainz (2006). Radiation Oncology Physics : A Handbook for Teachers and Students.
- Prezado, Y., G. Fois, et al. (2009). "Biological equivalent dose studies for dose escalation in the stereotactic synchrotron radiation therapy clinical trials." Medical Physics **36**(3): 725-733.
- Prezado, Y., G. Fois, et al. (2009). "Gadolinium dose enhancement studies in microbeam radiation therapy." Medical Physics **36**(8): 3568-3574.
- Prezado, Y., M. Renier, et al. (2009). "A new method of creating minibeam patterns for synchrotron radiation therapy: a feasibility study." Journal of Synchrotron Radiation **16**: 582-586.
- Prezado, Y., S. Thengumpallil, et al. (2009). "X-ray energy optimization in minibeam radiation therapy." Medical Physics **36**(11): 4897-4902.
- Richardson, R. M., F. Gimenez, et al. (2011). "T2 Imaging in Monitoring of Intraparenchymal Real-Time Convection-Enhanced Delivery." Neurosurgery **69**(1): 154-163.
- Rong, Y., G. Tang, et al. (2011). "Helical tomotherapy versus single arc intensity modulated arc therapy: a collaborative dosimetric comparison between two institutions. ." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **81**(1): 284-296.
- Rose, J. H., A. Norman, et al. (1999). "First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx)." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **45**(5): 1127-1132.
- Rousseau, J., C. Boudou, et al. (2007). "Convection-enhanced delivery of an iodine tracer into rat brain for synchrotron stereotactic radiotherapy." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **68**(3): 943-951.
- Schultheiss, T. E., L. E. Kun, et al. (1995). "Radiation response of the central-nervous-system." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **31**(5): 1093-1112.
- Serduc, R., T. Christen, et al. (2008). "Brain tumor vessel response to synchrotron microbeam radiation therapy: a short-term in vivo study." Physics in Medicine and Biology **53**(13): 3609-3622.
- Shaw, E., C. Scott, et al. (2000). "Single dose radiosurgical treatment of recurrent previously irradiated primary brain tumors and brain metastases: Final report of RTOG protocol 90-05." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **47**(2): 291-298.
- Solberg, T. D., K. S. Iwamoto, et al. (1992). "Calculation of radiation-dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain-tumors." Physics in Medicine and Biology **37**(2): 439-443.
- Thames, H. D., M. Zhang, et al. (2004). "Cluster models of dose-volume effects." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **59**(5): 1491-1504.
- Thoms, J. and R. G. Bristow (2010). "DNA Repair Targeting and Radiotherapy: A Focus on the Therapeutic Ratio." Seminars in Radiation Oncology **20**(4): 217-222.
- Travis, E. L. (2001). "Organizational response of normal tissues to irradiation." Seminars in Radiation Oncology **11**(3): 184-196.
- Van Dyk, J. (1999). The modern technology of radiation oncology, a compendium for medical physicists and radiation oncologists. Madison, Medical Physics Publishing.
- Vautrin, M. (2011). Planification de traitement en Radiothérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron

- Weichselbaum, R. R. (1984). "The role of DNA-repair processes in the response of human-tumors to fractionated radiotherapy." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **10**(7): 1127-1134.
- Withers, H. R., J. M. G. Taylor, et al. (1988). "Treatment volume and tissue tolerance." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **14**(4): 751-759.
- Yu, C. X. and G. Tang (2011). "Intensity-modulated arc therapy: principles, technologies and clinical implementation." Physics in Medicine and Biology **56**(5): R31-R54.
- Zach, L., B. Stall, et al. (2009). "A dosimetric comparison of four treatment planning methods for high grade glioma." Radiation Oncology **4**.
- Zeman, W., C. P. Baker, et al. (1961). "Histopathologic effect of high-energy-particle microbeams on visual cortex of mouse brain." Radiation Research **15**(4): 496-&.

2. Etude dosimétrique de la radiothérapie minifaisceaux monochromatique :

Cette étude de mise en place de la radiothérapie par minifaisceaux a été publiée (Deman, Vautrin et al. 2011). Il s'agit d'une étude préclinique dont la publication est reproduite en fin de thèse. Seul l'état de l'art, les points importants des matériels et méthodes et une ouverture sont détaillés dans ce chapitre.

2.1 Géométrie d'irradiation :

Comme il a été vu dans le précédent chapitre, le principe de l'irradiation par minifaisceaux est basé sur une distribution de dose la plus homogène possible dans une zone cible, et sur une distribution fractionnée spatialement sur la trajectoire des faisceaux, avant et après la zone cible. La zone cible correspond à la zone tumorale plus les marges. La zone tumorale peut être chargée en élément lourd comme proposé sur la figure ci-dessous (figure 25a). La zone d'entrelacement des minifaisceaux englobe donc ce volume. Les minifaisceaux utilisés dans ce travail font \approx environ 600 μm d'épaisseur, afin de correspondre aux tailles utilisées par d'autres auteurs étudiant ce type d'irradiation (Dilmanian, Zhong et al. 2006b; Dilmanian, Romanelli et al. 2008) (Gokeri, Kocar et al. 2010). L'épaisseur du faisceau sur la ligne d'expérimentation est définie par des lames de collimation en tungstène en sortie du monochromateur situé à 5 m de l'échantillon. Aussi, même si le faisceau synchrotron est faiblement divergent, du fait de cette distance importante, l'épaisseur du faisceau à l'échantillon est 3.5% plus importante que l'épaisseur définie par les dernières lames de collimation. Cette différence est à prendre en compte pour régler la position des lames de collimation.

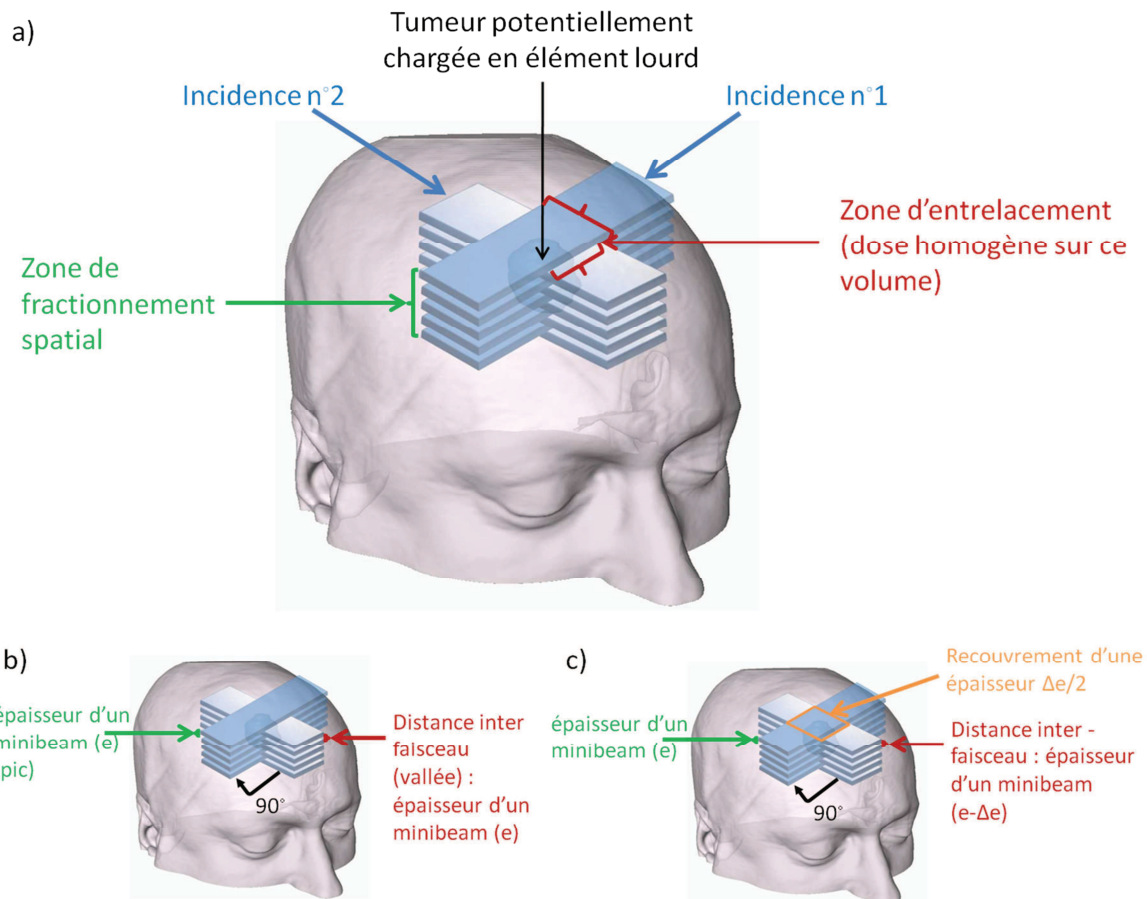


Figure 25 : Ces schémas sont des schémas de principe et les échelles ne sont pas respectées. a) principe général de l'irradiation par minifaisceau représenté dans le cas d'une tumeur cérébrale chez un patient après injection d'élément lourd au niveau de la tumeur. b) Cas idéal de la balistique : l'épaisseur d'un minifaisceau et la distance séparant deux minifaisceaux est identique. c) Condition à utiliser expérimentalement : une marge de sécurité est prise afin d'éviter des zones non irradiées en cas d'erreur moteur ou de mouvement du patient.

Dans le cas le plus simple, avec deux incidences d'irradiation, pour avoir une zone homogène au niveau du volume d'entrelacement, il faut respecter la condition présentée figure 25b, la distance entre deux faisceaux d'une incidence doit être égale à l'épaisseur d'un faisceau. Cette zone sera irradiée par un faisceau de l'incidence complémentaire. Si le volume tumoral est important, il peut être nécessaire d'utiliser 4 incidences, opposées 2 à 2, afin de compenser l'atténuation du faisceau en fonction de la profondeur.

En pratique, pour minimiser les erreurs de positionnements moteurs, on réalise :

- l'irradiation par un faisceau de l'incidence 1 est réalisée,
- puis une rotation de l'échantillon de 90 degrés,
- puis une translation verticale de l'épaisseur d'un faisceau,
- l'irradiation du faisceau par l'incidence 2.

Ensuite après une rotation de -90 degrés et une nouvelle translation verticale, on procède à l'irradiation du 2^{ème} faisceau de l'incidence 1, etc ... À chaque étage, le temps d'exposition de l'échantillon au faisceau est recalculé suivant le flux de photons incidents, qui est proportionnel au courant présent dans l'anneau de stockage du synchrotron.

En pratique les déplacements doivent être précis à quelques dizaines de microns près (proche de la limite théorique de déplacement des moteurs) et il est possible que le crâne de l'animal, bien que tenu par un cadre stéréotaxique, bouge de quelques microns durant l'irradiation. Ces mouvements et erreur de positionnement moteur pourraient générer un gap entre les

incidences et être responsable de la non irradiation directe d'un sous volume de la tumeur, entre les minifaisceaux de deux incidences. Ce volume serait donc sous irradié et laisserait potentiellement des cellules tumorales viables et pourrait provoquer ensuite une reprise de la croissance tumorale. Afin d'éviter ce problème, il a été choisi de réaliser un recouvrement de quelques micromètres (environ 10 microns, distance estimée supérieure aux erreurs de positionnement possible) entre deux faisceaux d'incidence différentes. Ainsi s'il y a une imprécision de positionnement de moteur ou un mouvement de l'échantillon, il n'y aura pas de volume non irradié dans le volume cible. Il y a donc par défaut un surdosage de quelques microns (une dizaine) à chaque translation verticale de l'échantillon (figure 25c). Ce surdosage est supposé bénin pour deux raisons. D'une part, ces fractions micrométriques de surdosage ont lieu dans la zone cible et non dans le tissu sain environnant. D'autre part, au vu des différentes études sur la thérapie par microfaisceaux, des « faisceaux » d'une ou deux dizaines de microns espacé d'environ 600 microns ne causent pas de dommage très importants aux doses considérées dans cette étude, qui reste très faibles par rapport à celles utilisées en thérapie par microfaisceaux (au moins un ordre de grandeur en dessous) (Serduc, de Looij et al. 2008; Serduc, Bouchet et al. 2009; Serduc, Brauer-Krisch et al. 2010). Cette gestion des marges d'erreur géométrique d'irradiation est une des principales limites de la technique des microbeams (MRT).

L'un des points essentiels de cette technique est la distribution de dose dans la partie fractionnée spatialement. Il est en effet nécessaire que la dose à la vallée (entre deux faisceaux) reste inférieure au seuil de tolérance du tissu sain (voir chapitre 1). La dose au pic elle doit être suffisamment importante pour apporter une dose conséquente à la zone cible. On définit ainsi le PVDR (*Peak to Valley Dose Ratio*) pour estimer l'intérêt de cette technique (rapport effet destructeur des cellules tumorales / effet protecteur du tissu sain). Une grande partie de l'étude dosimétrique qui suit porte sur ce point.

2.2 Dosimétrie Expérimentale :

2.2.1 Etat de l'art sur la dosimétrie expérimentale :

Il existe plusieurs méthodes de dosimétrie expérimentale pour les irradiations par rayons X en radiothérapie. Elles se définissent en particulier selon leurs dimensions d'acquisitions (ponctuelles, planes ou volumiques).

1D : Les chambres d'ionisations

Les chambres d'ionisations constituent la méthode de référence pour effectuer la dosimétrie. C'est d'ailleurs la principale méthode utilisée en clinique. Les chambres permettent une mesure ponctuelle de la dose absolue (grâce à une calibration réalisée au préalable). Si elles constituent toujours la méthode de prédilection pour effectuer des mesures, elles présentent néanmoins quelques inconvénients.

Tout d'abord le fait de ne pouvoir effectuer que des mesures ponctuelles est très limitant au vu des nouvelles techniques de radiothérapie présentant d'importants gradients de dose et des volumes de distribution de dose complexes. Il faudrait effectuer un nombre de mesures assez important pour vérifier la dosimétrie de ces techniques de radiothérapie en 3D. De plus la plupart des chambres d'ionisation perturbent le faisceau. Il n'est pas possible de réaliser plusieurs mesures à la fois. Il peut être également délicat de les insérer dans un fantôme de forme « réaliste » contrairement aux autres méthodes de dosimétrie présentées dans la suite. Seul des fantômes

spécialement prévus pour peuvent être utilisés. De plus si le faisceau est plus petit que la chambre, les mesures ne sont plus fiables, ce qui limite leur utilisation aux faisceaux macroscopiques ($> 2 \times 2 \text{ cm}^2$).

Dans cette thèse, pour effectuer la dosimétrie absolue, une chambre d'ionisation PTW 23331 d'un volume actif de 1 cm^3 , provenant de PTW (Freiburg, Allemagne) a été utilisée et lue par un électromètre Unidos (calibrés ensemble). Cette chambre fonctionne aux basses énergies telles que celles que nous utilisons (80 keV).

Dans le cas de la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT) ou par minifaisceaux, l'épaisseur du faisceau d'irradiation est plus faible que la hauteur de la chambre. Hors pour effectuer la mesure, tout le volume de la chambre doit être irradié. Pour compenser la faible épaisseur du faisceau, on réalise un balayage vertical du fantôme contenant la chambre devant le faisceau. L'équivalence entre l'irradiation par un faisceau fin balayé et l'irradiation par un faisceau équivalent grand et homogène est décrite par Prezado *et al.* dans la description du protocole de dosimétrie pour les essais cliniques au synchrotron en SSRT (Prezado, Vautrin et al. 2011).

Le débit de dose mesurée par la chambre à l'endroit où sera l'échantillon est alors estimé d'après la formule suivante :

$$\dot{D}(x_0, y_0, z_0) = \frac{e_{\text{faisceau}}}{Vz_{\text{faisceau}}} \frac{1}{I} \frac{(\mu_{en}/\rho)_{\text{eau},E}}{(\mu_{en}/\rho)_{\text{air},E}} D(x_0, y_0, z_0) \text{ avec } \dot{D}(x_0, y_0, z_0) \text{ en Gy/mA/s}$$

Avec :

- e_{faisceau} , l'épaisseur du faisceau en mm (dans le cas d'une irradiation minifaisceau environ 0.6 mm).
- Vz_{faisceau} la vitesse de balayage verticale de la chambre en mm/s. I le courant de l'anneau en mA (le débit de photons arrivant sur l'échantillon est proportionnel au courant de l'anneau représentant le nombre d'électron dans l'anneau d'insertion du synchrotron).
- $(\mu_{en}/\rho)_{\text{matériau},E}$ les coefficients d'absorption massique de l'eau et de l'air à l'énergie utilisée en cm^2/g (dans cette thèse, l'énergie d'irradiation est de 80 keV).
- $D(x_0, y_0, z_0)$ la dose en Gy au point de mesure lue sur l'électromètre après correction de la température et pression de l'air ambiant.

On obtient donc $\dot{D}(x_0, y_0, z_0)$ le débit de dose en ce point qui nous servira à calculer le temps d'exposition nécessaire pour distribuer la dose voulue à l'échantillon.

Il est important de garder en mémoire que cette méthode ne permet de mesurer la dose que pour des grands champs. Si on veut obtenir la dose dans un minifaisceau à partir d'une dose de référence mesurée dans un grand champ, il faudra avoir recours à de la modélisation et introduire un coefficient de correction.

2D : Les films radiochromiques

Les films radiochromiques permettent des mesures relatives de la dose en 2D (Butson, Yu et al. 2003; Soares 2006). Ils sont constitués de molécules monomères qui polymérisent lorsqu'elles subissent un rayonnement ionisant. Une fois polymérisées, leur densité optique change. C'est cette densité optique qui va être mesurée afin d'estimer la dose reçue. Pour lire cette densité optique, il est possible d'utiliser soit des scanners hautes résolutions « pour la photo », soit des scanners spécialement conçus pour cette application dont la principale différence est que la lumière émise par

la source est à faible bande passante autour du pic d'absorption du film. Cette méthode de dosimétrie nécessite une calibration. Un jeu de film doit être irradié à différentes doses dans une configuration proche de celle que l'on souhaite étudier. Tous les films doivent être irradiés dans la même orientation et une marge importante de film doit être prise autour de la zone cible, marge qui ne sera pas irradié (quelques centimètres). Grâce à ces films, on peut obtenir la forme du faisceau sur un plan et donc obtenir les profils d'intensités dans les deux directions, l'homogénéité du faisceau sur ce plan, alors que les chambres d'ionisation ne permettent que de mesurer la valeur en un point. On peut donc observer la forme de la distribution de dose suivant une coupe réalisée en positionnant le film où on le souhaite par rapport à l'échantillon pendant l'irradiation de l'échantillon. En effet, ces films sont constitués de matériaux de numéro atomique $Z_{\text{équivalent}} \approx 7$ similaire à celui des tissus biologiques. Ils ont donc une réponse dosimétrique équivalente aux tissus biologiques et ne perturbent que très peu le faisceau (ils ne font que quelques centaines de micromètres d'épaisseur). Vu leur faible épaisseur et le fait qu'ils ne perturbent que très peu le faisceau, ils peuvent facilement être insérés dans tout type de fantôme et ainsi proposer une dosimétrie très complète (Prezado, Martinez-Rovira et al. 2011).

Dans le cadre de cette thèse, les films radiochromiques utilisés sont les Gafchromic® type MD 55 (ISP Technologies Inc., NJ, Etats-Unis). Ils ne sont utilisés que dans un but d'évaluation de la géométrie d'irradiation, et non de dosimétrie quantitative. Lors d'une irradiation ils sont disposés sur le moteur permettant le déplacement de l'échantillon et servent à vérifier que lors d'un déplacement vertical, pour passer d'un minifaisceau au suivant, il y a bien une légère superposition des deux faisceaux afin d'être sûr d'éviter qu'il y ait des zones sous irradiées.

3D : Les gels polymères

Les polymères radiosensibles sont la seule méthode de dosimétrie expérimentale 3D (Baldock, De Deene et al. 2010). Des matrices de diodes orthogonales sont parfois utilisées pour faire de la dosimétrie en fausse 3D (Sadagopan, Bencomo et al. 2009). La plupart des polymères sont sous forme de gels et permettent une dosimétrie relative comme les films radiochromiques (il existe aussi un polymère radiosensible solide : PRESAGE®, mais celui-ci est encore peu utilisé (Rahman, Braeuer-Krisch et al. 2011)). Une calibration est nécessaire pour remonter à la dose absolue. Il existe de nombreux types de gels polymères, et de nombreuses méthodes de lecture après irradiation pour remonter à la dose qu'ils ont reçus. Cette méthode est encore très peu utilisée en clinique contrairement aux chambres d'ionisations et aux films radiochromiques, en raison des difficultés de lecture des gels. Pourtant ils permettent d'évaluer la distribution exacte de la dose, et on peut leur donner n'importe quelle forme (si l'on dispose du contenant adapté). Ces gels sont « équivalents » tissus pour la plupart d'entre eux, car constitués majoritairement d'eau. L'avantage des gels polymères pour la radiothérapie synchrotron est aussi la possibilité d'y ajouter un agent radiosensibilisant tel qu'un élément lourd pour observer le renforcement de dose avec les méthodes d'irradiation SSRT et minifaisceaux (Boudou, Tropes et al. 2007; Gastaldo, Boudou et al. 2008). Tout comme les films radiochromiques, le fonctionnement des gels dosimétriques repose sur la polymérisation d'un composé chimique soumis à un rayonnement ionisant. Cette polymérisation change la densité du gel. Ce qui rend possible une lecture par tomодensitométrie par rayon-X (Hilts, Jirasek et al. 2005). Cependant cette modification de densité reste faible et donc ce n'est pas le meilleur moyen de lecture. Les deux méthodes de lecture qui semblent les plus adaptées sont la tomographie optique et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). La polymérisation opacifie le gel proportionnellement à la dose reçue (jusqu'à saturation, dans le cas des gels utilisés dans cette thèse, ils deviennent blanc) et modifie donc leur densité optique (Gore, Ranade et al. 1996;

Maryanski, Zastavker et al. 1996; Lopatiuk-Tirpak, Langen et al. 2008). De plus la polymérisation rigidifie le gel et donc limite la mobilité des protons présents. Ce qui se traduit par une diminution du temps de relaxation transverse (T_2). On observe que l'inverse du T_2 (le R_2) est proportionnel à la dose déposée.

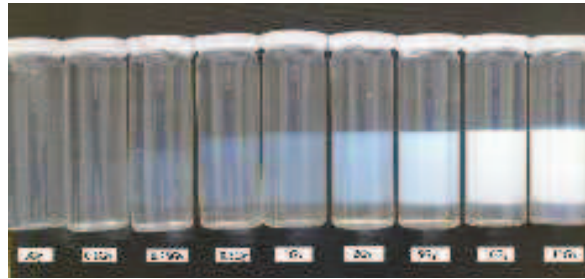


Figure 26 : Exemple de gels polymériques nPAG irradié à différentes dose (de gauche à droite des doses de plus en plus fortes) afin d'effectuer une calibration. Travaux de Florence Taupin durant son stage dans l'équipe sur l'amélioration du lecteur de gels par tomographie optique : CT Octopus™.

Si la lecture par tomographie optique semble plus appropriée (plus sensible, moins couteuse en temps et en argent), elle n'est pas encore bien développée actuellement. De nombreux essais ont été faits sur le lecteur optique CT Octopus™ (développé par Maryanski *et al.*), des modifications ont été apportées, mais aucune image correcte de la distribution de dose n'a pu être obtenue dans les conditions d'expérimentations. La limite principale semble notamment être le faible volume de gel que nous utilisons pour des raisons de coût, de temps d'irradiation, et parce que l'on souhaite que le volume soit proche de celui d'un cerveau de rat. Le volume est faible, et le contenant est cylindrique (obligatoire pour le lecteur optique), la paroi a alors un rayon de courbure important. De ce fait, les phénomènes de réfractions sur la paroi en verre semblent trop importants pour la tomographie optique, il vaut mieux avoir un gros tube si on veut éviter ce problème. Les phénomènes de diffusion sont également très importants et sont une limitation à la tomographie optique. Sur la figure ci-dessous est représenté un cas d'irradiation par 2 ports sur un tube de grand diamètre (16 cm) contenant un gel nPAG (dans le cadre de la mise en place du traitement de planning pour l'irradiation de patient en mode SSRT, travaux de Mathias Vautrin) (figure 27a). Il est aussi représenté un cas d'irradiation minifaisceau sur un tube de faible diamètre (2.8 cm) contenant un gel nPAG (dans le cadre des travaux sur la mise en place de la dosimétrie minifaisceau) (figure 27b). Les formes cubiques du volume irradié par minifaisceau n'ont jamais pu être retrouvées avec cette méthode de fait de la déformation géométrique trop importante. Il en est de même avec le fractionnement spatial, de longues lignes droites rapprochées d'indices optiques différents (effet guide d'onde) posent des problèmes de réflexion optique.

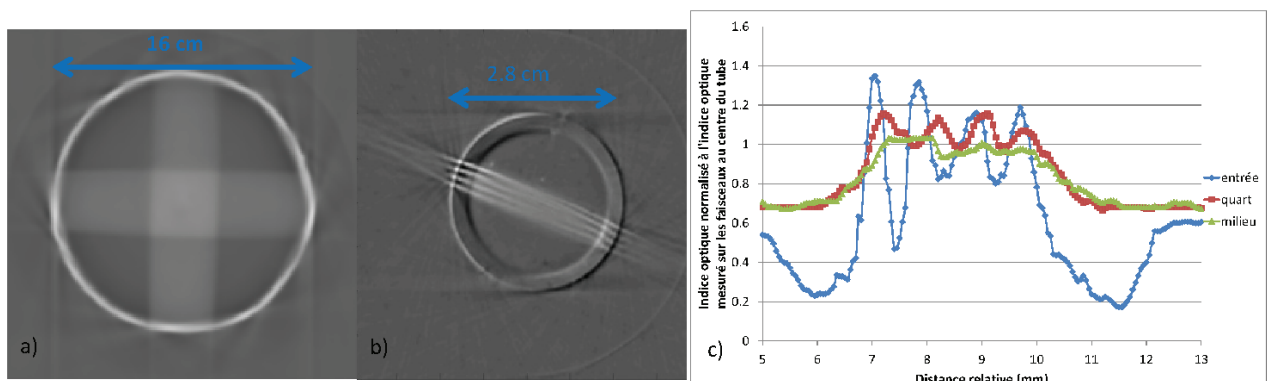
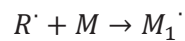


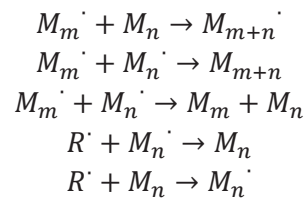
Figure 27 : Gros tube vs Petit tube : l'imagerie par tomographie optique fonctionne mieux sur des tubes de diamètres importants. Gels dosimétriques lus par tomographie optique dans des récipients de différentes tailles a) 16 cm de diamètre b) 2.8 cm de diamètre. Les artefacts entre les minifaisceaux sur la figure b sont trop importants pour effectuer une mesure correcte.

La lecture par IRM a donc été privilégiée. Comme écrit précédemment, la lecture repose sur l'acquisition d'une carte T_2 (et non d'une carte pondérée T_2 ou T_2^* comme c'est souvent le cas en imagerie clinique). Le T_2 quantitatif permet de compenser les inhomogénéités de champ B_0 et B_1 et de sensibilité des antennes suivant le placement du voxel dans le volume. De ce fait la séquence utilisée est une séquence en écho de spin. La figure 28 décrit l'acquisition de données par IRM pour la lecture du gel.

Il existe plusieurs types de gels polymères. Ils sont référencés en grande partie par Baldock et al. (Baldock, De Deene et al. 2010). Celui utilisé dans l'équipe et pour cette étude est le gel nPAG (*normoxic PolyAcrylamide Gelatin*). Sous l'effet de l'irradiation, une radiolyse de l'eau (constituant majoritaire du gel) produit des radicaux libres se déplaçant suivant un mouvement Brownien. Ils se recombinaient alors avec d'autres molécules provoquant une phase de polymérisation. Lors de la phase de polymérisation, les radicaux libres, l'oxygène et les polymères sont en compétition comme décrit par les équations chimiques suivantes :



M est un monomère, R^\cdot un radical libre et M_i^\cdot d'une chaîne polymère après la i ème réaction (à l'étape 1, M_i^\cdot est encore un monomère). La liste des réactions possibles est alors :



Durant ces réactions, l'oxygène est en compétition avec les monomères pour la réduction des radicaux libres. Ainsi, s'il y a présence d'oxygène, le gel ne polymérisera pas assez pour que la dose puisse être lisible après irradiation. Pour limiter l'influence de l'oxygène on ajoute du *Tetrakis Hydroxymethyl Phosphonium Chloride* (THPC) à la fin de la préparation. Le THPC va lier préférentiellement l'oxygène, l'empêchant de se lier avec les monomères. De Deene *et al.* ont étudié différents anti-oxydants avant de sélectionner le THPC (De Deene, Hurley et al. 2002). De plus ce composant densifie le gel et diminue donc le mouvement brownien des molécules et donc la diffusion des monomères/polymères dans le gel (Jirasek, Hilts et al. 2006). Ceci est un effet secondaire qui est intéressant pour améliorer la «résolution spatiale» du gel. En effet, la diffusion des polymères après irradiation seraient une limite considérable pour la résolution spatiale puisque qu'une zone irradiée pourraient «s'étendre» au cours du temps (et diminuer en intensité) du fait de cette diffusion. Lors des expériences sur gel réalisées au cours de ce travail, aucun phénomène de diffusion n'a été observé. Le temps entre l'irradiation et la lecture de l'échantillon étant peu important si le gel est conservé dans de bonnes conditions. Il faut notamment que la température ambiante ne soit pas trop élevée, elle augmente la diffusion des polymères. S'il n'a pas été étudié l'influence de la température de conservation, on n'observe aucun problème de conservation du gel lorsque celui-ci est stocké à température ambiante fixée autour de 20 degré Celsius.

L'avantage de ce gel par rapport à d'autres est notamment sa facilité de fabrication. Elle nécessite seulement quelques précautions simples du fait de l'utilisation de produit faiblement toxiques tel que l'acrylamide en solution et le THPC. Son seul inconvénient est donc sa sensibilité à l'oxygène, qui nécessite l'ajout de Tetrakis hydroxymethyl phosphonium chloride à la fin de la préparation, et son stockage avant utilisation et utilisation dans un récipient imperméable à

l'oxygène. L'oxygénation du gel post-irradiation n'est par contre aucunement problématique, au contraire, elle peut même protéger le gel d'autres sources de rayonnement tel que la lumière ou une lecture par tomodensitométrie par rayons X.

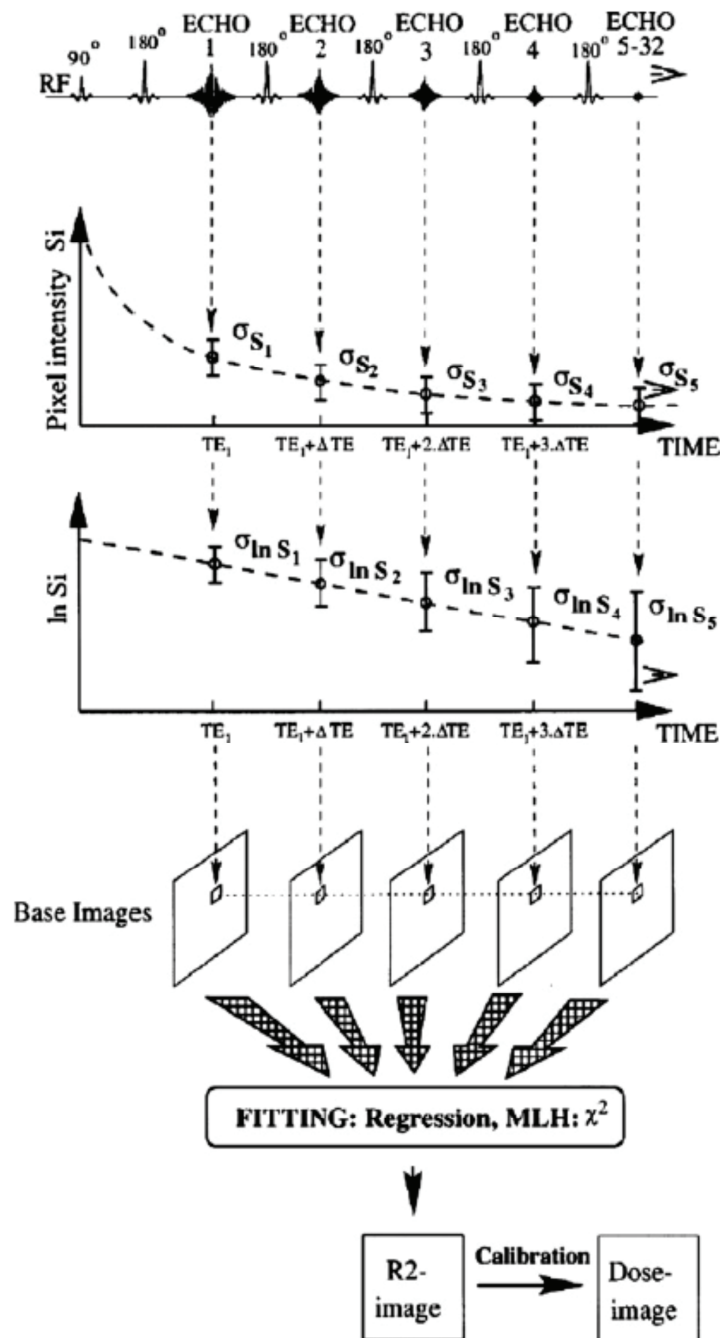


Figure 28 : Figure d'après De Deene *et al.* (De Deene, Van de Walle et al. 1998). Construction du R_2 grâce à une séquence IRM utilisant de multiple écho de spin pour calculer le T_2 , puis son inverse, le R_2 et ainsi obtenir une carte de dose. La calibration est nécessaire si l'on souhaite avoir la valeur de la dose. Sinon on ne peut travailler qu'en relatif.

2.2.2 Etude Réalisée :

Cette étude a pour but d'être confrontée à la dosimétrie Monte Carlo présentée dans le paragraphe 2.3. Cette sous-partie ne comprend donc que le matériel et méthode, les résultats sont associés avec ceux de la dosimétrie Monte Carlo. Cette étude a donc été réalisée sur des gels nPAG lus sur un IRM 4.7 T de la plate-forme IRM de l'institut des neurosciences.

La composition du gel est la suivante :

- Acrylamide : 3%
- N,N'-Méthylène-bis-acrylamide : 3%
- Gélatine porcine : 5%
- Tetrakis Hydroxymethyl phosphonium chloride : 5 mmol.l⁻¹

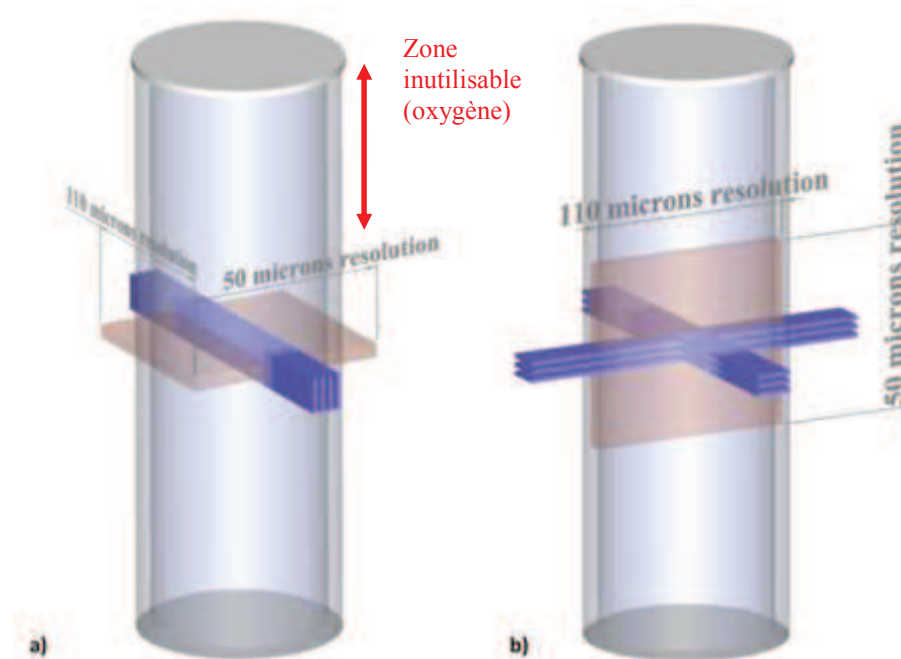


Figure 29 : Géométrie d'irradiation (en bleu) et disposition des coupes IRM sur les gels de dosimétrie (en marron). La résolution maximum de la cartographie T2 (50 μm) a été choisie dans le sens perpendiculaire à l'épaisseur des minifaisceaux pour pouvoir en mesurer précisément le profil. A) irradiation avec une seule incidence. B) Irradiation avec deux incidences et entrelacement au centre du tube. Dans les deux cas les faisceaux mesurent 620 μm d'épaisseur et sont espacés de 600 μm . Ils mesurent 5 mm de large.

La préparation exacte est décrite dans la publication de Boudou *et al.* (Boudou, Tropres et al. 2007). Les gels sont coulés entre 24 et 48 heures avant irradiation dans des tubes de 2.8 cm de diamètre et de 8 cm de haut. Ils sont en verre afin d'éviter l'oxygénation du gel. Le capuchon est en plastique, de ce fait une partie du haut du gel est polluée par l'oxygène et inutilisable pour la mesure de dose. Une marge de 3 ou 4 cm entre le bouchon et la zone irradiée est prise pour éviter tout problème du fait de l'oxygénation. Les gels sont emballés dans une feuille d'aluminium opaque afin de les protéger de la lumière et sont conservés à une température autour de 20 degrés Celsius.

L'IRM utilisé (Bruker Biospec 47/40 USR AV III, système de gradient activement blindé sur 12 cm de diamètre (670 mT.m⁻¹ en 115 μs)) est dédié aux petits animaux et fantômes. Il y a donc une très bonne homogénéité du champ magnétique dans le volume étudié. L'émission et la réception ont été réalisées par une antenne volumique quadratique. La séquence utilisée est appelée MSME (*Multi-Slice Multi-Echo*). 16 échos sont réalisés de 20 à 320 ms (un toutes les 20 ms), le temps de répétition TR est de 3100 ms. 64 accumulations sont faites afin d'avoir un rapport signal sur bruit suffisant. La matrice d'acquisition est de 256 x 512 x 1 afin d'avoir une résolution spatiale de 0.11 x

0.05 x 2 mm³. La disposition de la matrice sur les tubes de gels dosimétrique est représentée sur la figure précédente et a été choisi afin d'avoir le maximum de résolution suivant la direction perpendiculaire à l'épaisseur du faisceau pour en mesurer son profil le plus précisément possible. Le temps d'acquisition est de 10h34, auquel il faut rajouter le temps pour le réglage de l'homogénéité du champ magnétique et le temps de positionnement du tube. Une dose de 12 Gy a été prescrite à 1 cm de profondeur, délivrée par un faisceau de 80 keV. La lecture a été réalisée, selon la disponibilité de l'IRM, 15 et 50 jours après irradiation pour les protocoles une et deux incidences respectivement.

- Irradiation une incidence (4 minifaisceaux de 620 µm d'épaisseur, 5 mm de haut, espacés de 600 µm) : afin de mesurer le rendement de dose en profondeur (PDD pour *Percentage Depth Dose*) et les profils latéraux de la distribution de dose, dans le but d'étudier la distribution de dose dans la vallée (zone de pénombre) et la largeur à mi-hauteur des faisceaux. (figure 29a).
- Irradiation deux incidences (2 x 3 minifaisceaux de 620 µm d'épaisseur, 5 mm de large, espacés de 600 µm) : afin d'étudier la faisabilité de l'entrelacement et réaliser une dose homogène sur un volume de 5 x 5 x 3.6 mm³. (figure 29b).

Une fois la carte T_2 obtenue, le $R_2 = 1/T_2$ a été calculé. Une ROI a été réalisé dans une zone loin de l'irradiation puis sa valeur moyenne a été soustraite à l'ensemble de la matrice pour que la valeur 0 s^{-1} corresponde à la valeur 0 Gy. La matrice a ensuite été normalisée par la valeur moyenne d'une ROI (3x3 voxels) réalisée à 1 cm de profondeur au centre du deuxième minifaisceau en partant de la gauche dans le cas de l'irradiation unidirectionnelle. Et dans le cas de l'irradiation bidirectionnelle, la normalisation a été effectuée par la valeur moyenne d'une ROI (3x3 voxels) située au centre de la zone d'entrelacement.

Les mesures ont ensuite été réalisées de la façon suivante :

- Irradiation unidirectionnelle : Une moyenne sur 7 voxels a été réalisée dans la direction perpendiculaire aux faisceaux, donnant des ROI de 0.11 x 0.35 x 2 mm³.
- Irradiation bidirectionnel : Une moyenne sur 10 voxels dans le sens de la profondeur a été réalisée, donnant des ROI de 1.1 x 0.05 x 2 mm³.

Les incertitudes sont alors définies comme une fois l'écart-type sur la ROI.

2.3 Dosimétrie Monte Carlo :

2.3.1 Description :

La simulation Monte Carlo est un procédé utilisé pour simuler le résultat de phénomènes aléatoires, probabilistes. Dans le cas de la radiothérapie, le transport de particules à travers la matière est couramment simulé par la méthode de Monte Carlo. Une source (géométrie, nature du rayonnement) est définie, générant des particules dont le déplacement est simulé dans une géométrie définie par l'utilisateur. Chaque particule subit donc de manière aléatoire des interactions avec la matière tout en respectant les sections efficaces de chaque interaction. Ces interactions sont décrites dans le paragraphe 1.1 pour les particules nous concernant (photons d'énergie inférieur à 80 keV et électrons générés par les interactions photons/matière). Ces interactions sont décrites plus amplement dans la thèse de Magali Edouard (Edouard 2010). Afin de pouvoir décrire correctement les interactions dans le calcul Monte Carlo, il faut disposer des probabilités d'occurrence de chaque interaction, appelées sections efficaces, pour les matériaux et les différentes particules considérés. C'est cette connaissance des sections efficaces qui est en général la limite de la méthode Monte Carlo. Elles sont par exemple mal connues pour les faibles énergies (en dessous de 1 keV). De ce fait, et pour ne pas simuler plus d'interactions que nécessaire (temps de calcul trop long), une énergie d'absorption est utilisée dans le code, pour les électrons et pour les photons. Cette énergie

d'absorption correspond à l'énergie à partir de laquelle on arrête de simuler les interactions de la particule et on considère que toute son énergie est déposée localement. Elle est classiquement fixée à 1 keV pour les photons et électrons.

La grandeur que l'on souhaite obtenir en résultat de cette simulation est une énergie déposée par photon émis par la source dans un volume donné. Pour avoir une estimation correcte, avec une erreur statistique faible, il faut un grand nombre de particules N . L'incertitude statistique décroît proportionnellement à $1/\sqrt{N}$.

Afin d'optimiser le temps de calcul, qui peut être très long, le code Penelope définit des paramètres en plus des énergies d'absorption conditionnant le calcul. L'algorithme de Penelope utilise un procédé de simulation mixte définissant deux types d'interactions : les interactions dites « molles » et celles dites « dures ». Les interactions molles sont caractérisées par une faible déviation angulaire et une faible perte d'énergie. Elles sont réunies et traitées de manière groupée. Les interactions dures sont simulées en détail. L'effet global d'un nombre suffisant d'évènements mous entre deux évènements durs est simulé par une approche dite de diffusion multiple. Les paramètres suivants permettent de définir la séparation entre les évènements durs et mous et de les conditionner :

- **C_1** : c'est un indice relatif qui détermine la déviation angulaire moyenne entre deux évènements de diffusion élastique considérés comme « durs » (déviation due à tous les évènements « mous »). Le choix de la valeur se fait entre 0 et 0.2. 0 signifie que la simulation est entièrement détaillée. 0.2 correspond à une déviation angulaire moyenne de 37 degrés après un déplacement égal au parcours moyen entre deux évènements de diffusion élastique dur.
- **C_2** : c'est la fraction d'énergie moyenne que les particules peuvent perdre au maximum entre deux évènements élastiques considérés comme « durs ». Tout comme C_1 , la valeur doit être comprise entre 0 et 0.2.
- **W_{cc} (en eV)** : c'est le seuil de perte d'énergie à partir duquel une collision inélastique est considérée comme dure.
- **W_{cr} (en eV)** : c'est le seuil à partir duquel l'émission de rayonnement de freinage est considérée comme dure.
- **s_{max}** : c'est la distance maximale pouvant être parcourue entre deux évènements durs. Elle est donnée pour chaque élément de la géométrie de simulation. Une des conditions pour que l'algorithme de simulation mixte soit fiable est la présence d'un grand nombre d'évènements mous par trajectoire dans un élément de la géométrie (au moins 10 évènements). Afin de s'assurer de cette condition s_{max} est choisit à 1/10 de l'épaisseur de l'élément.

Ces valeurs sont surtout à prendre en compte lors de simulation à de très petites échelles, microdosimétrie ou nanodosimétrie. Dans le cas de cette thèse, les tailles de bins (les éléments volumiques constituant la géométrie dans lesquels sont comptés les dépôts d'énergie) sont proches des tailles classiques utilisées en dosimétrie pour la radiothérapie conventionnelle. Ces paramètres

seront choisis aux mêmes valeurs que celle de la littérature pour des simulations d'irradiation cliniques.

2.3.2 Etude Réalisée :

La dosimétrie Monte Carlo a été réalisée sous Penelope (Penelope 2006 code systm : (Salvat, Fernández-Varea et al. 2006)). Les détails du code sont présentés dans la thèse de Mathias Vautrin (Vautrin 2011). Les énergies d'absorption ont été définies à 1 keV pour les photons et les électrons. Les matériaux air, eau et verre sont ceux prédéfinis dans Penelope (Salvat, Fernández-Varea et al. 2006). Les valeurs de C_1 et C_2 ont été définies à 0.1 et celles de W_{cc} et W_{cr} à 1 keV. Les calculs ont été réalisés afin que l'incertitude statistique à 3σ soit d'environ 2 % dans les bins correspondant aux doses aux pics (dose maximum, au centre des faisceaux). La source est constituée de faisceaux non divergents de photons de 80 keV, mesurant $0.6 \times 5 \text{ mm}^2$ chacun, séparés par 0.6 mm.

Recouplement avec la dosimétrie expérimentale :

La première partie de l'étude Monte Carlo consiste en une confrontation avec la dosimétrie expérimentale sur gel afin de valider la distribution de dose de deux manières différentes, une théorique et une « réelle ». Pour cela, une première géométrie d'irradiation modélisée sur Penelope a été la géométrie des tubes de verres contenant les gels (figure 29). Le gel a été considéré équivalent à de l'eau pour cette étude, l'eau étant son constituant majoritaire. Pour la simulation de l'irradiation avec une seule incidence, la dose a été enregistrée dans une grille de $99 \times 99 \times 99$ bins sur un volume de $6 \times 6 \times 50 \text{ mm}^3$. La résolution spatiale est donc de $60.6 \times 60.6 \times 505 \text{ }\mu\text{m}^3$. Le rendement de dose en profondeurs (PDD, pour *Percentage Depth Dose*) et les profils de dose (avec calcul du PVDR (peak to valley dose ratio)) ont été calculés. Le PDD a été mesuré sur le deuxième minifaisceau en partant de la gauche. Les valeurs ont été normalisées à 1 cm de profondeur, comme pour les mesures sur gels. Ceci correspond à peu près à la position de l'isocentre de la tumeur sur les études chez le rat. Les normalisations ont été effectuées sur des ROI de $3 \times 3 \times 3$ pixels sur l'un des minifaisceaux centraux.

Concernant la simulation de l'entrelacement, la grille d'enregistrement était constituée de $100 \times 100 \times 100$ bins sur un volume de $6 \times 6 \times 6 \text{ mm}^3$, donc une résolution spatiale de $60 \times 60 \times 60 \text{ }\mu\text{m}^3$. Les bins ont été ré-échantillonnés dans les directions orthogonales à celle du profil sur 33×18 voxel afin d'avoir une résolution de $60 \times 1980 \times 1080 \text{ }\mu\text{m}^3$, proche de celle des mesures IRM des gels de dosimétrie. Une normalisation a été effectuée par la moyenne de 3 pixels à l'isocentre de l'entrelacement. Les profils de dose perpendiculaire aux faisceaux ont été évalués et comparés aux mesures sur gels de dosimétrie.

Une autre géométrie a été modélisée afin d'étudier plus en détail les rapports de la dose dans l'axe des faisceaux à la dose dans les vallées (entre les faisceaux), constituant le PVDR, puisque c'est le paramètre clé de la technique d'irradiation par minifaisceaux. Elle est présentée sur la figure 30a. Elle consiste en une couche de 1 mm de verre suivi de 30 cm d'eau, le tout entouré d'air. Le PVDR a été évalué en fonction de la profondeur, et pour différents nombres de faisceaux incidents (2, 4, 8, 16, 32). Les doses ont été enregistrées sur des grilles de $9 \times 9 \times 9$ bins et sur un volume de $6 \times 6 \times 50 \text{ mm}^3$, obtenant ainsi une résolution de $60.6 \times 60.6 \times 505 \text{ }\mu\text{m}^3$. Les doses ont été normalisées à 1 cm de profondeur par une moyenne sur $3 \times 3 \times 3$ pixels, mesurée au centre de l'un des faisceaux centraux. Les PVDR ont été calculés en faisant le rapport de la moyenne d'un des pics centraux ($3 \times 3 \times 3$ pixels) et la moyenne d'une des vallées aux centres ($3 \times 3 \times 3$ pixels) à la même profondeur. Pour

l'étude avec 4 minifaisceaux incidents, les calculs ont été réalisés avec plus de photons primaires, permettant de ne pas avoir à moyenniser et donc d'avoir une meilleure résolution spatiale. Pour cette simulation, la normalisation a été faite sur une ROI de 3 pixels dans la direction verticale.

Dosimétrie absolue en vue d'une irradiation cérébrale du rat :

Les études précédentes permettent de comprendre l'évolution des faisceaux en fonction de l'irradiation et de la quantité de matière traversée. Elles ne permettent pas cependant d'estimer la dose absolue délivrée lors d'une irradiation préclinique, à partir des mesures que l'on est capable d'effectuer par chambre d'ionisation en faisceau large. Une étude dosimétrique a donc été réalisée à cet effet. Les géométries modélisées sous Penelope sont représentées figure 30 b, c et d. La dose distribuée par un faisceau sur une couche d'eau semi-infinie de 1 mm d'épaisseur est simulée dans trois conditions : 1) un faisceau non divergent de $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$ sur la couche d'eau, 2) un minifaisceau non divergent de $0.6 \times 5 \text{ mm}^2$ sur la couche d'eau et 3) un minifaisceau sur la couche d'eau derrière laquelle est un volume d'eau de $2.5 \times 2.5 \times 2.5 \text{ cm}^3$ est présent. Tous les volumes sont entourés d'air pour assurer l'équilibre électronique. Le temps de simulation a été maintenu constant pour les trois études ($4.5 \times 10^4 \text{ s}$), ce qui correspond à un nombre de photon initial de 2.4×10^{10} , 2.45×10^{10} , 1.9×10^9 pour les conditions 1, 2 et 3 respectivement. Les doses normalisées par la fluence incidente sont enregistrées sur l'axe du faisceau au niveau de la couche d'eau semi-infinie (voxel de $0.05 \times 0.05 \times 1 \text{ mm}^3$) et valent 1924 ± 525 , 1925 ± 39 , $1929 \pm 141 \text{ (eV cm}^2\text{)/(g primary)}$ pour les 3 conditions respectivement. La variation relative de dose en fonction de la profondeur (PDD) a aussi été mesurée pour le cas 3 (volume d'eau derrière la couche d'eau). Aucune différence n'est donc observée entre les trois conditions, et ceci s'explique par le fait fait que l'échantillon est situé 5 m après les lames de collimations et qu'il n'y a donc pas d'influence de particules diffusées par ces lames. La rétro diffusion est également négligeable. Ces résultats sont cohérents avec le fait que lorsque les champs d'irradiation sont de petite taille, la dose n'est due quasiment qu'au rayonnement primaire et est indépendante du diffusé.

On peut ainsi relier la dose en entrée dans un faisceau large telle que mesurée par la chambre d'ionisation (cas 1) à la dose en entrée dans un minifaisceau (cas 2) et à la dose prescrite (cas 3).

La dose prescrite (à 1 cm) est donc calculée grâce au débit de dose dans l'eau mesuré par la chambre d'ionisation multiplié par le PDD à 1 cm (calculé à 0.835) et multiplié par un facteur de correction de l'hétérogénéité du cerveau (présence d'1 mm d'os du crâne) valant 0.99 (calculé à partir des données du NIST).

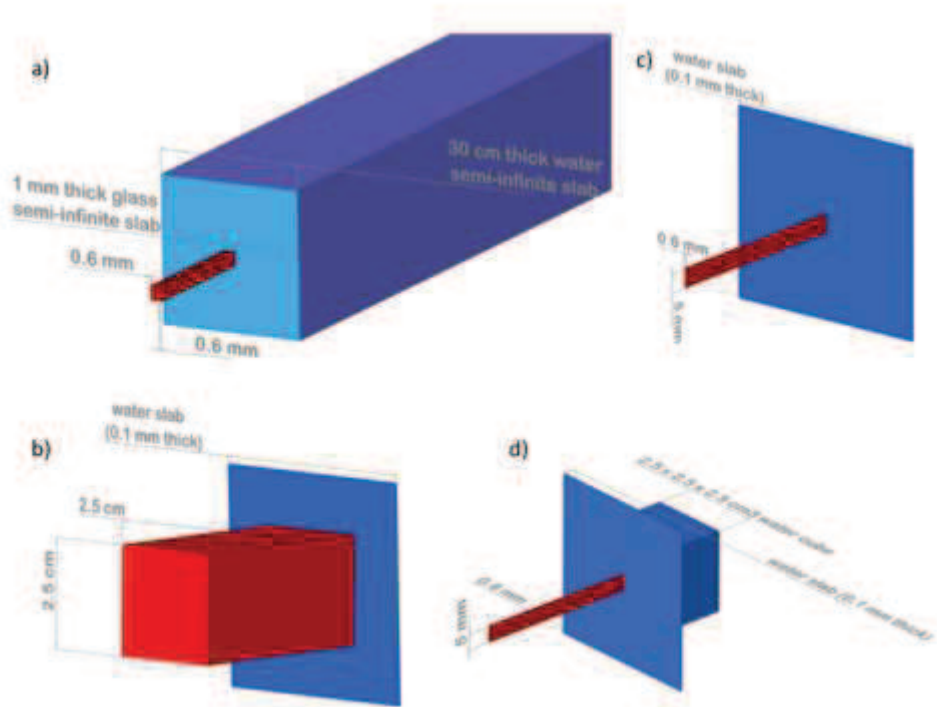


Figure 30 : Figure d'après Deman *et al.* (Deman, Vautrin *et al.* 2011). Géométrie des volumes irradiés et sources incidentes des différentes simulations Monte Carlo réalisées sous Penelope. a) 4 minifaisceaux sur une cuve à eau (pour la mesure des profils de faisceaux), b) un faisceau large sur une couche d'eau, c) un minifaisceau sur une couche d'eau, un minifaisceau sur une couche d'eau suivi d'un volume d'eau correspondant approximativement à une tête de rat.

2.4 Résultats :

Les PDD obtenus par simulation Monte Carlo et par mesure des gels de dosimétrie ne sont pas significativement différents d'après un test de Student (conditions : bidirectionnel, séries indépendantes, non appariées) : $t = 0.164$ et $p = 0.87$ (figure 31).

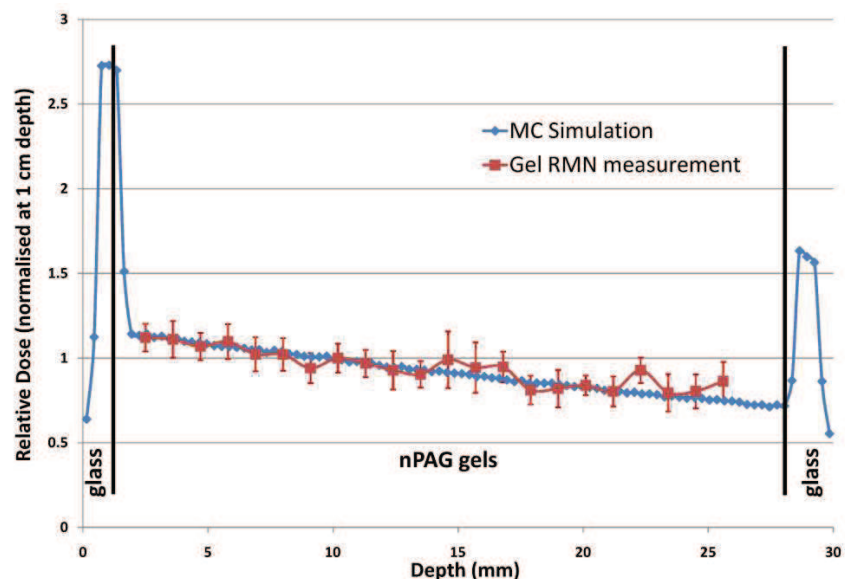


Figure 31 : Rendement en profondeur normalisé à 1 cm mesuré sur les gels de dosimétrie (rouge) et calculé par simulation Monte Carlo.

Ce résultat valide l'utilisation des gels nPAG pour la dosimétrie des minifaisceaux monochromatiques. Le PDD obtenu avec la simulation Monte Carlo a été ajusté par une loi

exponentielle (du premier point après le verre au dernier point avant l'autre paroi du verre). Le résultat de l'ajustement est :

$PDD(z) = A \cdot \exp(-B \cdot z)$ avec $A = 1.199 \pm 0.006$ et $B = 0.183 \pm 0.003 \text{ cm}^{-1}$. Le χ^2 normalisé par le degré de liberté est assez bon malgré les barres d'erreurs importantes et vaut 10.4/46. On retrouve la loi d'atténuation de Beer-Lambert dont le coefficient d'atténuation linéique de l'eau à 80 keV vaut théoriquement : $\mu = 0.1837 \text{ cm}^{-1}$.

On observe donc que la dose dans l'axe du minifaisceau peut être estimée en tenant compte uniquement du rayonnement primaire. Ceci est dû à la taille de champ très faible. En effet, la dose primaire est définie tel que :

$$D_{prim}(z) = \phi(z)E\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right) = \phi_0 e^{-\mu \cdot z} E\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)$$

Avec $\phi(z)$ et ϕ_0 la fluence des photons à la profondeur z et à l'entrée respectivement. $\frac{\mu_{en}}{\rho}$ est le coefficient d'absorption d'énergie massique de l'eau à 80 keV.

La dose normalisée à 1 cm est donc : $D_{norm}(z) = \frac{e^{-\mu \cdot z}}{e^{-\mu \cdot 1}} = 1.2 * e^{-\mu \cdot z}$

Le PDD théorique du au primaire est donc : $PDD_{prim}(z) = \frac{e^{-\mu \cdot z}}{e^{-\mu \cdot 1}} = 1.2 * e^{-\mu \cdot z}$

On retrouve donc aussi le coefficient de normalisation A simulé par Monte Carlo.

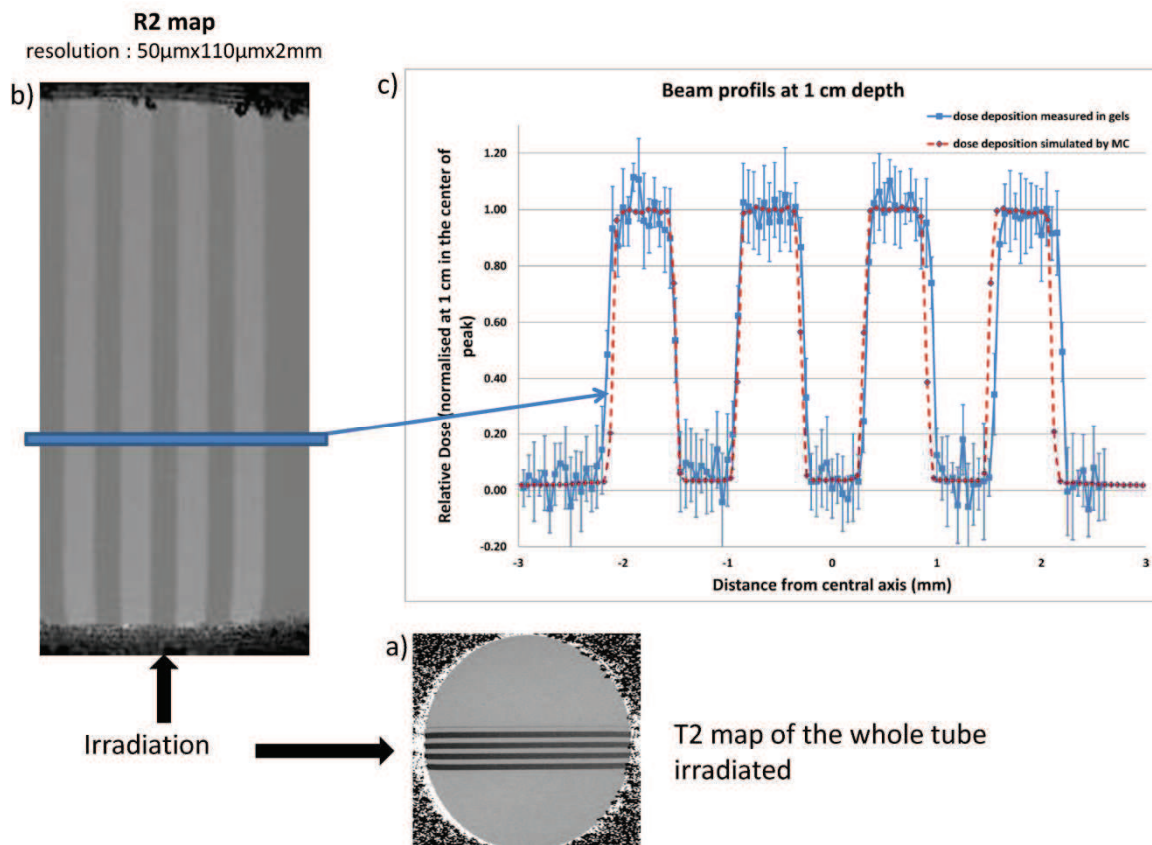


Figure 32 : Profil des minifaisceaux à 1 cm de profondeur mesuré sur les gels de dosimétrie (bleu) et calculé par simulation Monte Carlo (rouge). a) image T2 du tube irradié, b) image R2 des faisceaux, c) profil des faisceaux à 1 cm.

La mesure des profils des faisceaux à 1 cm réalisé sur gel dosimétrique n'est pas significativement différente de celle simulée par Monte Carlo comme le montre la figure 32 et le résultat du test de Student (conditions : bidirectionnel, séries indépendantes, non appariées) : $t = 0.927$ et $p = 0.36$. Ce résultat valide l'utilisation des gels nPAG pour la mesure des profils des faisceaux pour les irradiations minifaisceaux monochromatiques. Le résultat de test de Student est

légèrement moins bon que pour le PDD du fait de la différence de 20 μm entre les faisceaux simulés et les faisceaux irradiant le gel de dosimétrie.

La figure 33 présente les profils des faisceaux en fonction de la profondeur de matière traversée lors de l'irradiation du volume d'eau (figure 6a) avec 4 minifaisceaux incidents. La dose au pic en fonction de la profondeur a été ajustée par une fonction exponentielle de la forme $A \cdot \exp(-B \cdot z)$ et on retombe sur la loi de Beer-Lambert : $\text{Peak_dose} = 1.2e^{-0.183z}$, $R^2 = 0.9985$, avec $A = 1.199 \pm 0.07$ et $B = 0.183 \pm 0.001 \text{ cm}^{-1}$, le χ^2 normalisé par le degré de liberté étant $0.4491/4$ (les barres d'erreurs sont assez importantes). La dose à la vallée décroît aussi en fonction de la profondeur et reste inférieur à 5% de la dose au pic pour les profondeurs calculées. Elle est due à la diffusion Compton provenant des pics qui est quasi proportionnelle à la dose primaire dont elle provient. L'effet protecteur des tissus sains du au fractionnement spatial ne dépend donc pas de la profondeur d'irradiation. On peut aussi observer sur cette figure qu'il n'y a pas de variation observable de la largeur à mi-hauteur des faisceaux en fonction de la profondeur à l'échelle de calcul utilisée (60 μm).

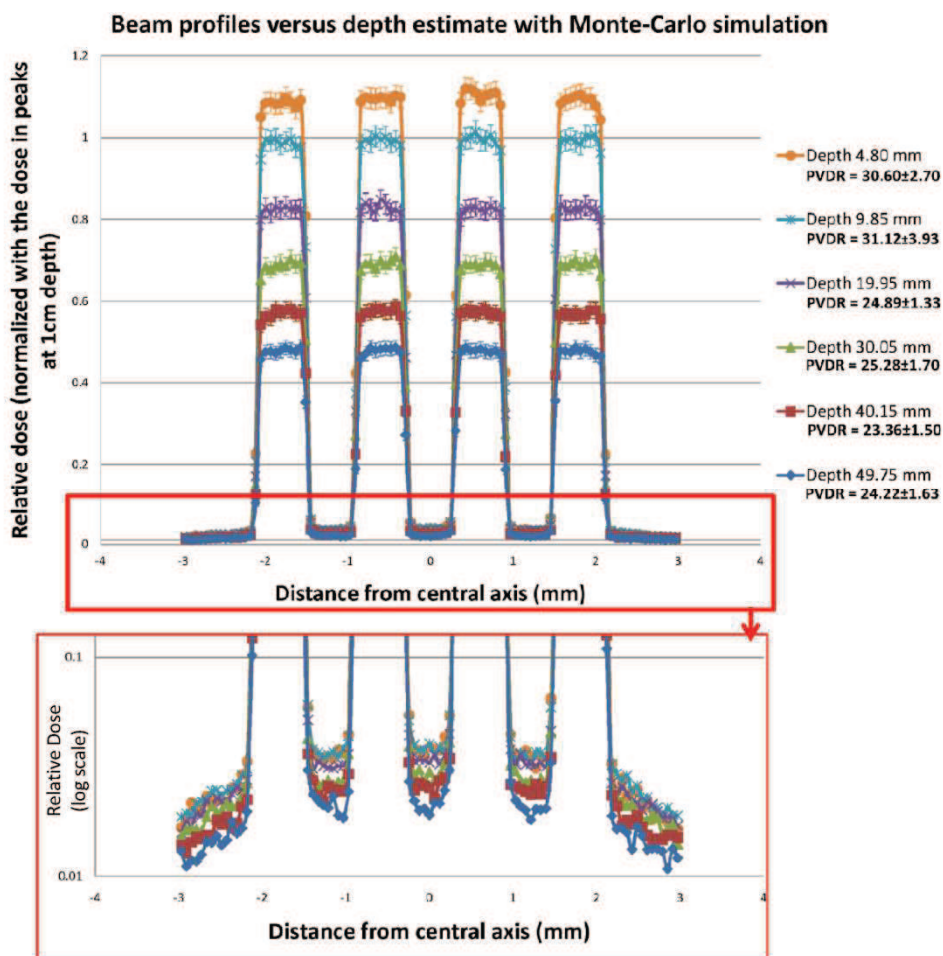


Figure 33 : Profils des faisceaux à différentes profondeurs de matière traversée simulés par Monte Carlo. Les PVDR sont reportés sur la légende. On observe qu'il n'y a pas de modification de la largeur à mi-hauteur des faisceaux mesurables à la résolution spatiale du calcul ($\approx 60 \mu\text{m}$). Les doses à la vallée décroissent en fonction de la profondeur.

Le PVDR en fonction de la profondeur z (mm) pour 4 minifaisceaux incidents a été ajusté par une loi puissance, comme représenté sur la figure 14. Le résultat de l'ajustement par la loi $A \cdot z^{-B}$ est le suivant : $A = 33.81 \pm 0.76 \text{ mm}^B$ et $B = 0.108 \pm 0.007$, le χ^2 normalisé par le degré de liberté étant $7.266/90$. La décroissance semble inférieure à 1 tous les 3 cm de tissu à partir de 50 mm d'après l'extrapolation de la loi puissance. Il est donc possible d'avoir des PVDR important, y compris à forte profondeur, comme en cerveau humain où la tumeur peut être située à une dizaine de cm suivant la

localisation. L'effet protecteur du tissu sain des minifaisceaux pourrait donc être utilisé en clinique en ce qui concerne la quantité de matière à traverser.

En revanche, le PVDR change également en fonction du nombre de minifaisceaux incidents comme le montre la figure 35 pour 2 à 32 faisceaux incidents. Les courbes de PVDR en fonction du nombre de minifaisceaux à 1 cm de profondeur et à 5 cm, ont été ajustées par des lois puissances ($A \cdot \text{nb_minifaisceau}^{-B}$). Pour 1 cm de profondeur, le résultat suivant a été obtenu : $A = 43.99 \pm 8.99$, $B = 0.34 \pm 0.1$, le χ^2 normalisé par le degré de liberté étant $0.6721/3$, on observe toujours que les barres d'erreurs sont assez importantes. Et à 5 cm de profondeur, l'ajustement a donné $A = 46.78 \pm 11.18$, $B = 0.47 \pm 0.12$, le χ^2 normalisé par le degré de liberté étant $0.5097/3$.

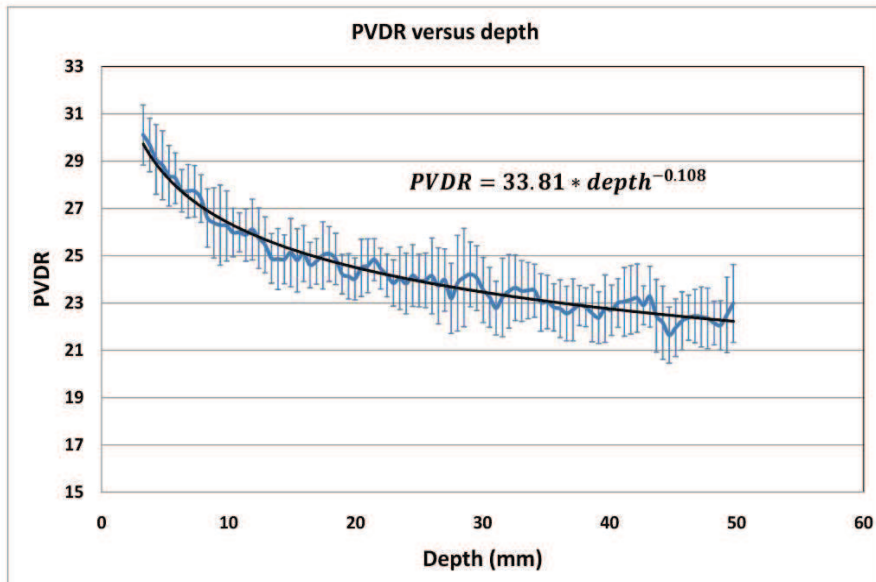


Figure 34 : Evolution du PVDR en fonction de la quantité de matière traversée et la courbe de régression exponentielle.

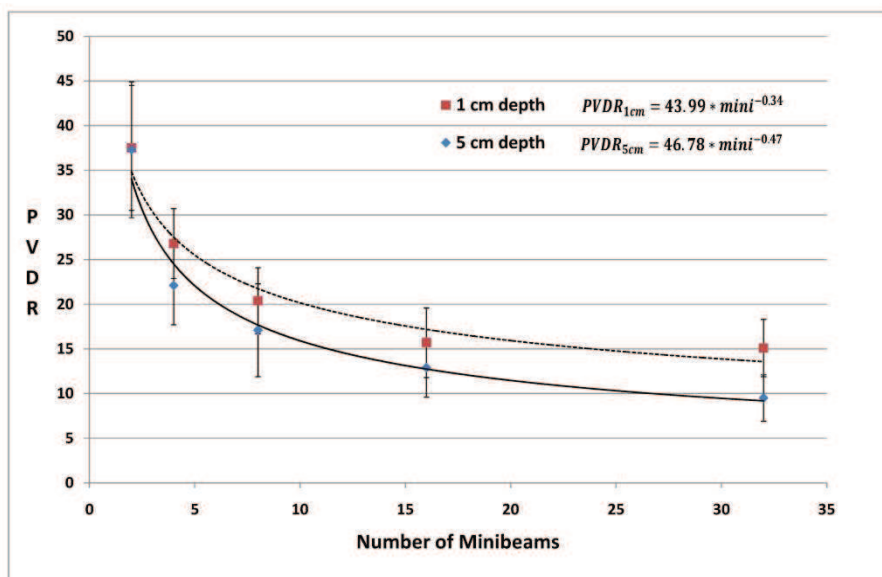


Figure 35 : Evolution du PVDR à 1 ou 5 cm de profondeur (respectivement rouge et bleu) en fonction du nombre de minifaisceaux par incidence. Dans les deux cas, l'évolution suit une loi puissance avec une bonne corrélation (respectivement $0.6721/3$ et $0.5097/3$ pour le χ^2 normalisé).

D'après ces résultats, le PVDR restait supérieur à 7 pour l'irradiation d'un volume d'environ 4 cm (32 minifaisceaux par incidence) dans une géométrie de tête humaine.

La qualité de l'entrelacement est représentée figure 36. La simulation Monte Carlo a été réalisée avec des faisceaux de même épaisseur que la translation verticale entre les deux incidences. On y observe un entrelacement « parfait », c'est-à-dire sans recouvrement. La dosimétrie sur gel à par contre été faite avec une épaisseur de faisceau 20 μm plus importante que la translation verticale, amenant un recouvrement théorique de 10 μm . On y observe un recouvrement à chaque limite d'incidence. Ce recouvrement est volontaire et évite d'avoir des zones non irradiées.

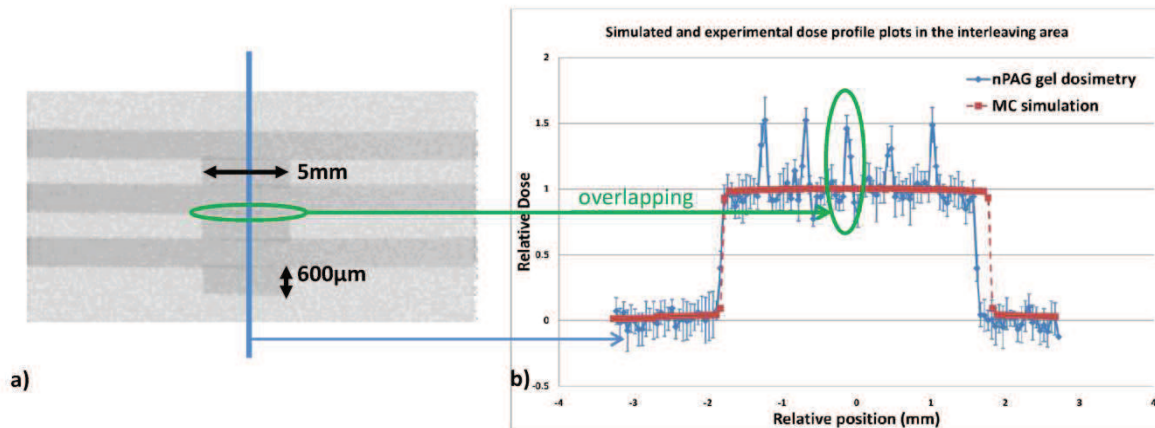


Figure 36 : Estimation de l'homogénéité de l'entrelacement. Comparaison entre la mesure sur gel (bleu) et le calcul Monte Carlo (rouge). a) carte R2 du gel de dosimétrie, on observe le recouvrement à la jonction des faisceaux des deux incidences. Ce recouvrement fait au maximum 50 μm .

Après 6 minifaisceaux, la différence entre le gel de dosimétrie et la simulation Monte Carlo est de 200 μm , ce qui donnerait un recouvrement de moins de 50 μm (résolution du pixel hors volume partiel). Le passage de la zone irradiée à la zone de pénombre est identique que ce soit pour la simulation Monte Carlo ou pour les gels et fait moins de 100 microns (moins de deux pixels). Cela montre la précision de la zone irradiée, le tissu sain environnant le cube cible ne subit presque pas de dose.

2.5 Discussion :

Cette étude décrit la dosimétrie associée à la technique d'irradiation par minifaisceaux monochromatique. Afin de valider les résultats, des simulations Monte Carlo ont été confrontés aux études dosimétriques expérimentales en trois dimensions sur gels polymères. Comme beaucoup d'autres techniques innovantes de radiothérapie (Baumert, Norton et al. 2004; Khuntia, Tome et al. 2009), les minifaisceaux ont pour but d'améliorer la distribution de dose. Les minifaisceaux se basent sur des effets dits « dose/volume » qui se situent entre ceux de la radiochirurgie conventionnelle (mm) (Flickinger, Lunsford et al. 1992a; Flickinger, Lunsford et al. 1992b; Kondziolka, Lunsford et al. 1992a; Kondziolka, Lunsford et al. 1992b) et ceux de la radiothérapie microfaisceaux développée en synchrotron (μm) (Dilmanian, Zhong et al. 2006a; Dilmanian, Zhong et al. 2006b; Serduc, Bouchet et al. 2009; Brauer-Krisch, Serduc et al. 2010; Serduc, Brauer-Krisch et al. 2010).

Le principe des minifaisceaux repose sur une plus grande tolérance du tissu sain environnant que pour la radiochirurgie conventionnelle, tout en réduisant significativement les difficultés techniques et dosimétriques inhérentes à la MRT, surtout si l'objectif final est l'application clinique.

La résistance des tissus sains aux minifaisceaux est démontrée dans le chapitre suivant.

La dosimétrie expérimentale est réalisée avec la meilleure résolution spatiale jamais décrites pour cette technique. Des incertitudes importantes sur les mesures, inhérentes à la technique de

lecture des gels (IRM), peuvent difficilement être réduites. En effet le temps d'acquisition est déjà de plus de 10h30 pour 64 accumulations. Cependant le grand nombre de points de mesures (>20) obtenus sur les profils ou les rendements en profondeur permettent de réaliser de test de Student afin de corrélérer ces résultats avec les simulations Monte Carlo.

D'autres études dosimétriques d'irradiations par minifaisceaux ont été réalisées, elles ont été présentées dans le dernier paragraphe du chapitre 1 (Dilmanian, Zhong et al. 2006b; Dilmanian, Romanelli et al. 2008; Gokeri, Kocar et al. 2010; Prezado, Martinez-Rovira et al. 2011). Mais celles-ci ne se positionnent que dans des conditions d'irradiations cliniques et avec des faisceaux de 680 μm . Ces études ne sont pas applicables aux irradiations précliniques. Dilmanian *et al.* ont effectués une dosimétrie expérimentale sur des gels dosimétriques BANG coulés dans un fantôme tête humaine. Cependant la résolution de lecture des gels était de 0.44 mm (Dilmanian, Zhong et al. 2006b) ou 0.59 mm (Dilmanian, Romanelli et al. 2008), qui sont des résolutions trop faibles pour l'étude de faisceau d'environ 600 μm d'épaisseur. Pour confronter la dosimétrie théorique, la dosimétrie expérimentale est nécessaire. Les films radiochromiques auraient pu être une solution mais n'offrent qu'une vue 2D de la distribution de dose (Lee, Fung et al. 2006; Brauer-Krisch, Serduc et al. 2010). Au vu de la géométrie d'irradiation, il a semblé important d'employer une méthode qui permette aussi d'acquérir la distribution de dose en 3D. Pour cela les gels polymères permettent une acquisition 3D dans un matériau tissu équivalent (Baldock, De Deene et al. 2010), mais leurs méthodes de lecture n'est pas évidente à haute résolution. Wong *et al.* ont reporté une expérience avec une lecture IRM de gel haute résolution après irradiation IMRT, technique nécessitant aussi un contrôle de la distribution en trois dimensions (Wong, Ackerly et al. 2007). L'étude menée dans cette thèse reprend l'idée de cette lecture IRM haute résolution, avec une résolution supérieure et un souci d'avoir un rapport signal sur bruit acceptable pour la comparaison avec les simulations Monte Carlo. Ces acquisitions sont donc très contraignantes parce que nécessitent plus d'une dizaine d'heures de monopolisation d'un IRM et ce n'est donc pas une méthode de lecture parfaite. Cependant la lecture de gels par tomographie optique n'a pas donné de résultat avec le matériel à disposition. D'autres lecteurs de gels par tomographie optique sont en développement et mériteraient d'être essayés pour la lecture des gels irradiés par minifaisceaux (Olding, Holmes et al. 2010; Papadakis, Zacharakis et al. 2010; Rahman, Brauer-Krisch et al. 2011). Certaines de ces méthodes utilisent notamment un détecteur plan (CCD) au lieu d'un détecteur ponctuel, pour imager le faisceau primaire et le faisceau diffusé séparément et ainsi effectuer des corrections. Le conditionnement des gels reste cependant la plus grosse difficulté des imageries optiques.

Les dosimétries expérimentales et théoriques réalisées ont montré une très bonne corrélation (les résultats des tests de Student sont $p = 0.87$ pour les rendements et $p = 0.36$ pour les profils). Ces résultats valident les gels nPAG pour la dosimétrie expérimentale 3D de la technique d'irradiation par minifaisceaux monochromatiques. Ces gels ont été testés aussi pour la dosimétrie de minifaisceaux polychromatiques à très hauts débit de dose ($\geq 15\ 000\ \text{Gy/s}$) (irradiations réalisées à l'ESRF par Prezado Y). Cependant les résultats n'ont pas été conformes aux attentes, si la géométrie mesurée a été proche de la géométrie théorique (en termes de profil), les rapports dose au pic/dose à la vallée sont plus faibles pour les mesures sur gels que les estimations par Monte Carlo. Plusieurs hypothèses ont été soulevées. La première est l'effet du débit de dose très important dans les faisceaux polychromatiques (ce qui rend difficile l'irradiation à faible dose nécessaire aux gels nPAG (la linéarité du gel en fonction de la dose se situe pour une gamme entre 0 et 15/20 Gy). La dose déposée dans le gel n'est donc peut-être pas exactement celle voulue et si elle est trop importante, la dose mesurée dans le gel sera sous estimé du fait que l'on perd la linéarité. De plus, le procédé de

polymérisation est peut être perturbé par une irradiation si rapide et la recombinaison des radicaux libres pourrait en être modifiée. Sur les films Gafchromic EBT Rink *et al.* ont observé aussi une influence du débit de dose sur le résultat de mesure (Rink, Vitkin et al. 2007). Lorsque le débit de dose augmente, la densité optique du film diminue pour une même dose déposée.

La dosimétrie dans les minifaisceaux peut être estimée grâce à la seule loi de Beer-Lambert (influence du diffusé négligeable) et simplifie donc grandement la planification d'un traitement.

La dose à la vallée est l'autre paramètre important car il fixe la limite de la technique des minifaisceaux. Elle est dûe aux photons diffusés et devrait être à peu près proportionnelle à la dose primaire dans les faisceaux donnée par la loi de Beer-Lambert. Le PVDR (peak to valley dose ratio) devrait donc être à peu près constant en fonction de la profondeur. Il a été montré dans cette étude qu'il suivait une loi exponentielle décroissante, mais que cette décroissance était faible après environ 3 cm de matière traversée. Siegbahn *et al.* ont déjà observé cet effet pour des microfaisceaux polychromatiques après 1 cm de tissu traversé (Siegbahn, Stepanek et al. 2006). Ils ont expliqué ce phénomène aux conséquences semblables à celui observé dans la zone de mise en équilibre électronique par une épaisseur de matière où l'influence du diffusé n'est pas à l'équilibre. Gokeri et al. l'on aussi observé avec une incidence de 20 minifaisceaux de 0.68 mm (Gokeri, Kocar et al. 2010). Leur estimation des PVDR été plus faible, peut être à cause des tailles de faisceaux, spectre et géométrie utilisés. Ceci est cohérent avec les PVDR obtenus par Prezado *et al.* sur un fantôme de tête humaine, plus de minifaisceaux et des énergies plus importantes (Prezado, Thengumpallil et al. 2009). En extrapolant la loi de puissance obtenue pour les PVDR en fonctions de la profondeur, on peut estimer que pour une tumeur située à 8 cm de profondeur et une irradiation avec 32 minifaisceaux, on a un PVDR plus grand que 7. Donc si l'on souhaite déposer 20 Gy en une fraction à 8 cm de profondeur, on obtiendrait une dose à la vallée inférieure à 3 Gy. Ceci est encore largement en dessous des seuils de tolérance du tissu sain estimé aux alentours d'une dizaine de Gy sur des faibles volumes (Emami, Lyman et al. 1991; Flickinger, Lunsford et al. 1992a; Niranjana and Flickinger 2008).

Les minifaisceaux peuvent être utilisés avec plus que deux incidences. Cela permettrait de diminuer les doses à la vallée sur les zones les plus éloignées du volume cible. En effet si l'on est loin du volume cible, les faisceaux sont éloignés et il n'y a pas d'influence entre eux. Par contre plus on est proche du volume cible et plus la distance entre deux faisceaux est faible et on ainsi chacun une contribution à la vallée se situant entre eux. Cette méthode permet donc de diminuer le PVDR et la dose à la vallée aux grandes distances par rapport au volume cible mais elle augmente les PVDR aux zones proches du volume d'entrelacement.

La technique des minifaisceaux est intéressante puisqu'elle permet de distribuer des doses importantes en seulement quelques ports d'irradiation. Elle permet donc plus facilement que d'autres techniques de protéger des organes à risques environnant. Cependant, les minifaisceaux, basés sur la théorie des FSU décrite dans le premier chapitre, n'ont pas les mêmes effets suivant les organes traversés. Notamment si un des organes à traverser est un organe dit en série où même un faible volume irradié peut avoir des conséquences importantes si c'est à une forte dose. Dans le cas où un de ce type d'organe est n'est pas évitable, les minifaisceaux ne seraient a priori pas applicables puisque l'effet dose volume pour la protection du tissu sera plus faible. Cependant une étude de Dilmanian *et al.* montre que la moelle épinière supporte bien ce type d'irradiation minifaisceaux

(Dilmanian, Zhong et al. 2006a). Ce qui laisse supposer d'autres mécanismes de protection du tissu sain mis en jeu.

Si lorsque l'on utilise un grand nombre de minifaisceaux par incidence, afin d'irradier un volume important, la dose à la vallée commence à être limitante (faible PVDR), il est possible de charger la tumeur en élément lourd comme il est fait pour la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT). Le renforcement de dose dû à l'augmentation de l'effet photoélectrique permet alors d'augmenter l'effet différentiel entre le tissu sain et le tissu tumoral. La dose à la vallée est directement liée à la largeur des minifaisceaux, la profondeur d'irradiation et au nombre de minifaisceaux. Elle doit rester inférieure à la tolérance en dose du tissu sain cérébral, environ 10 Gy (en une seule fraction). Le volume cible maximum est d'environ 30 cm³ dans ces conditions (photons de 80 keV, faisceaux de 600 µm), pour une irradiation d'une tumeur chez l'homme (Dilmanian, Zhong et al. 2006b), ce qui correspond à une sphère de 1.93 cm de diamètre. L'utilisation d'élément lourd tel que les agents de contraste utilisé en SSRT permettrait de gagner 10% de dose au pic par mg/ml d'élément lourd à 80 keV, sans augmenter la dose à la vallée en dehors du volume cible, et donc de traiter des volumes plus importants (Edouard, Broggio et al. 2010).

- Baldock, C., Y. De Deene, et al. (2010). "Polymer gel dosimetry." Physics in Medicine and Biology **55**(5): R1-R63.
- Baumert, B. G., I. A. Norton, et al. (2004). "Dose conformation of intensity-modulated stereotactic photon beams, proton beams, and intensity-modulated proton beams for intracranial lesions." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **60**(4): 1314-1324.
- Boudou, C., I. Tropres, et al. (2007). "Polymer gel dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy and iodine dose-enhancement measurements." Physics In Medicine And Biology **52**(16): 4881-4892.
- Brauer-Krisch, E., R. Serduc, et al. (2010). "Effects of pulsed, spatially fractionated, microscopic synchrotron X-ray beams on normal and tumoral brain tissue." Mutation Research-Reviews in Mutation Research **704**(1-3): 160-166.
- Butson, M. J., P. K. N. Yu, et al. (2003). "Radiochromic film for medical radiation dosimetry." Materials Science & Engineering R-Reports **41**(3-5): 61-120.
- De Deene, Y., C. Hurley, et al. (2002). "A basic study of some normoxic polymer gel dosimeters." Physics in Medicine and Biology **47**(19): 3441-3463.
- De Deene, Y., R. Van de Walle, et al. (1998). "Mathematical analysis and experimental investigation of noise in quantitative magnetic resonance imaging applied in polymer gel dosimetry." Signal Processing **70**(2): 85-101.
- Demant, P., M. Vautrin, et al. (2011). "Monochromatic minibeam radiotherapy: theoretical and experimental dosimetry for preclinical treatment plans." Physics in Medicine and Biology **56**(14): 4465-4480.
- Dilmanian, F. A., P. Romanelli, et al. (2008). "Microbeam radiation therapy: Tissue dose penetration and BANG-gel dosimetry of thick-beams' array interlacing." European Journal of Radiology **68**(3): S129-S136.
- Dilmanian, F. A., Z. Zhong, et al. (2006). "Microbeam radiation therapy in an interlaced geometry: Potential applicability to neuro-oncology and radiosurgery." Neuro-Oncology **8**(4): 484-485.
- Dilmanian, F. A., Z. Zhong, et al. (2006). "Interlaced x-ray microplanar beams: A radiosurgery approach with clinical potential." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(25): 9709-9714.
- Edouard, M. (2010). Dosimétrie pour la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron : d'une vision macroscopique aux considérations microscopiques des dépôts d'énergie. Grenoble, Université de Grenoble.

- Edouard, M., D. Broggio, et al. (2010). "Treatment plans optimization for contrast-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy." Medical Physics **37**(6): 2445-2456.
- Emami, B., J. Lyman, et al. (1991). "Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **21**(1): 109-122.
- Flickinger, J. C., L. D. Lunsford, et al. (1992). "Dose prescription and dose-volume effects in radiosurgery." Neurosurg Clin N Am **3**(1): 51-9.
- Flickinger, J. C., L. D. Lunsford, et al. (1992). "Radiosurgery and brain tolerance - an analysis of neurodiagnostic imaging changes after gamma-knife radiosurgery for arterio-venous malformations." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **23**(1): 19-26.
- Gastaldo, J., C. Boudou, et al. (2008). "Normoxic polyacrylamide gel doped with iodine: response versus X-ray energy." Eur J Radiol **68**(3 Suppl): S118-20.
- Gokeri, G., C. Kocar, et al. (2010). "Monte Carlo simulation of microbeam radiation therapy with an interlaced irradiation geometry and an Au contrast agent in a realistic head phantom." Phys Med Biol **55**(24): 7469-87.
- Gore, J. C., M. Ranade, et al. (1996). "Radiation dose distributions in three dimensions from tomographic optical density scanning of polymer gels .1. Development of an optical scanner." Physics in Medicine and Biology **41**(12): 2695-2704.
- Hilts, M., A. Jirasek, et al. (2005). "Technical considerations for implementation of X-ray CT polymer gel dosimetry." Physics in Medicine and Biology **50**(8): 1727-1745.
- Jirasek, A., M. Hilts, et al. (2006). "Investigation of tetrakis hydroxymethyl phosphonium chloride as an antioxidant for use in x-ray computed tomography polyacrylamide gel dosimetry." Physics in Medicine and Biology **51**(7): 1891-1906.
- Khuntia, D., W. A. Tome, et al. (2009). "Radiation Techniques in Neuro-Oncology." Neurotherapeutics **6**(3): 487-499.
- Kondziolka, D., L. D. Lunsford, et al. (1992). "Radiobiology of radiosurgery, .1. The normal rat-brain model." Neurosurgery **31**(2): 271-279.
- Kondziolka, D., L. D. Lunsford, et al. (1992). "Radiobiology of radiosurgery .2. The rat-C6 glioma model." Neurosurgery **31**(2): 280-288.
- Lee, K. Y., K. K. L. Fung, et al. (2006). "Application of high-resolution radiochromic film dosimetry in verifying a small-field stereotactic radiosurgery plan." Applied Radiation and Isotopes **64**(8): 934-939.
- Lopatiuk-Tirpak, O., K. M. Langen, et al. (2008). "Performance evaluation of an improved optical computed tomography polymer gel dosimeter system for 3D dose verification of static and dynamic phantom deliveries." Medical Physics **35**(9): 3847-3859.
- Maryanski, M. J., Y. Z. Zastavker, et al. (1996). "Radiation dose distributions in three dimensions from tomographic optical density scanning of polymer gels .2. Optical properties of the BANG polymer gel." Physics in Medicine and Biology **41**(12): 2705-2717.
- Niranjan, A. and J. C. Flickinger (2008). "Radiobiology, principle and technique of radiosurgery." Prog Neurol Surg **21**: 32-42.
- Olding, T., O. Holmes, et al. (2010). "Cone beam optical computed tomography for gel dosimetry I: scanner characterization." Physics in Medicine and Biology **55**(10): 2819-2840.
- Papadakis, A. E., G. Zacharakis, et al. (2010). "A New Optical-CT Apparatus for 3-D Radiotherapy Dosimetry: Is Free Space Scanning Feasible?" Ieee Transactions on Medical Imaging **29**(5): 1204-1212.
- Prezado, Y., I. Martinez-Rovira, et al. (2011). "Dosimetry protocol for the preclinical trials in white-beam minibeam radiation therapy." Medical Physics **38**(9): 5012-5020.
- Prezado, Y., S. Thengumpallil, et al. (2009). "X-ray energy optimization in minibeam radiation therapy." Medical Physics **36**(11): 4897-4902.
- Prezado, Y., M. Vautrin, et al. (2011). "Dosimetry protocol for the forthcoming clinical trials in synchrotron stereotactic radiation therapy (SSRT)." Medical Physics **38**(3): 1709-1717.
- Rahman, A. T. A., E. Braeuer-Krisch, et al. (2011). "Sophisticated test objects for the quality assurance of optical computed tomography scanners." Physics in Medicine and Biology **56**(14): 4177-4199.

- Rink, A., I. A. Vitkin, et al. (2007). "Intra-irradiation changes in the signal of polymer-based dosimeter (GAFCHROMIC EBT) due to dose rate variations." Physics in Medicine and Biology **52**(22): N523-N529.
- Sadagopan, R., J. A. Bencomo, et al. (2009). "Characterization and clinical evaluation of a novel IMRT quality assurance system." Journal of Applied Clinical Medical Physics **10**(2): 104-119.
- Salvat, F., J. Fernández-Varea, et al. (2006). A Code system for Monte Carlo Simulation of Electron and Photon Transport. Issy-les-Moulineaux, Nuclear Energy Agency (OECD).
- Serduc, R., A. Bouchet, et al. (2009). "Synchrotron microbeam radiation therapy for rat brain tumor palliation-influence of the microbeam width at constant valley dose." Physics in Medicine and Biology **54**(21): 6711-6724.
- Serduc, R., E. Brauer-Krisch, et al. (2010). "High-Precision Radiosurgical Dose Delivery by Interlaced Microbeam Arrays of High-Flux Low-Energy Synchrotron X-Rays." Plos One **5**(2).
- Serduc, R., Y. V. de Looij, et al. (2008). "Characterization and quantification of cerebral edema induced by synchrotron x-ray microbeam radiation therapy." Physics in Medicine and Biology **53**(5): 1153-1166.
- Siegbahn, E. A., J. Stepanek, et al. (2006). "Determination of dosimetrical quantities used in microbeam radiation therapy (MRT) with Monte Carlo simulations." Medical Physics **33**(9): 3248-3259.
- Soares, C. G. (2006). "New developments in radiochromic film dosimetry." Radiation Protection Dosimetry **120**(1-4): 100-106.
- Vautrin, M. (2011). Planification de traitement en Radiothérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron
Développement et validation d'un module de calcul de dose par simulations Monte Carlo. Grenoble, Université de Grenoble.
- Wong, C. J., T. Ackerly, et al. (2007). "High-resolution measurements of small field beams using polymer gels." Applied Radiation and Isotopes **65**: 1160-1164.

3. Essais des minifaisceaux monochromatiques sur un modèle *in vivo* :

Ce chapitre décrit les différentes études *in vivo* réalisées afin de déterminer le potentiel intérêt des minifaisceaux pour le traitement des tumeurs cérébrales. Toutes les études ont été menées sur des rats syngéniques Fischer mâles provenant de Charles Rivers Laboratories. Les rats sont âgés de 7/8 semaines au début des expériences. Toutes les études ont été conduites en respectant les règles d'éthique en vigueur dans les instituts où ont été réalisées les expériences (décret 87-848, 1987, licence 380534, A3851610008 et B3818510002). Les signes cliniques des animaux sont évalués au minimum tous les deux jours, et tous les jours pendant les périodes à risques tels qu'évaluées lors d'expériences précliniques. Ils sont pesés régulièrement. Le point limite pour les expériences a été défini conformément à la littérature définissant le point limite des animaux porteurs de tumeurs intracérébrales (Redgate et al. et UKCCCR Guideline for the welfare of animals in experimental neoplasia). Les rats sont euthanasiés s'ils subissent une perte de poids supérieure à 20% de leur poids maximum. Toutefois l'euthanasie d'un animal est réalisée pour toute constatation de signe extérieur de douleur intense et durable (prostration, paralysie).

L'euthanasie intervient donc si un des points suivants est observé :

1. Baisse du poids de 30% durant plusieurs jours.
2. Trouble de la locomotion.
3. Hémorragie per-orbitale.
4. Ataxie, prostration prolongée, incapacité de se nourrir.

Ou s'ils survivent plus d'un an, délai correspondant à la fin de l'expérimentation.

3.1 Le choix du modèle :

3.1.1 Le modèle F98 :

Les techniques de radiothérapie développées avec le faisceau synchrotron ciblent le traitement des tumeurs cérébrales. Le modèle de tumeur que l'on souhaite utiliser, se veut le plus proche possible des gliomes de haut grade chez l'humain qui sont très invasifs et chimio/radio-résistants. Il doit aussi être reproductible. Le modèle choisi par l'équipe depuis plusieurs années est le modèle F98 (gliome implanté chez le rat Fisher) (Barth 1998). Il répond à ces critères, et reste l'un des modèles tumoral le plus difficile à soigner. De plus, c'est un modèle issu de cellules de rats syngéniques et non un modèle humain qui lui ne pourrait être utilisé que sur des rats immunodéficients. Les conditions expérimentales sont de ce fait simplifiées et les risques liés à la manipulation de cellules cancéreuses diminués.

Le modèle tumoral a été obtenu après une injection de N-éthyl-N-nitroso-urée à une rate Fischer gestante (Swenberg, Wechsler et al. 1972). Après classification et sélection à partir d'information histologiques et morphologiques des tumeurs développées, le modèle F98, a été défini et classifié comme gliome anaplasique ou indifférencié (Ko, Koestner et al. 1980). Il a un caractère invasif et très agressif (index mitotique élevé) : des foyers de cellules tumorales se trouvent éloignés

de la masse tumorale principale lors de sa croissance. Ces infiltrations apparaissent jusque dans la matière blanche. Doblas *et al* ont en partie observé ces caractéristiques par IRM et angiographie (Doblas, He et al. 2010). La tumeur présente un cœur nécrotique bordé de cellules tumorales proliférantes, ce qui rend difficile la délimitation précise de son contour (Clendenon, Barth et al. 1990). Contrairement à d'autres modèles, le modèle F98 est faiblement immunogène et ne peut donc régresser que grâce à des traitements innovants et très ciblés (Barth 1998). L'implantation intracérébrale de 10 cellules ou plus entraîne invariablement la mort de l'animal. Le temps de survie des rats non traités dépend du nombre de cellules injectées.

Une semaine après injection de 1000 cellules F98 dans le cerveau d'un rat (comme il sera fait dans les études décrites plus loin), le gliome se développe de façon exponentielle. Le volume tumoral 14 jours après implantation (date conventionnelle de traitement dans les études de thérapie par minifaisceaux) est d'environ 30 mm³ comme le décrit Fournier *et al* (Fournier, Passirani et al. 2003). Le temps de survie des rats après implantation des 1000 cellules, et sans traitement, est d'environ 25.6 jours ± 2.4 (Adam, Joubert et al. 2006).

3.1.2 L'implantation :

Le protocole d'implantation de la tumeur est quasiment le même pour toutes les expériences réalisées dans cette thèse. La seule différence sera la présence ou non d'agarose lors de l'injection des cellules tumorales dans le cerveau du rat. L'agarose sert à éviter le reflux le long du trajet de l'aiguille d'injection en rendant plus visqueuse la solution contenant les cellules. L'agarose utilisé a un point de fusion à basse température, aux alentours de 25 degré Celsius. Ceci afin qu'il se liquéfie une fois la solution injectée, et soit éliminé petit à petit naturellement. L'implantation se déroule donc comme suit :

- Le rat est anesthésié par l'injection intrapéritonéale d'un mélange kétamine/xylazine (4 ml de kétamine, 2.5 ml de xylazine, 3 ml d'eau pour préparation injectable (eau ppi), injection à 0.2 ml/100g) puis placé sur un cadre stéréotaxique. Une incision est faite au dessus du crâne et le périoste est retiré afin de dégager le bregma (voir figure 37).
- Un trou dans l'os est effectué 3.5 mm à droite du bregma pour laisser le passage d'une aiguille Hamilton 26 ou 32 gauge (respectivement pour les cas avec ou sans agarose).
- La seringue Hamilton est ensuite descendue à 6 mm de profondeur par rapport à la surface de l'os puis remontée à 5.5 mm pour créer un volume où pourront se déposer les cellules F98.

Dans le cas avec agarose, l'injection se fait rapidement (20 µL.min⁻¹) afin que l'agarose reste gélifié avant de retirer l'aiguille lentement pour éviter le reflux. Au contraire, lorsque la solution cellulaire est dépourvue d'agarose, l'injection est réalisée lentement pour éviter le reflux (0.5 µL.min⁻¹). L'aiguille est laissée 2 min tel quel dans le cerveau du rat avant d'être retirée lentement pour que les cellules commencent à adhérer et que le tissu cérébral se referme le plus possible le long du trajet afin d'éviter le reflux.

Dans les deux cas, 1000 cellules F98 sont injectées dans un volume de 4 µL.

- Une fois l'aiguille retirée, le trou de l'os est rebouché avec de la cire à os, le scalp désinfecté, la peau recousue et désinfectée elle aussi.

L'agarose permet d'avoir moins de cas de reflux et des tumeurs plus sphériques. Ce protocole a été utilisé pour toutes les études de survie après traitement par radiothérapie minifaisceaux. Le protocole sans agarose a lui été utilisé pour l'étude sur la comparaison des mesures de perfusions

IRM/Synchrotron présenté dans le paragraphe 5 (sans traitement). Ceci permet de s'assurer que l'agarose, bien que censé être éliminé au moment de l'imagerie, ne contamine pas le signal RMN et ne fausse pas l'aspect quantitatif des mesures. La reproductibilité de l'implantation des tumeurs est moins importante dans cette étude d'imagerie puisque les comparaisons s'effectuent rat par rat et non sur des moyennes obtenues sur deux cohortes distinctes.

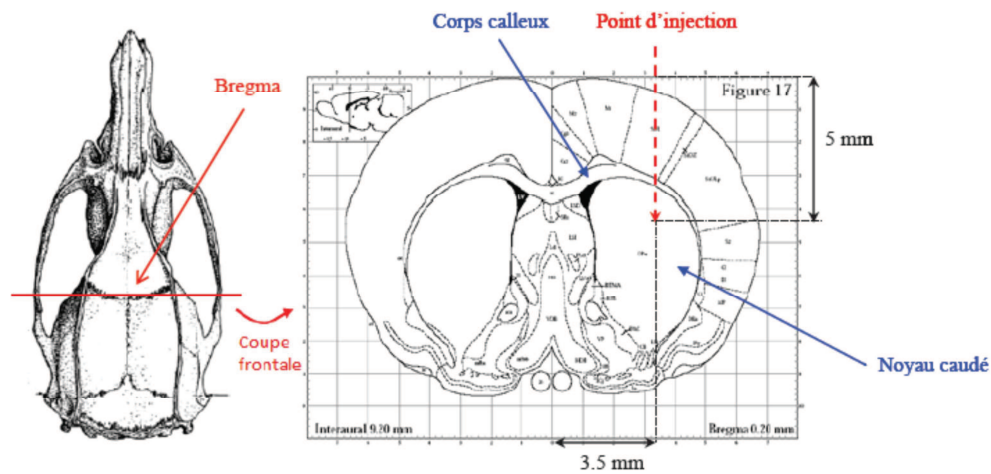


Figure 37 : Lieu d'implantation des tumeurs cérébrales. Figure reproduite à partir de l'atlas paxinos et modifiée par Laure Bobyk (Paxinos and Watson 2004; Bobyk 2010).

Le protocole de préparation des cellules F98 pour injection dans le cerveau du rat établi par Laure Bobyk est décrit dans sa thèse (Bobyk 2010).

Dans notre cas, les irradiations sont toujours effectuées 14 jours après implantation de la tumeur (soit environ à la moitié de l'espérance de vie moyenne d'un rat non traité après injection de la tumeur suivant ce protocole).

Afin de vérifier la présence d'une tumeur et d'estimer le volume occupé par celle-ci juste avant l'irradiation, une séquence d'imagerie anatomique (séquence pondérée T2) est réalisée quelques jours avant l'irradiation (entre 11 et 13 jours après implantation, ce qui correspond de 1 à 3 jours avant irradiation). Les animaux ayant bien une tumeur sont alors répartis de façon équilibrée dans les groupes, de manière à ce qu'il y ait dans chaque groupe, chaque cas de tumeur (petite, normale ou grosse). Ainsi l'évolution moyenne d'un groupe post-traitement de la tumeur ne sera pas dépendante de l'état de la tumeur au moment de l'irradiation.

3.2 Etat de l'art de la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron du modèle F98

De nombreux essais précliniques ont été réalisés sur le modèle F98 avec la technique de radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT). Ceux-ci ont été effectués avec et sans ajout d'élément lourd dans la tumeur (par voie systémique ou injection intracérébrale, technique dite convection enhanced delivery (CED)). Il a également été testé un couplage chimio/radiothérapie comme il est souvent utilisé en clinique. Des drogues telles que le Cisplatine, le Carboplatine, ont été testées. Il n'y a cependant pas d'effet de renforcement de la dose de rayonnement du fait de la présence de l'élément lourd, pendant l'irradiation à basse énergie (Rousseau, Boudou et al. 2007a). Les bons résultats de cette technique montrent juste un couplage optimal de la chimiothérapie délivrée localement suivie d'une irradiation ciblée.

Lors d'une première étude d'escalade de dose (survie en fonction de la dose distribuée) réalisée par Adam *et al.* (Adam, Joubert et al. 2006) sans ajout d'élément lourd, il a été observé une progression du taux de survie suivant une loi exponentielle (figure 38) :

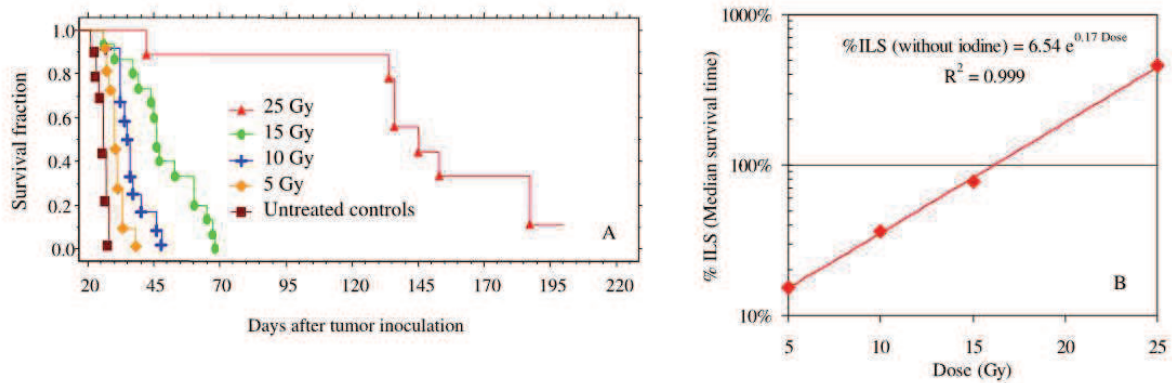


Figure 38 : Figure d'après Adam *et al.* (Adam, Joubert et al. 2006). A gauche, Courbes de Kaplan-Meier des survies de différents groupes de rats porteurs de tumeur F98 : ■ témoins, ◆ 5 Gy, + 10 Gy, ● 15 Gy, ▲ 25 Gy. Les doses sont délivrées avec un faisceau de 50 keV et sont les doses au niveau de la tumeur (environ 1 cm de profondeur). A droite est représenté le pourcentage d'augmentation de survie en fonction de la dose (échelle semi-logarithmique) ainsi que la courbe de régression par une fonction exponentielle associée. Le coefficient de corrélation est de : $R^2 = 0.999$.

Le pourcentage d'augmentation de la survie définie (%ILS) utilisé dans cet essai et dans cette thèse est défini par la relation suivante :

$$\% ILS = 100 \frac{MeST_{traité} - MeST_{témoin}}{MeST_{témoin}}$$

$MeST_{groupe}$ étant le temps de survie médian du groupe (Median Survival Time).

L'étude a été complétée par une comparaison entre l'irradiation de rats à différentes doses sans ajout d'élément lourd, et avec ajout par voie intra-artérielle ou intraveineuse d'un agent de contraste iodé couplé à un agent hyperosmolaire utilisé pour altérer transitoirement la barrière hémato encéphalique (figure 39). Des concentrations respectives de 10.13 ± 7.79 mg/ml et 2.74 ± 1.51 mg/ml d'iode sont obtenues 14 min après l'injection intra-artérielle ou intraveineuse de produit de contraste. Le mannitol est un produit pharmaceutique utilisé cliniquement pour réduire la pression intracrânienne après un traumatisme. Son moyen d'action est de réduire la taille des cellules endothéliales et d'écartier leurs jonctions, ouvrant ainsi la barrière hémato-encéphalique et permettant une régulation osmotique. De ce fait le mannitol est aussi utilisé pour augmenter la quantité de drogues injectée dans le sang qui passe dans l'espace interstitiel.

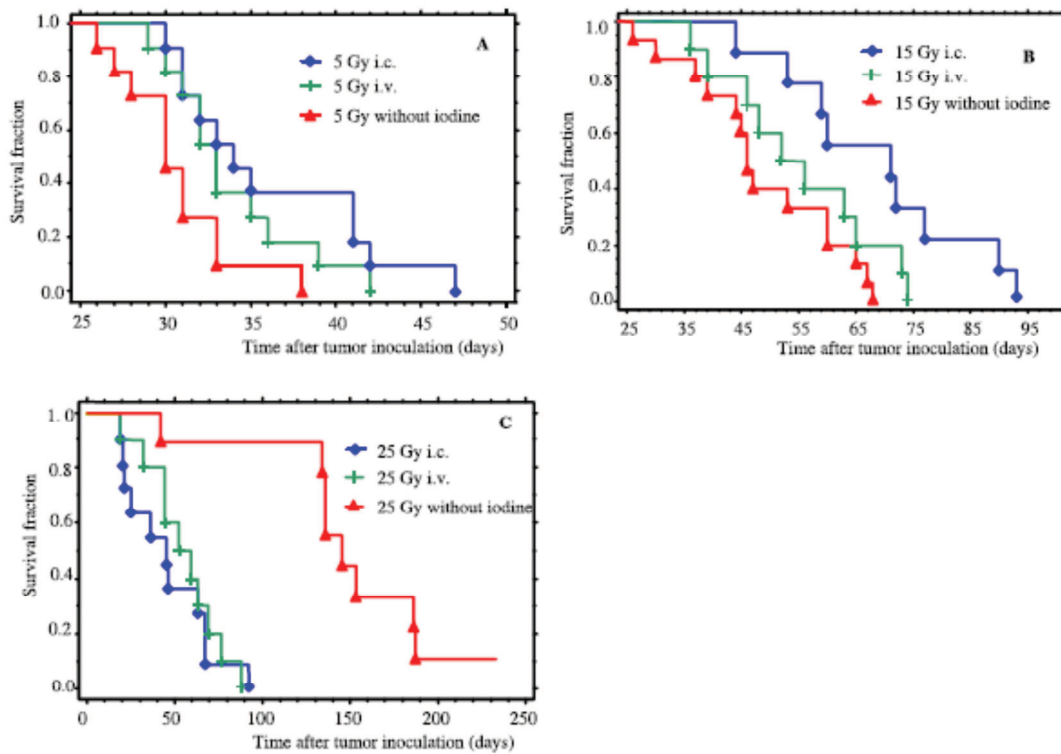


Figure 39 : Figure d'après Adam *et al.* (Adam, Joubert *et al.* 2006). Courbes Kaplan-Meier de survie des rats après une irradiation de A) 5 Gy, B) 15 Gy, C) 25 Gy. + injection intraveineuse, ● 15 injection intra-artérielle, ▲ sans injection.

L'ajout d'élément lourd permet d'augmenter la dose localement, dans la zone tumorale, en augmentant que très peu la dose dans le tissu sain environnant. La dose prescrite ne tient pas compte de l'éventuel facteur d'augmentation dû à l'iode. On s'attend à un facteur d'augmentation de dose de un à quatre suivant le mode d'injection. C'est pourquoi pour des doses prescrites inférieure à 15 Gy, on observe une survie supérieure des rats avec injection d'iode, d'autant plus importante que la quantité d'iode dans la tumeur est élevée. Pour la dose maximale prescrite (25 Gy au niveau de la tumeur), il a été observé une diminution de la survie dans les cas avec injection d'élément lourd (pas de différence significative entre les deux groupes). L'hypothèse faite par Adam *et al.* est une sur-irradiation du fait de la présence de l'iode.

Rousseau *et al.* ont réalisé d'autres études utilisant de l'iode désoxyridine (IUdR), ou encore du carboplatine (Rousseau, Adam *et al.* 2009; Rousseau, Barth *et al.* 2009) comme drogue de chimiothérapie (figure 40 et 41). Celle-ci n'apportant pas de renforcement de dose, les injections de drogues et les irradiations ont été découplées (réalisées à des moments différents). Les meilleurs résultats ont été obtenus pour le moment avec le carboplatine (figure 41). Durant sa thèse, Laure Bobyk a utilisé des nanoparticules d'or injectées par CED juste avant irradiation afin de coupler chimiothérapie et photoactivation, et a obtenu des résultats mitigés *in vivo*. Les hypothèses pour expliquer ces résultats sont une mauvaise répartition microscopique des nanoparticules d'or (inhomogène et ne pénétrant pas dans le noyau) et la difficulté de recouvrir tout le volume tumoral lors de l'injection.

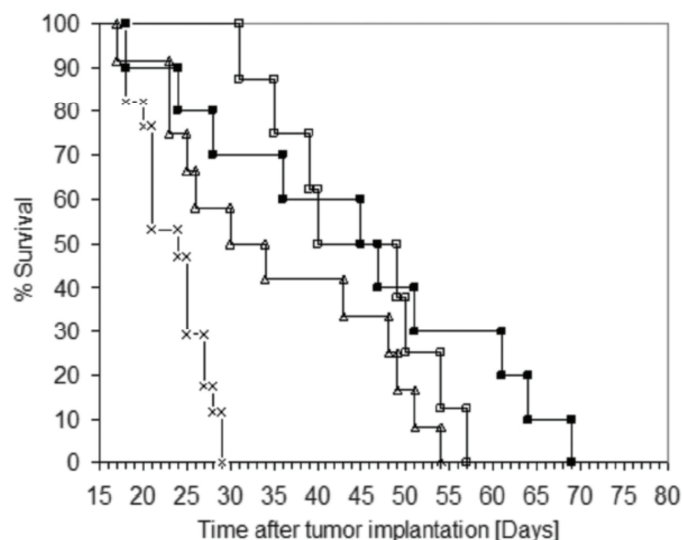


Figure 40 : Figure d'après Rousseau *et al.* (Rousseau, Adam *et al.* 2009). Courbes Kaplan-Meier de survie de rats porteurs de tumeur F98 après traitement. x témoins, Δ injection d'IUDR seul, □ irradiation seule (15 Gy au niveau de la tumeur), ■ irradiation 15 Gy et injection d'IUDR. Le ^{127}I UdR a été injecté par des pompes osmotiques à une concentration de 20 mg.ml^{-1} , $1 \mu\text{L.h}^{-1}$ pendant 6 jours. En cas d'irradiation, celle-ci a été effectuée un jour après la fin de l'injection d'IUDR, 14 jours après implantation. Faisceau ajusté à une énergie proche de 80 keV.

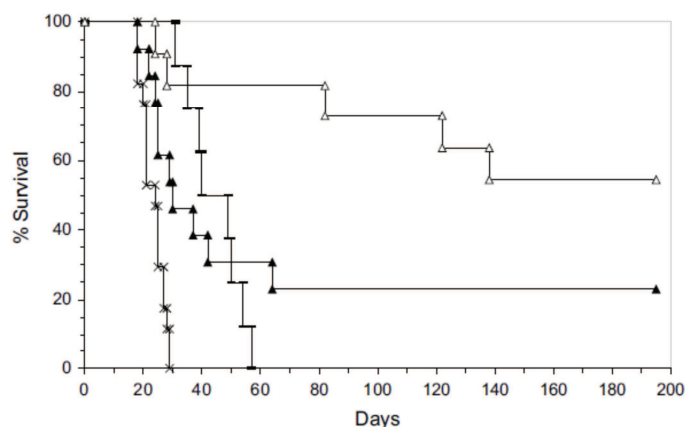


Figure 41 : Figure d'après Rousseau *et al.* (Rousseau, Barth *et al.* 2009). x témoins, - irradiation seule (15 Gy), ▲ carboplatine seul, Δ carboplatine + irradiation (15 Gy). Faisceau ajusté à une énergie proche de 80 keV. Le carboplatine été injecté par CED 1 jour avant traitement.

Si les résultats obtenus sont encourageants, il semble que pour atteindre un traitement curatif il faut pouvoir augmenter la dose prescrite sans dépasser la tolérance du tissu sain environnant. D'après l'étude d'Adam *et al.* les rats ayant reçus une dose prescrite de 25 Gy sont morts à partir de 140 jours après le traitement (sauf pour un rat). Ces morts à long terme laissent penser à un effet néfaste dû à une sur-irradiation. En effet lors d'examen histologiques des cerveaux des rats, il a été observé qu'il y avait une reprise tumorale pour les groupes ayant reçus des doses prescrites inférieures ou égales à 15 Gy tandis que pour les rats ayant reçus 25 Gy il n'y a plus de trace de la tumeur observable. Des cellules atypiques avec des noyaux plus gros que la normal ont par exemple été observé dans la zone irradié, ainsi que des anomalies vasculaires. Si la distribution de dose en SSRT propose de fort gradient autour de la tumeur, et donc une dose au tissu sain faible, celle-ci existe quand même. Dans le cas d'une irradiation minifaisceaux, la dose distribuée en dehors de la zone cible est fractionnée spatialement. Ceci a à priori pour effet de protéger le tissu sain autours, diminuant potentiellement les dégâts à long terme. C'est ce qui a été testé dans les études suivantes.

3.3 Radiochirurgie par minifaisceaux :

3.3.1 Effet protecteur sur le tissu sain :

Irradiation :

Avant de réaliser des irradiations sur rats porteurs de gliomes, une étude a été réalisée pour vérifier l'effet protecteur sur le tissu sain des minifaisceaux tel que décrit par Dilmanian *et al.* et confirmer que cela s'applique à nos conditions (débit de dose plus faible, faisceaux monochromatiques à 80 keV) (Dilmanian, Zhong *et al.* 2006b).

Deux groupes de rats ont été irradiés afin de valider la non toxicité de l'irradiation sur le tissu sain. Le premier a subi une irradiation unidirectionnelle (5 rats) et le deuxième une irradiation bidirectionnelle (6 rats) tels que présentés sur la figure 42. A 1 cm de profondeur, avec 4 minifaisceaux, la dose à la vallée est environ 30 fois inférieure à la dose au pic (cf chapitre 2, paragraphe 2.4).

- Dans le cas unidirectionnel, une incidence de 4 minifaisceaux (620 μm d'épaisseur espacés de 600 μm) a été utilisée avec une dose à 1 cm de 123 Gy (dose à la vallée d'environ 4.1 Gy). Ceci correspond à peu près à une dose de 30 Gy à une tumeur à 8 cm chez l'humain. (figure 42a).

- Dans le cas bidirectionnel, il y a eu deux incidences (décalées de 600 μm de haut) de 4 minifaisceaux (620 μm d'épaisseur espacé de 600 μm afin d'assurer le recouvrement et éviter des zones non irradiés (cf chapitre 2)). Le volume entrelacé était donc de 5 x 5 x 4.8 cm^3 . L'entrelacement a été centré à 1 cm de profondeur et la dose y était de 54 Gy (dose à la vallée d'environ 1.8 Gy). (figure 42b).

Le suivi a duré 1 an afin d'observer à la fois d'éventuels effets aigus et à long terme (prise de poids régulière, observation de signe cliniques). Au cours de cette année, les animaux ont été imagés par IRM 1, 5, 26, 59, 200, 298 et 347 jours après irradiation.

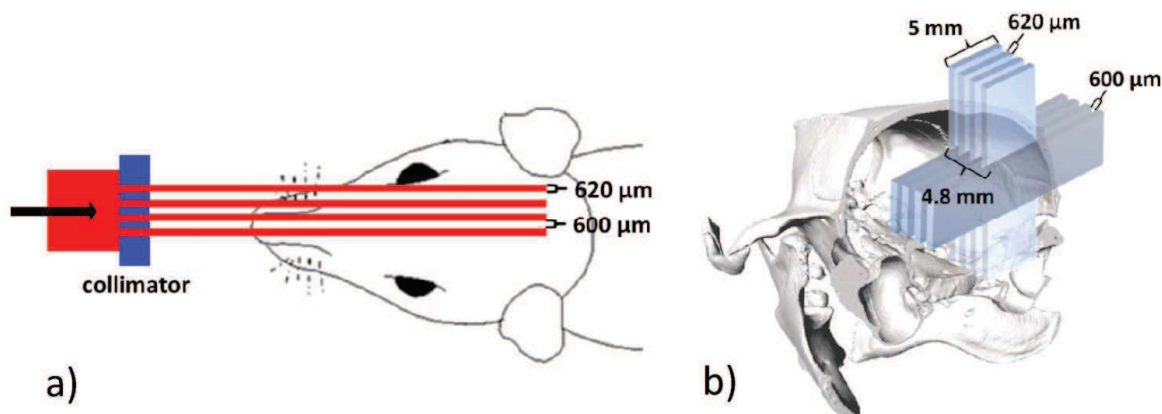


Figure 42 : Schéma de la géométrie d'irradiation des rats : a) géométrie 1 incidence, b) géométrie deux incidences avec entrelacement.

Suivi :

Le suivi IRM a été réalisé sur des aimants pour petits animaux, 4.7 T ou 7 T suivant les disponibilités (tous deux Bruker Advance III systems) avec un couples d'antenne volumique/surfacique (émission/réception). Durant l'acquisition les rats sont anesthésiés par inhalation d'air à 2% d'isoflurane (enrichi en oxygène). Un cathéter a été posé dans la veine de la queue pour les injections de produits de contraste. Les séquences d'IRM utilisées sont les suivantes :

- Imagerie morphologique (pondérée T_2) (temps de répétition (TR) = 4000 ms, temps d'écho (TE) = 33 ms, champ de vue (FOV) = 4 x 4 cm², taille de la matrice = 256 x 256
- Cartes du coefficient de diffusion apparent (ADC) de l'eau : Séquence EPI (echo planar imaging) : 3 directions orthogonales ($b = 1000 \text{ s/mm}^2$), référence ($b \approx 0 \text{ s/mm}^2$), FOV = 3 x 3 cm², taille de la matrice = 128 x 128
- Imagerie de l'extravasation d'un agent de contraste paramagnétique sur deux rats par groupe. Imagerie pondérée T_1 avant et 5 minutes après injection de Gd-DOTA (Guerbet SA, France) sous forme de bolus (injection manuelle de 200 $\mu\text{mol/kg}$ en 1 à 2 secondes environ). (TR = 800 ms, TE = 4.2 ms, champs de vue : 3 x 3 cm², taille de la matrice : 128 x 128).

L'analyse des images a été effectuée en délimitant des régions d'intérêts (ROI) d'environ 2 mm² au centre des zones cibles irradiées (au niveau de la coupe où a lieu l'implantation de cellules tumorales pour les études associées) et de son controlatéral. Dans le cas où il y a une extravasation de l'agent de contraste, deux ROIs supplémentaires sont définies. La première contenant exclusivement les pixels apparaissant en hypersignal lors de la soustraction des images pondérées T_1 après et avant injection. La deuxième centrée sur la région correspondante dans la zone controlatérale. Les valeurs moyennes des ROIs de la zone irradiée ont été normalisées par les valeurs moyennes des ROIs controlatérales correspondantes.

Après l'euthanasie des rats au bout d'un an (par une injection d'1 ml de Dolethal ou de KCl en intracardiaque), le cerveau a rapidement été prélevé et congelé à -80 degré Celsius par trempage dans de l'isopentane. Des sections de 10 microns de cerveaux ont été coupées au cryo-microtome et marquées avec de l'hématoxyline/érythrosine. L'orientation des coupes a été choisie perpendiculaire à la direction d'irradiation (figure 43).

Résultats :

Durant l'année de suivi aucun signe clinique n'a été observé ni pour les rats du groupe irradié avec une seule incidence, ou ceux du groupe irradié avec entrelacement.

Dans le cas de l'irradiation unidirectionnelle (123 Gy à 1 cm de profondeur), aucune modification en fonction du temps n'a été observée sur les valeurs du T_{2w} et de l'ADC normalisées au controlatéral. Un ajustement par une fonction linéaire (polynôme de degré 1) a donné les résultats suivant :

- T_{2w} : offset = 0.972 ± 0.029 , pente = $-7.23 \cdot 10^{-5} \pm 11 \cdot 10^{-5} \text{ jours}^{-1}$ (χ^2 réduit = 1.4, probabilité $\chi^2 = 0.220$)

- ADC: offset = 1.013 ± 0.0114 , pente = $-3.9 \cdot 10^{-5} \pm 6.3 \cdot 10^{-5} \text{ jours}^{-1}$ (χ^2 réduit = 0.9816, probabilité $\chi^2 = 0.427$).

Dans le cas de l'irradiation bidirectionnelle (54 Gy à 1 cm de profondeur) il apparaît une région d'intérêt présentant un hyposignal T_2 , localisée dans la zone d'entrelacement 200, 298 jours après irradiation. Dans la même région on observe aussi une prise de contraste au gadolinium montrant une perméabilité des vaisseaux sanguins à la molécule du Gd-DOTA.

Sur les coupes histologiques, aucune différence entre le tissu irradié et le tissu controlatéral n'a été observée pour l'irradiation avec une incidence. Dans le cas de l'irradiation avec deux incidences, une petite région avec des vaisseaux dilatés et coagulés a été observée à la même position que celle de la prise de contraste vue en IRM.

Ces résultats sont présentés sur la figure suivante (figure 43).

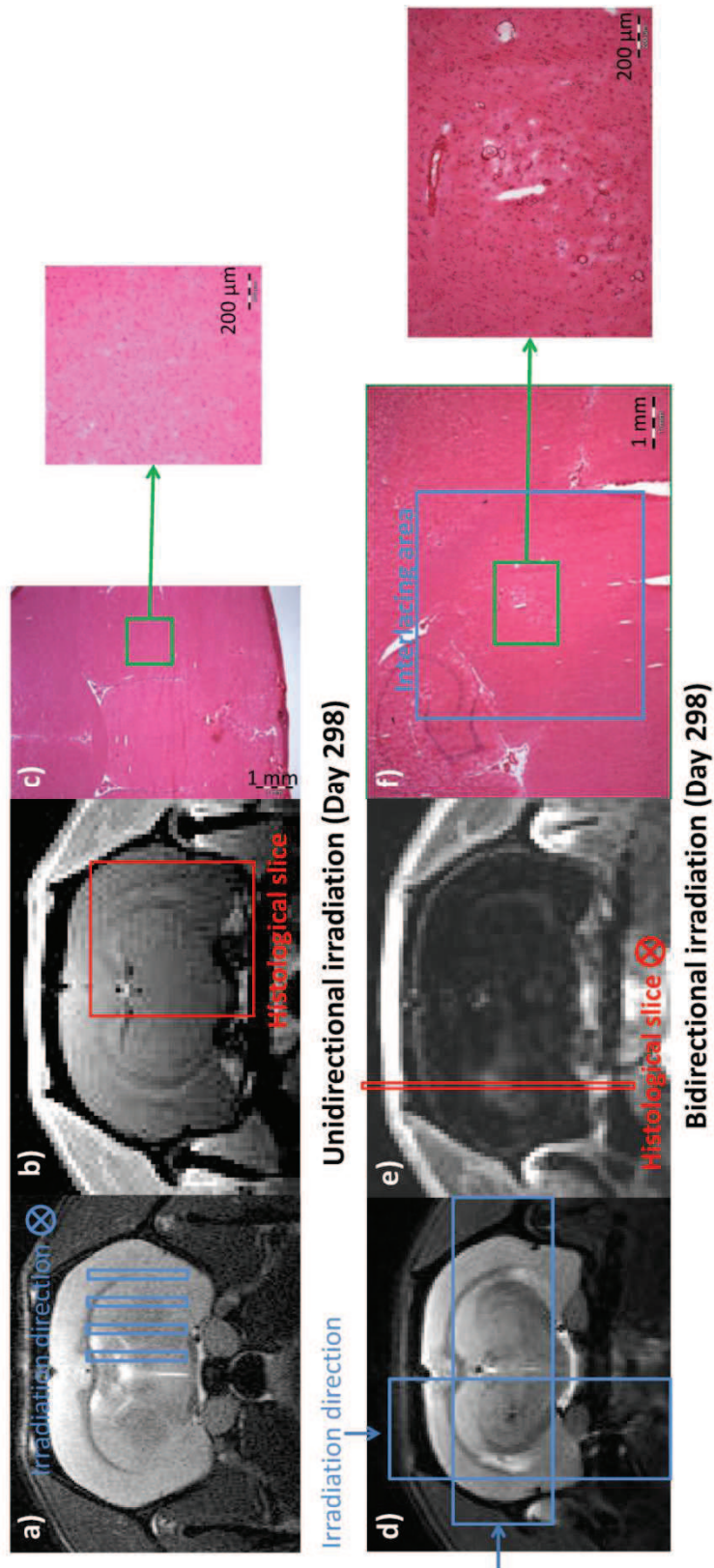


Figure 43 : Suivi d'un rat irradié avec une seule incidence (a : T_{2w}, b : T_{1w} après injection de Gd-DOTA, c : coupe histologique marqué H&E) et d'un rat irradié avec entrelacement (d : T_{2w}, e : T_{1w} après injection de Gd-DOTA, f : coupe histologique marqué H&E). Aucune modification n'est observée sur le trajet de l'irradiation unidirectionnelle. Au niveau de l'entrelacement on observe un hyposignal T2, une perméabilité à l'agent de contraste IRM et la présence de vaisseaux dilatés et coagulés. La direction de coupe pour l'histologie est représentée en rouge et la géométrie d'irradiation en bleu.

Bien qu'il y ait eu des conséquences à long terme visibles macroscopiquement sur les rats irradiés avec un entrelacement de 5 x 5 x 4.8 mm³ recevant 54 Gy, ceux-ci ont vécu 1 an sans signe

clinique apparent. De plus les modifications tissulaires n'ont été observées que dans la zone cible, donc là où serait la tumeur. On peut donc valider l'effet protecteur sur le tissu sain environnant d'une irradiation fractionnée spatialement sur la trajectoire d'incidence, et entrelacée sur le volume cible. Les doses utilisées sur cette expérience correspondent aux doses qui seraient attribuées lors d'un traitement de tumeur cérébrale chez l'homme, soit une dose d'environ 50 Gy en une fraction pour tenter de stériliser la tumeur, ce qui correspond à une dose d'environ 130 Gy à l'entrée du port. Cette technique d'irradiation serait donc, de ce point de vue, utilisable dans des conditions cliniques, cependant la différence d'échelle reste un point critique sujet à controverse (notamment en termes de volumes cibles).

3.3.2 Essais sur rats porteurs de gliomes :

Au vu des résultats de l'effet protecteur sur le tissu sain, plusieurs essais sur rats porteurs de tumeurs F98 ont été réalisés.

Comparaison des techniques d'irradiation SSRT et Minibeam :

Les résultats obtenus par Adam *et al.* (Adam, Joubert et al. 2006) semblent montrer qu'une irradiation de 25 Gy en SSRT prolonge significativement l'espérance de vie des animaux. Néanmoins ceux-ci meurent tout de même à partir de 130 jours après implantation. Ce résultat laisse penser que les animaux meurent en partie à cause d'un effet de sur-irradiation. Les minifaisceaux et l'effet protecteur du tissu sain semblent donc parfaitement appropriés pour éviter ce potentiel effet de sur-irradiation. Il a donc été effectué une comparaison de traitement SSRT/minifaisceaux. Les hauteurs de faisceau utilisées étaient les mêmes dans les deux cas, 0.620 mm. L'irradiation a été effectuée sur 17 étages. Le volume d'irradiation est donc de :

- Un cylindre de 8 mm de diamètre et 10.2 mm de haut pour la SSRT
- Un pavé de 8 x 8 x 10.2 mm³ pour la radiothérapie minifaisceaux

Les résultats de survie sont représentés sur les courbes de Kaplan-Meier figure 44 et sur le tableau récapitulatif ci-dessous (tableau 1 et 2).

| Groupe | Moyenne | Ecart-type | %ILS _{moyenn} ^e | Médiane | %ILS _{médian} ^e |
|------------------------------|---------|------------|-------------------------------------|---------|-------------------------------------|
| Témoin (n = 4) | 28.25 | 1.5 | 0 | 28 | 0 |
| 25 Gy SSRT (n = 12) | 66.5 | 16.47 | 135.40 | 64 | 128.57 |
| 25 Gy Minifaisceaux (n = 12) | 59.64 | 9.36 | 111.10 | 57 | 103.57 |

Table 1 : Tableau récapitulatif des résultats de survie des rats porteurs de tumeurs F98 irradiés soit par minifaisceaux soit par SSRT. Dans les deux cas, la dose à la tumeur était de 25 Gy.

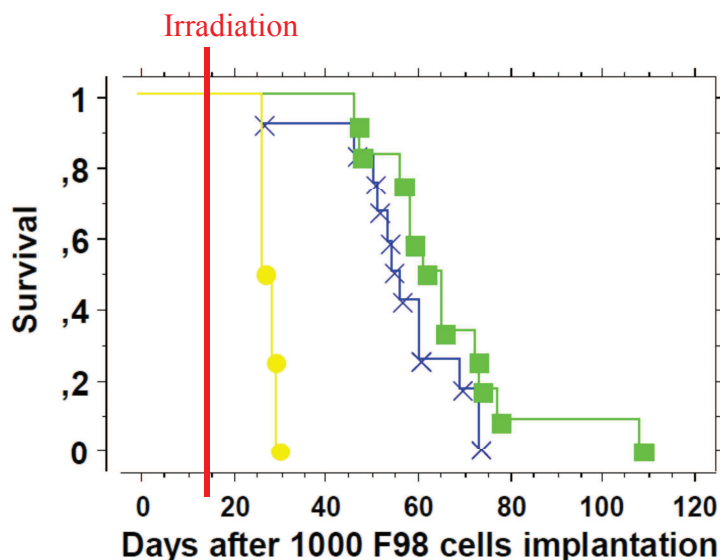


Figure 44 : Courbes de Kaplan-Meier de la survie de rats porteur de tumeur F98 après irradiation en mode minifaisceaux ou SSRT de 25 Gy au niveau de la tumeur. ● jaune : témoin, x bleu : minibeam, ■ vert : SSRT.

| Test Mantel-Cox | Minibeam : | SSRT : |
|-----------------|------------|----------|
| Témoin : | p<0.001 | p<0.001 |
| Minibeam : | | P = 0.16 |

Table 2 : Résultats des tests Mantel-Cox Logrank pour les différences entre les courbes de survie. Les survies entre Témoin et minifaisceaux sont significativement différentes, ainsi qu'entre témoin et SSRT. Les survies entre minifaisceaux et SSRT ne sont pas significativement différentes.

Les deux courbes de survie SSRT et minifaisceaux sont significativement différentes de la courbe de survie des témoins. Les deux courbes ne sont pas significativement différentes entre elles. La survie des rats irradiés par SSRT est nettement inférieure à celle observée dans l'étude d'Adam *et al.* (Adam, Joubert *et al.* 2006) (moyenne de survie de 66.5 ± 16.47 jours contre 180 ± 130 jours). La différence peut être due à une évolution de la lignée tumorale. Les rats ont été observés par IRM anatomique à différents temps après irradiation. Lors du dernier IRM ante-mortem, il a été observé que la tumeur avait continué à croître. Il semble donc que la mort des rats ne provienne pas uniquement de surdosage.

Irradiation minifaisceaux 54 Gy :

Les images IRM réalisées sur les rats irradiés à 25 Gy montrent qu'en fin de vie la tumeur était encore présente et occupait tout l'hémisphère droit. L'une des hypothèses est que la dose prescrite était trop faible pour stériliser la tumeur. Une irradiation minifaisceaux a été réalisée avec 54 Gy prescrit à la tumeur. Le volume d'irradiation est de $7 \times 7 \times 7.8 \text{ mm}^3$ (13 minifaisceaux). Un suivi par imagerie IRM a été effectué. Le volume irradié est inférieur au volume d'irradiation de l'étude précédente (25 Gy) pour correspondre cette fois-ci strictement à un seul hémisphère. Le groupe témoin comporte 9 animaux tandis que le groupe irradié en comporte 14. Lors de l'euthanasie des rats, le cerveau a été prélevé et des coupes histologiques H&E ont été réalisées. Les survies moyennes des rats est de 49 ± 12.5 et 23.3 ± 2 jours après implantation pour le groupe irradié par minifaisceaux et le groupe témoin respectivement. Leurs médianes de survie sont respectivement 45 et 23. Ceci correspond à un $\%ILS_{moyenne}$ de 110% et un $\%ILS_{médiane}$ de 90%. Les deux courbes de survie sont significativement différentes (Test Mantel-Cox Logrank : p<0.001).

Les courbes de Kaplan-Meier de la survie des rats après implantation de la tumeur sont représentées sur la figure 45.

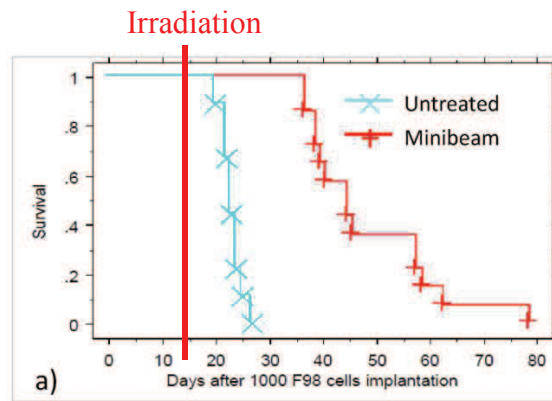


Figure 45 : a) Courbes de Kaplan-Meier de survie des rats après implantation de 1000 cellules F98 dans le striatum droit. X témoins, + minifaisceaux.

Après l'euthanasie des rats (par une injection d'1 ml de Dolethal ou de KCL en intracardiaque), une fois le point limite atteint, le cerveau a rapidement été prélevé et congelé à -80 degré Celsius. Des sections de 10 microns ont été coupées au cryo-microtome et marquées avec de l'hématoxyline/éosine. L'orientation des coupes a été choisie perpendiculaire à la direction d'irradiation. D'après l'étude des coupes histologiques H&E (réalisées sur 3 rats par groupe), on observe dans les deux cas que la tumeur présente un aspect très hétérogène au moment du décès du rat. Il y a présence d'un œdème périphérique, d'un cœur nécrotique au centre de la tumeur, qui est entouré de cellules tumorales avec un aspect dit en pseudo-palissade. Du tissu tumoral viable est observé en périphérie de la nécrose sur tous les rats. La nécrose couvre environ 40 à 50 % de la surface total dans le cas des rats témoins (non traités). C'est significativement moins que ce qui est observé sur les rats traités par minifaisceaux (environ 70%). Ceux-ci sont par ailleurs d'avantage pseudo-kystiques (présence de zone liquidienne). Un exemple est représenté sur la figure 46.

La quantité de nécrose de tissu est plus importante que la taille de la tumeur au moment de l'irradiation. Ceci laisse à penser à une sur-irradiation, malgré la résistance du tissu sain à cette dose (étude sur rat sain présentée dans la section précédente). Si l'on considère que le tissu sain ne subit pas ou faiblement de dégradation du fait de l'irradiation, comme le laisse penser l'étude sur tissu sain, il est possible que la nécrose provient d'une sur irradiation des cellules tumorales. Si celles-ci meurent toutes en même temps il peut se former un œdème cytotoxique. L'œdème déformerait la partie nécrotique et alors le volume occupé par la nécrose n'est plus comparable au volume de la tumeur au moment du traitement. Cette hypothèse de sur irradiation de la tumeur pourrait correspondre au fait qu'on n'ait pas une survie plus importante lors de l'irradiation avec 54 Gy prescrits à la tumeur que dans le cas des 25 Gy prescrits à la tumeur, bien que les deux expériences soient difficilement comparable à cause du volume irradié différent.

Pour expliquer la reprise tumorale, l'une des hypothèses est que l'irradiation n'ait pas touché toutes les cellules infiltrantes. C'est l'une des raisons données par Clavier *et al.* pour expliquer que les limites de la radiochirurgie dans le cas des gliomes (Clavier, Voirin et al. 2010). La radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron serait alors plus adaptée puisqu'elle dépose une dose sur un volume plus important, même si la dose en périphérie du planning target volume (PTV) est assez faible (qq Gy).

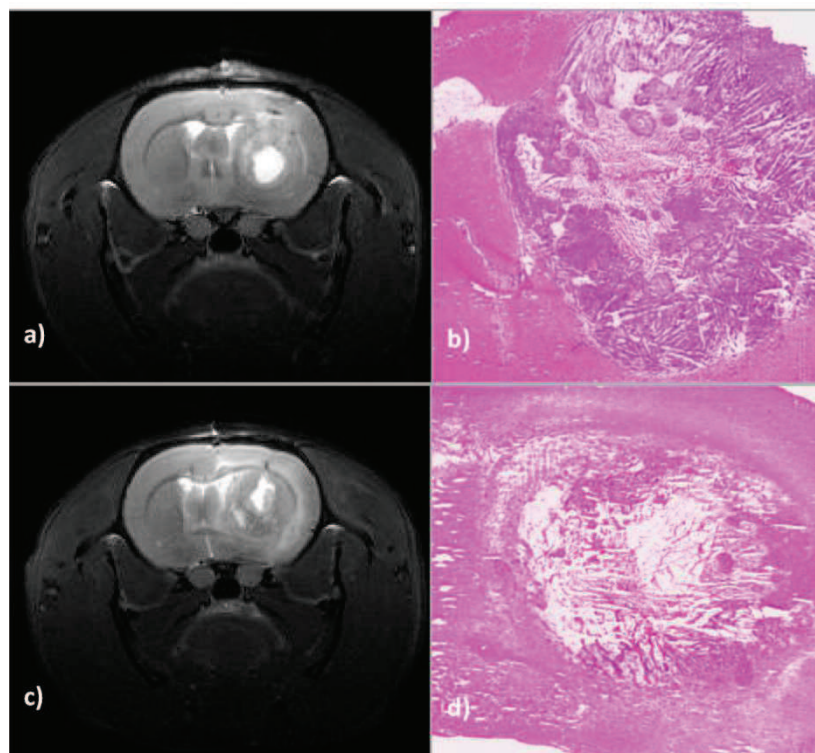


Figure 46 : Image pondérée T_2 et coupe histologique H&E d'une section central de la tumeur (modèle F98) d'un rat non traité et d'un rat irradié par minifaisceaux (54 Gy à 1 cm de profondeur). Rat témoin: a) Image T_{2w} , 18 jours après implantation; b) H&E section, même rat, 27 jours après implantation. Rat irradié: c) Image T_{2w} , 35 jours après implantation; d) H&E section, même rat, 48 jours après implantation. La surface occupée par la nécrose est plus grande dans le cas du rat traité. Cependant dans les deux cas, il y a toujours présence de cellules tumorales en fin de vie du rat.

Afin d'étudier l'influence de la dose sur la tumeur et si elle a un effet délétère sur la tumeur une étude en escalade de dose a été conduite. De même, pour vérifier si le volume irradié couvre ou non toutes les cellules tumorales, y compris les cellules infiltrantes, des irradiations par minifaisceaux complétées d'une irradiation panencéphalique ont été réalisées.

Etude escalade de dose :

On suppose que les effets bénéfiques dûs à l'irradiation ont un maximum à une dose donnée, puis la survie tend à décroître à nouveau. Dans cette étude, des groupes d'animaux ont donc été irradiés aux doses suivantes : 0 (n = 5), 15 (n = 8), 25 (n = 7), 35 (n = 7) et 50 (n = 7) Gy. Les doses sont prescrites à 1 cm de profondeur. Le volume irradié est de $8 \times 8 \times 10.2 \text{ mm}^3$ (17 minifaisceaux) pour prendre une partie des cellules infiltrantes dans le volume tumoral. Deux groupes ont en plus suivi un traitement type radiochirurgie clinique, c'est-à-dire qu'en plus de la radiochirurgie limité à la tumeur plus les marges, il y a eu une irradiation cérébrale totale. Cette irradiation cérébrale totale a été réalisée 24h après la radiochirurgie pour laisser le temps aux réparations des lésions sublétales de l'ADN de s'effectuer. Cette irradiation est réalisée en deux incidences latérales pour avoir une dose la plus homogène possible. Chaque incidence a distribué 5 Gy à 1 cm de profondeur. Ce schéma d'irradiation a pour but d'être certain d'irradier aussi les cellules infiltrantes des gliomes, qui peuvent se trouver à des distances assez importantes de la masse tumorale principale. Le fait d'irradier en deux fois permet de diminuer l'impact de l'irradiation du tissu sain (par effet du fractionnement temporel) et donc réduire le risque de complication à long terme (dont la nécrose).

Les résultats de la survie sont représentés sur la figure 47 et les tableaux 3.

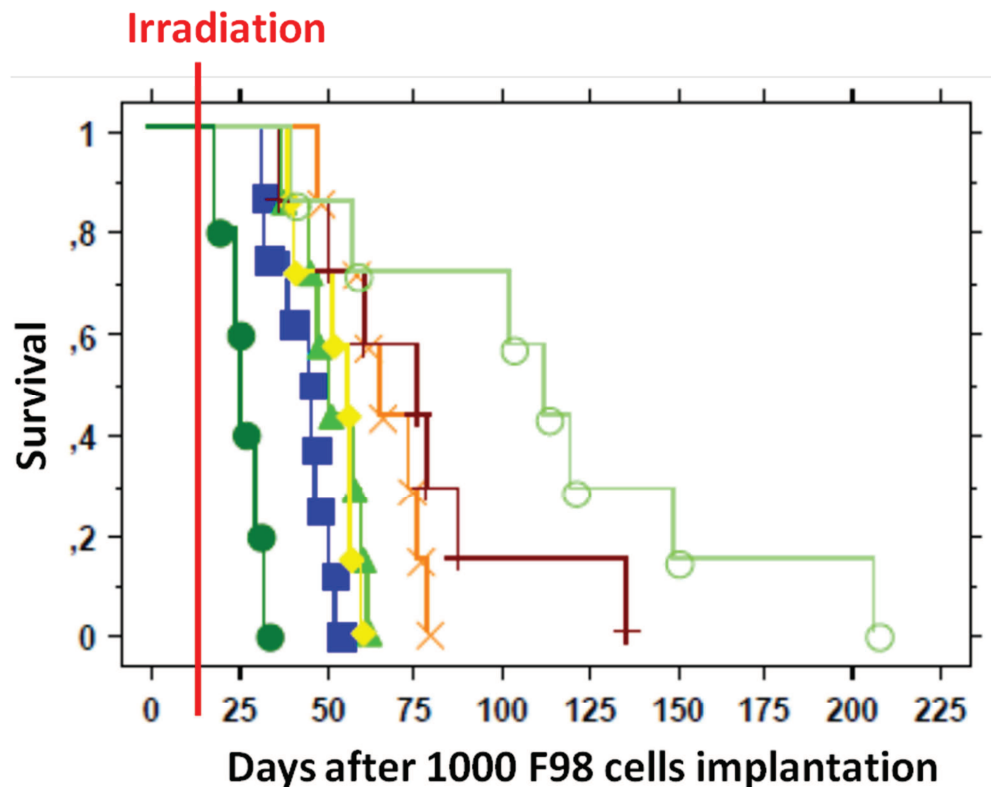


Figure 47 : Courbes de Kaplan-Meier de survie des différents groupes de rats : ● témoins, ■ 15 Gy minifaisceaux, ◆ 25 Gy minifaisceaux, ▲ 15 Gy minifaisceaux et 10 Gy total, × 25 Gy minifaisceaux et 10 Gy total, + 35 Gy minifaisceaux, ○ 50 Gy minifaisceaux.

| Groupe | Moyenne | Ecart-type | %ILS _{moye} | Médiane | %ILS _{médi} |
|--------------|---------|------------|----------------------|---------|----------------------|
| | | | nne | | ane |
| Témoin | 27.2 | 2.58 | 0 | 27 | 0 |
| 15 Gy | 44.25 | 2.77 | 62.7 | 47 | 74.07 |
| 15 Gy + WBRT | 52.71 | 3.31 | 93.79 | 52 | 92.59 |
| 25 Gy | 52.71 | 3.17 | 93.79 | 57 | 111.11 |
| 25 Gy + WBRT | 66.86 | 4.22 | 145.81 | 66 | 144.44 |
| 35 Gy | 76.43 | 12.07 | 180.99 | 77 | 185.19 |
| 50 Gy | 113.43 | 20.97 | 317.02 | 113 | 318.52 |

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des résultats de survie des rats porteurs de tumeurs F98 irradiés par minifaisceaux à différentes doses. WBRT signifie whole brain radiation, avec une prescription de 10 Gy à 1 cm.

On observe que le groupe recevant 25 Gy à la tumeur à une survie très proche dans cette étude de celle obtenue dans la précédente (comparaison SSRT et Minifaisceaux) (52.71 ± 3.17 et 59.64 ± 9.36 respectivement).

Le test statistique logrank a été utilisé pour tester la différence entre les courbes de survie 2 à 2 (Bland and Altman 2004). Les résultats, présentés sur le tableau 4, sont à prendre avec précaution du fait que le test logrank peut ne pas détecter une différence significative lorsque les courbes de survie se croisent. Il faut donc relativiser certains résultats aux valeurs des %ILS et courbes de survie.

| Test Mantel-Cox Logrank : p | 15 Gy | 15 Gy + W | 25 Gy | 25 Gy + W | 35 Gy | 50 Gy |
|--------------------------------|-------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| Témoin | 0.001 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 | 0.0003 |
| 15 Gy | | 0.06 | 0.021 | 0.0005 | 0.0048 | 0.0015 |
| 15 Gy + W | | | 0.62 | 0.0155 | 0.0305 | 0.011 |
| 25 Gy | | | | 0.0057 | 0.027 | 0.0069 |
| 25 Gy + W | | | | | 0.25 | 0.025 |
| 35 Gy | | | | | | 0.12 |

Table 4 : Résultats des tests Mantel-Cox Logrank pour les différences entre les courbes de survie. Toutes les survies de groupes de rats irradiés sont significativement différentes de la survie des témoins. La différence n'est pas forcément significative entre les groupes irradiés (en rouge), d'après le test logrank et les limites de ses conditions d'utilisation. W signifie whole brain irradiation, avec une prescription de 10 Gy à 1 cm.

Un ajustement des %ILS_{moyenne} en fonction de la dose a été réalisé afin de comparer ces résultats à ceux d'Adam *et al.* (Adam, Joubert et al. 2006) (figure 48).

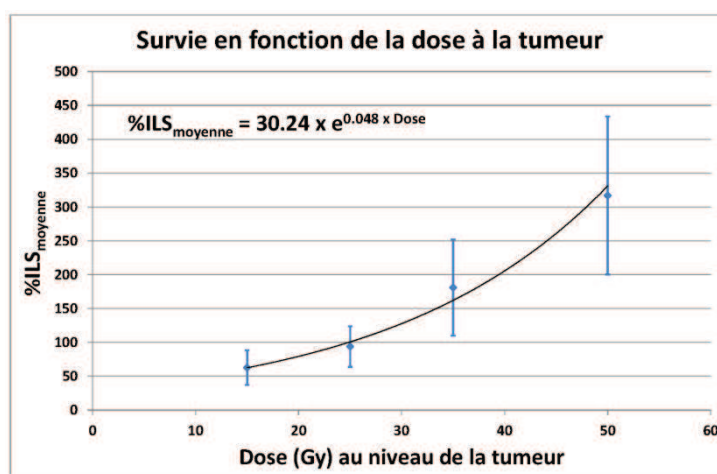


Figure 48 : %ILS_{moyenne} en fonction de la dose prescrite à la tumeur (en bleu) pour les groupes avec irradiation minifaisceaux seule. Un ajustement avec une courbe exponentielle est réalisé (en noir).

L'ajustement avec une exponentielle de la forme $\%ILS_{moyenne} = A \exp(B \times Dose)$ donne : $A = 30.24 \pm 1.63$ et $B = 0.048 \pm 0.014 \text{ Gy}^{-1}$. Le χ^2 réduit vaut 0.13/2 et la probabilité vaut 0.937. On ne retombe à priori pas sur la loi exponentielle trouvée par Adam *et al.* Il semble que l'irradiation à un effet moindre, peut être dû à une évolution de la lignée tumorale qui serait plus virulente.

Lors de l'examen des coupes histologiques H&E (réalisées sur 2 à 3 rats par groupe dans les mêmes conditions que pour l'étude des rats irradiés avec 54 Gy), on observe à peu près la même chose que pour l'étude précédente. Il y a présence d'un œdème périphérique, d'un cœur nécrotique au centre de la tumeur, qui est entouré de cellules tumorales avec un aspect de pseudo-palissade (figure 49 et 50). La quantité de nécrose est très importante (environ 70% pour tous les groupes irradiés) et représente un volume plus important que celui occupé par la tumeur lors de l'irradiation. Ce volume semble indépendant de la dose prescrite. Il n'y a pas de différence visible à l'histologie entre les différentes doses au niveau de la tumeur. Dans le cas des groupes irradiés en plus avec une irradiation cérébrale totale, le tissu controlatéral semble un peu plus hémorragique. Il faudrait un nombre plus important de rats pour confirmer cette observation.

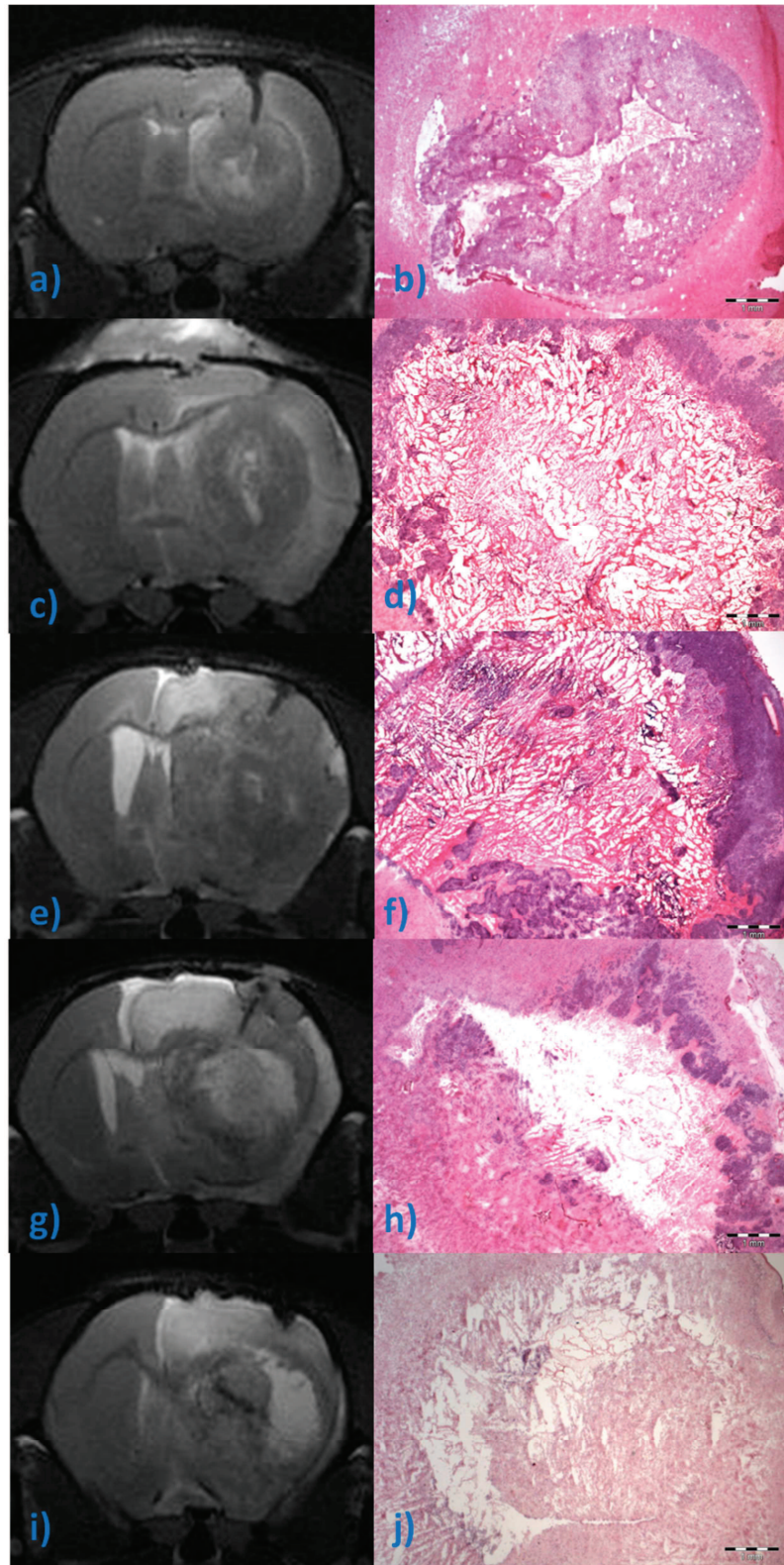


Figure 49 : Image pondérée T_2 et coupe histologique H&E d'une section central de la tumeur (modèle F98) d'un rat non traité et de rats irradiés par minifaisceaux. Rat témoin: a) Image T_{2w} , 22 jours après implantation; b) H&E section, même rat, 25 jours après implantation. Rat 15 Gy: c) Image T_{2w} , 35 jours après implantation; d) H&E section, même rat, 48 jours après implantation. Rat 25 Gy: e) Image T_{2w} , 53 jours après implantation; f) H&E section, même rat, 58 jours après implantation. Rat 35 Gy: g) Image T_{2w} , 70 jours après implantation; h) H&E section, même rat, 77 jours après implantation. Rat 50 Gy: i) Image T_{2w} , 100 jours après implantation; j) H&E section, même rat, 103 jours après implantation. La surface occupée par la nécrose est plus grande dans le cas des rats traités. Cependant dans tous les cas, il y a toujours présence de cellules tumorales en fin de vie du rat.

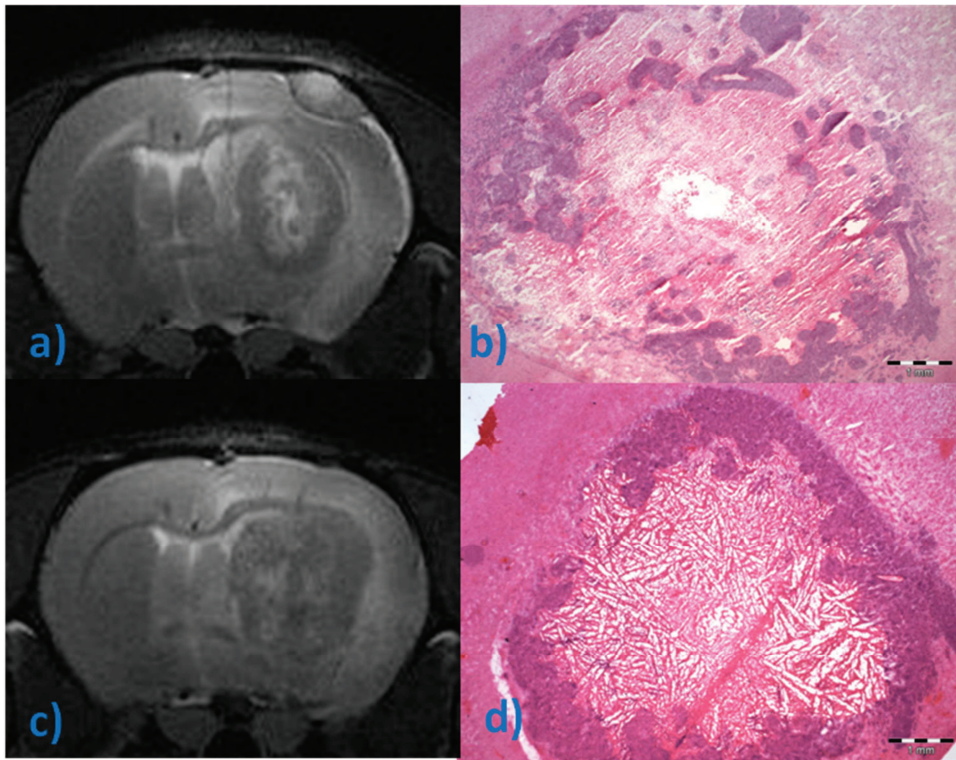


Figure 50 : Image pondérée T_2 et coupe histologique H&E d'une section central de la tumeur (modèle F98) d'un rat non traité et de rats irradiés par minifaisceaux. Rat 15 Gy + WBRT : a) Image T_{2w} , 35 jours après implantation; b) H&E section, même rat, 46 jours après implantation. Rat 25 Gy + WBRT : c) Image T_{2w} , 53 jours après implantation; d) H&E section, même rat, 62 jours après implantation. La surface occupée par la nécrose est plus grande que dans le cas des rats témoins. Cependant dans tous les cas, il y a toujours présence de cellules tumorales en fin de vie du rat.

3.4 Discussion :

Le principal avantage de la technique des minifaisceaux est son effet protecteur sur le tissu sain traversé par les faisceaux (Dilmanian, Zhong et al. 2006a; Dilmanian, Zhong et al. 2006b). Cette technique est caractérisée par son fractionnement spatial comme il a été vu dans le chapitre précédent. Elle permet de distribuer de fortes doses dans un parallépipède de façon homogène sans endommager le tissu sain environnant. La première étude permet de démontrer l'effet protecteur sur le tissu sain des minifaisceaux monochromatiques chez le rat, pour des doses allant jusqu'à 123 Gy à 1 cm de profondeur. Cette étude est un premier développement de radiochirurgie par minifaisceaux sur des rats porteurs de tumeur. L'objectif est d'optimiser ses conditions d'application indépendamment de son couplage potentiel avec des drogues de chimiothérapie ou de son couplage avec des éléments lourds pour créer un renforcement de dose local au niveau de la tumeur. La radiochirurgie peut se faire par d'autres techniques (Baumert, Norton et al. 2004; Khuntia, Tome et al. 2009). Concernant le rayonnement synchrotron il y a également les microfaisceaux (MRT) mais il y a de nombreuses difficultés techniques à surmonter pour passer potentiellement au stade clinique, notamment celle de la précision micrométrique du positionnement de la tumeur pour les différentes incidences. Elle peut aussi se réaliser par des faisceaux d'ions (hadronthérapie, ...) (Schulz-Ertner and Tsujii 2007), mais la dosimétrie et la balistique peuvent être extrêmement complexes pour que le dépôt d'énergie soit le plus homogène possible sur le volume cible.

Le fractionnement spatial des minifaisceaux utilise un effet dose/volume entre celui de la radiochirurgie photonique conventionnelle (millimétrique) (Flickinger, Lunsford et al. 1992a; Kondziolka, Lunsford et al. 1992a; Kondziolka, Lunsford et al. 1992b) et celui de la thérapie

microfaisceaux (micrométrie) (Serduc, Bouchet et al. 2009; Serduc, Brauer-Krisch et al. 2010). Pour étudier son effet protecteur sur les tissus sains, une première expérience a été conduite durant 1 an sur des animaux sains. Un suivi a été réalisé à la fois afin d'observer les potentiels effets néfastes aigus peu de temps après irradiation ainsi que les effets tardifs (Ruben, Dally et al. 2006). Les effets tardifs sont principalement dus à des dommages sur les cellules endothéliales vasculaires (Munter, Karger et al. 1999; Coderre, Morris et al. 2006). C'est pourquoi le suivi a été réalisé par IRM avec des séquences anatomiques (T_{2w}) mais aussi par la mesure de l'ADC et la différence entre un T_1 avant et après injection d'agent de contraste pour voir la perméabilité des vaisseaux. Sur les animaux irradiés avec une seule incidence et 123 Gy à 1 cm, aucune altération clinique n'a été observée, et les mesures de T_{2w} et ADC normalisées à la zone controlatérale n'ont pas significativement évolué en fonction du temps. Pour les rats irradiés avec deux incidences et un entrelacement réalisé avec une dose homogène de 54 Gy à 1 cm, un hyposignal T_{2w} et une perméabilité des vaisseaux à l'agent de contraste ont été observés dans la région entrelacée à partir de 200 et 298 jours après irradiation. Ces modifications se retrouvent sur les coupes histologiques par la présence de vaisseaux dilatés et coagulés. Cependant malgré cela, les animaux ont vécu 1 an sans montrer aucune altération clinique (poids, déplacement, etc ...). De plus elles sont limitées à la zone d'entrelacement, là où on cherche à stériliser la tumeur. Ceci ne correspond pas tout à fait à ce qu'ont pu observer Dilmanian *et al* (Dilmanian, Zhong et al. 2006b) avec des doses similaires mais un suivi plus court, un faisceau polychromatique et un débit de dose plus élevé. On conclut donc de cette expérience que de fortes doses (30 à 50 Gy) pourraient être distribuées en une seule fraction à un patient humain sans conséquence pour le tissu sain environnant la tumeur, du moment que l'on respecte la tolérance du tissu sain dans les vallées, c'est-à-dire qu'on reste en dessous d'une dizaine de Gy (Emami, Lyman et al. 1991; Flickinger, Lunsford et al. 1992a; Niranjani and Flickinger 2008).

L'espérance de vie des différents groupes de rats irradiés a augmenté de façon significative, d'autant plus que la dose totale était élevée. Cependant ces augmentations de survie ne sont pas forcément supérieures à celles qui ont pu être observées dans d'autres études de radiochirurgie seules (Barth, Grecula et al. 2004; Adam, Joubert et al. 2006; Serduc, Bouchet et al. 2009). Il est néanmoins difficile de comparer ces résultats puisque les modèles tumoraux utilisés sont rarement identiques. Dans l'étude de Adam *et al*, il s'agit du même modèle, cependant les résultats obtenus diffèrent de ceux obtenus par d'autres expérimentateurs plus tard dans des conditions d'irradiations identiques, laissant supposer que la lignée tumorale a pu évoluer lors de son renouvellement. Les suivis IRM anatomique et l'analyse histologique H&E ont permis de montrer que les rats étaient dans tous les cas décédés du fait de la présence de la tumeur. Au cours de cette expérience nous avons observé, dans le volume tumoral en fin de vie des animaux, la présence d'un œdème et de nécrose très importante. De plus certaines images IRM montrent que le liquide cérébro-spinal ne peut plus s'évacuer (le volume tumoral comprimerait peut être le trou de monro). Ceci nous mène à penser que d'autres causes que la présence seule de la tumeur pourraient expliquer la mort des rats. Le volume tumoral en fin de vie est par ailleurs beaucoup plus important chez les rats irradiés que chez les rats témoins. La quantité de nécrose du tissu ne semble pas dépendre de la dose, et est beaucoup plus grande que le volume tumoral lors de l'irradiation. Ceci laisse supposer une « croissance de la nécrose » si l'on considère, comme semble le montrer l'étude sur les rats sains, que l'irradiation du tissu sain, même en condition entrelacée, n'a que peu d'incidence aux doses étudiées. Ce résultat est surprenant, et mériterait une étude biologique plus approfondie.

Dans tous les cas le traitement n'a pas été curatif. Ceci peut être dû au fait que des cellules tumorales restent en dehors de la zone d'irradiation malgré les volumes importants irradiés dans

certain cas vu que le modèle tumoral F98 est très agressif. En effet la radiochirurgie conventionnelle seule est rarement concluante (Kondziolka, Somaza et al. 1996; Sneed, Suh et al. 2002; Clavier, Voirin et al. 2010). La survie des rats irradiés avec 54 Gy n'était pas significativement différente de celle des rats irradiés à 25 Gy. L'une des hypothèses est donc que l'on a trop réduit le volume irradié et donc que certaines cellules tumorales étaient hors du volume. Cependant cette hypothèse n'est pas forcément valable pour les cas d'irradiations sur un grand volume ($8 \times 8 \times 10.2 \text{ mm}^3$). Les essais où une irradiation cérébrale totale ont été réalisées en complément d'une irradiation par minifaisceaux semblent en effet contredire cette hypothèse. Les résultats de survie des groupes « 15 Gy minifaisceaux + 10 Gy total » et « 25 Gy minifaisceaux » ne sont pas significativement différents, de même que pour les groupes « 25 Gy minifaisceaux + 10 Gy total » et « 35 Gy minifaisceaux ». Même si les tests statistiques logrank ne sont pas forcément concluants lorsque les courbes de survie se croisent (Tubert-Bitter, Kramar et al. 1994; Bland and Altman 2004), les %LS tendent à montrer la même chose. L'étude de l'évolution de la vascularisation en fonction du temps, et de la formation de la nécrose semble être primordiale pour comprendre la nécrose extrêmement importante du tissu dans le cas des rats irradiés par minifaisceaux. Le chapitre 6 décrira justement le suivi par imagerie de perfusion des rats irradiés par minifaisceaux.

Les essais précliniques de cette thèse n'ont porté que sur des irradiations seules. Il n'a pas été testé l'injection d'élément lourd dans la tumeur pour augmenter y augmenter la dose sans modifier celle du tissu sain. Cela permettrait de diminuer la dose prescrite par les minifaisceaux et donc dans le tissu sain, tout en distribuant la même dose dans la tumeur. Il n'a pas non plus été testé de combiner les irradiations minifaisceaux à de la chimiothérapie. Dans différentes études, l'intérêt de ce couplage a été démontré, la chimiothérapie apportant une autre source de dommage aux cellules tumorales, et pouvant agir en périphérie, là où il y a le plus de reprise tumorale d'après l'étude de Clavier *et al.* (Clavier, Voirin et al. 2010). De plus dans l'étude de Clavier *et al.*, il est signalé qu'il vaut mieux irradier en hypo fractionné plutôt qu'en une seule incidence. L'effet préférentiel temporel (décrit au chapitre 1) permettrait peut être de protéger quelques cellules saines restant dans le volume tumoral et il conserverait mieux son intégrité tissulaire.

- Adam, J. F., A. Joubert, et al. (2006). "Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy." International Journal Of Radiation Oncology Biology Physics **64**(2): 603-611.
- Barth, R. F. (1998). "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas." Journal Of Neuro-Oncology **36**(1): 91-102.
- Barth, R. F., J. C. Grecula, et al. (2004). "Combination of boron neutron capture therapy and external beam radiotherapy for brain tumors." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **58**(1): 267-277.
- Baumert, B. G., I. A. Norton, et al. (2004). "Dose conformation of intensity-modulated stereotactic photon beams, proton beams, and intensity-modulated proton beams for intracranial lesions." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **60**(4): 1314-1324.
- Bland, J. A. and D. G. Altman (2004). "The logrank test." British Medical Journal **328**(7447): 1073-1073.
- Bobyk, L. (2010). Renforcement de la dose par rayonnement synchrotron et atomes lourds dans le cadre du traitement des gliomes. Grenoble, Université de Grenoble.
- Clavier, J. B., J. Voirin, et al. (2010). "Systematic review of stereotactic radiotherapy for high-grade gliomas." Cancer Radiothérapie **14**(8): 739-754.

- Clendenon, N. R., R. F. Barth, et al. (1990). "Boron neutron-capture therapy of rat glioma." Neurosurgery **26**(1): 47-55.
- Coderre, J. A., G. M. Morris, et al. (2006). "Late effects of radiation on the central nervous system: Role of vascular endothelial damage and glial stem cell survival." Radiation Research **166**(3): 495-503.
- Dilmanian, F. A., Z. Zhong, et al. (2006). "Microbeam radiation therapy in an interlaced geometry: Potential applicability to neuro-oncology and radiosurgery." Neuro-Oncology **8**(4): 484-485.
- Dilmanian, F. A., Z. Zhong, et al. (2006). "Interlaced x-ray microplanar beams: A radiosurgery approach with clinical potential." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(25): 9709-9714.
- Doblas, S., T. He, et al. (2010). "Glioma Morphology and Tumor-Induced Vascular Alterations Revealed in Seven Rodent Glioma Models by In Vivo Magnetic Resonance Imaging and Angiography." Journal of Magnetic Resonance Imaging **32**(2): 267-275.
- Emami, B., J. Lyman, et al. (1991). "Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **21**(1): 109-122.
- Flickinger, J. C., L. D. Lunsford, et al. (1992). "Dose prescription and dose-volume effects in radiosurgery." Neurosurg Clin N Am **3**(1): 51-9.
- Fournier, E., C. Passirani, et al. (2003). "Therapeutic effectiveness of novel 5-fluorouracil-loaded poly(methylidene malonate 2.1.2)-based microspheres on F98 glioma-bearing rats." Cancer **97**(11): 2822-2829.
- Khuntia, D., W. A. Tome, et al. (2009). "Radiation Techniques in Neuro-Oncology." Neurotherapeutics **6**(3): 487-499.
- Ko, L., A. Koestner, et al. (1980). "Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell-lines and clones." Acta Neuropathologica **51**(1): 23-31.
- Kondziolka, D., L. D. Lunsford, et al. (1992). "Radiobiology of radiosurgery, .1. The normal rat-brain model." Neurosurgery **31**(2): 271-279.
- Kondziolka, D., L. D. Lunsford, et al. (1992). "Radiobiology of radiosurgery .2. The rat-C6 glioma model." Neurosurgery **31**(2): 280-288.
- Kondziolka, D., S. Somaza, et al. (1996). "Radiosurgery and fractionated radiation therapy: Comparison of different techniques in an in vivo rat glioma model." Journal of Neurosurgery **84**(6): 1033-1038.
- Munter, M. W., C. P. Karger, et al. (1999). "Delayed vascular injury after single high-dose irradiation in the rat brain: Histologic, immunohistochemical, and angiographic studies." Radiology **212**(2): 475-482.
- Niranjan, A. and J. C. Flickinger (2008). "Radiobiology, principle and technique of radiosurgery." Prog Neurol Surg **21**: 32-42.
- Paxinos, G. and C. Watson (2004). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.
- Rousseau, J., J. F. Adam, et al. (2009). "Intracerebral delivery of 5-iodo-2'-deoxyuridine in combination with synchrotron stereotactic radiation for the therapy of the F98 glioma." Journal of Synchrotron Radiation **16**: 573-581.
- Rousseau, J., R. F. Barth, et al. (2009). "Efficacy of intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation for treatment of F98 glioma-bearing rats." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **73**(2): 530-536.
- Rousseau, J., C. Boudou, et al. (2007). "Enhanced survival and cure of f98 glioma-bearing rats following intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation." Clinical Cancer Research **13**(17): 5195-5201.

- Ruben, J. D., M. Dally, et al. (2006). "Cerebral radiation necrosis: Incidence, outcomes, and risk factors with emphasis on radiation parameters and chemotherapy." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **65**(2): 499-508.
- Schulz-Ertner, D. and H. Tsujii (2007). "Particle radiation therapy using proton and heavier ion beams." Journal of Clinical Oncology **25**(8): 953-964.
- Serduc, R., A. Bouchet, et al. (2009). "Synchrotron microbeam radiation therapy for rat brain tumor palliation-influence of the microbeam width at constant valley dose." Physics in Medicine and Biology **54**(21): 6711-6724.
- Serduc, R., E. Brauer-Krisch, et al. (2010). "High-Precision Radiosurgical Dose Delivery by Interlaced Microbeam Arrays of High-Flux Low-Energy Synchrotron X-Rays." Plos One **5**(2).
- Sneed, P. K., J. H. Suh, et al. (2002). "A multi-institutional review of radiosurgery alone vs. radiosurgery with whole brain radiotherapy as the initial management of brain metastases." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **53**(3): 519-526.
- Swenberg, J. A., W. Wechsler, et al. (1972). "Quantitative aspects of transplacental tumor induction with ethylnitrosourea in rats." Cancer Research **32**(12): 2656-&.
- Tubert-Bitter, P., A. Kramar, et al. (1994). "Linear rank-tests for comparing survival in 2 groupes with crossing hazards." Computational Statistics & Data Analysis **18**(5): 547-559.

4. État de l'art angiogénèse tumorale et mesure de perfusion

Les gliomes représentent 2% des tumeurs chez l'adulte, et 30% des tumeurs cérébrales primitives. Ils peuvent se développer dans n'importe quelle région du cerveau, ce qui rend leur traitement très compliqué. Ce chapitre a pour but de décrire (brièvement) ce type de tumeurs, l'angiogénèse tumorale, la barrière hémato-encéphalique et sa rupture. Enfin les diverses techniques d'imagerie disponibles et utilisées en oncologie cérébrale seront présentées. Une attention particulière sera portée aux mesures de perfusion cérébrale et aux modèles pharmacocinétiques existants.

4.1 Les gliomes et l'angiogénèse tumorale

4.2.1 Les gliomes

Les gliomes (dérivant de la glie) sont des tumeurs histologiquement hétérogènes et peuvent être très invasifs. L'OMS propose une classification des différents gliomes basée sur des caractéristiques histologiques. Ils sont aussi répartis en 4 « grades », du plus bénin (I) au plus malin (IV).

- Astrocytomes avec comme sous catégorie :
 - astrocytome pilocytique grade I
 - astrocytome diffus, grade II
 - astrocytome anaplasique, grade III
- Oligodendrogliomes
 - oligodendrogliome, grade II
 - oligodendrogliome anaplasique, grade III
- Tumeurs mixtes
 - Oligoastrocytome, grade II
 - Oligoastrocytome anaplasique, grade III
 - Glioblastome à composante oligodendrogliale, grade IV
- Glioblastomes, grade IV

Seuls les gliomes de grade I peuvent se délimiter facilement du tissu sain. Les autres gliomes sont très invasifs. Ce caractère est l'une de leur principale caractéristique et l'une des principales raisons de la difficulté du traitement. Les gliomes de grade IV, dont le modèle F98 chez le rat Fischer étudié dans cette thèse est proche, correspondent aux glioblastomes multiformes (GBM). Ils sont notamment caractérisés par une forte prolifération et la présence de tissus nécrotiques. Les glioblastomes représentent 60 à 70% des gliomes et se localisent dans les hémisphères cérébraux dans lesquels est présente la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière est une membrane de cellules endothéliales très resserrées qui permet de filtrer les échanges entre les capillaires sanguins et le tissu cérébral. La vascularisation et la BHE seront décrites plus en détails dans le paragraphe suivant. Les facteurs biologiques et les différentes voies de l'oncogenèse gliale ont été revus par Charles *et al* et Figarella-Branger *et al* (Figarella Branger, Colin et al. 2010; Charles, Holland et al. 2011).

Les tumeurs cérébrales ont la particularité de modifier de façon importante les paramètres hémodynamiques à cause de deux phénomènes : la néoangiogénèse et la rupture de la BHE. Ces phénomènes sont une étape clé du passage de la tumeur d'un état bénin à un état malin. La néoangiogénèse est un développement anarchique de la vascularisation locale permettant un apport nutritif et d'oxygène essentiel à la croissance de la tumeur. Le deuxième phénomène propre aux tumeurs cérébrales est la rupture de la BHE qui est une conséquence directe du développement anarchique et incomplet des vaisseaux sanguins tumoraux, la BHE, n'ayant pas la possibilité de se former complètement.

4.2.2 La néoangiogénèse :

L'angiogénèse est le phénomène physiologique consistant au développement du réseau vasculaire. Ce réseau est structuré afin que toutes les cellules se situent au maximum à environ 200 micromètres d'un capillaire sanguin pouvant les approvisionner en nutriments. Le facteur limitant est la diffusion de l'oxygène dans le milieu extravasculaire (Carmeliet and Jain 2000). Lorsque de nouveaux vaisseaux se forment à partir de vaisseaux primitifs, on parle de néoangiogénèse.

La néoangiogénèse est dépendante du type tumoral (du type de gliome dans notre cas) et plusieurs mécanismes d'angiogénèse sont possibles (Bergers and Benjamin 2003; Jain, Di Tomaso et al. 2007). La description faite ici est la plus courante. Dans le cas de la plupart des tumeurs solides, il existe un phénomène appelé le « switch » angiogénique qui marque le début de cette néoangiogénèse tumorale et la fin de la phase dormante de la tumeur. Le volume de la tumeur augmente alors exponentiellement, et la vascularisation doit s'adapter pour pouvoir la nourrir. Les deux phases de développement vasculaire sont la phase d'induction puis la phase de maturation. Pendant l'induction la membrane basale est dégradée et il y a des cellules endothéliales qui migrent à travers la matrice extracellulaire. Les cellules endothéliales prolifèrent. (figure suivante 51b,c,d). La phase de maturation correspond alors à l'adhérence de cellules endothéliales entre elles et avec la membrane basale (figure 51e).

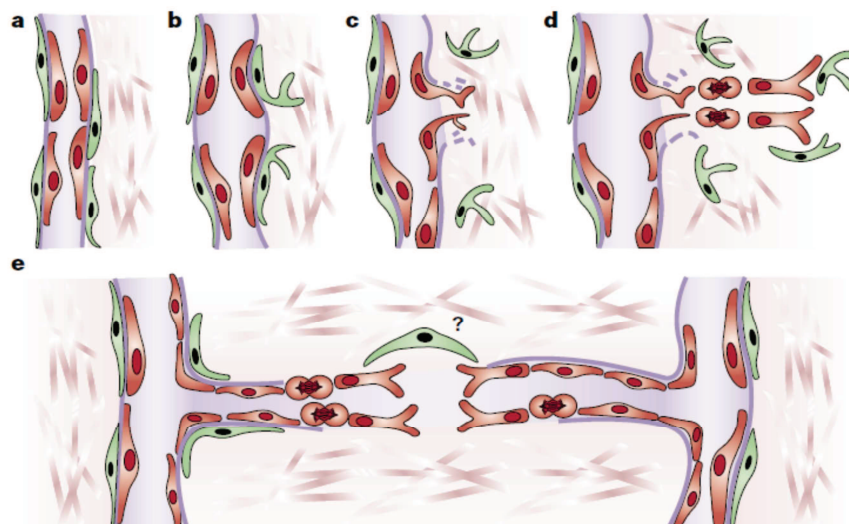


Figure 51 : figure d'après (Bergers and Benjamin 2003). Représentation de l'angiogénèse tumorale. A) capillaire préexistant avec en rouge les cellules endothéliales et en vert les pericytes. B) les pericytes se détachent et les vaisseaux se dilatent. C) La dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire permet la migration de pericytes et de cellules endothéliales. D) prolifération des cellules endothéliales « une à une ». E) connexion entre les cellules endothéliales, formation de la membrane, Création d'un nouveau circuit sanguin.

Dans les gliomes, ces mécanismes sont souvent déclenchés par l'expression de certains gènes contrôlant l'angiogénèse par les cellules hypoxiques (figure 52). Les cellules arrivent en hypoxie à cause de la prolifération de cellules tumorales augmentant la masse et la distance de ces cellules vis-à-vis de la vascularisation existantes. Il peut y avoir une surproduction de capillaires sanguins vis-à-vis du besoin nutritionnel du tissu. Il arrive souvent aussi que la vascularisation ne croisse pas assez vite pour palier aux demandes colossales de la tumeur. Il se forme alors dans une région centrale de la tumeur une nécrose où les cellules seront en hypoxie, principalement en son centre. Les vaisseaux tumoraux sont en généraux plus tortueux, dilatés et peuvent ne pas être connectés au reste du réseau vasculaire (un vaisseau "sans fin"). Les capillaires tumoraux sont souvent perméables et hémorragiques. Le facteur de croissance appelée vascular endothelial growth factor (VEGF) joue un rôle crucial dans ce développement anarchique et est surexprimée dans les gliomes. Risser *et al.* (Risser, Plouraboue et al. 2007) ont caractérisé l'aspect chaotique du réseau vasculaire tumoral (forte tortuosité, désorganisation complète) en démontrant une augmentation significative de la dimension fractale du réseau vasculaire dans le cas d'un modèle de tumeur cérébrale du rat. La taille des capillaires est aussi plus importante dans une tumeur solide que dans le tissu sain (d'un facteur 4 ou 5 en moyenne) (Beaumont, Lemasson et al. 2009). Les procédés plus complets de l'angiogénèse avec notamment les autres voies de création de vaisseaux et le caractère invasif des tumeurs et les différents facteurs anti-angiogénique et pro-angiogénique ont été décrits notamment par (Bergers and Benjamin 2003; Jain, Di Tomaso et al. 2007; Tate and Aghi 2009; Figarella Branger, Colin et al. 2010).

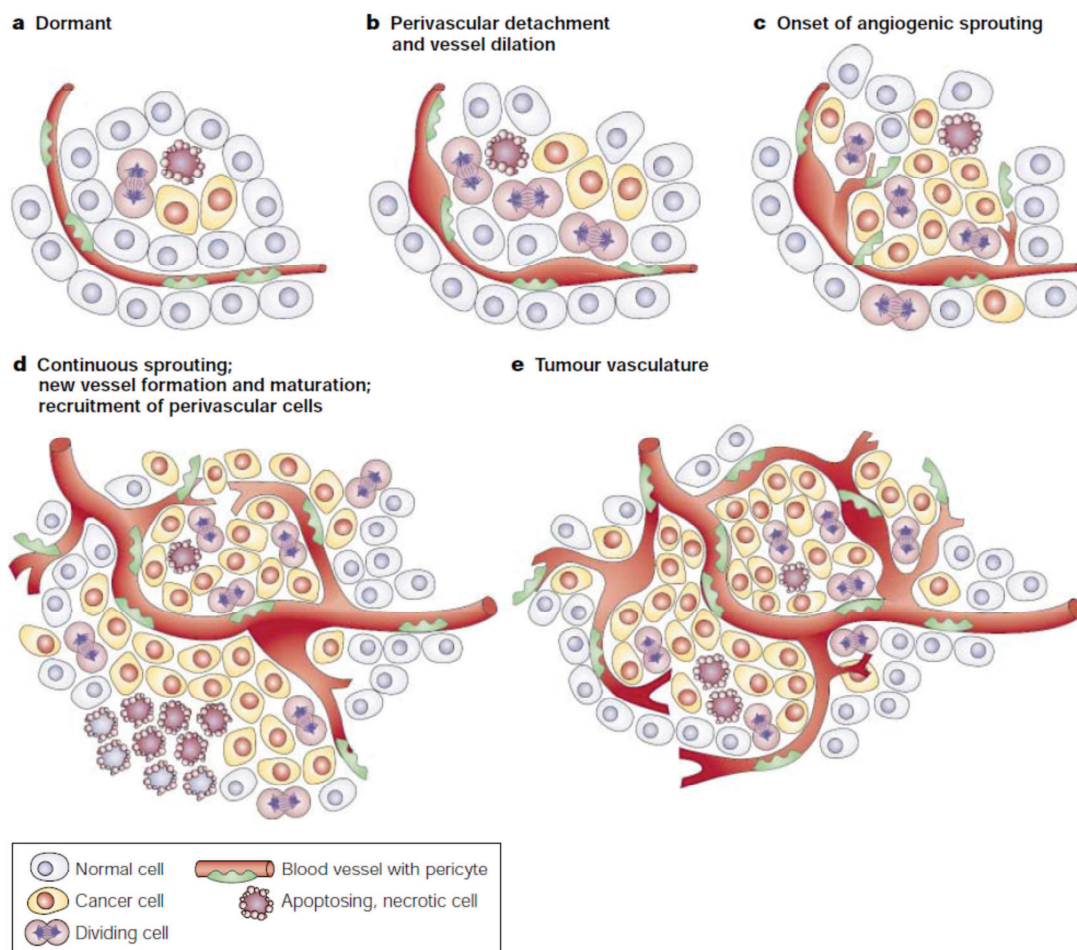


Figure 52 : Figure d'après (Bergers and Benjamin 2003) Exemple de développement de la tumeur. Les cellules en hypoxie (proche de la nécrose) provoquent la génération de nouveaux vaisseaux.

4.2 La BHE et son altération dans les tumeurs cérébrales :

4.2.1 La circulation sanguine :

Le Sang :

La circulation sanguine est très complexe de part la composition sanguine et de part le réseau vasculaire.

Le sang est une suspension concentré d'éléments dont les principaux sont :

- Le plasma sanguin

C'est une solution aqueuse formée de 91% d'eau comprennent un grand nombre d'ions (majoritairement Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^-), protéines (7%) et macromolécules. Il représente environ 55% du volume sanguin total.

-Les globules rouges

Ils représentent 99% du volume des éléments figurés contenus dans le sang. Ce sont des disques biconcaves très déformables, de 6 à 8 μm de diamètre et d'une épaisseur de 2 μm . Leur flexibilité leur permet des déplacements dans les plus petits capillaires du système sanguin (figure 53). Ils ne réagissent pas avec la paroi vasculaire. L'hématocrite mentionnée par la suite est le ratio entre le volume occupé par les globules rouges et le volume total de sang dans un échantillon.

-Les globules blancs

Ils représentent 0.2% des éléments figurés. Ils ont des tailles très variables, mais sont plus grands que les globules rouges. Lors de l'activation du système immunitaire, ils se fixent à la paroi vasculaire et la traverse. Leurs circulations ne peut donc pas être assimilé comme identique au plasma et aux globules rouges.

-Les plaquettes

Elles représentent 0,8% du volume des éléments figurés du sang. Ce sont des disques de 2 μm . Elles peuvent interagir entre elles, avec les cellules endothéliales et des composants du sang. Elles sont en partie responsable de la coagulation du sang et donc de sa viscosité.

Les interactions entre éléments ou entre les éléments et la paroi ont été rapportés par Kamm (Kamm 2002). Nous ne nous intéresserons par la suite qu'aux globules rouges et au plasma sanguin du fait de leur quantité largement supérieur aux autres constituants et de leur comportement relativement similaire.

Le réseau vasculaire :

Le réseau vasculaire de l'homme adulte contient environ 5 à 6L de sang (contre environ 12 ml chez le rat adulte). Le débit sanguin en sortie du cœur est d'environ 7 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (contre 45 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$). 10% de ce sang va au cerveau (alors que le cerveau ne représente que 2% de la masse totale du corps). Le réseau vasculaire se décompose dans l'ordre en artères, artérioles, capillaires, veinules, veines afin d'alimenter les organes à travers le corps.

Au niveau des gros vaisseaux, comme les carotides internes et vertébrales alimentant le cerveau, le sang circule dans un régime turbulent et pulsatile (de 20 à 45 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$). Puis le sang parcourt les artérioles de quelques de dizaine de micromètre dans un régime laminaire à une vitesse de 1 à 20 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Il arrive ensuite dans les capillaires, pouvant descendre jusqu'à quelques micromètres (leur diamètre luminal est d'environ 5 μm (Pawlik, Rackl et al. 1981)). Leur faible taille

permet d'avoir une surface d'échange très importante, estimée à environ 10 mm^2 par mm^3 de tissu cérébrale. La vitesse du sang dans les capillaires est estimée à entre 0.3 et 3.2 mm.s^{-1} avec une vitesse moyenne de 1 mm.s^{-1} . La distance entre deux capillaires est estimée à environ 25 micromètres (Donahue, Weisskoff et al. 1997), donc les cellules du cerveau se trouvent au maximum à environ 10 micromètres d'un capillaire. L'hémodynamisme dans le réseau vasculaire se complexifie à ce niveau, les hématies évoluant de façon très différentes pour une faible variation de la taille du capillaire.

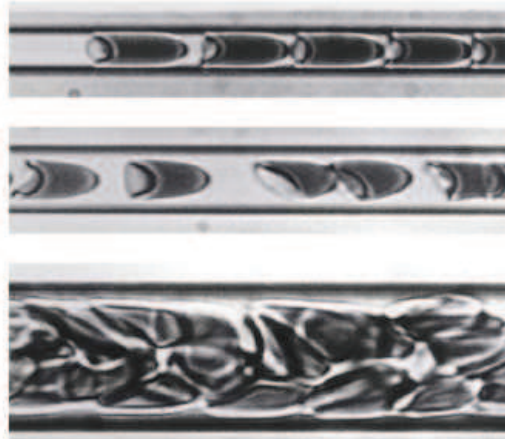


Figure 53 : Ecoulements des globules rouges humain dans des tubes de diamètres 4 , 7 et $17 \mu\text{m}$ de haut en bas respectivement. (d'après Handbook of Physiology – Microcirculation (2002))

Du fait de ces particularités du sang et du réseau vasculaire, trois domaines d'études peuvent se distinguer suivant le rapport entre le diamètre du vaisseau vasculaire (D) et celui des globules rouges (d) :

- L'échelle macroscopique ($D/d > 50$). Le sang peut être considéré comme un fluide newtonien (la déformation subie par le fluide est proportionnelle à la contrainte appliquée), et les effets inertiels et/ou instationnaires sur les écoulements sont non négligeables.
- L'échelle mésoscopique ($1 < D/d < 50$). Elle concerne l'artère ou veine de diamètre moyen jusqu'aux artérioles et veinules. Les effets inertiels et pulsatiles sont faibles pour les plus gros vaisseaux et négligeables pour les plus petits de la gamme. De plus, les propriétés non-newtoniennes du sang deviennent importantes.
- L'échelle microscopique ($D/d < 1$). Elle est responsable de la plus grande partie des échanges gazeux et métaboliques dans le cerveau. L'écoulement sanguin peut être assimilé à un écoulement visqueux et le fluide se comporte comme un fluide non-newtonien.

L'élasticité de la paroi vasculaire, très importante dans les capillaires (relativement à leur taille), est l'une des hypothèses pour le changement de régime des écoulements sanguins (notamment pour le caractère pulsatile).

Les mesures de perfusion qui vont être décrites par la suite portent principalement sur des vaisseaux de taille microscopique ou de la partie inférieure de l'échelle mésoscopique.

L'effet Fåhræus :

Le centre de masse des hématies ne peut pas approcher la paroi d'un capillaire au-delà d'une distance estimée au minimum à 1 μm . Ils ont tendance à migrer vers le centre du tube comme le montre la figure précédente (figure 53). Le sang forme alors une couche plasmatique dépourvue de cellule sur une faible distance à côté de la paroi vasculaire. L'effet est augmenté lors d'écoulements très lent qui vont favoriser l'agrégation des hématies vers le centre du tube. Dans la région proche de la paroi (écoulement lent) la concentration en globules rouges va donc diminuer et donc globalement leur vitesse moyenne de déplacement va augmenter relativement à la vitesse moyenne de la suspension. Fåhræus a montré en 1929 (Fahraeus 1929) que cette différence de vitesse à pour conséquence un changement de l'hématocrite dans le capillaire par rapport à celui dans les vaisseaux l'alimentant (artériole). L'hématocrite dans les capillaires est donc plus faible que l'hématocrite systémique classiquement mesuré chez un patient. On appelle cet effet l'effet Fåhræus-Lindqvist (Fahraeus and Lindqvist 1931). Il a pour conséquence aussi de modifier la viscosité apparente du sang suivant la taille des capillaires (Pries, Neuhaus et al. 1992) (figure 54).

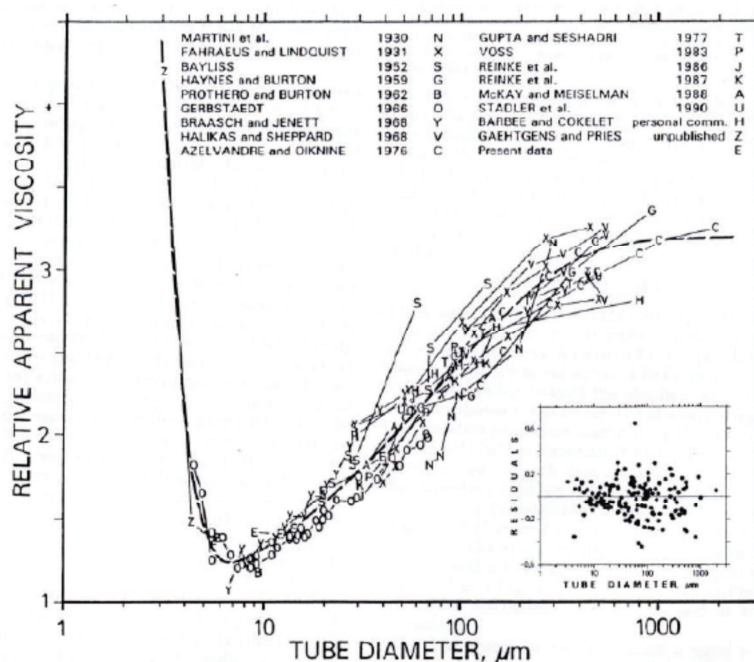


Figure 54 Figure d'après (Pries, Neuhaus et al. 1992). Compilation d'expérience in vitro évaluant la viscosité apparente du sang pour différents diamètres de tube (de 3.3 à 1978 μm) pour un hématocrite fixé à 45%. La viscosité relative apparente du sang est le rapport entre la viscosité apparente du sang et celle du plasma.

On observe une diminution importante de la viscosité apparente du sang en fonction du diamètre du tube pour une gamme d'environ une dizaine de micromètre à 300 μm . La viscosité atteint un minimum entre 5 et 7 micromètres (les globules rouges ne semblent pas gêner la circulation sanguine pour cette gamme de diamètre donc) puis augmente à nouveau très rapidement pour des diamètres inférieurs.

Il est donc très difficile de connaître l'hématocrite et la viscosité du sang dans les capillaires cérébraux, qui sont pourtant des paramètres importants pour les mesures de perfusion. Tajima *et al* font l'hypothèse que 30% des capillaires sont perfusés par du plasma et 70% par du plasma et des globules rouges (Tajima, Nakata et al. 1992).

4.2.2 La Barrière Hémato-Encéphalique :

Qu'est que la barrière hémato-encéphalique (BHE) :

Le réseau vasculaire dans le cerveau est un peu différent de celui de la plupart des autres organes, le cerveau étant en effet un organe privilégié (il consomme 20% de l'oxygène inspiré contre 2% de la masse du corps). La signalisation neuronale dans le système nerveux central requiert un microenvironnement hautement fiable. Ce microenvironnement est préservé grâce à la présence d'un système dynamique en équilibre: la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière est la plus vaste aire d'échange entre le sang et le cerveau, elle est estimée par à entre 12 et 18 m² (Abbott, Patabendige et al. 2010). Cette barrière est composée principalement de cellules endothéliales présentant des jonctions "serrées" (Huber, Egleton et al. 2001) (contrairement à la majorité des autres organes) ainsi que d'autres types cellulaires présentés dans la figure suivante (figure 55).

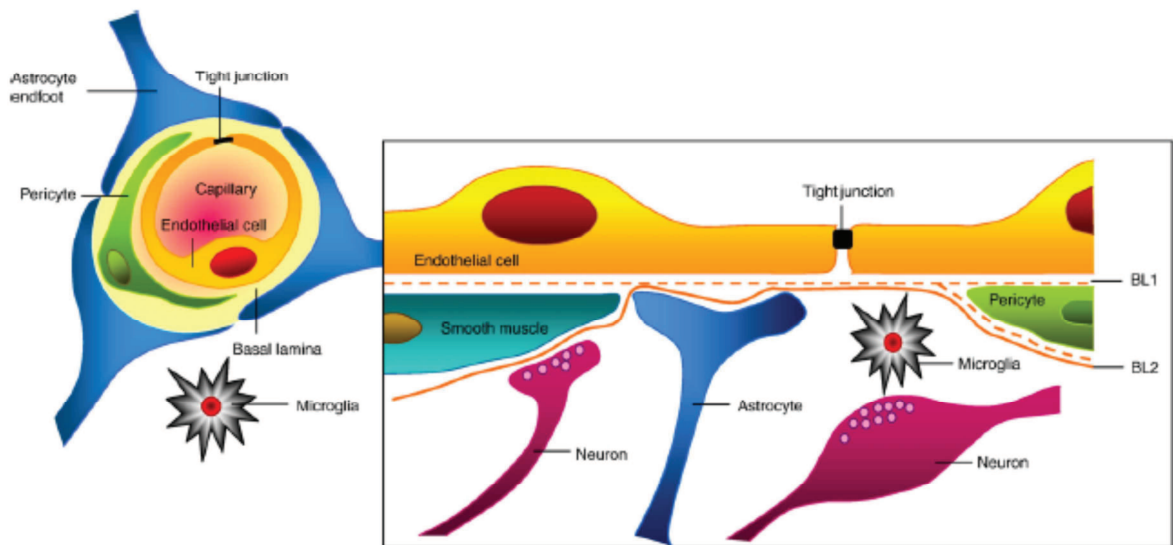


Figure 55 figure de (Abbott, Patabendige et al. 2010). La Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) et ses constituants cellulaires : Cellules endothéliales capillaires, entouré d'une lame basale (dont le principale constituant est le collagène IV), de péricytes et de pieds astrocytaires périvasculaires.

Les péricytes ont la possibilité de se contracter et ainsi réguler le débit sanguin des vaisseaux qu'ils entourent.

Les systèmes de régulation des échanges sang/environnement cellulaire sont extrêmement précis, nécessitent divers types cellulaires, et de nombreuses voies de communications. C'est pourquoi le maintien de l'intégrité de cette barrière est nécessaire sous peine de conséquences chimiques et physiologiques très importantes.

En conditions normales, peu d'éléments peuvent la traverser. Les petites molécules gazeuses (O₂ et CO₂ par exemple) peuvent diffuser librement à travers les membranes lipidiques. Les petites molécules lipophiles (<180 Da) peuvent traverser aussi la BHE. Des systèmes de transport spécifiques régulent les échanges des petites molécules hydrophiles permettant ou facilitant l'entrée des nutriments. Une combinaison d'enzymes intra et extra cellulaires constitue une barrière métabolique, en métabolisant les peptides et l'ATP et en rendant inactifs des composés neuroactifs et toxiques. L'endothélium cérébral a une plus faible activité d'endocytose que l'endothélium périphérique ce qui rend la pénétration des grosses molécules hydrophiles très restreinte. Les différentes voies d'échange sang/cerveau sont représentées dans la figure suivante.

La BHE ne fournit pas seulement un environnement stable au système nerveux central, mais par la combinaison de canaux ioniques et de transporteurs elle assure aussi une composition ionique optimale pour la fonction de signalisation synaptique.

La lésion de la BHE :

Plusieurs pathologies (telle que l'hypertension, l'ischémie, certaines infections, les tumeurs) provoquent une altération de la BHE. On parle alors de lésion de la BHE. La barrière est partiellement rompue les constituants du sang peuvent alors passer entre les cellules endothéliales et se retrouver dans l'espace interstitiel du tissu (figure 56a et figure 57). Ce phénomène est appelé *extravasation*. La lésion de la BHE est majoritairement étudiée dans le cas des tumeurs cérébrales (gliomes ou métastases) (Roberts, Roberts et al. 2000; Duda, Batchelor et al. 2007; Jain, Di Tomaso et al. 2007; Beaumont, Lemasson et al. 2009; Di Nallo, Vidiri et al. 2009). Elle y indique le développement d'une angiogénèse pathogène.

Cette plus grande perméabilité permet également un apport plus important en nutriments aux cellules tumorales qui sont très consommatrices du fait de leur croissance rapide. Tout comme la vascularisation, le degré de lésion de la BHE est très hétérogène dans la tumeur.

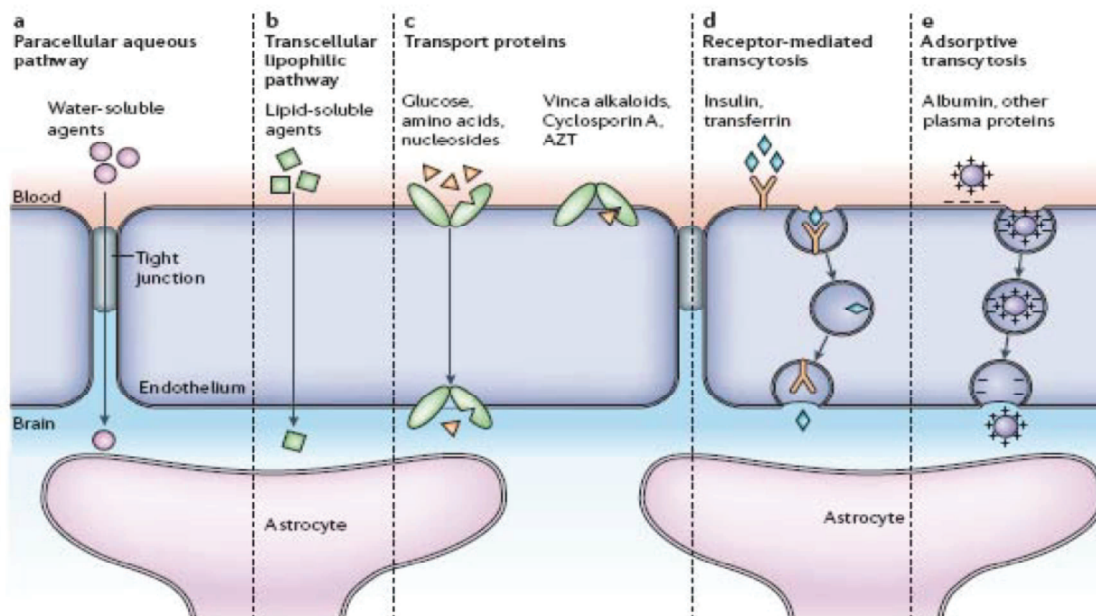


Figure 56: figure de (Abbott, Ronnback et al. 2006). Les différentes voies de transport à travers la BHE. A) Restriction du passage paracellulaire par des molécules hydrosolubles. B) Les petites molécules lipophiles peuvent passer à travers les membranes cellulaires. C) Glucose, acides aminés, etc ... peut traverser l'endothélium vasculaire grâce à des protéines de transport. D) Des récepteurs spécifiques à certaines protéines (comme l'insuline) induisent une endocytose. E) Les protéines plasmatiques sont peu transportées mais leur cationisation induit leur captation dans la circulation sanguine via transcytose.

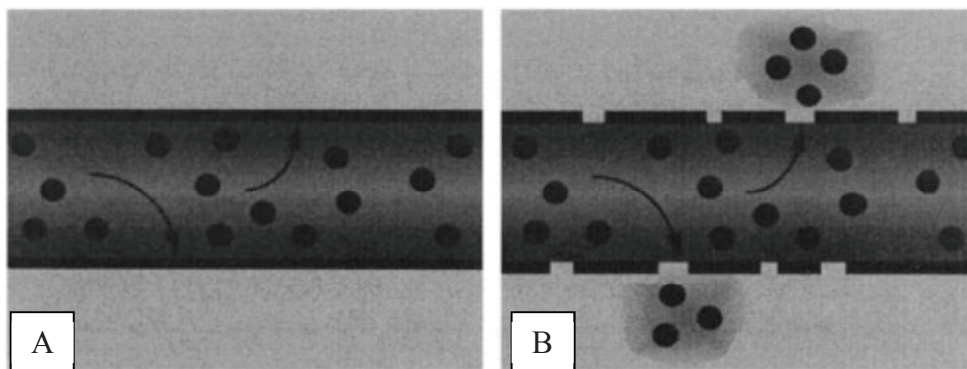


Figure 57 : figure d'après (Roberts, Roberts et al. 2000). A) Cas d'un vaisseau avec une BHE intacte, l'agent de contraste reste intravasculaire. B) Cas d'un vaisseau provenant d'une angiogénèse tumorale avec une BHE lésée, l'agent de contraste peut s'extravaser.

La rupture de la BHE s'évalue à travers des coefficients de perméabilité qui traduisent, pour une molécule donnée, le débit d'extravasation ou de réintégration de cette molécule. C'est à cause de cette perméabilité que les agents de contraste utilisés en scanner et en IRM, bien qu'étant biologiquement neutres, s'extravasent préférentiellement dans les tumeurs. Ces dernières deviennent alors bien visibles sur les images.

4.3 Influence sur les paramètres hémodynamiques :

Les principaux paramètres hémodynamiques que l'on considère pour les mesures de perfusion sont le débit sanguin cérébral (Cerebral Blood Flow, CBF en ml/min/100g), le volume sanguin cérébral (Cerebral Blood Volume, CBV en ml/100g), le temps de transit moyen (Mean Transit Time, MTT en s), et la perméabilité des capillaires (P) ou plus particulièrement pour ce dernier paramètre, le produit perméabilité x surface des capillaires sanguins (PS en ml/min/100g). Ces paramètres sont dépendants de l'architecture vasculaire et de l'état physiologique du patient. Dans le cas de tumeurs cérébrales, ces paramètres sont étroitement liés à la néoangiogénèse et au degré de rupture de la BHE. Globalement, dans un gliome malin, il y a une augmentation de la taille des vaisseaux (Beaumont, Lemasson et al. 2009) et du volume sanguin (Miles 1999), et un débit sanguin irrégulier (Jain, Ellika et al. 2008), ainsi qu'une perméabilité importante (Roberts, Roberts et al. 2000). Il peut y avoir aussi une pression interstitielle bien plus importante dans la tumeur que dans le tissu sain (Zhao, Salmon et al. 2007), ceci peut avoir comme influence de modifier la perméabilité apparente des vaisseaux. La nouvelle vascularisation est bien moins structurée que celles des tissus sains. Risser *et al.* (Risser, Plouraboue et al. 2007) ont caractérisé cette désorganisation en démontrant une augmentation significative de la dimension fractale du réseau vasculaire dans le cas d'un modèle de tumeur cérébrale du rat.

Ces modifications ont lieu dans la zone de la tumeur en croissance. Il peut y avoir cependant une zone nécrotique au sein de la tumeur, dans ce cas, le volume sanguin irrigué est très faible et les valeurs des paramètres hémodynamiques sont alors quasi nulles du fait que les vaisseaux ne sont pas ou peu irrigués, rendant très incertaine la mesure de l'hémodynamisme dans ces régions.

4.4 Les techniques d'imagerie en neuro-oncologie :

4.4.1 Le but de l'imagerie :

Les techniques d'imageries macroscopiques en générale sont l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomodensitométrie (Computed Tomography (CT)) réalisée sur un scanner à rayon X, la tomographie par émission de positons (TEP) et l'échographie. A cela peut s'ajouter la tomodensitométrie par rayonnement synchrotron (Synchrotron Radiation Computed Tomography (SRCT)) qui est l'équivalent de la CT appliquée avec les particularités du rayonnement synchrotron. Cette technique est disponible uniquement en recherche. Dans ce paragraphe sont décrit rapidement les intérêts et inconvénients de ces différentes techniques.

En cancérologie, l'imagerie a pour but de répondre à un des trois buts suivants :

- Diagnostique
- Imagerie préopératoire ou pour constituer le plan de traitement.
- Imagerie postopératoire/suivi de traitement.

Selon le but les séquences d'imagerie peuvent différer.

Pour le diagnostic, le but est de différencier une modification structurelle, anatomique ou fonctionnelle par rapport au reste du tissu cérébrale, et une fois détecté il faut pouvoir identifier le plus précisément possible la pathologie (par exemple si un gliome est détecté, il faut pouvoir définir son grade).

Le but de l'imagerie préopératoire ou prétraitement est de pouvoir au mieux définir l'opération (identifier des chemins d'accès à la tumeur) ou la radiothérapie. Pour définir le plan de traitement par radiothérapie il faut que l'imagerie apporte toutes les informations nécessaires au calcul de distribution de dose (densité, densité électronique, ...). De plus les nouvelles modalités de radiothérapie permettent de contrôler très précisément les volumes et gradients de dose applicables à la tumeur et même à des zones tumorales (ex : IMRT, boost par radiochirurgie, ...). Pour exploiter pleinement ces capacités, l'imagerie prétraitement doit apporter toutes les informations fonctionnelles régionales qu'elle est capable d'apporter. Il est intéressant par exemple de connaître les zones de proliférations importantes, les zones en hypoxie, les zones nécrotiques, œdémateuses, etc, ... pour modifier la distribution de dose en conséquence. Les volumes et marges pourraient être ainsi mieux définis. Un boost ou point chaud pourrait par exemple être appliqué dans les zones les moins radiosensibles (hypoxie, nécrose, ...).

Pour un suivi de traitement, si l'information structurelle, anatomique est intéressante pour voir si le volume tumoral réduit ou si on a bien tout enlevé, voir l'évolution fonctionnel de l'activité tumorale peut être très intéressant pour estimer le plus tôt possible l'efficacité du traitement et si il faut l'adapter, le modifier éventuellement. En effet si le phénomène de néoangiogenèse, de prolifération de cellules tumorales ne diminue pas, cela peut être un signe d'inefficacité du traitement.

Parmi les types d'imagerie fonctionnelle il y a les mesures de perfusion cérébrale utilisées aussi bien pour les ischémies (Klotz and Konig 1999), les tumeurs (Eastwood and Provenzale 2003) et les

traumatismes (Wintermark, van Melle et al. 2004). Les mesures des paramètres de la perfusion cérébrale (Cerebral Blood Flow CBF, Cerebral Blood Volume CBV, Mean Transit Time MTT et Product Permeability Surface PS) donne accès à un degré de connaissance supérieur sur chaque tumeur, par des cartographies fonctionnelles de ses paramètres hémodynamiques, et donc de son agressivité. La présence de la barrière hémato-encéphalique dans le cerveau et le fait qu'elle est lésée dans le cas des tumeurs cérébrales, permet à ce type d'imagerie d'être à la fois utile pour le diagnostic, pour la planification de traitement en radiothérapie et pour le suivi de traitement. Roberts *et al* et Aronen *et al* (Aronen, Gazit et al. 1994; Roberts, Roberts et al. 2000) ont par exemple corrélié les valeurs de volume sanguin aux grades des tumeurs (évalué par histologie), et donc à leur agressivité. Jain R *et al* (Jain, Ellika et al. 2008) ont fait de même pour la perméabilité des capillaires. La biopsie reste la méthode de référence (gold-standard) pour la détermination du grade des tumeurs, cependant elle peut être difficile à pratiquer du fait de la localisation dans le cerveau. De plus une biopsie ne représente qu'un faible volume de la tumeur et peut ne pas la représenter dans son ensemble. C'est pourquoi l'imagerie de perfusion pourrait être un premier indicateur des caractéristiques tumorales et guider la biopsie.

Les mesures de perfusions peuvent être aussi corrélées aux pressions interstitielles dans la tumeur comme certaines études tendent à le montrer (Wintermark, Chioloro et al. 2004). Cette information, en plus de la perméabilité, peut indiquer en partie si une drogue de chimiothérapie, un agent radio sensibilisant (comme un élément lourd pour la radiothérapie synchrotron monochromatique) peuvent gagner certains sous volumes de la tumeur ou non.

4.4.2 Suivi de traitement par imagerie de perfusion :

Les paramètres de perfusion sont aussi de bons indicateurs pour effectuer un suivi de traitement. En effet de nombreuses études portent sur l'évolution de ces paramètres après irradiation ou chimiothérapie (notamment des drogues antiangiogéniques). (Cao, Tsien et al. 2006; Serduc, Christen et al. 2008; De Keyzer, Vandecaveye et al. 2009; Bouchet, Lemasson et al. 2010; Cao 2011). Certains de leurs résultats sont présentés dans les deux figures suivantes (figure 58 et 59). Les mesures de perfusion peuvent aussi servir à vérifier que le tissu sain environnant la tumeur ne subit pas trop de dommage du fait de l'irradiation (augmentation de la perméabilité, dilatation des vaisseaux, etc ...) (Cao 2011).

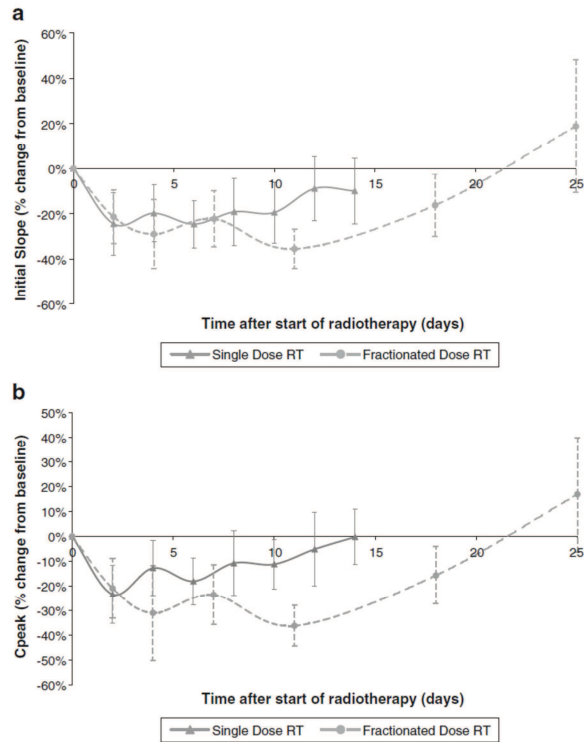


Figure 58 : Conséquences d'une irradiation d'un modèle de rhabdomyosarcome sur la perfusion. La dose a été soit délivrée en une seule fraction (▲) soit en plusieurs fractions (●). La prise de contraste du à l'injection de gadolinium a été suivie par IRM (T1) : a)Pente initiale de prise de contraste après injection de gadolinium, b) Prise de contraste au pic. Dans les deux cas les mesures ont été faite sur le volume totale de la tumeur figure d'après (De Keyzer, Vandecaveye et al. 2009). La chute momentanée de ces indicateurs indique d'après De Keyzer *et al* le fonctionnement de la radiothérapie en provoquant une destruction de la vascularisation. La reprise tumorale provoquant une nouvelle croissance des paramètres de perfusion. Il a cependant observé que le coefficient de diffusion apparent (ADC) corrèle mieux avec le délai d'arrêt de la croissance tumorale.

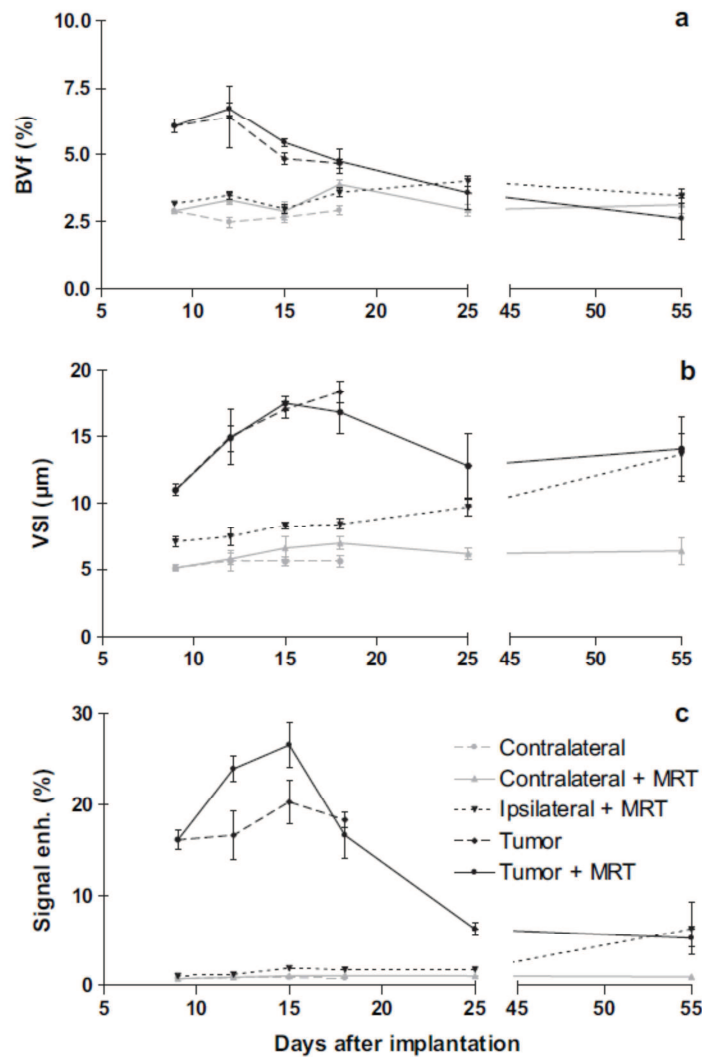


Figure 59 : Suivi de la perfusion après irradiation par microbeam (MRT) d'un model de gliome chez le rat (9L). Figure d'après (Bouchet, Lemasson et al. 2010). A) Fraction du volume sanguin, B) Vessel size index, C) Pourcentage de la prise de contraste au pic. La fraction de volume sanguin a chuté après irradiation dans les zones les plus irradiés (zone tumorale et ipsilatérale) du fait de la destruction des cellules endothéliales d'après les auteurs. La taille des vaisseaux a augmenté après irradiation avant de retourner aux mêmes valeurs qu'avant irradiation pour la zone tumorale. Elle a tout le temps augmenté pour le tissu environnant (dilatation des vaisseaux irradiés). La prise de contraste a augmenté de façon passagère après irradiation dans les zones cibles (tumorale et ipsilatérale). Cela montre une perméabilité accrue du fait de la destruction partiel de la paroi vasculaire par l'irradiation.

En plus des mesures de perfusions, les autres paramètres fonctionnels intéressants sont le coefficient de diffusion (ADC, tenseur de diffusion) par IRM, les mesures d'oxygénation des tissus qui sont possible par IRM et TEP, spectroscopie RM du proton, et il existe de nombreux marqueurs fonctionnels en TEP. Les principaux seront décrits dans le paragraphe concernant ce type d'imagerie.

Afin d'utiliser au maximum les informations données par l'imagerie, et notamment pour un suivi de traitement, il faut que les mesures soient quantitatives. C'est un aspect extrêmement important, et qui n'est pourtant toujours pas proprement résolu pour les mesures de perfusion.

4.4.3 CT:

L'imagerie par tomodensitométrie aux rayons X est devenue un examen de pratique clinique courante en hôpital (peu après la radiographie/fluoroscopie et l'échographie). C'est la principale imagerie macroscopique 3D médicale, notamment pour le domaine cérébrale et est celle de référence en cas d'urgence. La résolution spatiale théorique est de l'ordre de 400 microns (250 microns sur les scanner les plus récents (celle-ci peut être dégradée par la Point Spread Function, dépendante du type d'acquisition et de reconstruction)). Un scan volumique tête entière dure une quinzaine de secondes. La résolution temporelle lors d'une acquisition dynamique (en mode axial, sans déplacement du patient) est légèrement inférieure à la seconde (0.5 secondes pour les plus performant) avec un champ de vue de $25 \times 25 \times 8 \text{ cm}^3$ d'épaisseur sur les machines récentes. Flohr *et al* et Ritman décrivent les principes généraux de la tomographie par rayon X (Flohr, Schaller *et al.* 2005; Ritman 2011).

Les scanners cliniques utilisent l'atténuation des rayons X par les tissus afin de constituer l'image. On parle de tomodensitométrie. Dans le cas du cerveau, si l'on n'injecte pas d'agent de contraste, les tissus mous le composant atténuent très similairement les rayons-X, n'offrant qu'un faible contraste (figure 61). Il reste cependant très sensible pour détecter des hémorragies, les hydrocéphalies ou les hernies du cerveau. Mais pour les tumeurs cérébrales, sans injection d'agent de contraste, il ne présente que peu d'intérêt pour le diagnostic et le suivi de traitement en dehors de sa facilité d'usage (Cha 2009). Il est par contre toujours l'outil numéro 1 pour définir les plans de traitement par radiothérapie. Un scan volumique avec le système de contention fournissant les données nécessaires en termes de densité pour définir les conditions d'irradiations et estimé la distribution de dose. Les principales limites de cette méthode résident dans le fait qu'ils utilisent un spectre d'énergie de rayon-X de faible énergie. Les algorithmes de reconstruction sont donc le siège de grosses hypothèse et approximations. De plus la dose que reçoit le patient lors d'un examen est importante par rapport à un examen radiologique standard. Les basses énergies sont en effet stoppées très rapidement à la surface et dans la boîte crânienne.

Avec injection de produit de contraste, le scanner permet de voir les zones d'extravasation, de perméabilité vasculaire aux agents iodés comme il y a dans le cas des tumeurs. Le scanner est d'ailleurs assez quantitatif, la relation entre la concentration en agent de contraste et le nombre Hounsfield étant linéaire avec une bonne corrélation. Il permet donc des mesures de paramètres de perfusion « quantitatif » à condition d'avoir les bons modèles pharmacocinétiques (Miles 1999; Lee, Purdie *et al.* 2003; Lee, Cheung *et al.* 2004; Miles 2004; Miles 2006). L'inconvénient de cette modalité d'imagerie pour les mesures de perfusion est la dose importante reçu par l'échantillon comme le montre Hirata *et al* (Hirata, Sugawara *et al.* 2005). Des études ont défini les meilleures conditions d'utilisation du scanner afin d'optimiser le rapport signal sur bruit des paramètres de perfusion mesurés avec la dose reçue par le patient (Hirata, Murase *et al.* 2005; Hirata, Sugawara *et al.* 2005; Murase, Nanjo *et al.* 2005). Actuellement en clinique, la majorité des mesures de perfusions cérébrales se font avec une injection de 40 ml d'agent de contraste iodée à 4 ml/s, une tension d'anode de 80 kV, un courant de 120 mA et des coupes de 5 mm. La dose reçue estimée par Hirata *et al* est alors d'environ 250 mGy dans le cerveau et de 500 mGy à la surface (sans prise en compte de l'augmentation de dose du à l'iode).

Certains parmi les nouveaux développements sur les scanner portent sur la réduction de dose pour les imageries dynamiques (en faisant un premier scan « normal » puis des scans avec moins de

projection et en injectant des informations « à priori » du premier scan pour la reconstruction). Des développements techniques très importants sur les micro-CT de recherche offrent beaucoup plus de modalités d'imagerie que les scanners cliniques actuels. Ritman décrit la plupart de ces nouvelles modalités d'acquisition, qui s'apparentent à ce qui a été développé pour l'imagerie synchrotron (Ritman 2004; Ritman 2011). Parmi ces modalités, il y a l'imagerie type CT clinique mais à une échelle plus petite (entre 50 et 100 microns de résolution), et une imagerie haute résolution (en mode tomographie locale donc) sur un organe avec laquelle on peut balayer des échelles cellulaires (environ 20 microns).

Parmi les autres techniques d'imagerie à partir de rayon-X on peut citer :

« Multienergy K Absorption Edge Subtraction Scanning » : Les coefficients d'atténuation des photons d'un élément changent fortement autour des seuils K alors qu'ils suivent toujours la loi exponentielle pour les autres éléments autour de cette énergie. En soustrayant alors une image avec des énergies supérieures au K-Edge avec une image avec des énergies inférieures, on peut en déduire la concentration de cet élément très précisément (figure 60 ci-dessous).

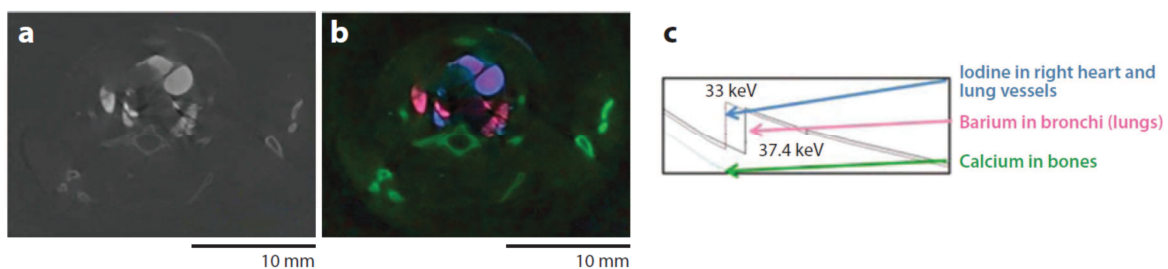


Figure 60 : Figure d'après (Ritman 2011). K-Edge subtraction. A) Image CT (atténuation) d'un thorax de souris. Du sulfate de barium a été injecté dans l'arbre bronchique et un agent de contraste iodé a été injecté dans les artères pulmonaires. B) En sélectionnant différentes énergies, et en reconstruisant en prenant en compte les atténuations des éléments connus à ces énergies, il est possible de différencier les quantités des différents matériaux. C) coefficient d'atténuation des différents éléments recherchés en fonction de l'énergie.

« X-Ray Phase Delay » : Ce type d'imagerie est basé, de même que certains modes d'imagerie TEP pour les positons, sur le fait que les rayons X se déplacent à des vitesses différentes suivant les tissus et la quantité de matière à traverser. Il y a alors un délai de phase entre un photon traversant un tissu et un photon ne le traversant pas. En mesurant les patterns d'interférence de l'intensité des rayons X on peut estimer ce décalage de phase. Grâce à cette méthode on a de meilleurs contrastes qu'avec seulement l'atténuation, hors c'est une des limites du scanner pour les tissus mous du cerveau. On peut détecter la présence d'iode à partir de $250 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

« Fluorescence Based Scanning » : la fluorescence X apparaît quand un électron est éjecté de son orbite atomique par un photon X. L'énergie du photon X de fluorescence est spécifique à l'élément le produisant. On peut alors différencier de nombreux éléments et estimer la concentration avec une grande précision (pour l'iode, $60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Cependant l'énergie des rayons X émis est faible (inférieur à ceux de l'excitation) donc il ne traverse que peu la matière et peuvent être confondu avec les photons secondaires.

« Scatter-Based Scanning » : Suivant si les photons sont diffusés de manière cohérente ou non, ils ont des angles de déviation différents. La distribution angulaire de la diffusion cohérente est spécifique de l'élément la provoquant (notamment pour les molécules polymérique comme le collagène du fait de la nature répétitive de leur liaison chimique de même ordre de grandeur que la

longueur d'onde des rayons X). En mesurant le pattern du faisceau à différents angles on peut alors estimer les matériaux le composant.

« Phase-Contrast Scanning » : Les rayons-X sont réfractés par la matière. Si ce coefficient de réfraction est très faible dans l'eau, la composante de décalage de phase de l'index de réfraction reste supérieure à celui de l'atténuation de l'index de réfraction. La mesure de pattern d'interférence permet de remonter à cette composante. De meilleurs contrastes sont accessibles qu'avec une tomographie par atténuation seule.

Ces techniques sont pour la plupart développées et utilisées en rayonnement synchrotron avec de meilleures performances que lorsqu'un tube à rayons X est utilisé.

4.4.4 IRM :

L'IRM est la deuxième méthode d'imagerie cérébrale utilisée en clinique. Le nombre d'IRM par habitant augmente rapidement en France et est très supérieur au nombre de machines TEP (tomographie par émission de positons). C'est la méthode d'imagerie multimodale par excellence. De nombreux types d'acquisition sont possible même si encore peut d'entre eux sont utilisés en routine clinique. La sensibilité à la différence entre deux tissus est nettement supérieure à celui de scanner, notamment dans le domaine cérébral (figure 61). Les principes de l'IRM sont décrits entre autres dans le livre de Haacke *et al* (Haacke, Brown et al. 1999).

Parmi les nombreuses séquences utilisables en IRM il y a principalement les séquences pondérées T_1 (avant ou après injection d'un agent de contraste paramagnétique), pondérées T_2 , les mesures de cartes de diffusion (que ce soit juste le coefficient de diffusion apparent ou le tenseur de diffusion). Les mesures de perfusion avec différent agent de contraste (agents de faible poids moléculaire tel de que Gd-Dota utilisé pour les suivis de perfusion IRM dans cette thèse ou agents de fort poids moléculaires comme certaines molécules à base de fer (Beaumont, Lemasson et al. 2009; Pannetier, Lemasson et al. 2011)). Il y a aussi les mesures de saturations en oxygène pour repérer les zones d'hypoxie (Christen, Lemasson et al. 2011). L'IRM permet aussi des mesures de spectroscopie, tels que la spectroscopie de protons ^1H -MRSI comme utilisé par Voglein *et al* pour suivre l'évolution tumoral de gliome après traitement (Voglein, Tuttonberg et al. 2011). Cependant cette dernière étude a également montré que les mesures de perfusions étaient plus appropriées pour suivre l'évolution tumorale.

L'IRM est un moyen d'imagerie à priori non invasif pour le patient (pas de dose de rayonnement reçue par le patient contrairement aux CT et TEP), d'autant plus que les produits de contraste à base de gadolinium utilisé en clinique pour l'IRM sont en général mieux supportés par les patients que les produits de contraste iodée utilisés en scanner (existence d'allergie, et potentiels problèmes rénaux lors d'injection importante de produit). Il semble de ce point de vue beaucoup plus disposé pour effectuer un suivi de traitement avec des séquences d'imageries importantes et régulières après le traitement des patients. Cependant, il reste un inconvénient majeur qui est la difficulté d'être quantitatif, notamment lors de l'estimation de la concentration d'un agent de contraste.

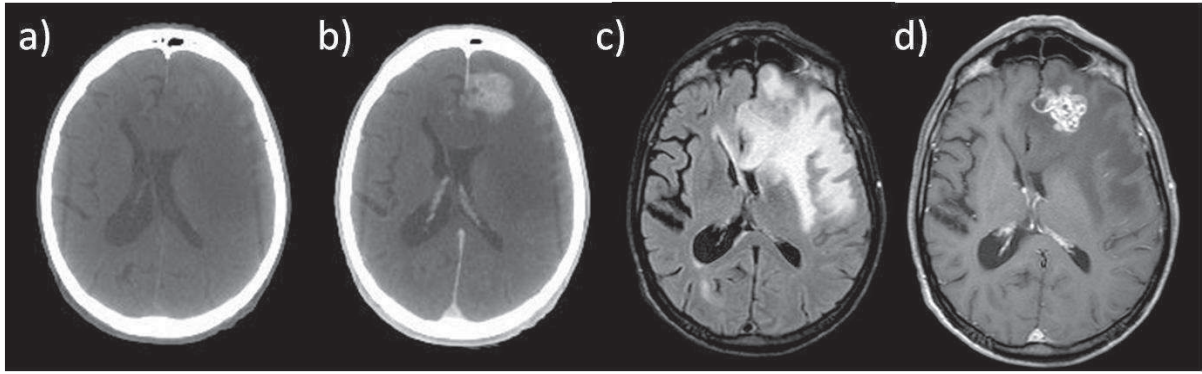


Figure 61 : Comparaison de type d'imagerie CT et IRM sur un patient porteur d'une métastase. Imageries réalisées dans le cadre de l'étude sur la concentration en agent de contraste iodée que l'on est capable d'atteindre dans des métastases en vue de l'essai clinique sur la SSRT, et le lien avec les mesures de perfusions. A) image CT à 120 kV, image CT à 120 kV après injection d'agent de contraste iodée. C) Séquence IRM Fair (fluid attenuation inversion recovery). D) Image pondérée T1 après injection d'agent de contraste comportant du gadolinium.

4.4.5 TEP (Tomographie par émission de positons):

Il s'agit d'une modalité d'imagerie fonctionnelle pure souvent couplée à un scanner X sur la même machine permettant d'obtenir entre autres les données morphologiques (qui peuvent être utilisées pour améliorer la qualité d'image). L'imagerie TEP (ou TEP-CT lors du couplage à un scanner) est la modalité d'imagerie la plus récente parmi celles proposées en clinique. Elle est pour le moment la plus chère et la plus rare, malgré son intérêt évident pour l'imagerie des tumeurs. C'est une limite très contraignante de ce type d'imagerie pour les études cliniques. Les principes de l'imagerie TEP les plus classiques sont décrits par Daube-Witherspoon *et al* et Zanzonico (Daube-Witherspoon, Zubal *et al.* 2003; Zanzonico 2004).

Le très grand nombre d'agents de contraste «fonctionnel», c'est-à-dire interagissant de façon ciblée avec certaines cellules, certaines propriétés biochimiques en font un outil d'imagerie très spécifique d'une pathologie, notamment en oncologie. Le TEP mesure aussi avec une très grande précision la concentration de l'agent de contraste et de façon très reproductible. C'est pourquoi il est la technique d'imagerie de référence pour les mesures de perfusion.

Une partie des agents de contraste TEP les plus couramment utilisés pour l'imagerie des gliomes est référencée par Dhermain *et al* (Dhermain, Hau *et al.* 2010). Les plus intéressants pour un suivi de traitement sont l' $^{15}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ pour les mesures de perfusions. Le $^{18}\text{F}-\text{FMISO}$ permet la mesure de l'hypoxie et le $^{11}\text{C}-\text{méthionine}$ et $^{18}\text{F}-\text{FET}-\text{PET}$ permettent d'évaluer la néoangiogénèse et la progression tumorale après traitement.

Les principales limites de TEP sont la faible résolution spatiale (quelques millimètres cubes, au mieux 2 mm^3 (Abraham and Feng 2011)) et la dose très importante reçue par le patient (surtout que la plupart des protocoles d'imageries TEP sont combinés à des images CT afin d'avoir une carte des matériaux traversés par les positions et corrigés ainsi leur atténuation) ainsi que par le personnel de l'hôpital pour la manipulation des agents de contraste. Le couplage des imageries TEP avec des imageries CT (ou IRM avec le développement en recherche de TEP-IRM) permet d'avoir une information morphologique en plus de fonctionnelle des organes étudiés.

Une partie des modalités d'imagerie accessible par IRM et par TEP sont représentés sur la figure 62.

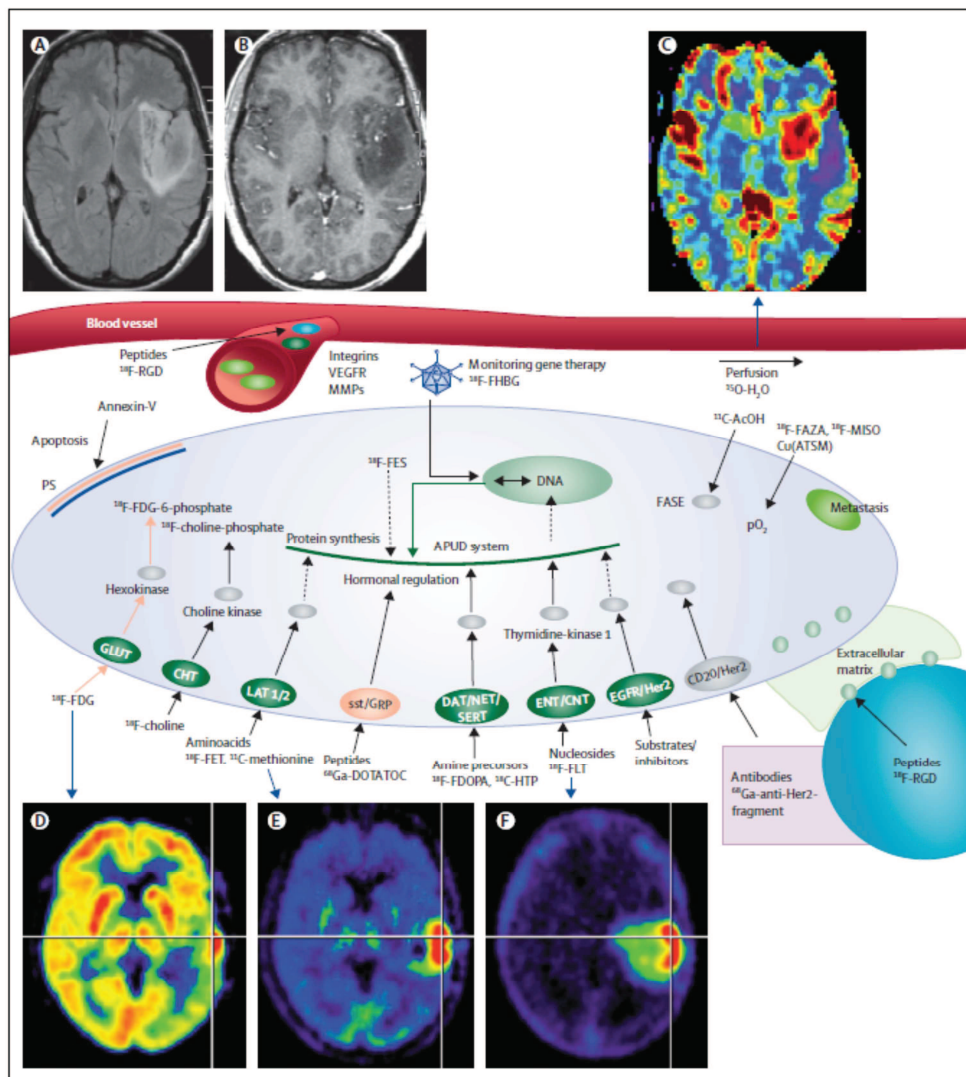


Figure 62 : Figure d'après Dhermain *et al.* Exemple de modalités d'imagerie accessible par IRM et TEP pour le suivi de traitement de cancer : A) Séquence IRM FAIR (Fluid-attenuated inversion recovery) B) Image IRM pondéré T1 après injection systémique d'un agent de contraste pour localiser les zones de lésions de la barrière hémato encéphalique. C) Mesure de perfusion par IRM (ici le volume sanguin cérébral). D) Imagerie PET de l'agent de contraste ^{18}F -FDG-PET pour localiser les zones de haute densité cellulaire. E) Imagerie PET de l'agent de contraste ^{11}C -méthionine, marquant la néovascularisation. F) Imagerie PET de l'agent de contraste ^{18}F -FLT, marquant la prolifération cellulaire.

4.4.6 Echographie :

L'échographie est peu utilisée dans le domaine cérébral. Quelques études existent cependant montrant les possibilités de cette modalité (Winkler 1998; Ellegala, Poi et al. 2003; Vicenzini, Delfini et al. 2008). Des mesures de perfusion peuvent être réalisées en utilisant comme agent de contraste des microbulles comme celle d'Ellegala *et al* (Ellegala, Poi et al. 2003). Le faible coût de ce type d'imagerie, sa disponibilité et le caractère non invasif pour le patient (pas de dose reçu par le patient) en font une technique intéressante mais avec encore de nombreuses limites dont la qualité d'image et la représentation 3D des résultats (Winkler 1998).

4.4.7 Tomodensitométrie par rayonnement synchrotron :

L'ouverture angulaire du faisceau synchrotron sur la ligne médicale ID17 est de 2 mrad dans le plan horizontal et de 0.14 mrad dans le plan vertical d'après (Elleaume, Charvet et al. 1999). Vu que la salle d'imagerie fait une dizaine de mètres de longueur, on peut considérer le faisceau quasiment parallèle. Le détecteur est situé à environ 6 m de l'échantillon. Ces propriétés permettent de s'affranchir du problème de détection du rayonnement diffusé à l'origine d'erreurs de mesures sur les scanners conventionnels malgré des algorithmes de corrections de plus en plus efficaces (Dilmanian 1992). Seul le diffusé aux très petits angles est détecté et peut introduire des erreurs sur la mesure. Cependant celui-ci est limité aux énergies utilisées (figure 18). Ces propriétés permettent d'imager à très haute résolution (de l'ordre de quelques micromètres) et ce de manière quantitative.

Par ailleurs le flux très intense du faisceau synchrotron permet d'utiliser des monochromateurs pour sélectionner des énergies précises tout en gardant un flux suffisant pour réaliser de l'imagerie à haute résolution, ou à résolution moyenne mais avec une bonne résolution temporelle. Parmi les méthodes d'imagerie *in vivo* possible par rayonnement synchrotron il y a donc :

La tomographie monochromatique :

Lors de l'utilisation du monochromateur de tomographie, on peut sélectionner une énergie dans la gamme de 25 à 100 keV avec une largeur spectrale de l'ordre de 1/1000 eV. Le monochromateur laisse également passer la 3^{ème} harmonique (et supérieures) mais en de faibles proportions (<1%). Les avantages d'avoir un faisceau monochromatique en tomographie X sont bien connus. Il constitue d'abord un avantage sur la dose reçue par l'échantillon. En effet les basses énergies présentes dans les spectres des scanners conventionnels sont absorbées totalement par le patient et n'apportent pas ou très peu d'information pour l'image. Les énergies les plus hautes apportent moins de contraste que les énergies en milieu de gamme. On peut choisir l'énergie des photons pour la tomographie en fonction de l'élément que l'on souhaite imager en particulier lorsqu'il y en a un (agent de contraste) en se situant par exemple légèrement au dessus de son K-edge et ainsi avoir le maximum d'écart entre l'atténuation de l'agent de contraste et l'atténuation des tissus mous autour. De plus l'utilisation d'un faisceau monochromatique simplifie énormément les algorithmes de reconstruction et leur approximation. En effet lors de l'imagerie par tomographie avec un spectre d'énergie, il faut prendre en compte le phénomène connu sous le nom de durcissement de faisceau. Il s'agit de l'évolution du spectre au fur et à mesure que les photons traversent la matière. En effet comme tous les photons n'ont pas la même énergie, ils vont traverser la matière différemment. Comme les photons de basses énergies traversent moins la matière, le spectre va petit à petit perdre ses composantes de faibles énergies et son énergie moyenne augmente. Etant donné que la mesure des coefficients d'atténuation dépend de l'énergie des photons incidents, il faut estimer ce durcissement de faisceaux pour les scanners conventionnels. Ce qui n'est pas nécessaire lorsque le faisceau est monochromatique. La résolution de l'équation de Beer-Lambert est donc exacte en tomographie monochromatique par rayonnement synchrotron et la mesure du coefficient d'atténuation est remarquablement quantitative (Dilmanian 1992; Dilmanian, Wu et al. 1997; Elleaume, Charvet et al. 2002).

La tomographie multi-énergies :

Pour obtenir précisément la concentration d'un élément, il est possible de réaliser en même temps par tomographie synchrotron et grâce à un monochromateur spécial, une image réalisée à une énergie juste au dessus du seuil K (K-Edge) de l'élément et une image à une énergie juste en dessous (avec une bande passante d'environ 450 eV). Le monochromateur permet en fait d'avoir un faisceau dont l'incidence de sortie dépend de l'énergie. En mettant un élément pour bloquer les incidences centrales, on obtient alors deux faisceaux monochromatiques proches permettant d'imager l'objet, chacun des deux faisceaux allant sur l'échantillon et étant enregistré sur une ligne du détecteur différente. L'élément choisi est donc le seul élément donc le coefficient d'atténuation change de façon significative entre les deux images. Il est ainsi possible de mesurer très précisément sa concentration. La méthodologie et des exemples sont présentés dans la publication d'Adam *et al.* (Adam, Bayat et al. 2009). Cependant lorsque cela est possible (injection d'un agent de contraste pendant la séance d'imagerie), de meilleurs résultats sont obtenus en réalisant une soustraction temporelle (après apparition de l'agent de contraste moins avant son apparition) plutôt qu'en réalisant la soustraction autour du k-edge (Elleaume, Charvet et al. 2002). Cependant l'imagerie autour du k-edge est très intéressante pour l'imagerie d'un agent de contraste dans un organe en mouvement (poumon, cœur, etc ...).

L'imagerie multi-énergies permet aussi d'imager avec précision la concentration de plusieurs éléments. Cette technique qui existe aussi pour les micro-CT comme précisé auparavant, est plus simplement réalisable avec un rayonnement synchrotron avec les mêmes avantages que l'imagerie monochromatique. Le choix de plusieurs énergies spécifiques aux éléments que l'on souhaite mesurer permet de réduire la dose reçue par l'échantillon tout en optimisant les énergies pour avoir le meilleur rapport signal sur bruit (Taschereau, Silverman et al. 2010). Et cela simplifie les algorithmes de reconstructions d'images. Cette méthode permet d'imager simultanément la concentration de deux agents de contraste comme le montre l'étude de Suhonen *et al.* (Suhonen, Porra et al. 2008) où la ventilation pulmonaire est mesurée par l'intermédiaire du xénon respiré et la perfusion autour des poumons est mesurée grâce à l'injection d'un agent de contraste iodée. Mesurer la concentration de ces deux éléments en une fois permet de corrélérer parfaitement les deux mesures, et surtout de réduire la dose reçue par le patient.

Le système d'équation pour la résolution des concentrations des éléments est celui d'un système linéaire :

$$\mu_{M_1,E_1} \cdot f_{M_1} + \mu_{M_2,E_1} \cdot f_{M_2} + \mu_{M_3,E_1} \cdot f_{M_3} = \mu_{E_1}$$

$$\mu_{M_1,E_2} \cdot f_{M_1} + \mu_{M_2,E_2} \cdot f_{M_2} + \mu_{M_3,E_2} \cdot f_{M_3} = \mu_{E_2}$$

$$f_{M_1} + f_{M_2} + f_{M_3} = 1$$

où μ_{M_i,E_k} représente le coefficient linéique d'atténuation de l'élément i pour l'énergie E_k et f_{M_i} correspond à la fraction volumique de l'élément i . On retrouve l'intérêt d'avoir des « composantes » monochromatiques afin d'estimer précisément les μ .

La tomographie PBI :

La tomographie PBI, pour Propagation-Based Imaging, est une technique d'imagerie par contraste de phase. Comme pour le micro-CT, le principe est basé sur le fait que les rayons-x sont réfractés par la matière de manière plus différenciée qu'ils ne sont atténués pour le type de tissu étudié. Pour la PBI, la mesure s'effectue comme une tomographie synchrotron classique, avec les mêmes propriétés de résolution spatiale et temporelle. La seule différence est que l'échantillon doit être suffisamment loin du détecteur pour pouvoir mesurer l'angle de réfraction qui est faible. La mesure à 2 distances permet d'estimer précisément les coefficients de réfraction (par exemple une image à 6 m pour avoir l'influence de la réfraction et une image à 2 m pour avoir le contrôle, c'est-à-dire sans l'influence des angles de réfractons). Pour une même dose reçue par le patient de meilleurs contrastes sont accessibles qu'avec une tomographie par atténuation seule. On peut mesurer la concentration d'un agent de contraste à un seuil plus bas, ce qui serait intéressant pour des mesures de perfusion dans le cerveau sain ou atteint de pathologie ne modifiant pas la BHE, où la concentration ne monte pas très haut du fait qu'il n'y a pas d'angiogénèse tumorale. L'imagerie par contraste de phase pourrait aussi aider à distinguer différents détails dans ou autour de la tumeur comme la présence d'œdème ou de nécrose. Cependant la relation entre la concentration en agent de contraste et le signal est plus difficile à estimer que pour la tomographie X par atténuation. Ce qui est difficile est de plus à surmonter pour d'éventuelles mesures de perfusions.

4.5 Les modèles pharmacocinétiques pour la mesure de perfusion :

Les mesures de perfusions sont basées sur le suivi temporel de la concentration d'un marqueur dans le corps grâce à un appareil d'imagerie macroscopique. Dans la plupart des cas il s'agit d'un agent de contraste que l'on injecte. Il existe cependant aussi l'Arterial Spin Labelling, une technique IRM consistant à utiliser les protons présents dans le sang comme « agent de contraste ». Son intérêt est d'utiliser un composant parfaitement représentatif du sang, et de plus, permet d'éviter le problème de la mesure de la concentration des agents paramagnétique à forte concentration (la relation signal irm/concentration en agent de contraste est difficile à obtenir). Dans ce chapitre il n'est question que des mesures obtenues grâce à l'injection d'un agent de contraste.

4.5.1 Rappel sur la pharmacocinétique global :

Le système sanguin du corps humain est très complexe. Lors de l'injection d'une drogue, d'un agent de contraste, beaucoup d'interactions avec les différents organes sont possibles comme le résume les schémas suivant (figure 63 et 64).

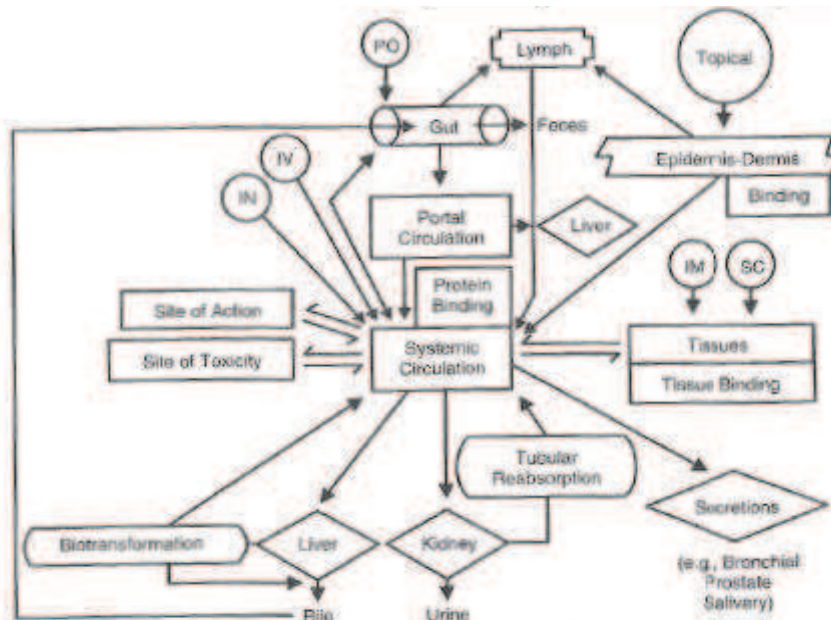
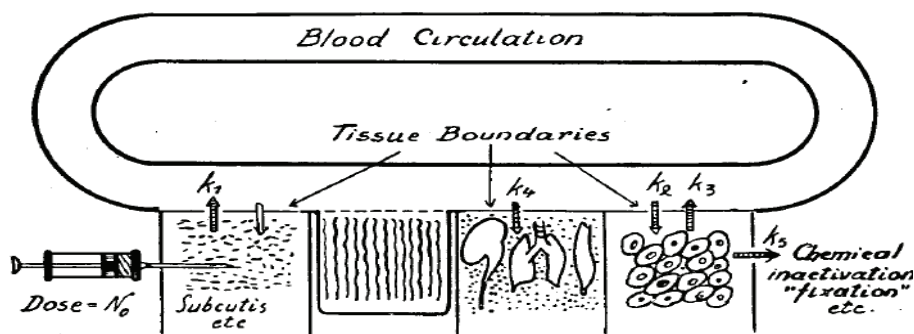


Figure 63 : Schéma représentant les différentes voies d'interactions d'une drogue injecté en systémique avec les autres organes du corps humain. Figure d'après (Riviere 2011)

Pour le cas d'une injection d'un agent de contraste en sous cutané on peut résumer les échanges entre les différents compartiments du corps comme étant ceux représentés sur la 64. Il s'agit d'une modélisation du corps humain en différent compartiments. Le nombre de compartiment et les liens entre eux sont choisis en fonction de la drogue injectée et de la pathologie concernée. Il s'agit donc d'hypothèse réalisée qui peuvent influencer les résultats bien que ceux-ci sont proches de ce qui peut être observé.



| Local | Drug Depot | Blood + equivalent blood volume | Kidney etc Elimination | Tissues | Tissue inactivation | Unit |
|-----------------------|------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| Symbol | D | B | K | T | I | |
| Amount | x | y | u | z | w | mg |
| Volume | V_1 | V_2 | | V_3 | | ml |
| Concentration | x/V_1 | y/V_2 | | z/V_3 | | mg/ml |
| Perm coeff | k_1' | | k_4' | k_2' | | s^{-1} |
| Velocity constant out | $k_1 = k_1'/V_1$ | | $k_4 = k_4'/V_2$ | $k_3 = k_2'/V_3$ | k_5 | $1/(ml \cdot s^{-1})$ |
| Velocity constant in | neglected | | Not existing | $k_2 = k_2'/V_2$ | | $1/(ml \cdot s^{-1})$ |
| Name of the process | Resorption | | Elimination | Tissue take up/output | Inactivation | |

Figure 64 : d'après (Teorell 1937a) Récapitulatif des échanges entre les différents compartiments mis en jeu lors de l'injection d'un agent de contraste dans le corps (en sous cutanée, injection extravasculaire).

Une résolution de ce système d'équation linéaire amène alors aux équations suivantes, donnant la quantité d'agent de contraste par compartiment en fonction du temps (Teorell 1937a) :

$$\text{Quantité en sous cutané : } x = N_0 e^{-k_1 t} \quad \text{Equation 1}$$

$$\text{Quantité dans le sang : } y = C_1 e^{m_1 t} + C_2 e^{m_2 t} + S e^{-k_1 t} \quad \text{Equation 2}$$

$$\text{Avec } m_1 = -0.5p + \sqrt{0.25p^2 - q} \quad m_2 = 0.5p - \sqrt{0.25p^2 - q}$$

$$p = (k_2 + k_3 + k_4 + k_5) \quad q = (k_2 k_5 + k_3 k_4 + k_4 k_5)$$

$$C_1 = \frac{k_1 N_0 + S(k_1 + m_2)}{m_1 - m_2} \quad C_2 = -\frac{k_1 N_0 + S(k_1 + m_2)}{m_1 - m_2} \quad S = \frac{(k_3 + k_5 - k_1) k_1}{k_1(k_1 - p) + q} N_0$$

Quantité dans le tissu cible :

$$z = R_1 e^{m_1 t} + R_2 e^{m_2 t} + H e^{-k_1 t} \quad \text{Equation 3}$$

$$\text{Avec } R_1 = \frac{k_1 + m_2}{m_1 - m_2} H \quad R_2 = -\frac{k_1 + m_2}{m_1 - m_2} H \quad H = \frac{k_1 k_2}{k_1(k_1 - p) + q} N_0$$

Quantité éliminée :

$$u = k_4 \left[\frac{S}{k_1} (1 - e^{-k_1 t}) - \frac{C_1}{m_1} (1 - e^{m_1 t}) - \frac{C_2}{m_2} (1 - e^{m_2 t}) \right] \quad \text{Equation 4}$$

Quantité inactivée par le tissu :

$$w = k_5 \left[\frac{H}{k_1} (1 - e^{-k_1 t}) - \frac{R_1}{m_1} (1 - e^{m_1 t}) - \frac{R_2}{m_2} (1 - e^{m_2 t}) \right] \quad \text{Equation 5}$$

C'est le cas le plus complet des échanges entre un agent de contraste et le reste du corps. La plupart des autres cas sont un cas particulier de ce système. Une complexification peut être faite cependant en remplaçant les coefficients d'échanges k_i par les lois physiques les régissant. Pour les agents de contraste classiquement utilisés en tomodensitométrie ou en IRM, injectés en intravasculaire, on parle d'agent de contraste non diffusible (ne sorte pas du réseau vasculaire), de diffusible (s'extravase uniquement en cas de BHE rompue), ou de librement diffusible (s'extravase dans tous les cas, cas de l'eau pour l'Arterial Spin Labelling). De ce fait le transfert d'un élément à travers la membrane, s'il y a, est régi par la première loi de Fick : le flux de diffusion est proportionnel au gradient de concentration. Du fait de ce mode de transfert, plus la concentration intravasculaire en agent de contraste est élevée (par rapport à la concentration interstitielle), plus le transfert entre les deux compartiments sera rapide. D'autres interactions peuvent exister, influençant le transfert de la drogue d'un compartiment à l'autre. Elles sont alors dépendantes de l'élément injecté, s'il est métabolisé par des cellules ou non, sa taille, s'il est lipophile ou non, s'il est polarisé ou non, etc ... (Crone and Lassen 1970).

Dans l'étude de Teorell, l'influence des différents paramètres est testée. Sur la figure 65 on peut voir un exemple du modèle complet puis un exemple sans l'inactivation du produit (comme c'est le cas pour les agents de contrastes clinique en scanner et en IRM), puis le cas le plus simple, où il n'y aurait pas d'élimination.

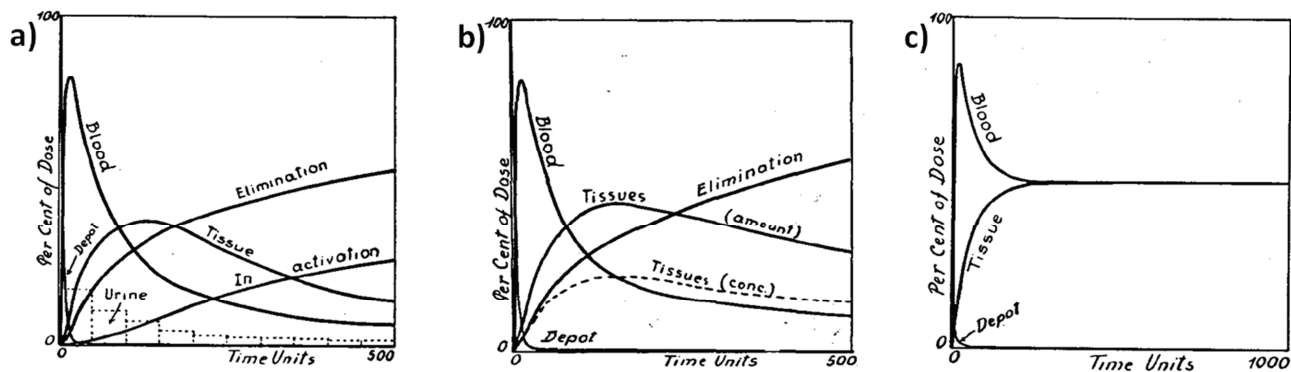


Figure 65 : a) Cas complet, b) Cas sans inactivation (l'inactivation correspond au cas des agents de contraste pour le TEP, sans inactivation correspond aux cas des agents de contraste pour IRM, CT et ultrason, c) Cas avec juste le tissu et le sang. Figure d'après (Teorell 1937a).

Cas de l'injection intravasculaire rapide (cas des études en « suivi de bolus ») :

L'injection intravasculaire supprime le compartiment sous cutané dans le modèle précédent. Pour garder le même formalisme qu'avant, on peut considérer que ça correspond au cas $k_1 \rightarrow \infty$, c'est équivalent à un passage instantané de l'agent de contraste dans le sang à partir du tissu sous cutané.

$$\lim_{k_1 \rightarrow \infty} C_1 = -\frac{k_2 + k_4 + m_2}{m_1 - m_2} N_0 = E_1 N_0$$

$$\lim_{k_1 \rightarrow \infty} C_2 = \frac{k_2 + k_4 + m_1}{m_1 - m_2} N_0 = E_2 N_0$$

$$\lim_{k_1 \rightarrow \infty} R_1 = \frac{k_2}{m_1 - m_2} N_0$$

$$\lim_{k_1 \rightarrow \infty} R_2 = -\frac{k_2}{m_1 - m_2} N_0$$

On obtient donc :

$$\text{Quantité dans le sang : } y = N_0 (E_1 e^{m_1 t} + E_2 e^{m_2 t}) \quad \text{Equation 6}$$

$$\text{Quantité dans le tissu : } z = \frac{k_2}{m_1 - m_2} N_0 (e^{m_1 t} - e^{m_2 t}) \quad \text{Equation 7}$$

$$\text{Quantité éliminé : } u = -k_4 N_0 \left[\frac{E_1}{m_1} (1 - e^{m_1 t}) + \frac{E_2}{m_2} (1 - e^{m_2 t}) \right] \quad \text{Equation 8}$$

$$\text{Quantité inactivé : } u = \frac{k_2 k_5}{m_1 - m_2} N_0 \left[\frac{1}{m_2} (1 - e^{m_2 t}) - \frac{1}{m_1} (1 - e^{m_1 t}) \right] \quad \text{Equation 9}$$

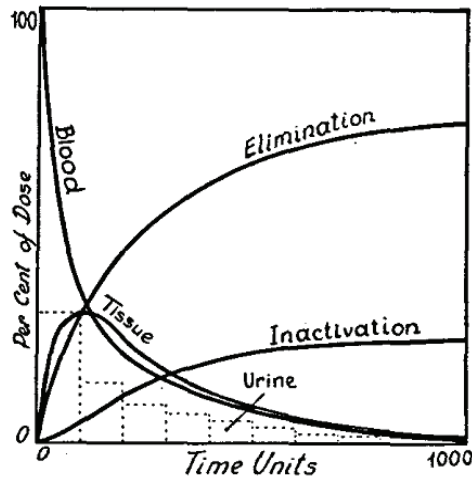


Figure 66 : Exemple d'injection intravasculaire tel que décrite par les équations précédentes. On retrouve quasiment la même allure que pour la figure 15a) excepté qu'il n'y a pas la montée en quantité de produit dans le sang puisque l'injection est supposée instantanée. Figure d'après (Teorell 1937b)

Des exemples de courbes de la quantité de drogue en fonction du temps dans les différents compartiments sont présentés figure 66. La mesure de la quantité d'un élément en fonction du temps se fait le plus facilement dans le tissu de la zone d'intérêt. Le maximum de cette courbe peut être décrit mathématiquement par les formules suivantes :

$$t_{max} = \frac{1}{m_1 - m_2} \log\left(\frac{m_1}{m_2}\right) \quad \text{Equation 10}$$

$$z_{max} = N_0 \frac{k_2}{m_1 - m_2} \left(\frac{m_2}{m_1}\right)^{\frac{m_1}{m_1 - m_2}} \quad \text{Equation 11}$$

On peut en déduire à partir de ces formules que le temps au maximum est indépendant de la quantité de drogue injectée, alors que la valeur du maximum est quand à elle directement proportionnelle à celle-ci. On voit ici la linéarité du modèle qui est très importante pour les modèles de mesure de perfusion que nous décrirons plus loin. On voit par ailleurs que si on ne peut pas faire des suppositions supplémentaires permettant de négliger certaines variables le système nécessiterait de nombreuses mesures pour avoir assez de variables « connues » pour résoudre le problème. Mesurer séparément tous ces compartiments n'est pas forcément possible avec les appareils d'imageries macroscopiques cliniques.

Cas de l'injection intravasculaire lente (cas des études en « steady-state » ou méthode à l'équilibre) :

Dans le cas d'une injection intravasculaire lente, à partir du modèle complet, on rajoute la contrainte suivante : $\frac{dx}{dt} = cste$. Ceci correspond à dire que le débit de passage du produit dans le sang est constant (on se limite donc à la durée de l'injection).

On obtient alors d'après la résolution des équations différentielles les équations suivantes :

$$\text{Quantité dans le sang : } y = r(A_1 e^{m_1 t} + A_2 e^{m_2 t} + I) \quad \text{Equation 12}$$

$$\text{Quantité dans le tissu : } z = r(B_1 e^{m_1 t} + B_2 e^{m_2 t} + J) \quad \text{Equation 13}$$

$$\text{Quantité éliminé : } u = k_4 r \left[I * t - \frac{A_1}{m_1} (1 - e^{m_1 t}) - \frac{A_2}{m_2} (1 - e^{m_2 t}) \right] \quad \text{Equation 14}$$

$$\text{Quantité inactivé : } u = k_5 r \left[J * t - \frac{B_1}{m_1} (1 - e^{m_1 t}) - \frac{B_2}{m_2} (1 - e^{m_2 t}) \right] \quad \text{Equation 15}$$

$$\text{Avec : } A_1 = \frac{q + m_2(k_3 + k_5)}{q(m_1 - m_2)} \text{ et } A_2 = -\frac{q + m_2(k_3 + k_5)}{q(m_1 - m_2)}$$

$$B_1 = \frac{k_2 m_2}{q(m_1 - m_2)} \text{ et } B_2 = -\frac{k_2 m_2}{q(m_1 - m_2)}$$

$$I = \frac{k_3+k_5}{q} \text{ et } J = \frac{k_2}{q}$$

$$r = k_1 N_0 e^{-k_1 t}$$

Sur la figure suivante (figure 67) est donnée un exemple de solution de se système dans le cas complet. On y observe que le taux d'agent de contraste dans le sang et dans le tissu tende vers un maximum. On y observe aussi (et d'après les équations 12 et 13), que le taux d'agent de contraste dans le sang et dans le tissu est directement proportionnel au débit d'injection.

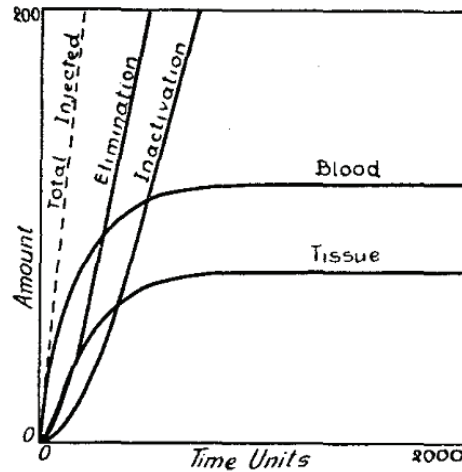


Figure 67 : Figure d'après (Teorell 1937b). Solution des équations dans le cas d'une injection lente. On observe que le taux d'agent de contraste dans le sang et dans le tissu tend vers un maximum.

Bien que ce ne soit pas représenté par ce modèle, la quantité éliminée et inactivée arrive aussi à saturation. Lors d'une injection lente, la quantité dans le sang et dans le tissu est limitée par l'élimination des reins. Sans élimination on aurait une quantité croissante en fonction du temps, comme il est représenté sur la figure 68, avec un facteur de proportionnalité entre le sang et le tissu (qui correspondrait au volume interstitiel du tissu si on fait l'hypothèse que la drogue ne pénètre pas dans les cellules, comme c'est le cas pour les agents de contrastes cliniques pour le scanner et l'IRM). Cependant, dans le papier de Teorell, l'élimination est considérée comme très rapide vu qu'il s'intéresse à des molécules de constantes d'échange très élevé. Dans notre cas, les agents de contraste sont éliminés plus lentement. Sur le principe cependant, en dehors des constantes k qui changent, on s'attend au même type de courbes avec une dynamique d'élimination plus lente et une concentration maximum qui atteint moins rapidement son maximum pour le sang et le tissu (système linéaire).

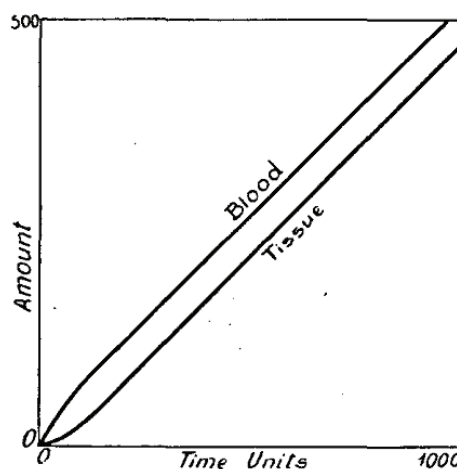


Figure 68 : Quantité de drogue dans le sang et le tissu en cas d'absence d'élimination et d'inactivation. Figure d'après (Teorell 1937b)

Ces équations montrent que dans le cas d'une injection lente (par rapport à l'élimination du produit), le maximum atteint par le sang et le tissu, n'est plus proportionnel à la quantité injectée. Sur la figure suivante (figure 69) est représentée la quantité maximum dans le sang en fonction de la quantité injectée et de son débit d'injection.

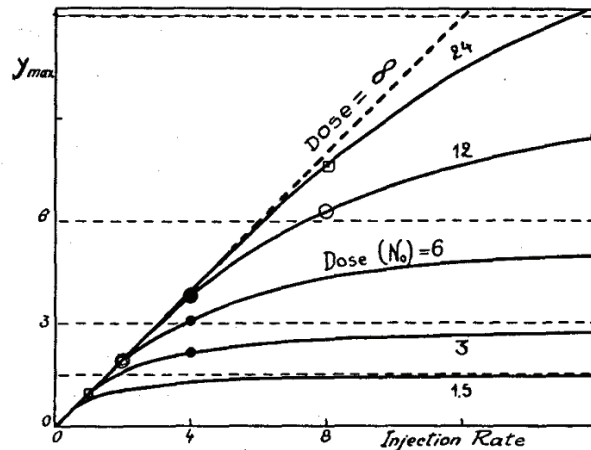


Figure 69 : Quantité maximum de drogue dans le sang après une injection intraveineuse suivant la quantité injectée (dose) et le débit d'injection. Figure d'après (Teorell 1937b). Les différentes courbes représentent différentes quantités totales injectées.

Pour atteindre la quantité maximum, il faut injecter le produit rapidement. Pour les différentes figures précédemment citées, les valeurs des k sont référencées dans les publications de Teorell (Teorell 1937b; Teorell 1937a) et correspondent généralement à des constantes de transfert rapide, pour des molécules plus petites que celle utilisés comme agent de contraste pour le scanner et l'IRM. Cependant, comme à la fois l'élimination et le passage dans le tissu sont plus lents pour les agents de contraste, le type de courbe ne devrait pas trop varier (hypothèse par rapport au fait que le système soit linéaire).

Dans l'étude proposée par Teorell, la « limitation » dans l'apport de la drogue au tissu n'apparaît pas. Il y a en fait deux cas extrêmes de limitation de ce passage de la drogue dans le sang, au tissu. Ces cas sont présentés sur la figure 70 et sont appelés « perfusion limited » ou « permeability limited ».

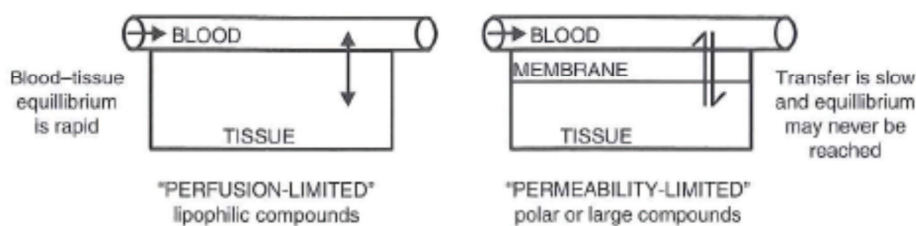


Figure 70 : Les deux cas extrêmes d'échanges entre le sang et les tissus : limité par la perfusion ou limité par la perméabilité. Figure d'après (Riviere 2011)

Le premier cas de figure ; « perfusion limited » correspond au cas où c'est la quantité de drogue présente dans les vaisseaux qui va être la limite de son extravasation alors que celle-ci est « instantanée ». Les membranes permettraient un transfert plus important si elles voyaient une plus grande quantité d'éléments. Ce cas de figure existe notamment pour les agents de contraste librement diffusible dans les cas de BHE fortement rompue ou dans les nécroses où le débit sanguin peut être quasi-inexistant. Le deuxième cas de figure correspond au cas où la drogue n'arrive pas à traverser la membrane, bien que la quantité de drogue arrivant sur cette membrane soit importante. Il s'agit du cas des molécules de tailles relativement importantes (les gros agents de contraste), du

cas où la pression interstielle à l'extérieur de la membrane est trop importante (zone œdémateuse) ou encore du cas des vaisseaux très faiblement perméable (zone périphérique de la tumeur).

Phénomène de recirculation :

Lors de l'injection d'un agent de contraste, qui est généralement en voie intraveineuse, celui-ci passe une première fois dans l'organe étudié (dans les études concernant cette thèse il s'agit du cerveau), puis continue son parcours dans le reste du corps. Les veines revenant jusqu'au cœur, le produit va à nouveau être renvoyé dans l'organe d'intérêt. On peut donc parler de phénomène de recirculation. Cependant seule une partie de cet agent de contraste va être renvoyée puisque le cerveau n'est alimenté que par un tiers du sang en provenance du cœur et puisque les reins auront filtré une partie de cet agent de contraste. Le mélange de l'agent de contraste avec le sang augmente, y compris par le fait de sa circulation dans des sous-branches différentes de la vascularisation.

De ce fait, lors de son second passage, on peut observer un pic de concentration en agent de contraste, plus faible et plus aplati que lors du premier passage si l'on a réalisé une injection rapide (bolus, voir figure 71). On n'observe rien lors d'une injection lente (steady-state).

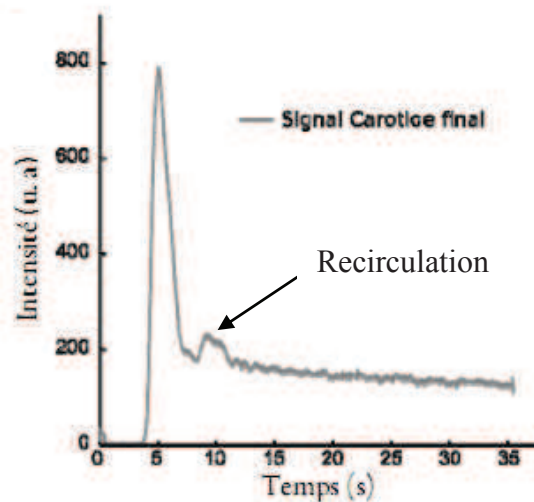


Figure 71 : Mesure de la concentration d'un agent de contraste dans la carotide commune après injection du traceur fluorescent dans la veine fémorale. Présence de la recirculation vers 10s. Image réalisée grâce à une caméra optique à 50 images par seconde. Thèse de Nicolas Pannetier (Pannetier 2010).

Que mesure-t-on en perfusion ? :

Les agents de contraste clinique actuel utilisé pour l'imagerie CT ou IRM ne sont pas métabolisés. Au contraire des agents de contraste utilisés pour l'imagerie TEP qui sont spécifiques à certaines activités métaboliques des cellules. Les agents de contraste utilisés dans cette thèse ne sont pas internalisés par les cellules cérébrales (la zone d'intérêt dans les différentes études de perfusion décrites) ni par les globules rouges sanguins (Krause 1999). Cela signifie que lorsque l'agent de contraste occupera le volume du vaisseau sanguin, il occupera en fait le volume du vaisseau « apparent » c'est-à-dire le volume réel moins le volume occupé par les globules rouges. Pour obtenir le volume réel il faut diviser ce volume apparent par $(1-Hct)$:

$$V_{réel} = \frac{V_{mesuré}}{(1 - Hct)}$$

Hct étant l'hématocrite. Hors comme il a été dit dans le paragraphe 4.2.1, il est quasiment impossible de connaître précisément l'hématocrite dans les capillaires d'un voxel imagé. Il faut faire une estimation moyenne sur l'ensemble des capillaires de ce voxel. Cette estimation est faite pour

des voxels ne comprenant que des capillaires, la présence de gros vaisseaux dans le voxel peut fausser cette estimation et donc biaiser la mesure de perfusion. C'est une limite qui ne pourra à priori pas être franchie. Pour ne pas surcharger les équations dans la suite du document, la normalisation pour corriger de l'hématocrite ne sera pas effectuée (supposition Hct = 0).

De plus en perfusion, avec les méthodes d'imagerie macroscopique (IRM, Scanner, TEP, ...), il n'est pas possible de faire des mesures de concentration d'agent de contraste intracapillaire. On ne peut mesurer que la concentration dans un voxel comprenant l'ensemble « capillaire + tissu + cellules ». Dans le paragraphe suivant on va voir comment surmonter ce problème.

4.5.2 La pharmacocinétique locale :

On va présenter maintenant les mesures de perfusion telle qu'on peut les faire, c'est-à-dire en suivant la concentration d'un agent de contraste en fonction du temps seulement localement, dans un seul organe (pour nous le cerveau). Sur la figure 72 suivante est représenté un exemple des différentes grandeurs que l'on est capable de mesurer lors d'un examen de perfusion scanner réaliser dans le cadre du projet clinique sur le traitement des tumeurs cérébrales. Il s'agit ici d'une injection rapide de type « bolus ». La sortie veineuse n'est pas représentée mais est mesurable aussi.

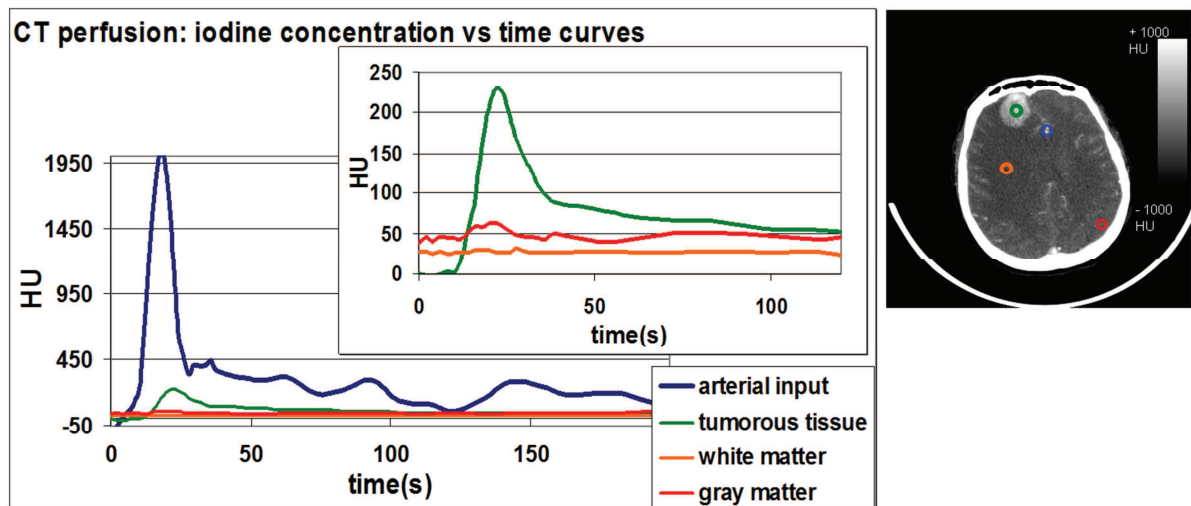


Figure 72 : Exemple de mesure de perfusion chez un patient par scanner. Imageries réalisées dans le cadre de l'étude sur la concentration en agent de contraste iodée que l'on est capable d'atteindre dans des métastases en vue de l'essai clinique sur la SSRT, et le lien avec les mesures de perfusions. Les régions d'intérêts tracées pour les mesures sont représentées en haut à droite et les résultats sur la figure de gauche. La matière blanche ne prend quasiment pas le contraste du fait qu'elle est très peu vascularisée. Sur la matière grise on distingue le passage de l'agent de contraste. Sur la tumeur, la prise de contraste est beaucoup plus importante du fait de l'angiogénèse tumorale, et la décroissance se fait en deux phases. Une première rapide du fait de la partie de l'agent de contraste qui ne s'est pas extravasé, et une deuxième partie plus lente qui correspond au retour de l'agent de contraste dans le sang par diffusion avant d'être chassée par convection.

Le système nerveux central humain doit être considéré, pour les modèles mathématiques qui vont suivre, comme étant linéaire, stationnaire et fermé.

- Linéaire : La superposition d'injection d'agent de contraste donne le même résultat que la superposition des réponses tissulaires tant qu'il n'y a pas de phénomène de saturation. Cette hypothèse est fautive du fait que l'extravasation dépend de la concentration en agent de contraste puisque régulée par la loi de Fick. Cependant la gamme de concentration intravasculaire dans les vaisseaux perméables (capillaire) n'est pas très grande et se permet donc l'hypothèse de la linéarité.
- Stationnaire : Les paramètres de perfusion sont constants le temps de la mesure.

- Fermé : Tout agent de contraste arrivé par l'entrée artérielle, ressortira par la sortie veineuse (pas de création ou de disparition d'agent de contraste, ou de modification de celui-ci de telle sorte qu'il ne soit plus visible par l'appareil d'imagerie).
- De plus l'injection de produit de contraste doit être suffisamment faible pour ne pas modifier l'hydrodynamique du système. Il est aussi fait comme hypothèse que le mélange sang/produit de contraste est homogène et instantané.

La répétabilité du système est aussi supposée, c'est-à-dire que si on réalise deux fois la même injection dans des conditions identiques, on obtient deux fois la même réponse.

On ne considère dans les équations suivantes que des agents de contraste de type Scanner/IRM, c'est-à-dire qui ne sont pas métabolisés par les cellules (Krause 1999; Lee, Zhang et al. 2010). Pour passer aux agents de contraste de type TEP, métabolisés par des cellules cibles, il faut rajouter une composante prenant en compte ce troisième compartiment, qualifié d'inactivation dans le paragraphe précédent.

Pour décrire la cinétique des traceurs telle qu'elle est mesurable par un appareil d'imagerie macroscopique (on mesure la concentration d'un agent de contraste dans un voxel), commençons par un modèle simple, le système vasculaire ne sera constitué que d'une entrée, d'un contenant homogène, et d'une sortie (figure 73).

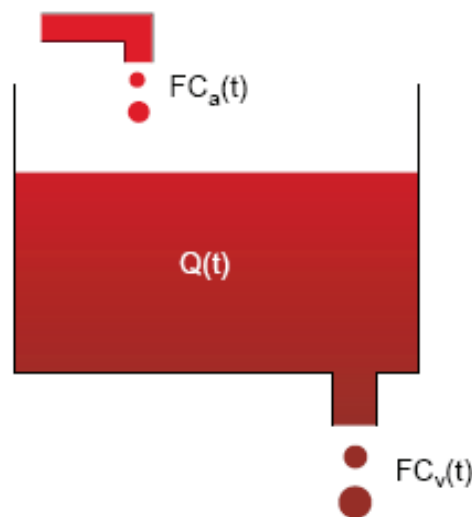


Figure 73: Schéma représentant un système vasculaire simplifié, une entrée, un volume homogène, une sortie.

Soit m (en mg) la masse de l'élément lourd que l'on injecte, V (en ml) le volume de fluide du système, alors c (en mg/ml), la concentration en produit de contraste dans la zone homogène du système vaut :

$$c = m/V \quad \text{Equation 16}$$

Soit i la vitesse d'injection du produit de contraste (en mg/sec).

La concentration en produit de contraste à l'équilibre vaut :

$$c = i/F \quad \text{Equation 17}$$

avec F (en ml/sec) le débit du système.

Pour que le système ne soit pas biaisé par la recirculation dans le cas d'une injection rapide pour un examen de type « suivi de bolus », il faut que l'injection soit très rapide (de type

impulsionnelle (dirac)), et que $c(t)$ revienne à son niveau de base (sans présence de produit de contraste) pendant un certain temps, avant que le phénomène de recirculation n'apparaisse et que $c(t)$ n'augmente à nouveau. Ainsi le système ne comporte qu'exactly la quantité injectée. Dans le cas contraire, il faudrait additionner à la quantité injectée, la quantité qui repasse dans le cerveau. La masse de produit de contraste injecté est égale à l'intégrale du débit du système multipliée par la concentration en fonction du temps (Eq 18).

$$m = \int_0^{\infty} Fc(t)dt \quad \text{Equation 18}$$

Tout le produit injecté doit passer par l'artère, entrée du système, et par la veine, sortie du système, on doit donc avoir

$$m = \int_0^{\infty} FC_a(t)dt = \int_0^{\infty} FC_v(t)dt \quad \text{Equation 19}$$

Avec $C_a(t)$ et $C_v(t)$ les concentrations de produit de contraste dans l'artère et dans la veine au temps t .

L'équation 19 nous donne m , et on peut en déduire F à partir de l'équation 3 :

$$F = \frac{m}{\int_0^{\infty} c(t)dt} \quad \text{Equation 20}$$

On peut définir aussi le temps de transit moyen :

$$\bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} tc(t)dt}{\int_0^{\infty} c(t)dt} \quad \text{Equation 21}$$

qui d'après le théorème du volume central reliant débit volume et temps de transit vaut aussi (Hamilton, Moore et al. 1928; Axel 1980) :

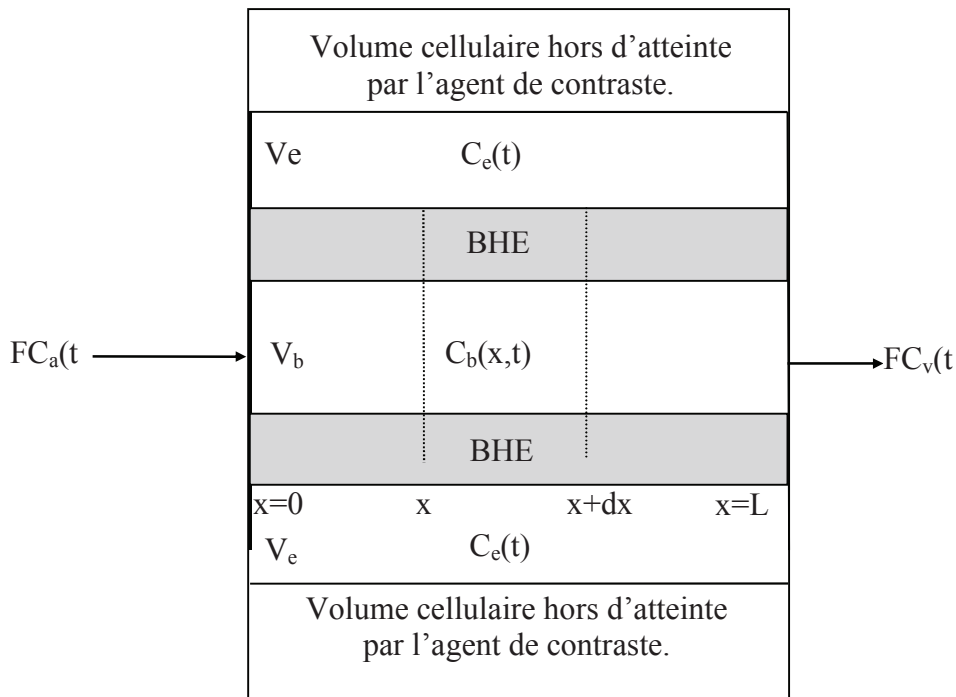
$$\bar{t} = F/V \quad \text{Equation 22}$$

Cependant la taille des capillaires est inférieure à la résolution des appareils d'imagerie médicale. Un pixel représente à la fois la contribution au signal des capillaires, des cellules et du tissu interstitiel. Si le traceur est non diffusible, on peut alors définir un facteur d'échelle f :

$$f = \frac{V_{vasc}}{V_{vasc} + V_{interstitium} + V_{cells}} = \frac{V_{vasc}}{V_{total}} \quad \text{Equation 23}$$

Avec V_{cells} , le volume pris par les cellules, $V_{interstitium}$, le volume interstitiel et V_{vasc} , le volume vasculaire (correspondant au V des équations d'avant). Si notre traceur occupe bien tout le volume vasculaire, f fois le volume du voxel représente le CBV sinon il faut corriger la présence des globules rouges (hématocrite) comme précisé précédemment. L'équation 22 permet de le calculer si l'on connaît le CBF (ou F) et le MTT (ou \bar{t}). Le MTT étant facilement mesurable directement sur le voxel (équation 21). Et le CBF aussi, par l'équation 20.

Si maintenant on suppose que les vaisseaux sont perméables au produit de contraste, on doit considérer deux compartiments distincts comme le montre le schéma suivante:



- Le compartiment intravasculaire avec C_b , la concentration en agent de contraste et V_b le volume intravasculaire
- Le compartiment extravasculaire extracellulaire avec C_e et V_e , la concentration en agent de contraste et le volume extravasculaire
- Le compartiment cellulaire n'est pas pris en compte dans les équations puisqu'il n'est pas mesuré du fait que l'agent de contraste reste extérieur aux cellules.

La concentration de produit de contraste présente dans un voxel du tissu du cérébral à l'instant t est appelé $Q(t)$.

La fraction de d'agent de contraste passant des vaisseaux au compartiment extravasculaire correspond à la fraction d'extravasation E .

Plusieurs algorithmes existent pour calculer les paramètres hémodynamiques à partir de $Q(t)$, $C_a(t)$ et $C_v(t)$ qui sont les trois valeurs mesurables sur les images tomodensitométriques. Parmi ces algorithmes, il y a ceux qui sont modèles dépendants (hypothèses préliminaires sur la micro-fluidique) et ceux qui sont modèles indépendants (pas d'hypothèses). Ces modèles donnent chacun des mesures de la perfusion mais parfois difficilement comparables en ce qui concerne la perméabilité. De plus ils ne donnent pas forcément les mêmes résultats, sans qu'aucune d'entre eux ne soit validé (Kershaw and Buckley 2006; Goh, Halligan et al. 2007; Goh and Halligan 2008; Takasawa, Jones et al. 2008).

La taille des agents de contraste a une très grande importance. Plus la molécule est grande et plus les résultats semblent reproductibles et exacts pour la mesure de perméabilité et de volume lors d'un suivi de bolus (Choyke 2005; de Lussanet, Langereis et al. 2005). La taille de l'agent de contraste permet de choisir si l'on est en condition « perfusion-limité » ou « perméabilité-limité ». Plus la taille de l'agent de contraste est grande (mais quand même diffusible à travers la membrane), moins on

est gêné par le cas « perfusion limité » qui peut fausser les résultats. Dans le cas où on pourrait mesurer la perméabilité avec un agent de fort poids moléculaires et un de faible poids moléculaire, on pourrait alors distinguer ces limites par région et choisir le modèle et l'agent de contraste menant aux valeurs de perméabilité et de perfusion exactes. Un autre moyen de diminuer les erreurs possibles dans les mesures de perfusion, est de mesurer séparément la perméabilité et les autres paramètres. On utilise alors un agent de contraste traversant la BHE en injection lente pour une mesure de la perméabilité et le CBV par les méthodes dites « à l'équilibre » (steady-state) et un agent de contraste ne traversant pas la BHE pour mesurer le CBF/CBV avec les méthodes en suivi de bolus. Les CBV sont censés être identiques quelque soit l'agent de contraste utilisé.

Afin d'avoir un meilleur rapport signal sur bruit pour mesurer la perméabilité, et comme celle-ci dépend de la loi de Fick, il est intéressant d'utiliser une solution la plus concentrée possible en agent de contraste lors de l'injection pour des mesures en suivi de bolus (Silvennoinen, Hamberg et al. 2006). Ceci est moins important lors d'injection lente (à l'équilibre) puisque la concentration sanguine va plus dépendre des conditions d'injection (débit et temps) (voir paragraphe précédent).

Modèle du maximum slope (le plus simple) :

La méthode du maximum slope (Klotz and König 1999) est un des modèles les plus simples qui nécessite une hypothèse très contraignante : celle d'une BHE non lésée, c'est-à-dire qu'il n'y a pas (ou de façon négligeable) d'extravasation du produit de contraste de l'intra vers l'extravasculaire. On a donc d'après le cas simpliste décrit précédemment :

$$Q(t) = F \int_0^t [C_a(t') - C_v(t')] dt'$$

Equation 24

Dans ce cas, la loi de Fick donne :

$$\frac{F}{V} = \frac{(dQ(t)/dt)_{tissue}}{(C_a(t) - C_v(t))} \quad \text{Equation 25}$$

Cette relation est valable pour tout t, donc, pour avoir le meilleur rapport signal sur bruit et pour établir un critère reproductible permettant de mesurer la perfusion faire des cartes de perfusion automatiquement, la valeur de t choisie est la valeur où $(dC(t)/dt)_{tissue}$ est maximum : t_{max_slope} . Si de plus à t_{max_slope} , le produit de contraste n'a pas encore commencé à ressortir par la veine (possible avec des injections rapides) alors on obtient :

$$\frac{F}{V} = \frac{(dQ/dt)_{tissue}(t_{max_slope})}{C_a(t_{max_slope})} \quad \text{Equation 26}$$

On peut aussi calculer le CBV grâce à la relation suivante :

$$CBV = \frac{\int_0^\infty Q_{tissue}(t) dt}{\int_0^\infty C_a(t) dt} \quad \text{Equation 27}$$

Les courbes tissulaires et artérielles sont de même forme (figure 72). En première approximation, on peut dire qu'il y a une relation de proportionnalité entre elles. Cette approximation signifie que le temps de transit moyen et le débit seraient identiques, que seul le volume vasculaire change. Les courbes étant de forme d'un pic resserré, la valeur de l'air sous la courbe dépend principalement de la valeur du pic. On peut donc faire l'approximation suivante :

$$CBV = \frac{\max(C_{tissue}(t))}{\max(C_a(t))} \quad \text{Equation 28}$$

Le calcul de t_{max_slope} à partir $C_{tissue}(t)$ est sensible au bruit. Les variations rapides du signal dû au bruit impliquent des valeurs de la dérivée importantes non représentatives de la fluidique mis en jeu. Il est nécessaire de filtrer les hautes fréquences des courbes temporelles avant d'effectuer ces calculs. Des acquisitions avec une bonne résolution temporelle sont nécessaires afin de ne pas louper le maximum. Cette condition est nécessaire pour tous les modèles de mesure de perfusion en suivi

de bolus, mais est moins contraignante lorsqu'on ajuste les courbes mesurées par des équations tel que pour le modèle de la variable gamma, puisque l'ajustement permet en partie de retrouver la valeur au pic si elle se situe entre deux pas de temps.

Cet algorithme ne peut pas donner de résultat correct dans les zones où la BHE est lésée, les équations 24 et 27 étant alors inexacte. Cependant les valeurs obtenues dans les zones où elle est intacte sont une première approximation des valeurs réelles, que l'on peut obtenir avec un temps de calcul minimal. Ce calcul peut être utilisé dans une étape préliminaire pour initialiser des paramètres d'ajustement plus complexes comme par exemple, lorsqu'on utilise des variables gammas qui sont décrites dans le paragraphe suivant :

Modèle de la variable gamma :

Comme on le voit sur la figure 72, page 107, les courbes de concentrations en agent de contraste en fonction du temps présentent une augmentation brusque puis une décroissance qui peut être considérée comme mono-exponentielle dans le cas d'une BHE non lésée. Il a été montré par Thompson *et al* que les variables gamma étaient des fonctions qui pouvaient décrire avec précision ce type d'évolution de la concentration de traceur dans le sang après l'injection d'un bolus. La variable gamma est une fonction du type:

$$Q(t) = C_p \left(\frac{e}{\alpha\beta}\right)^\alpha (t - t_a)^\alpha \exp\left(-\frac{t-t_a}{\beta}\right) \quad \text{Equation 29}$$

où C_p est la concentration au pic, α et β sont des paramètres influant la largeur à mi-hauteur de la fonction, le temps de montée et de redescente de la concentration. t_a est le temps d'apparition du produit de contraste (Thompson, Whalen et al. 1964). Une représentation de ce type de fonction est donnée sur la courbe suivante (figure 74) :

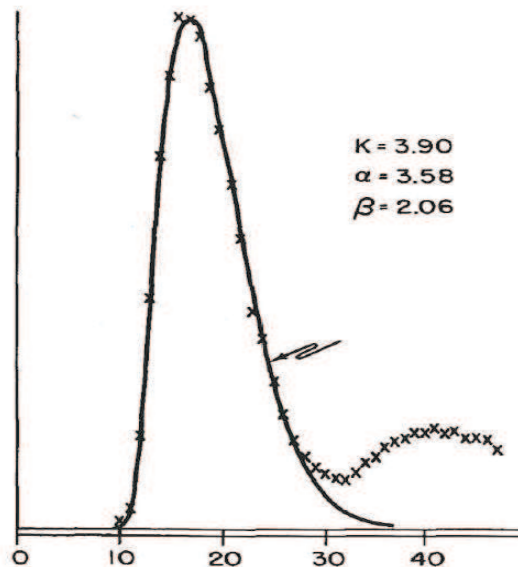


Figure 74 : Exemple d'ajustement par une variable gamma et suppression de la recirculation, d'après la publication de Thompson (Thompson, Whalen et al. 1964).

A partir de cette fonction, on peut calculer le CBF, CBV et MTT :

$$MTT = t_a + \beta(\alpha + 1) \quad \text{Equation 30}$$

D'après l'équation 27 on a :

$$CBV = \frac{\int_0^\infty Q(t)dt}{\int_0^\infty C_a(t)dt} = \frac{[C_p(\frac{e}{\alpha\beta})^\alpha \beta^{\alpha+1} \Gamma(\alpha+1)]_t}{[C_p(\frac{e}{\alpha\beta})^\alpha \beta^{\alpha+1} \Gamma(\alpha+1)]_a} \quad \text{Equation 31}$$

Avec $\Gamma(n) = \int_0^\infty x^{n-1} e^{-x} dx$

Le dénominateur concerne les paramètres de la variable gamma obtenus sur une entrée artérielle de référence. Le numérateur représente les paramètres de la variable gamma obtenu dans le voxel d'intérêt. Γ , représente l'intégrale de la variable gamma de 0 à $+\infty$.

$$CBF = CBV/MTT \quad \text{Equation 32}$$

Pour ajuster les courbes $Q(t)$ avec les variables gamma, plusieurs méthodes ont été essayées. Celle retenue utilise l'algorithme de Levenberg-Marquardt, basé lui aussi sur les moindres carrés.

Les variables gamma permettent d'éliminer le phénomène de recirculation. Par contre pour implémenter une méthode d'ajustement qui converge, il est nécessaire de ne considérer que les points de concentration avant l'apparition de la recirculation (figure 73).

On peut anticiper le fait que la méthode de la variable gamma ne va pas être concluante lorsque la BHE est rompue car la décroissance de la courbe de concentration tissulaire est une combinaison d'un mécanisme actif vasculaire que modélise la variable gamma, avec un mécanisme de diffusion passive vers le milieu vasculaire de la fraction extravasée non pris en compte dans le modèle. En cas de BHE lésée, le modèle de la variable gamma impliquera une surestimation de la mesure de $\int Q(t)dt$ car l'agent de contraste présent dans l'espace interstitiel élargira la courbe ajustée et donc l'aire sous la courbe sera plus importante. Pour pallier au problème de condition de BHE intact, il est possible de charger au préalable la tumeur en injectant une première fois de l'agent de contraste. Il s'agit ensuite de faire le suivi de bolus sur une seconde injection. La première injection diminuant ainsi les gradients de concentration d'agent de contraste entre le milieu vasculaire et le milieu interstitiel. Et donc la constante de transfert k entre les deux compartiments sera quasi nulle.

Modèle de Johnson et Wilson :

Les deux algorithmes précédents nécessitent une hypothèse très contraignante : qu'il n'y ait pas d'extravasation et donc soit une BHE intact soit un cas où l'agent de contraste ne s'extravasera pas lors de son passage. Avec les agents de contraste classiques ils ne permettent donc à priori que d'effectuer des mesures de perfusion dans le cerveau sain (ou une pathologie n'altérant pas la BHE). L'une des seules méthodologies permettant de mesurer tous les paramètres de perfusion en une seule acquisition et dans le cas d'une BHE rompue est l'approximation adiabatique (St Lawrence and Lee 1998) du modèle de Johnson et Wilson (Johnson and Wilson 1966) (figure 75).

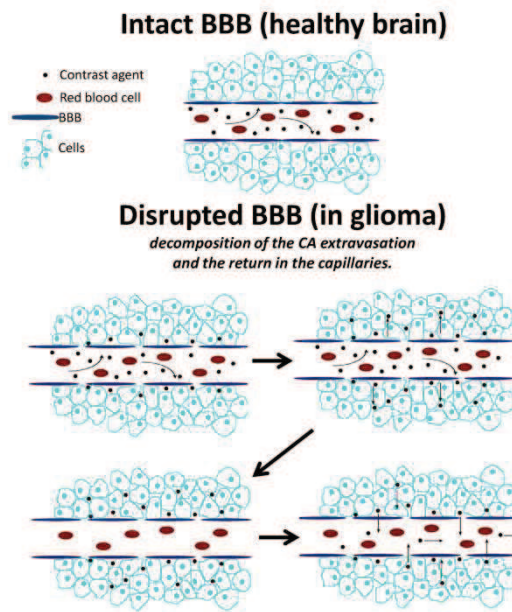


Figure 75 : Comparaison de l'évolution de molécules d'agent de contraste entre le cas a) d'une BHE non rompue (tissu sain) et b-e) le cas d'une BHE rompue (gliomes) suivant l'hypothèse du modèle adiabatique de Johnson et Wilson. L'évolution de la concentration dans l'espace interstitielle est lente par rapport à celle dans le sang. La phase où l'agent de contraste resté intravasculaire est chassé de la ROI et la phase où l'agent de contraste de l'espace interstitiel retourne dans le sang sont décorrélée.

L'approximation adiabatique correspond à faire l'hypothèse que l'évolution de la concentration en agent de contraste en milieu interstitielle est nettement plus lente et en plus faible concentration que l'évolution de la concentration en agent de contraste intravasculaire.

La méthode présentée dans ce chapitre utilise la notion de fonction de résidu impulsionnelle tissulaire (Lee, Purdie et al. 2003). Si $F.C_a(t)$ était exactement une fonction dirac alors la réponse impulsionnelle du système observée dans un voxel de tissus $R(t)$ (quantité de produit de contraste restant dans le tissu observé au temps t) en fonction du temps t serait tel que décrit sur la figure 76 :

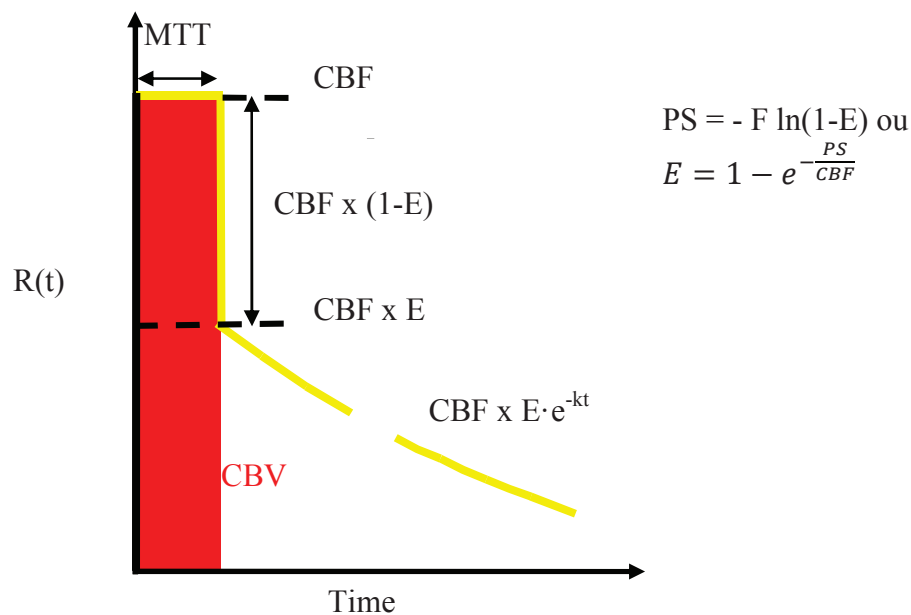


Figure 76 : Représentation de la réponse impulsionnelle et description des paramètres hémodynamiques à partir de cette fonction.

On appelle cette réponse impulsionnelle « BF scaled IRF » (Blood Flow scaled impulse residue function) ou fonction résidu. On obtient à partir de cette fonction tous les paramètres de perfusion souhaités à savoir CBV, CBF, MTT et PS :

CBV = aire sous la première partie de la courbe

CBF = max de la courbe

MTT = CBV/CBF

PS = $-F \times \ln(1-E)$ avec E fraction d'extravasation

La présence d'une fonction créneau durant le MTT correspond à l'approximation adiabatique. Durant le MTT la concentration dépend uniquement de l'agent de contraste en intravasculaire, puis celui-ci est éliminé instantanément et il ne reste que l'agent de contraste extravasculaire qui repasse dans le système vasculaire par diffusion passive pour être éliminé instantanément par le sang une fois dedans.

Or $F.C_a$ n'est pas une fonction Dirac, mais peut être considéré comme une succession de Diracs. On utilise alors l'outil de convolution pour passer du cas du Dirac au cas réel comme l'explique la figure suivante (figure 77) :

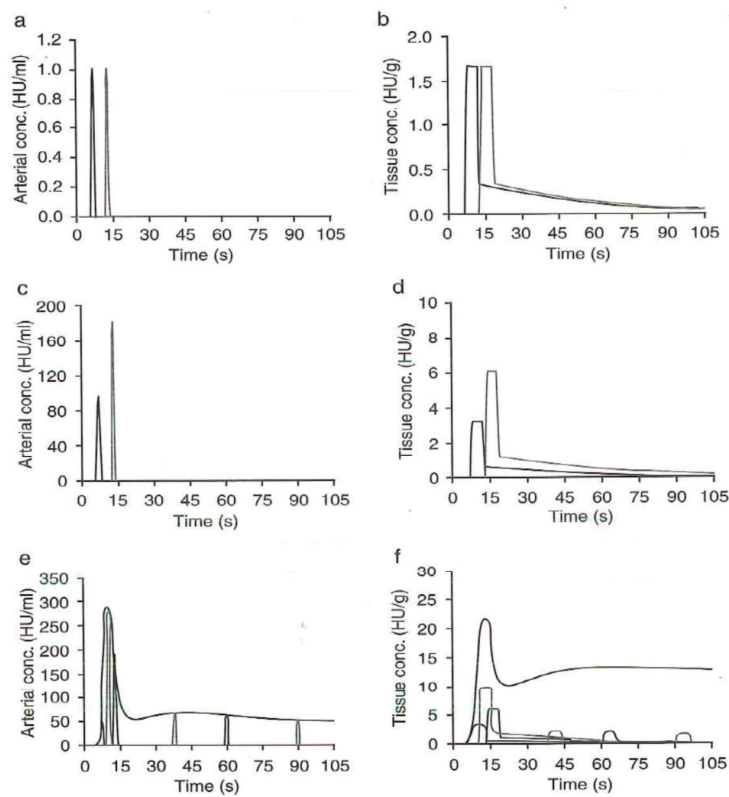


Figure 77 : Passage du modèle d'une entrée artérielle sous forme de Dirac au cas réelle d'une entrée artérielle réelle (possédant un temps de passage). Figure d'après (Miles K.A., Charnsangavej C. et al. 2007)

On a donc l'équation suivante :

$$Q(t) = FC_a(t) \otimes R(t) \quad \text{Equation 33}$$

Les paramètres mesurables sur une acquisition de perfusion sont $Q(t)$ et $Ca(t)$. Grâce à la déconvolution de ces deux fonctions, on obtient alors $F.R(t)$ et donc les paramètres hémodynamiques qui nous intéressent.

La convolution est un opérateur non bijectif. La déconvolution est donc une technique relativement instable, sensible au bruit et aux incertitudes sur les mesures temporelles. Pour effectuer la déconvolution, il y a deux méthodes possibles : une méthode utilisant la transformée de

Fourier inverse ($x_n = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} X(k) e^{2i\pi \frac{kn}{N}}$, avec N le nombre total de points, x_n le signal temporel

discret indicé n, k/N la $k^{\text{ième}}$ fréquence), ou une méthode analytique consistant à écrire le produit de déconvolution sous forme matricielle (Equation 19) puis effectuer une inversion matricielle.

$$\begin{pmatrix} Q(\Delta t) \\ Q(2\Delta t) \\ \vdots \\ Q((M-1)\Delta t) \\ Q(M\Delta t) \\ Q((M+1)\Delta t) \\ Q((M+2)\Delta t) \\ \vdots \\ Q((N-1)\Delta t) \\ Q(N\Delta t) \end{pmatrix} = F \cdot \Delta t \cdot \begin{pmatrix} C_a(0\Delta t) & 0 & 0 & \dots & \dots & 0 \\ C_a(\Delta t) & C_a(0\Delta t) & 0 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ C_a((M-2)\Delta t) & C_a((M-3)\Delta t) & \dots & C_a(\Delta t) & C_a(0\Delta t) & 0 \\ C_a((M-1)\Delta t) & C_a((M-2)\Delta t) & \dots & \dots & C_a(\Delta t) & C_a(0\Delta t) \\ C_a((M)\Delta t) & C_a((M-1)\Delta t) & \dots & \dots & C_a(2\Delta t) & C_a(\Delta t) \\ C_a((M+1)\Delta t) & C_a((M)\Delta t) & \dots & \dots & C_a(3\Delta t) & C_a(2\Delta t) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ C_a((N-2)\Delta t) & C_a((N-1)\Delta t) & \dots & \dots & C_a(N-M)\Delta t & C_a(N-M-1)\Delta t \\ C_a((N-1)\Delta t) & C_a(N-2)\Delta t) & \dots & \dots & C_a(N-M+1)\Delta t & C_a(N-M)\Delta t \end{pmatrix} \begin{pmatrix} R(\Delta t) \\ R(2\Delta t) \\ \vdots \\ R((M-1)\Delta t) \\ R(M\Delta t) \end{pmatrix}$$

Les méthodes utilisant les transformées de Fourier sont les plus rapides, mais les plus sensibles au bruit. On peut être amené à utiliser des filtres passes bas adaptatifs (Gobbel and Fike 1994). Il existe des méthodes d'inversion matricielles moins sensibles au bruit telles que la décomposition en valeur singulière (SVD) où il est plus facile de filtrer le bruit sur la matrice diagonale résultante de la décomposition (Miles, Eastwood et al. 2006).

L'optimisation de la méthode faite par Lee *et al.*, consiste à faire une première déconvolution par SVD pour estimer des paramètres préliminaires de l'IRF, puis une technique de déconvolution itérative (succession de modification des paramètres recherché puis de reconvolution et estimation de l'écart quadratique moyen entre la courbe mesurée et la courbe reconstruite), pour retrouver la fonction tissulaire expérimentale (Miles, Eastwood et al. 2006).

Modèle de Patlak (injection lente, étude en steady-state) :

Le modèle de Patlak présenté ici fonctionne dans le cas d'une BHE rompue. Cependant, étant donné qu'on fonctionne en mode steady-state, c'est-à-dire à l'équilibre, on ne peut pas mesurer le phénomène convectif régissant le CBF mais seulement les phénomènes diffusifs et le volume sanguin depuis et vers lequel l'agent de contraste va diffuser dans l'espace interstitiel.

D'après le modèle de Patlak (Patlak and Blasberg 1985), les échanges entre les deux compartiments sont caractérisés par deux constantes de transfert K et k2. Ces constantes correspondent aux temps caractéristiques d'échange entre le compartiment vasculaire et le compartiment extravasculaire extracellulaire (K) et entre le compartiment extravasculaire extracellulaire et le compartiment vasculaire (k2). Les valeurs de K et k2 dépendent directement de la perméabilité surfacique. Dans notre cas on va considérer un k2 nul, ce qui correspond à l'approximation que l'extravasation de l'agent de contraste, domine largement. Ceci est vérifié si la mesure est effectuée lorsque la concentration en agent de contraste intravasculaire est plus importante que la concentration tissulaire. C'est-à-dire qu'on ne prend pas en compte un éventuel retour de l'agent de contraste dans la vascularisation puisque le gradient de concentration n'y est pas favorable. Le modèle de Patlak est basé sur une analyse graphique du modèle compartimentale. Les équations suivantes ne représentent pas les phénomènes physiques mis en jeu mais correspondent à un modèle dont le résultat est proche de ce qu'on peut observer. Dans ce modèle la courbe tissulaire, c'est à dire la concentration en agent de contraste en fonction du temps dans un voxel du tissu est décrit par l'équation suivante :

$$Q(t) = K * \int_0^t C_{capillary}(\tau) * d\tau + V_0 * C_{capillary}(t) \quad \text{Equation 34}$$

t est le temps, Q(t) est la concentration en agent de contraste dans le voxel au temps t. $C_{capillary}$ est la concentration en agent de contraste dans les capillaires au temps t. K est la constante de temps d'échange (en s^{-1}), elle détermine le débit de transfert d'un agent de contraste des vaisseaux au milieu interstitiel. V_0 est le volume de distribution de l'agent de contraste dans les capillaires divisé par le volume totale du voxel (donc le CBV, moyennant la correction de l'hématocrite). Les variables inconnues sont donc K et V_0 . Elles sont obtenues par la régression linéaire de données brutes par l'équation suivante :

$$\frac{Q(t)}{C_{capillary}(t)} = K \frac{\int_0^t C_{capillary}(\tau) d\tau}{C_{capillary}(t)} + V_0 \quad \text{Equation 35}$$

On recherche V_0 et K, et donc les variables d'entrées sont Q(t) et $C_{capillaire}(t)$. Q(t) peut être facilement obtenu vu que c'est ce que l'on mesure directement dans une ROI tissulaire. Par contre pour la mesure de la concentration intracapillaire, dans un voxel lambda elle n'est pas accessible vu qu'on mesure l'ensemble « capillaire, espace extravasculaire extracellulaire et espace cellulaire ». Par contre dans le cas d'une injection lente, à l'équilibre, on peut faire l'hypothèse que la concentration plasmatique est la même dans une artère de référence et dans les capillaires du cerveau. Le temps caractéristique d'injection est considéré strictement supérieur au temps de circulation entre l'artère et la région d'intérêt, et au temps de transit dans la région d'intérêt. On va donc mesurer une entrée artérielle et considérer que $C_a(t) = C_{capillaire}(t)$ moyennant la différence d'hématocrite entre les petits vaisseaux et les gros vaisseaux à cause de l'effet Fåhræus-Lindqvist. On pourrait faire la correction suivante :

$$C_a(t) = \frac{(1-Hct_{capillaire})}{(1-Hct_{artère})} C_{capillaire}(t) \quad \text{Equation 36}$$

Avec $Hct_{capillaire}$ l'hématocrite dans les capillaires (environ 0.3) et $Hct_{artère}$ l'hématocrite dans les artères (environ 0.42) (Bereczki, Wei et al. 1993a; Bereczki, Wei et al. 1993b).

Dans le cas « perfusion limited » ($PS \gg F$), on définit $K = F(1-Hct)$.

Dans le cas « permeability limited » ($PS \ll F$), on définit $K = PS$

Le modèle de Patlak et autres modèles dérivés (Kety et Tofts par exemple), peuvent s'étendre à des cas avec plus de compartiment, et des retours possibles ou non du traceur d'un compartiment vers les capillaires (Patlak, Blasberg et al. 1983; Patlak and Blasberg 1985; Tofts, Brix et al. 1999).

On a par exemple le modèle de Tofts suivant en considérant que les échanges entre le milieu vasculaire et interstitiel se font avec la même constante de temps dans un sens ou dans l'autre :

$$Q(t) = V_0 C_{capillaire}(t) + K \int_0^t C_{capillaire}(\tau) e^{-\frac{K}{v_i}(t-\tau)} d\tau \quad \text{Equation 37}$$

avec v_i la fraction volumique du compartiment interstitiel.

4.5.3 La mesure d'une entrée artérielle, avantage et inconvénient :

La mesure de l'entrée artérielle n'est pas prérequis pour tous les modèles mais l'est pour certains. Elle est nécessaire si l'on souhaite réaliser des mesures quantitatives puisqu'elle permet de comparer les courbes tissulaires par rapport à une référence sur la quantité d'agent de contraste réellement injectée et sur sa dispersion avant d'arriver dans le cerveau. En effet on pourrait estimer une différence volume sanguin entre deux mesures parce que dans un cas, une quantité d'agent de contraste plus faible est arrivé jusqu'au cerveau. De plus si elle arrive de façon plus dispersé, le CBF peut être sous-estimé et le MTT surestimé. L'entrée artérielle permet donc de corriger d'éventuelles modifications dans la façon qu'a l'agent de contraste d'arriver dans la région cérébrale cible.

Cependant mesurer l'entrée artérielle qui alimente toute la région d'intérêt voulue, et seulement cette région d'intérêt est impossible. De plus la mesure de l'entrée artérielle se fait dans une zone relativement éloignée de la région d'intérêt pathologique pour pouvoir trouver une artère suffisamment grosse pour être vue et pour pouvoir réaliser une mesure correcte (avec le moins de volume partiel possible). Une correction de ce volume partiel est pour autant toujours nécessaire. Une méthode de correction pour les mesures par tomographie X est présentée dans le paragraphe suivant.

Il peut également y avoir une dispersion de l'agent de contraste au cours du temps entre l'endroit où est effectuée la mesure artérielle et l'artéριοle alimentant réellement la zone d'intérêt. Cela aurait pour conséquence une surestimation du MTT et une sous-estimation du CBF. Cependant cette dernière source d'erreur peut être négligeable par rapport aux potentielles variations dans l'injection du produit de contraste.

La correction du volume partiel sur la mesure de l'entrée artérielle en tomographie X :

On remarque dans tous les modèles précédemment cités que les mesures de perfusion impliquent les mesures d'une concentration artérielle de référence. Ces artères sont de taille proche ou inférieure à la résolution des appareils d'imagerie médicale. Le signal de l'artère est moyenné avec le tissu environnant et est sous-estimé par rapport à sa valeur réelle: c'est l'effet de volume partiel. L'artère de référence, par laquelle on déconvolue la fonction $Q(t)$ dans le modèle de Johnson et Wilson par exemple, est donc sous-estimé d'un facteur $1/k$ ($k < 1$) à cause de cette effet, et les mesures des paramètres hémodynamiques sont alors erronées. Il est donc nécessaire d'implémenter des méthodes de correction de volume partiel. Une méthode indépendante du système d'imagerie consiste à trouver dans le volume observé, une veine suffisamment grosse pour qu'elle ne soit pas affectée par le volume partiel. De plus le signal dans la veine est moins important que dans l'artère du fait de la dispersion de l'agent de contraste, et est donc ainsi dans une gamme plus favorable au respect de la linéarité du signal par rapport à la concentration que ne l'est l'artère. Si C_a' est la courbe mesurée, alors la courbe "réelle" serait C_a tel que $C_a' = k.C_a$. k est le facteur de volume partiel.

On a alors :

$$C_v(t) = C_a(t) \otimes h(t) = \frac{C_a'(t)}{k} \otimes h(t) = C_a'(t) \otimes \frac{h(t)}{k} \quad \text{Equation 38}$$

La déconvolution de C_v avec C_a' permet alors d'estimer $h(t)/k = h'(t)$.

Hors $\int_0^\infty h(t)dt = 1$ par définition puisque h est une densité de probabilité de temps de transition.

Donc

$$k = \frac{1}{\int_0^\infty h'(t)dt} \quad \text{Equation 39}$$

Le facteur de correction du volume partiel est directement mesuré en déconvoluant l'artère erronée par le volume partiel et une veine suffisamment grosse pour ne pas y être sensible.

4.5.4 Conclusion :

Comme il a été vu il existe de nombreuses méthodes pour estimer les paramètres de perfusion cérébrale. Les méthodes décrites précédemment sont toutes réalisables à la fois par tomographie X et par IRM, seules des conditions et hypothèses de pharmacocinétiques les différencient. Cependant les modalités d'imagerie peuvent aussi conduire à des différences de résultats. Toute méthode de mesure de perfusion requiert la mesure de la concentration exacte d'un agent de contraste en fonction du temps dans une région d'intérêt, avec une bonne résolution temporelle lorsqu'on réalise un suivi de bolus, et une bonne résolution spatiale. Si la

tomodensitométrie répond assez bien à ces critères, la relation entre la concentration en agent de contraste et le signal IRM est très complexe (pas linéaire sur une gamme importante de concentration et dépend de la répartition de l'agent de contraste dans le voxel) et difficilement quantitative. Il est notamment très difficile de mesurer correctement une entrée artérielle en IRM surtout chez le petit animal. Pourtant puisque l'IRM est non invasive et facilement disponible, cette modalité est la plus appropriée pour effectuer un suivi de traitement. Le chapitre suivant consiste en une vérification / calibration des mesures de perfusions IRM grâce aux mesures en tomodensitométrie synchrotron qui est la modalité la plus quantitative disponible. N'ayant pas pu mesurer d'entrée artérielle en IRM, l'analyse portera essentiellement sur le modèle de la variable gamma et sur l'analyse des courbes de perfusion brutes.

- Abbott, N. J., A. A. K. Patabendige, et al. (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." Neurobiology of Disease **37**(1): 13-25.
- Abbott, N. J., L. Ronnback, et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nature Reviews Neuroscience **7**(1): 41-53.
- Abraham, T. and J. Feng (2011). "Evolution of Brain Imaging Instrumentation." Seminars in Nuclear Medicine **41**(3): 202-219.
- Adam, J. F., S. Bayat, et al. (2009). "Quantitative functional imaging and kinetic studies with high-z contrast agents using synchrotron radiation computed tomography." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **36**(1): 95-106.
- Aronen, H. J., I. E. Gazit, et al. (1994). "Cerebral Blood-Volume Maps Of Gliomas - Comparison With Tumor Grade And Histologic-Findings." Radiology **191**(1): 41-51.
- Axel, L. (1980). "Cerebral Blood-Flow Determination By Rapid-Sequence Computed-Tomography - A Theoretical-Analysis." Radiology **137**(3): 679-686.
- Beaumont, M., B. Lemasson, et al. (2009). "Characterization of tumor angiogenesis in rat brain using iron-based vessel size index MRI in combination with gadolinium-based dynamic contrast-enhanced MRI." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **29**(10): 1714-1726.
- Berezki, D., L. Wei, et al. (1993). "Hypoxia increases velocity of blood-flow through parenchymal microvascular systems in rat brain." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **13**(3): 475-486.
- Berezki, D., L. Wei, et al. (1993). "Hypercapnia slightly raises blood volume and sizably elevates flow velocity in brain microvessels." The American journal of physiology **264**(5 Pt 2): H1360-9.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nature Reviews Cancer **3**(6): 401-410.
- Bouchet, A., B. Lemasson, et al. (2010). "Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy on intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **78**(5): 1503-1512.
- Cao, Y. (2011). "The Promise of Dynamic Contrast-Enhanced Imaging in Radiation Therapy." Seminars in Radiation Oncology **21**(2): 147-156.
- Cao, Y., C. I. Tsien, et al. (2006). "Clinical investigation survival prediction in high-grade gliomas by MRI perfusion before and during early stage of RT." International Journal Of Radiation Oncology Biology Physics **64**(3): 876-885.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-57.
- Cha, S. (2009). "Neuroimaging in Neuro-Oncology." Neurotherapeutics **6**(3): 465-477.
- Charles, N. A., E. C. Holland, et al. (2011). "The Brain Tumor Microenvironment." Glia **59**(8): 1169-1180.

- Choyke, P. L. (2005). "Science to practice - Contrast agents for imaging tumor angiogenesis: Is bigger better?" Radiology **235**(1): 1-2.
- Christen, T., B. Lemasson, et al. (2011). "Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation." Nmr in Biomedicine **24**(4): 393-403.
- Crone, C. and N. A. Lassen (1970). Capillary Permeability: The Transfer of Molecules and Ions Between Capillary Blood and Tissue. Copenhagen, Munksgaard Scandinavian University.
- Daube-Witherspoon, M. E., I. G. Zubal, et al. (2003). "Developments in instrumentation for emission computed tomography." Seminars in Nuclear Medicine **33**(1): 28-41.
- De Keyser, F., V. Vandecaveye, et al. (2009). "Dynamic contrast-enhanced and diffusion-weighted MRI for early detection of tumoral changes in single-dose and fractionated radiotherapy: evaluation in a rat rhabdomyosarcoma model." European Radiology **19**(11): 2663-2671.
- de Lussanet, Q. G., S. Langereis, et al. (2005). "Dynamic contrast-enhanced MR imaging kinetic parameters and molecular weight of dendritic contrast agents in tumor angiogenesis in mice." Radiology **235**(1): 65-72.
- Dhermain, F. G., P. Hau, et al. (2010). "Advanced MRI and PET imaging for assessment of treatment response in patients with gliomas." Lancet Neurology **9**(9): 906-920.
- Di Nallo, A. M., A. Vidiri, et al. (2009). "Quantitative analysis of CT-perfusion parameters in the evaluation of brain gliomas and metastases." Journal of Experimental & Clinical Cancer Research **28**: 10.
- Dilmanian, F. A. (1992). "Computed tomography with monochromatic x rays." American journal of physiologic imaging **7**(3-4): 175-93.
- Dilmanian, F. A., X. Y. Wu, et al. (1997). "Single- and dual-energy CT with monochromatic synchrotron x-rays." Physics in Medicine and Biology **42**(2): 371-387.
- Donahue, K. M., R. M. Weisskoff, et al. (1997). "Water diffusion and exchange as they influence contrast enhancement." Jmri-Journal of Magnetic Resonance Imaging **7**(1): 102-110.
- Duda, D. G., T. T. Batchelor, et al. (2007). "VEGF-targeted cancer therapy strategies: current progress, hurdles and future prospects." Trends in Molecular Medicine **13**(6): 223-230.
- Eastwood, J. D. and J. M. Provenzale (2003). "Cerebral blood flow, blood volume, and vascular permeability of cerebral glioma assessed with dynamic CT perfusion imaging." Neuroradiology **45**(6): 373-376.
- Elleau, H., A. M. Charvet, et al. (1999). "Instrumentation of the ESRF medical imaging facility." Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section A-Accelerators Spectrometers Detectors And Associated Equipment **428**(2-3): 513-527.
- Elleau, H., A. M. Charvet, et al. (2002). "Performance of computed tomography for contrast agent concentration measurements with monochromatic x-ray beams: comparison of K-edge versus temporal subtraction." Physics in Medicine and Biology **47**(18): 3369-3385.
- Ellegala, D. B., H. L. Poi, et al. (2003). "Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta(3)." Circulation **108**(3): 336-341.
- Fahraeus, R. (1929). "The suspension stability of the blood." Physiological Reviews **9**(2): 241-274.
- Fahraeus, R. and T. Lindqvist (1931). "The viscosity of the blood in narrow capillary tubes." American Journal of Physiology **96**(3): 562-568.
- Figarella Branger, D., C. Colin, et al. (2010). "Glioblastomas: Gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment." Neurochirurgie **56**(6): 441-448.
- Flohr, T. G., S. Schaller, et al. (2005). "Multi-detector row CT systems and image-reconstruction techniques." Radiology **235**(3): 756-773.

- Gobbel, G. T. and J. R. Fike (1994). "A Deconvolution Method For Evaluating Indicator-Dilution Curves." Physics In Medicine And Biology **39**(11): 1833-1854.
- Goh, V. and S. Halligan (2008). "CT perfusion imaging: Know its assumptions and limitations - Response." Radiology **246**(2): 650-650.
- Goh, V., S. Halligan, et al. (2007). "Quantitative tumor perfusion assessment with multidetector CT: Are measurements from two commercial software packages interchangeable?" Radiology **242**(3): 777-782.
- Haacke, E., R. Brown, et al. (1999). Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design, John Wiley & Sons.
- Hamilton, W. F., J. W. Moore, et al. (1928). "Simultaneous determination of the pulmonary and systemic circulation times in man and of a figure related to the cardiac output." American Journal of Physiology **84**(2): 338-344.
- Hirata, M., K. Murase, et al. (2005). "A method for reducing radiation dose in cerebral CT perfusion study with variable scan schedule." Radiat Med **23**(3): 162-9.
- Hirata, M., Y. Sugawara, et al. (2005). "Measurement of radiation dose in cerebral CT perfusion study." Radiat Med **23**(2): 97-103.
- Huber, J. D., R. D. Egleton, et al. (2001). "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier." Trends in Neurosciences **24**(12): 719-725.
- Jain, R., S. K. Ellika, et al. (2008). "Quantitative estimation of permeability surface-area product in astroglial brain tumors using perfusion CT and correlation with histopathologic grade." American Journal Of Neuroradiology **29**(4): 694-700.
- Jain, R. K., E. Di Tomaso, et al. (2007). "Angiogenesis in brain tumours." Nature Reviews Neuroscience **8**(8): 610-622.
- Johnson, J. A. and T. A. Wilson (1966). "A model for capillary exchange." Am J Physiol **210**(6): 1299-303.
- Kamm, R. D. (2002). "Cellular fluid mechanics." Annual Review of Fluid Mechanics **34**: 211-232.
- Kershaw, L. E. and D. L. Buckley (2006). "Precision in measurements of perfusion and microvascular permeability with T-1-weighted dynamic contrast-enhanced MRI." Magnetic Resonance In Medicine **56**(5): 986-992.
- Klotz, E. and M. Konig (1999). "Perfusion measurements of the brain: using dynamic CT for the quantitative assessment of cerebral ischemia in acute stroke." European Journal Of Radiology **30**(3): 170-184.
- Krause, W. (1999). "Delivery of diagnostic agents in computed tomography." Advanced Drug Delivery Reviews **37**(1-3): 159-173.
- Lee, R., R. T. F. Cheung, et al. (2004). "Use of CT perfusion to differentiate between brain tumour and cerebral infarction." Cerebrovascular Diseases **18**(1): 77-83.
- Lee, T., X. A. Zhang, et al. (2010). "In Vivo Imaging with a Cell-Permeable Porphyrin-Based MRI Contrast Agent." Chemistry & Biology **17**(6): 665-673.
- Lee, T. Y., T. G. Purdie, et al. (2003). "CT imaging of angiogenesis." Quarterly Journal Of Nuclear Medicine **47**(3): 171-187.
- Miles K.A., Charnsangavej C., et al. (2007). Multi-Detector Computed Tomography in Oncology: CT Perfusion Imaging. U.K., Informa Healthcare.
- Miles, K. A. (1999). "Tumour angiogenesis and its relation to contrast enhancement on computed tomography: a review." European Journal of Radiology **30**(3): 198-205.
- Miles, K. A. (2004). "Brain perfusion: computed tomography applications." Neuroradiology **46**: S194-S200.
- Miles, K. A. (2006). "Perfusion imaging with computed tomography: brain and beyond." Eur Radiol **16 Suppl 7**: M37-43.
- Murase, K., T. Nanjo, et al. (2005). "Effect of x-ray tube current on the accuracy of cerebral perfusion parameters obtained by CT perfusion studies." Physics In Medicine And Biology **50**(21): 5019-5029.

- Pannetier, N., B. Lemasson, et al. (2011). "Vessel size index measurements in a rat model of glioma: comparison of the dynamic (Gd) and steady-state (iron-oxide) susceptibility contrast MRI approaches." NMR Biomed.
- Patlak, C. S. and R. G. Blasberg (1985). "Graphical Evaluation Of Blood-To-Brain Transfer Constants From Multiple-Time Uptake Data - Generalizations." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism **5**(4): 584-590.
- Patlak, C. S., R. G. Blasberg, et al. (1983). "Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **3**(1): 1-7.
- Pawlik, G., A. Rackl, et al. (1981). "Quantitative capillary topography and blood-flow in the cerebral-cortex of cats - an in vivo microscopic study." Brain Research **208**(1): 35-58.
- Pries, A. R., D. Neuhaus, et al. (1992). "Blood-viscosity in tube flow - Dependence on diameter and hematocrit." American Journal of Physiology **263**(6): H1770-H1778.
- Risser, L., F. Plouraboue, et al. (2007). "From homogeneous to fractal normal and tumorous microvascular networks in the brain." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism **27**(2): 293-303.
- Ritman, E. L. (2004). "Micro-computed tomography-current status and developments." Annual review of biomedical engineering **6**: 185-208.
- Ritman, E. L. (2011). "Current Status of Developments and Applications of Micro-CT." Annual review of biomedical engineering **13**: 531-52.
- Riviere, J. E. (2011). Comparative pharmacokinetics, John Wiley & Sons.
- Roberts, H. C., T. P. Roberts, et al. (2000). "Quantitative measurement of microvascular permeability in human brain tumors achieved using dynamic contrast-enhanced MR imaging: correlation with histologic grade." AJNR Am J Neuroradiol **21**(5): 891-9.
- Serduc, R., T. Christen, et al. (2008). "Brain tumor vessel response to synchrotron microbeam radiation therapy: a short-term in vivo study." Physics in Medicine and Biology **53**(13): 3609-3622.
- Silvennoinen, H. M., L. M. Hamberg, et al. (2006). Increasing contrast agent concentration improves enhancement in first-pass CT perfusion. 92nd Scientific Assembly and Annual Meeting of the Radiological-Society-of-North-America, Chicago, IL, Amer Soc Neuroradiology.
- St Lawrence, K. S. and T. Y. Lee (1998). "An adiabatic approximation to the tissue homogeneity model for water exchange in the brain: I. Theoretical derivation." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism **18**(12): 1365-1377.
- Suhonen, H., L. Porra, et al. (2008). "Simultaneous in vivo synchrotron radiation computed tomography of regional ventilation and blood volume in rabbit lung using combined K-edge and temporal subtraction." Physics in Medicine and Biology **53**(3): 775-791.
- Tajima, A., H. Nakata, et al. (1992). "Differences and similarities in albumin and red-blood-cell flows through cerebral microvessels." American Journal of Physiology **262**(5): H1515-H1524.
- Takasawa, M., P. S. Jones, et al. (2008). "How reliable is perfusion MR in acute stroke? Validation and determination of the penumbra threshold against quantitative PET." Stroke **39**(3): 870-877.
- Taschereau, R., R. W. Silverman, et al. (2010). "Dual-energy attenuation coefficient decomposition with differential filtration and application to a microCT scanner." Physics in Medicine and Biology **55**(4): 1141-1155.
- Tate, M. C. and M. K. Aghi (2009). "Biology of Angiogenesis and Invasion in Glioma." Neurotherapeutics **6**(3): 447-457.
- Teorell, T. (1937a). "Kinetics of distribution of substances administered to the body I The extravascular modes of administration." Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie **57**: 205-225.

- Teorell, T. (1937b). "Kinetics of distribution of substances administered to the body II The intravascular modes of administration." Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie **57**: 226-240.
- Thompson, H. K., R. E. Whalen, et al. (1964). "Indicator Transit Time Considered As Gamma Variate." Circulation Research **14**(6): 502-&.
- Tofts, P. S., G. Brix, et al. (1999). "Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusable tracer: standardized quantities and symbols." J Magn Reson Imaging **10**(3): 223-32.
- Vicenzini, E., R. Delfini, et al. (2008). "Semiquantitative human cerebral perfusion assessment with ultrasound in brain space-occupying lesions - Preliminary data." Journal of Ultrasound in Medicine **27**(5): 685-692.
- Voglein, J., J. Tuttonberg, et al. (2011). "Treatment Monitoring in Gliomas Comparison of Dynamic Susceptibility-Weighted Contrast-Enhanced and Spectroscopic MRI Techniques for Identifying Treatment Failure." Investigative Radiology **46**(6): 390-400.
- Winkler, P. (1998). "Advances in paediatric CNS ultrasound." European Journal of Radiology **26**(2): 109-120.
- Wintermark, M., R. Chioloro, et al. (2004). "Relationship between brain perfusion computed tomography variables and cerebral perfusion pressure in severe head trauma patients." Critical Care Medicine **32**(7): 1579-1587.
- Wintermark, M., G. van Melle, et al. (2004). "Admission perfusion CT: Prognostic value in patients with severe head trauma." Radiology **232**(1): 211-220.
- Zanzonico, P. (2004). "Positron emission tomography: A review of basic principles, scanner design and performance, and current systems." Seminars in Nuclear Medicine **34**(2): 87-111.
- Zhao, J. B., H. Salmon, et al. (2007). "Effect of heterogeneous vasculature on interstitial transport within a solid tumor." Microvascular Research **73**(3): 224-236.

5. L'aspect quantitatif des mesures de perfusion pour un suivi de traitement :

Comme il a été vu dans le chapitre précédent, de nombreux modèles hémodynamiques permettent de remonter aux différents paramètres de perfusion à partir du suivi temporel d'un agent de contraste injecté systémiquement. Il y a de même de nombreux moyens d'acquisition tel que l'IRM, la tomographie X, le TEP, les ultrasons, et même depuis quelques temps sont développées des techniques de spectrométrie proche infrarouge tel que le NIRS (Near-InfraRed Spectroscopy) (Pollard and Prough 1996; Pollard, Prough et al. 1996). Parmi toutes ces techniques, deux sont prédominantes cliniquement du fait de leur disponibilité et de la possibilité de les coupler à des examens de routine. Il s'agit de la tomodensitométrie par rayon X et de l'IRM. Comme il a été vu, le scanner est plus quantitatif que l'IRM mais le patient reçoit une dose de rayonnement ionisant non négligeable. Ce chapitre présente une étude dont le but a été d'établir un jeu de données permettant la comparaison de ces deux méthodes d'acquisition pour la perfusion. En ce qui concerne la tomographie X, la tomographie monochromatique par rayonnement synchrotron a été utilisée afin d'avoir les données les plus quantitatives possibles (Adam, Elleaume et al. 2003b; Adam, Nemoz et al. 2005). Et en ce qui concerne l'IRM, des séquences spirales ont été utilisées parce qu'elles représentent elles aussi les séquences les plus quantitatives disponibles dans leur modalité. Elles ont été développées à l'institut des neurosciences de grenoble. On peut citer entre autres Marine Beaumont (Beaumont 2007; Beaumont, Lamalle et al. 2007) et notamment Nicolas Pannetier (Pannetier 2010). Le but de cette expérience est de « calibrer », les séquences de perfusion IRM de façon à pouvoir utiliser cette méthode d'imagerie non nocive pour le patient dans le cadre d'un suivi de traitement où il est nécessaire d'avoir des valeurs quantitatives pour faire les comparaisons entre les différents temps.

5.1 Matériel et Méthodes :

5.1.1 Protocole animal :

1000 cellules de tumeurs F98 ont été implantées sur des rats Fisher suivant le protocole présenté au chapitre 3, sans agarose. L'imagerie IRM et Synchrotron ont eu lieu le même jour sur les animaux, 19 jours après leur implantation afin que l'angiogénèse tumorale soit suffisamment importante pour pouvoir à coup sûr réaliser des mesures de perfusion. Afin d'avoir des courbes témoins des rats sains sont conservés.

Un cathéter est placé dans la jugulaire afin d'avoir des courbes de perfusion le plus reproductible possible (moins sensible à la coagulation que lors d'une cathétérisation dans la veine de la queue) et afin que le passage de l'agent de contraste dans le cerveau soit le plus précis possible (concentration plus élevée, dispersion de l'agent de contraste dans le sang plus faible). De plus, dans le cas de la tomographie synchrotron, le rat doit être placé à la verticale. Dans ces conditions il a été vu que lorsqu'un agent de contraste est injecté par la veine de la queue, la circulation de celui-ci est très différente de sa circulation lorsque l'animal est en position couchée. Ce problème n'apparaît plus lorsque que l'on injecte directement dans la jugulaire du rat, et donc presque en intracardiaque.

Le cathéter est laissé à demeure entre l'imagerie IRM et synchrotron. En effet la cathétérisation en jugulaire nécessite la ligature de celle-ci. Il n'est donc pas possible d'en réaliser deux sans modifier la circulation sanguine. Pour laisser le cathéter à demeure, celui-ci, une fois la première séquence d'imagerie réalisée, est séparé du prolongateur permettant de le relier au pousse seringue Harvard Apparatus réalisant l'injection, bouché, puis laissé en sous-cutané. Pour le réutiliser il suffit donc de redécoudre la peau de l'animal au niveau du cou et de reconnecter le cathéter avec le prolongateur.

Pendant les imageries, l'animal est anesthésié avec un mélange kéthamine/xylasine injecté en *ip*. Ce mélange est vasoconstricteur et donc diminue potentiellement la valeur du volume sanguin. L'isofluorane utilisé classiquement sur la plateforme IRM n'est pas vasoconstricteur mais implique un apport en gaz (isofluorane 2 % + air) pendant toute la durée de l'acquisition. L'animal étant en rotation continue pendant plusieurs minutes lors d'acquisition synchrotron, l'apport (et l'extraction) du gaz nécessite un connecteur deux gaz rotatif qui n'était pas encore disponible au moment des expériences. Le mélange kéthamine/xylasine a donc été préféré. L'aspect vasoconstricteur n'est pas un inconvénient majeur du moment qu'on utilise le même produit et les mêmes dosages dans les deux acquisitions, IRM et synchrotron.

Pour les deux modalités d'acquisition, deux injections ont été réalisées. La première est une injection lente en mode steady-state afin d'avoir un jeu de données permettant de mesurer le volume sanguin et la perméabilité (modèle de Patlak par exemple). D'après la littérature ce mode d'injection serait le plus approprié pour ces paramètres. La deuxième injection est réalisée rapidement (en mode suivi de bolus) afin de pouvoir mesurer tous les paramètres sanguins suivant le modèle pharmacocinétique utilisé. Cette deuxième injection est en fait réalisée à la suite de la première, donc la tumeur est « pré chargée » en agent de contraste, limitant ainsi grandement l'extravasation de celui-ci au niveau de la tumeur. Cela rend donc possible l'analyse du suivi de bolus par des modèles faisant l'hypothèse d'une barrière hémato encéphalique intacte comme celui de l'ajustement par une variable gamma qui a été utilisé. Un logiciel permettant l'analyse des acquisitions de perfusion par IRM et par tomographie X a été développé par l'équipe 5 et moi même. Une attention particulière a été donnée pour que les méthodes de calcul soient identiques entre les données provenant de l'IRM et celles provenant de la tomographie X (scanner ou synchrotron). Ceci afin que les différences de résultats soient uniquement dues au type d'acquisition et non à l'implémentation du traitement du modèle pharmacocinétique. Dans ce chapitre seul les données provenant de la deuxième acquisition seront analysés.

Les injections ont été réalisées avec les paramètres suivants :

- -injection lente : 0.3 ml en 40 secondes, 20 min d'acquisition
- 20 min après :
- -injection rapide: 0.1 ml/100g à 1.5 ml/s

Le volume et le débit d'injection ont été choisis identiques pour les deux modalités d'acquisition afin de limiter l'influence de ces deux facteurs sur les résultats. Pour la tomodensitométrie l'agent de contraste qui a été utilisé est de l'Iomeron® 400 ([I] = 400 mg/ml et pour l'IRM du Dotarem® dilué pour atteindre une concentration en gadolinium de 37.5 mg/ml.

5.1.2 Mesures de perfusion en tomographie par rayonnement synchrotron :

L'énergie du faisceau monochromatique est choisie à 33.9 keV, juste au-dessus du seuil K de l'iode (33.17 keV), afin d'avoir le meilleur contraste possible entre l'iode et le tissu cérébral. L'utilisation de ce type de faisceau au lieu d'une association de deux faisceaux, un juste au-dessus du seuil K et un juste en dessous (description de la technique chapitre 4), est plus intéressante dans le cas d'acquisition temporelle. Comme décrit par Elleaume *et al.*, de meilleurs résultats sont obtenus avec une soustraction temporelle qu'avec une soustraction autour du K-Edge (Elleaume, Charvet et al. 2000). Une soustraction temporelle est donc effectuée entre les acquisitions au temps t et la moyenne des 4 premières acquisitions (avant apparition de l'agent de contraste). Elle est effectuée directement sur les sinogrammes, avant d'appliquer la rétroprojection filtrée. Une fois ces sinogrammes obtenus, les images spatiales sont obtenus par l'algorithme de rétroprojection filtrée SNARK89 (Medical Image Processing Group, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, Etats Unis) (Herman, Lewitt et al. 1989). La reconstruction donne directement les cartes des coefficients d'atténuations linéiques quantitatifs. Pour avoir la concentration en iode il suffit donc de diviser ces coefficients par le coefficient d'atténuation massique de l'iode à l'énergie d'acquisition. L'agent de contraste utilisé est l'Iomeron[®] à 400 mg/ml d'iode. Donc en temps normal la relation utilisée est :

$$[I] = \frac{\mu_{tissu}(E) - \mu_{eau}(E)}{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_I(E)} \quad \text{Equation 40}$$

Avec $[I]$ la concentration en iode du tissu en mg/ml, μ_i le coefficient d'atténuation linéique de du composé i , et μ/ρ le coefficient d'atténuation massique, E étant l'énergie des photons incidents. Le tissu cérébral est ici assimilé à de l'eau (il est donc fait l'hypothèse que le coefficient linéique d'atténuation du tissu et de l'eau sont proches et que la concentration en iode dans le tissu reste suffisamment faible pour modifier de façon négligeable le coefficient linéique d'atténuation de l'eau).

Dans notre cas, la soustraction est réalisé directement sur les sinogrammes entre $\mu_{tissu}(E)$ et $\mu_{tissu}(E)_{\text{temps_court}}$ avant apparition de l'agent de contraste. On a donc :

$$[I] = \frac{\Delta\mu(E)}{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_I(E)} \quad \text{Equation 41}$$

L'imagerie tomographique en synchrotron est réalisée de la façon suivante :

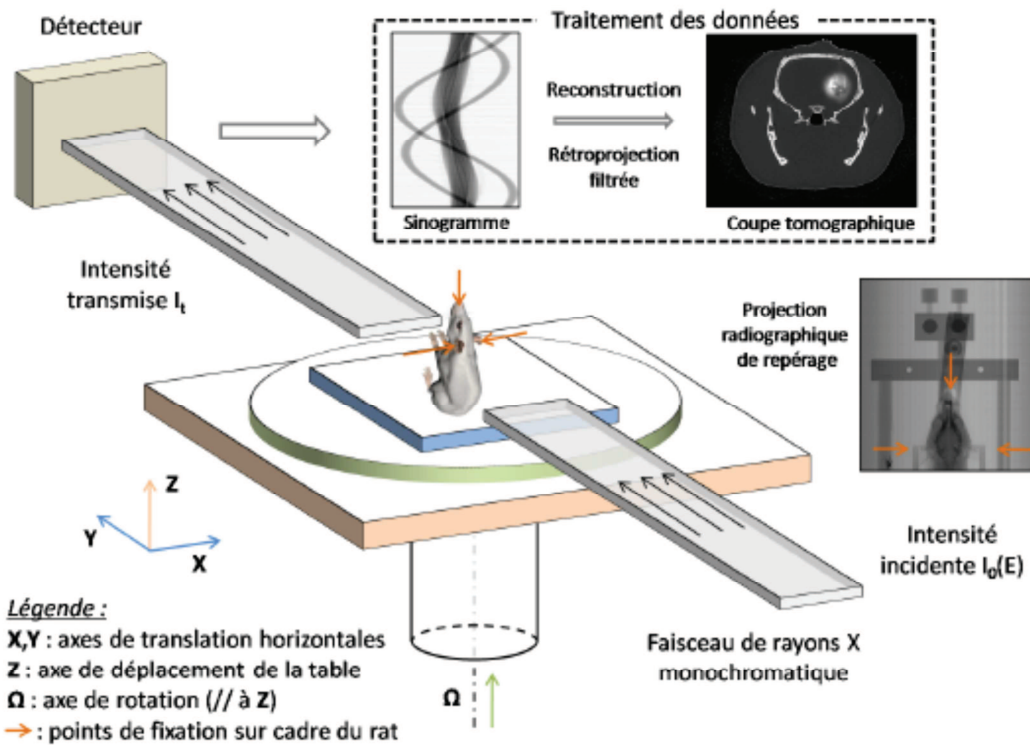


Figure 78: Setup d'imagerie : le rat tourne sur lui-même afin d'avoir toutes les projections nécessaires à la tomographie. Figure d'après la thèse de Sébastien Besse (Besse 2010).

Le moteur actuel réalisant la rotation de l'échantillon sur lui-même afin d'avoir la projection aux différents angles pour constituer le sinogramme ne permet de tourner qu'à 180 degrés par seconde, soit un tour en 2s. Cette vitesse de rotation définit le temps d'acquisition d'une image. On peut reconstruire les images soit en ne prenant les données que sur 180 degrés, et en les reproduisant inversées sur les 180 autres degrés vu que le sinogramme est censé être symétrique. Ou on peut aussi reconstruire les images en prenant bien les informations obtenues sur 360 degrés. On obtient donc dans ces cas là une résolution temporelle respectivement de 1 s^{-1} et de 0.5 s^{-1} . Ces résolutions temporelles sont trop faibles pour réaliser un suivi de bolus. S'il n'est pas possible d'améliorer cette résolution temporelle puisqu'elle est directement liée à la vitesse de rotation de l'échantillon, il est par contre possible de réaliser un sur échantillonnage permettant de reconstruire des images acquises en une ou deux secondes (respectivement 180 et 360 degrés), mais espacées temporellement d'un pas de temps inférieur. C'est ce que représente la figure 79. Sur cette figure, une image est reconstruite tous les 45 degrés, soit toutes les 0.25 secondes. C'est un moyen artificiel d'augmenter la « résolution temporelle » par interpolation qui a été utilisé pour traiter les données synchrotron correspondant au suivi de bolus.

Les images synchrotron sont acquises de manière continue sur une coupe de 1 mm d'épaisseur et de $350 \times 350 \mu\text{m}^2$ de résolution, une image toutes les 2 secondes, pendant 1 min 40 s. Elles sont centrées sur le trou de la boîte crânienne préalablement réalisé afin de pouvoir implanter la tumeur. Ce trou marque le centre de la tumeur suivant l'axe tête-pied.

Différentes ROIs sont réalisées sur les une image de prise de contraste moyen obtenu en faisant la moyenne temporelle des images acquises lors du passage du bolus : cerveau entier, artère, veine, muscle. La tumeur et la zone controlatérale sont également tracées lorsqu'il y a une présence de la tumeur. Un exemple d'image moyenne et des ROIs tracées sont représentés figure 80.

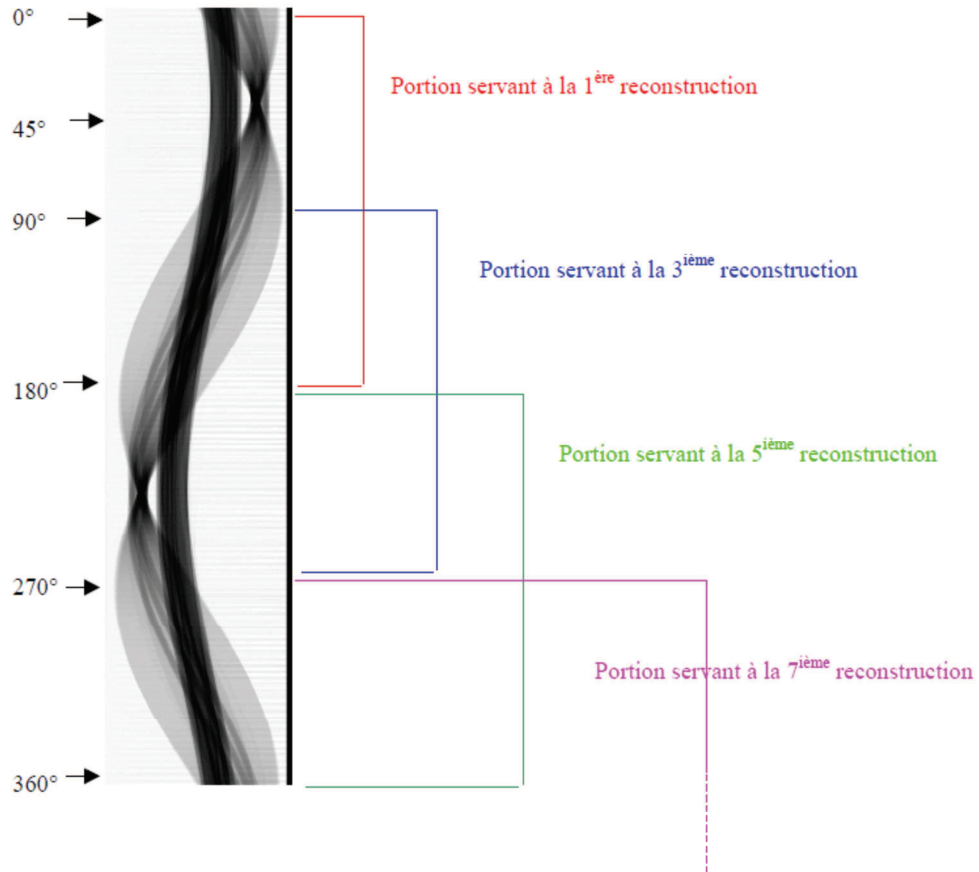


Figure 79 : Figure provenant de la thèse de Adam Jean-François. Sur échantillonnage des sinogrammes permettant d'avoir un pas temporel entre les images, inférieur à la durée d'acquisition des images. On obtient ainsi un pas temporel de 0.25 seconde dans nos conditions d'utilisation.

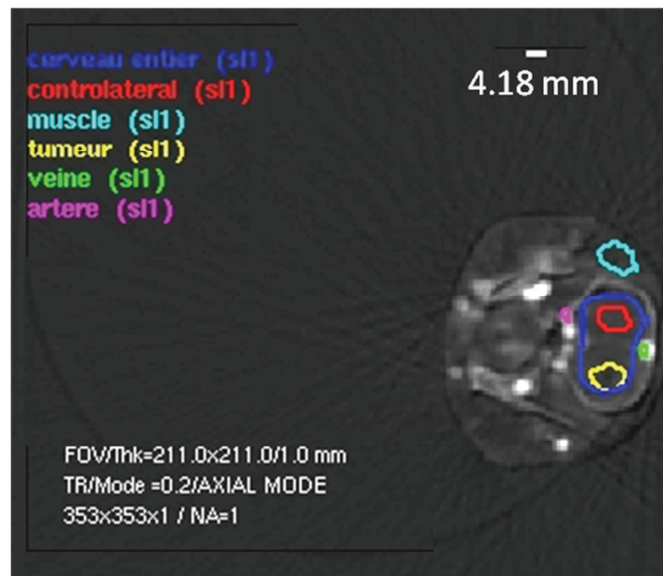


Figure 80 : Exemple d'images synchrotrons obtenues. Les ROI sont réalisées sur le logiciel permettant le traitement de données (μ vasc). Elles sont réalisées sur une image moyenne temporelle de toutes les images du passage du bolus.

5.1.3 Mesures de perfusion en IRM :

Comme il a été vu dans le chapitre 4, les modèles de pharmacocinétique ont tous un point commun : ils nécessitent en entrée des courbes d'évolution de la concentration en agent de contraste en fonction du temps. En IRM, la variation de signal mesurée n'est pas proportionnelle à la concentration en agent de contraste (Pannetier 2010; Pannetier, Lemasson et al. 2011). De nombreuses approximations sont couramment utilisées pour relier le signal à la concentration en agent de contraste. En suivi de bolus, les variations du signal IRM proviennent notamment de la variation de susceptibilité magnétique due à la présence de l'agent de contraste. La formation du signal IRM et son lien avec la concentration en agent de contraste est très complexe, et est décrite par Nicolas Pannetier (Pannetier 2010). Il n'est pas possible dans cette section d'expliquer tous les phénomènes en jeu influençant le signal RMN ni les différentes façons de le corriger. Cette section reprend rapidement les étapes qui amènent à l'estimation de la concentration d'un agent de contraste lors d'une acquisition en suivi de bolus, et décrit brièvement la séquence d'imagerie utilisée. La partie IRM de cette étude a été faite en collaboration avec Nicolas Pannetier.

La méthode de perfusion en suivi de bolus la plus couramment utilisée en IRM est le DSC (pour Dynamic Susceptibility Contrast). Elle permet d'allier une résolution spatiale suffisante pour différencier les zones tumorales et les artères (nécessaire pour réaliser une mesure d'entrée artérielle) et une résolution temporelle inférieure à la seconde (au moins 0.5s). Cette technique réside dans l'estimation de la variation de la vitesse de relaxation transversale durant le passage du bolus. Elle est obtenue à partir du suivi du signal IRM en écho de gradient (GE) suivant l'équation 42 :

$$\Delta R_2^{GE} = -\frac{1}{T_E^{GE}} * \ln\left(\frac{S^{GE}(t)}{S^{GE}(0)}\right) \quad \text{Equation 42}$$

Avec $S^{GE}(i)$ le signal IRM au temps i , T_E^{GE} le temps d'écho de gradient et ΔR_2^{GE} la vitesse de relaxation transversale. Cette équation provient du caractère monoexponentiel décroissant du signal IRM en fonction du temps. Elle reste valable tant que la variation de la vitesse de relaxation longitudinale du voxel induite par l'agent de contraste reste négligeable (fraction de volume sanguin faible, pas d'extrasation de l'agent de contraste).

La relation permettant de relier la concentration d'un agent de contraste à la vitesse de relaxation transversale est la suivante :

$$\Delta R_2 = r_2 * [CA] \quad \text{Equation 43}$$

Avec r_2 la relaxivité de l'agent de contraste à une température donnée, dans un environnement donné et un champ magnétique donné. En réalité, cette relation n'est exacte que pour une certaine gamme de concentration (assez faible) de l'agent de contraste. Les variations de vitesses de relaxation dépendent en plus de la concentration en agent de contraste, de la composition vasculaire du voxel et du régime de diffusion comme le rapportent différentes études (Kiselev 2001; Kiselev, Strecker et al. 2005).

C'est l'estimation exacte de ΔR_2^{GE} qui est le point critique de la mesure de perfusion en suivi de bolus par IRM. Cette variation peut être mesurée par différentes séquences d'IRM. La technique de mesure la plus classiquement utilisée est la séquence EPI (Echo Planar Imaging)(Mansfield 1977). Elle utilise un unique écho de gradient. Cette approche permet d'estimer le ΔR_2^{GE} à partir d'un seul temps d'écho en utilisant l'équation 42 mais est biaisée par la variation de la vitesse de relaxation longitudinale, en cas d'extrasation notamment. Afin de pouvoir séparer l'influence de ces deux paramètres, il est intéressant de mesurer le signal à plusieurs temps d'écho de gradient (Barbier, den Boer et al. 1999). Cela peut être réalisé à partir de séquence EPI. Ce type de séquence ne permet pas

cependant de réaliser une mesure à des temps d'écho court. Un autre type de séquence a été développé depuis les années 1986, il s'agit des séquences dites spirales (Ahn, Kim et al. 1986). Ces séquences sont appelées ainsi parce qu'elles parcourent l'espace-k non plus en ligne droite comme les EPI classiques mais en spirale (figure 81). Tout comme les EPI, il est possible de parcourir l'espace k en entrelaçant des acquisitions tel que le montre la figure 82. Cette méthode ne permet pas l'acquisition des fréquences aux extrémités de l'espace K, c'est-à-dire les hautes fréquences spatiales. Cependant l'information est principalement située dans le centre de l'espace k. Il n'y a donc quasiment pas de différence de qualité d'image lorsque les hautes fréquences sont acquises ou non (Beaumont 2007).

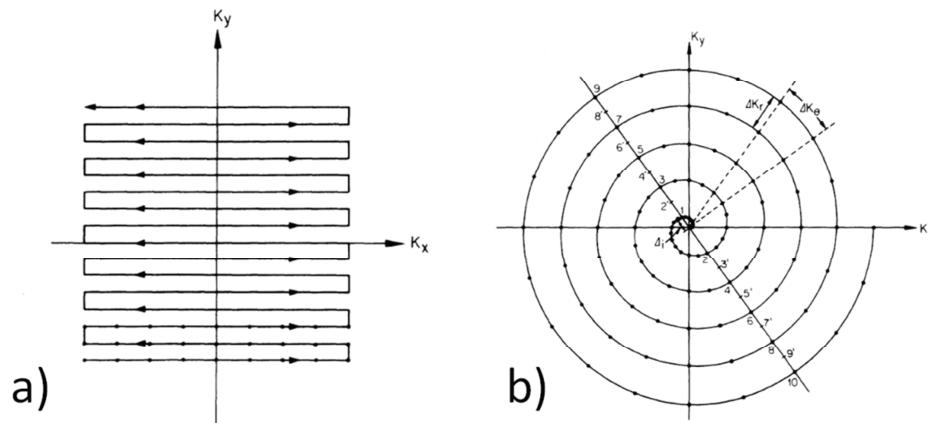


Figure 81 : Balayage de l'espace k dans le cas d'une séquence a) EPI et b) Spirale. Figure d'après Ahn et al. (Ahn, Kim et al. 1986).

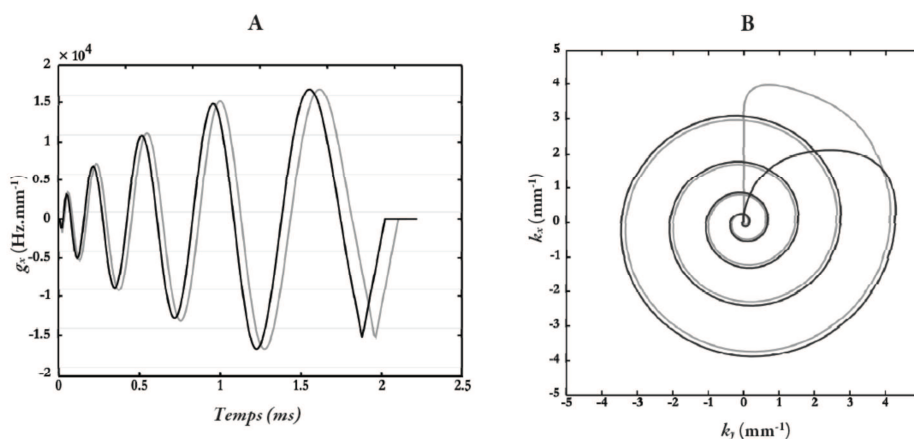


Figure 82 : Entrelacement de séquence spiral afin de parcourir plus rapidement l'ensemble de l'espace k. a) représentation du signal en fonction du temps, b) représentation dans l'espace k. Figure d'après la thèse de Nicolas Pannetier (Pannetier 2010).

De part leur géométrie circulaire, les séquences spirales permettent d'avoir une résolution spatiale identique dans toutes les directions. Elles permettent de plus de faire des acquisitions à des temps d'échos très courts (intéressant pour obtenir la meilleure estimation de la vitesse de relaxation transversale) et elles permettent de maximiser le nombre d'échos de gradient mesurable après l'impulsion RadioFréquence (du fait de l'utilisation symétrique des gradients d'imagerie). Ceci permet de réaliser un ajustement sur la décroissance exponentielle du signal et d'obtenir une valeur quantitative de R_2^{GE} à chaque temps d'acquisition. La sensibilité à la relaxation longitudinale est ainsi nulle, et l'approche DSC peut être utilisée dans des cas où l'agent de contraste s'extravase.

Les différents avantages et difficultés des séquences spirales sont décrits dans de nombreuses études dans la littérature (Block and Frahm 2005; Beaumont, Lamalle et al. 2007; Delattre, Heidemann et al. 2010; Pannetier 2010; Pannetier, Lemasson et al. 2011). L'intérêt dans notre cas est de pouvoir effectuer des acquisitions précises de ΔR_2^{GE} en terme quantitatif avec une meilleur résolution temporelle et spatiale que le permettent les séquences EPI. Différentes études comparent l'utilisation des séquences spirales et EPI (Meyer, Hu et al. 1992; Klarhofer, Barth et al. 2002; Pannetier, Lemasson et al. 2011).

Une comparaison de la mesure du paramètre ΔR_2^{GE} entre les séquences conventionnelles EPI et les séquences spirales a notamment été réalisée par Pannetier *et al.* (Pannetier, Lemasson et al. 2011). A partir de cette comparaison, il en déduit l'influence de la vitesse de relaxation longitudinale R_1 sur la mesure de ΔR_2^{GE} . Ses résultats sont présentés sur la figure suivante (figure 83).

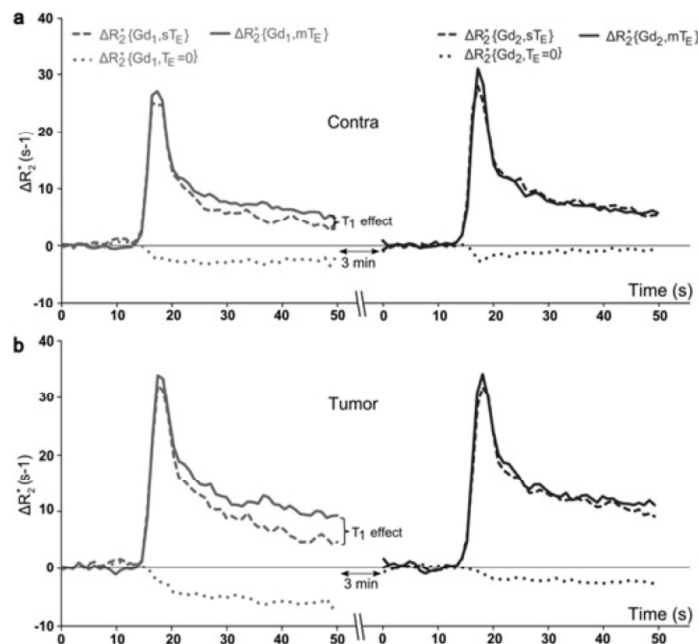


Figure 83 : Estimation du ΔR_2^{GE} en fonction du temps lors de l'injection d'agent de contraste à base de gadolinium (Dotarem®) dans a) le tissu controlatérale et b) la tumeur. A gauche il y a une première injection, à droite une deuxième injection (donc lorsqu'il n'y a pas d'extravasation d'agent de contraste parce qu'il y a une pré charge). En trait plein il s'agit du ΔR_2^{GE} estimé avec les séquences spirales, en trait pointillé le ΔR_2^{GE} estimé avec les séquences EPI et en pointillé, le ΔR_2^{GE} estimé au temps d'écho $TE = 0$, donc l'effet T_1 . Figure d'après Pannetier *et al.* (Pannetier, Lemasson et al. 2011)

Lors de la première injection, la différence entre les deux séquences est importante au niveau du pic, et au niveau de la décroissance du signal, notamment dans la région tumorale. Lors de la deuxième injection, la différence au niveau du pic est encore présente bien qu'atténuée, mais au niveau de la décroissance du signal, la différence est beaucoup plus faible que lors de la première injection. L'effet de la vitesse de la relaxation R_1 est donc observable dans le tissu tumoral et sain et valide l'intérêt de la mesure spirale pour le suivi de bolus.

L'agent de contraste injecté en intrajugulaire est du Dotarem® dilué de façon à divisé la concentration en gadolinium par 2, donc à une concentration en gadolinium de $[Gd] = 37.5$ mg/ml. Ce choix a été fait afin de pouvoir utiliser les mêmes volumes d'injection entre les acquisitions synchrotron et IRM. La quantité d'agent de contraste nécessaire en acquisition synchrotron pour avoir des courbes d'évolutions d'agent de contraste en fonction du temps suffisamment non bruité pour effectuer un ajustement par une variable gamma est significativement supérieur à la quantité

d'agent de contraste classiquement utilisée pour les acquisitions IRM. Il est nécessaire, à volume constant, de diminuer la concentration de l'agent de contraste IRM (0.1 ml/100g à 1.5 ml/s d'agent de contraste iodé 400 mg/ml ou à base de gadolinium à 37.5 mg/ml). On peut ainsi être dans une gamme de concentration où la relation linéaire de l'équation 43 est encore une approximation acceptable. Des ROIs sont réalisées sur le cerveau entier et la veine. Si présente la tumeur est également délimitée par une ROI et ainsi que la zone controlatérale. Un exemple de ces ROI est représenté sur la figure ci-dessous (figure 84). La résolution spatiale de la séquence (et l'effet de volume partiel) ne permettent pas de délimiter suffisamment bien l'artère pour obtenir une mesure correcte (volume partiel, effet magnétique différent du fait de la taille de l'artère).

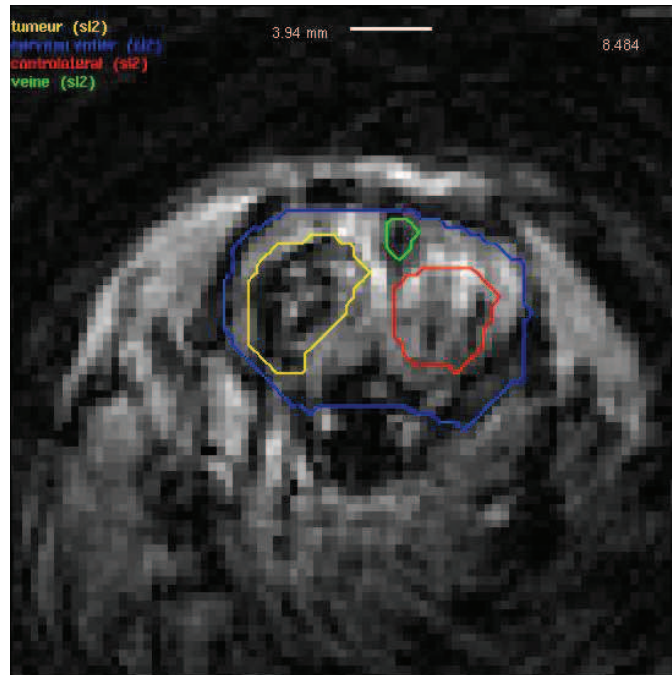


Figure 84 : Exemple d'image IRM (séquence spirale) obtenue. Les ROI sont réalisées sur le logiciel permettant le traitement de données (μ vasc). Elles sont réalisées sur une image moyenne temporelle de toutes les images du passage du bolus.

L'imagerie spirale a été réalisée sur 3 coupes de 1 mm d'épaisseur (la coupe la plus proche de celle mesurée en synchrotron sera choisie pour réaliser les ROIs). La résolution spatiale et le champ de vue sont : $358 \times 358 \mu\text{m}^2$ et $30.1 \times 30.1 \text{ mm}^2$ respectivement. La résolution temporelle est de 2 images par secondes. Les temps d'échos de gradient sont : 0.9, 8.484, 16.068, 23.652 ms. Le temps de répétition est : 500 ms. La durée totale de l'acquisition est de 2 min 20 s.

5.1.4 Le traitement des données :

Les données sont analysées du logiciel μ vasc (microvascularisation, logiciel réalisé par l'équipe 5 et moi même), acceptant les données d'imagerie sous plusieurs formats (Bruker®, Philips®, Dicom, ...). Les données synchrotrons sont transformées en données DICOM en prenant modèle sur les champs DICOM générés par les scanners GE et Philips que l'équipe utilise pour le traitement de données patients (voir le rapport de stage de Loyal Obeid en annexe). Toutes les courbes d'évolution de la quantité d'agent de contraste ont été recalées temporellement au pic comme le montre la figure 85 suivante. Les valeurs ont été normalisées à la valeur moyenne de la ROI cerveau entier pendant la recirculation à $t=35\text{s}$, mesurée sur les courbes brutes ($f_{\text{norm}} = 1/\text{moyenne}(\text{cerveau entier à } t = 35\text{s})$), ceci afin de pouvoir les comparer qualitativement entre elles. Le choix de la normalisation sur la phase de recirculation a été fait parce que cette partie tardive, est moins sensible à des

différences de produits injectés. Le nombre de recirculation (et donc la dispersion du produit dans le sang), et du coup la dilution dans le sang, est plus importante à ces temps plus long. Les différentes courbes sont nommées Dx, x étant le numéro du rat concerné. Pour les acquisitions synchrotrons, la quantité d'agent de contraste est représentée par le signal mesuré, c'est-à-dire la concentration absolue en iode. Pour les acquisitions spirales, la quantité d'agent de contraste est représentée par la valeur du ΔR_2^{GE} censé être proportionnelle à la concentration en gadolinium.

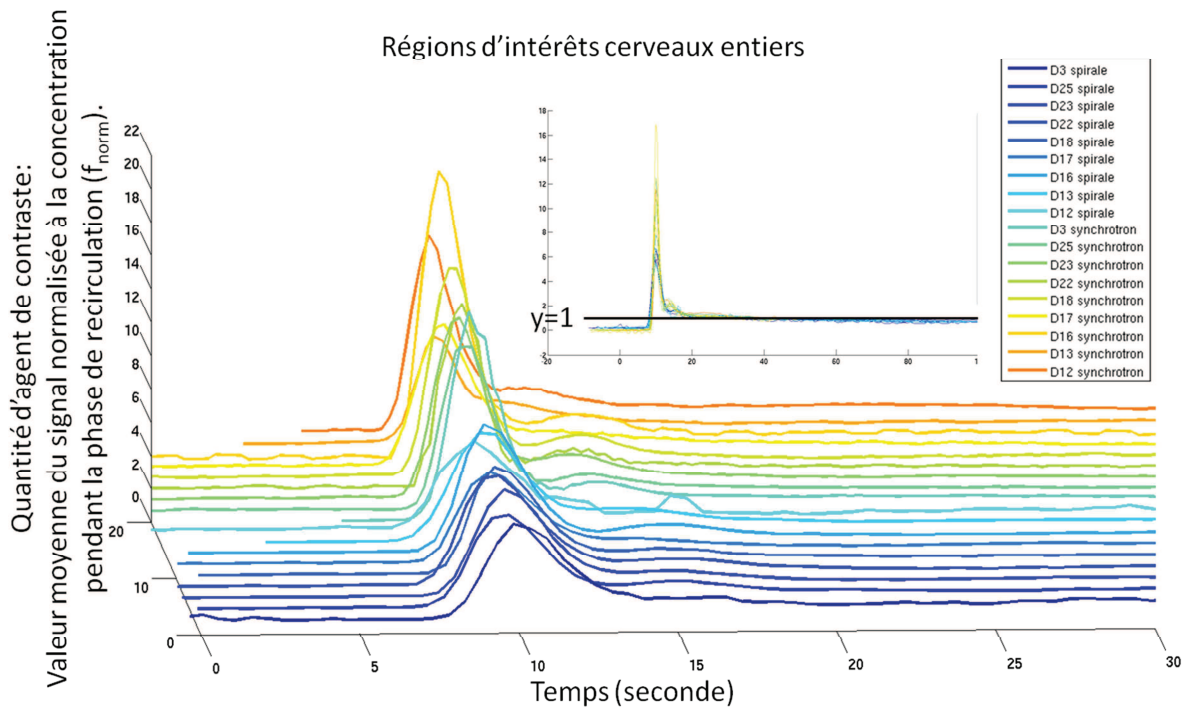


Figure 85 : Représentation des différentes courbes d'évolution de la quantité d'agent de contraste en fonction du temps. Les valeurs sont les valeurs moyennes de la ROI cerveau entier et normalisées à sa valeur à $t = 35s$, pendant la phase de recirculation. Les courbes sont recalées au pic. La superposition des courbes en 2D avec la droite $y = 1$ permet d'observer l'évolution des courbes aux temps long. Il y a toujours une décroissance de la quantité d'agent de contraste en fonction du temps.

Une courbe moyenne a été réalisée sur toutes les courbes des ROI cerveaux des différents rats en synchrotron après normalisation par la quantité d'agent de contraste injectée afin d'obtenir $[I] = f(t)$. Il a été fait de même pour les acquisitions spirales ($\Delta R_2^{GE} = f(t)$). A partir de ces courbes la relation $\Delta R_2^{GE} = f(I)$ a été obtenue. Les courbes cerveaux entiers moyennés ont été moyennés entre toutes les acquisitions spirales et toutes les acquisitions synchrotrons pour en tirer une information générale sur le comportement de l'agent de contraste et la relation entre la valeur du ΔR_2^{GE} et la concentration obtenue en imagerie synchrotron.

Calcul de ΔR_2^{GE} :

Un ajustement par une courbe mono exponentielle décroissante a été réalisé entre les 4 différents temps d'écho pour chaque voxel (spatial et temporel) afin d'estimer des cartes de R_2^{GE} à chaque temps (exemple figure 86 suivante).

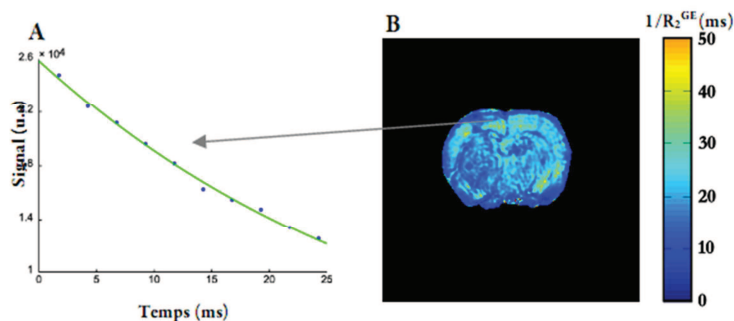


Figure 86 : A) Exemple de fit du R_2^* à partir de multiples échos de gradient et de la carte $1/R_2^*$ obtenue (B). Dans cet exemple il y a 10 échos de gradients. Figure provenant de la thèse de Nicolas Pannetier (Pannetier, Lemasson et al. 2011)

Fit gamma :

Le suivi de bolus a été analysé par un fit gamma comme il a été décrit dans le chapitre 4. Cependant comme il n'est pas possible de mesurer le signal dans l'artère, pour ne pas être sensible à aux conditions d'injection de l'agent de contraste, une normalisation est effectuée par les valeurs de perfusion obtenues sur le côté controlatéral.

Les données sont ajustées par la variable gamma voxel par voxel avec le même programme que ce soit pour les images synchrotrons ou pour les images ΔR_2^{GE} provenant des ajustements à partir des acquisitions spirales. La méthode d'ajustement utilise l'algorithme de Levenberg-Marquart pour minimiser les moindres carrés. Le CBV est alors l'air sous la courbe tissulaire, le MTT est le moment d'ordre 1 de la variable gamma et le CBF est par l'équation du volume centrale : $CBF=CBV/MTT$. Les valeurs moyennes et écart-type des paramètres perfusion sont alors calculées pour chaque ROI. Ces valeurs sont ensuite normalisées par la quantité d'agent de contraste injectée (concentration x volume), de façon à pouvoir être comparé entre elles. La valeur moyenne des mesures de CBV et CBF est alors estimée pour les différentes modalités d'imagerie ainsi que l'écart-type associé afin d'estimer la reproductibilité de la mesure. La valeur moyenne des écart-types relatifs est aussi calculés afin d'estimer la précision de la mesure.

5.2 Résultats :

Tout d'abord les courbes rat par rat (nommées Dx en fonction du nom du rat) seront commentées qualitativement, puis les courbes moyennées sur tous les rats seront décrites.

Les données « brutes » :

Les figures suivantes représentent les concentrations en agent de contraste en fonction du temps dans le cas des acquisitions synchrotrons et les courbes ΔR_2^{GE} en fonction du temps dans le cas des acquisitions spirales.

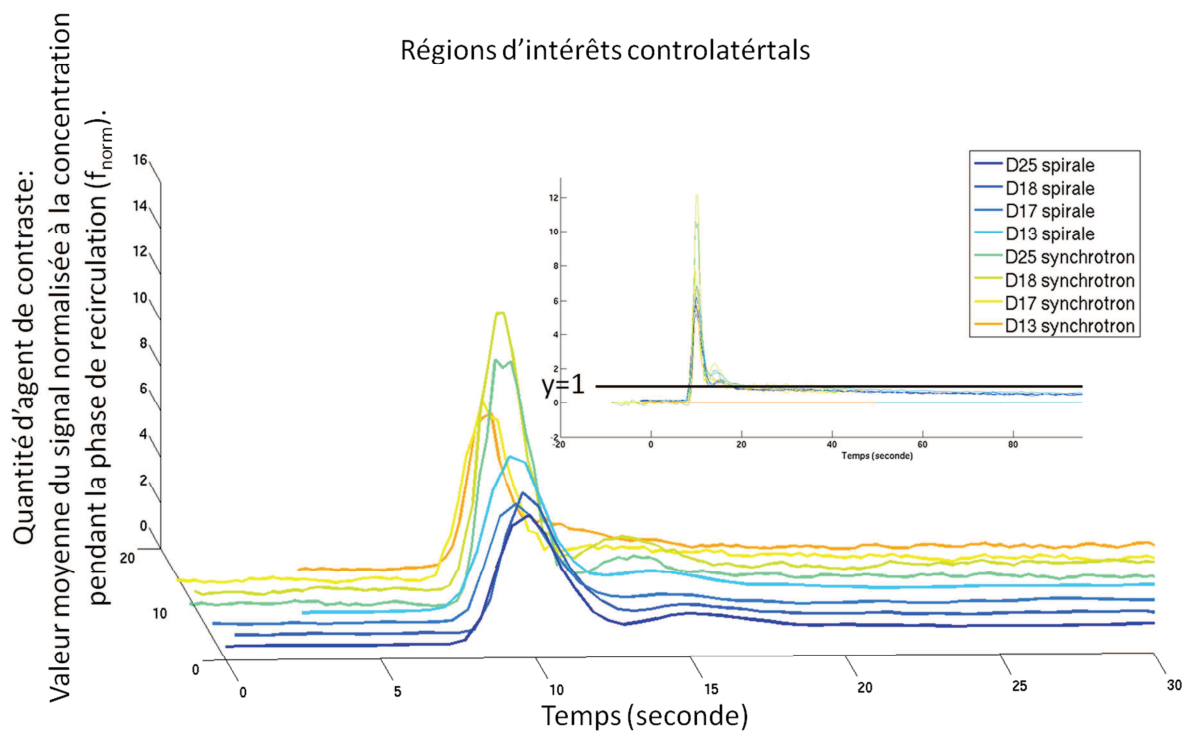


Figure 87 : Représentation des différentes courbes d'évolution de la quantité d'agent de contraste en fonction du temps. La quantité d'agent de contraste est représentés par la valeur moyenne du signal sur l'ensemble de la ROI controlateral et normalisées à la valeur moyenne mesurée sur le cerveau entier à $t = 35s$. Les courbes sont recalées au pic. Sur la représentation 2D des courbes, la droite $y = 1$ a été tracé comme repère pour l'évolution de la courbe. La décroissance temporelle de la quantité d'agent de contraste est présente aux temps long et est rapide.

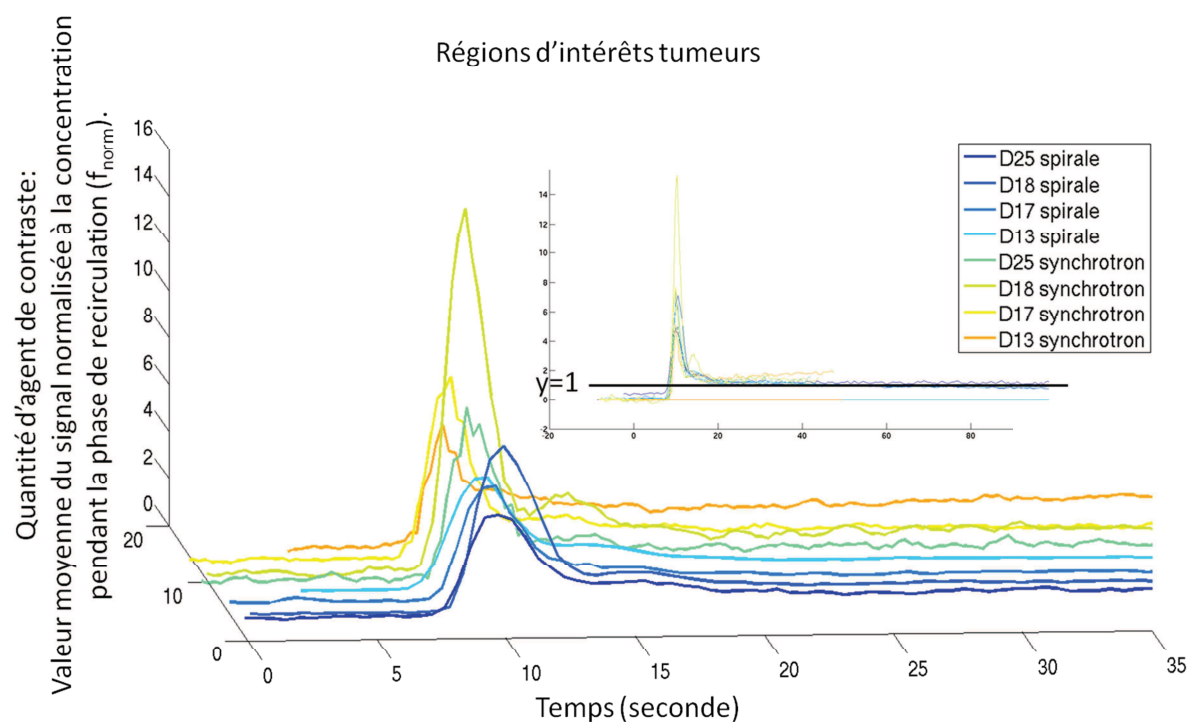


Figure 88 : Représentation des différentes courbes d'évolution de la quantité d'agent de contraste en fonction du temps. La quantité d'agent de contraste est représentés par la valeur moyenne du signal sur l'ensemble de la ROI tumeur et normalisées à la valeur moyenne mesurée sur le cerveau entier à $t = 35s$. Les courbes sont recalées au pic. Sur la représentation 2D des courbes, la droite $y = 1$ a été tracé comme repère pour l'évolution de la courbe. La décroissance temporelle de la quantité d'agent de contraste est quasiment inexistant aux temps longs.

Sur ces différentes courbes brutes (cerveau entier, controlatéral et tumeur) on observe que l'allure générale des courbes IRM spirales et synchrotron est identique. La recirculation a le même comportement dans les deux cas, que ce soit dans la zone tumorale, cerveaux entiers ou controlatérale. La zone controlatérale et cerveau entier sont d'ailleurs très proches ce qui est cohérent à la faible taille de la tumeur par rapport au tissu sain.

On observe que dans la tumeur, la décroissance de la concentration en agent de contraste est quasiment nulle pendant la période de recirculation contrairement à la zone controlatéral. En effet dans la zone controlatérale, la concentration mesurée n'est dûe qu'à la concentration sanguine et donc décroît avec la filtration rénale et la dilution de plus en plus importante de l'agent de contraste dans l'ensemble du sang.

Dans la zone tumorale, la concentration est dûe à la fois à la concentration vasculaire et la concentration extravasculaire extracellulaire. Le processus de transfert de l'agent de contraste extravasé dans les vaisseaux est un processus diffusif, donc lent et nécessite un gradient de concentration. Or la concentration sanguine reste plus importante que la concentration tissulaire pendant un moment. D'où la stabilité de la concentration en fonction du temps dans la période de la recirculation.

On observe aussi que la largeur à mi-hauteur est plus importante pour les acquisitions spirales que pour les acquisitions synchrotrons. De même la recirculation est plus prononcée pour les acquisitions synchrotrons. Ceci peut être dû à la différence de viscosité des deux agents de contraste. La viscosité des agents de contraste, à différente concentration (dilutions effectuée dans du sérum physiologique) est représentée sur la figure 89 ci-dessous. La concentration pour l'agent de contraste IRM est de 37.5 mg/ml alors que celle de l'agent de contraste synchrotron est de 400 mg/ml lors de l'injection. Le rapport entre les viscosités est donc d'environ 10.

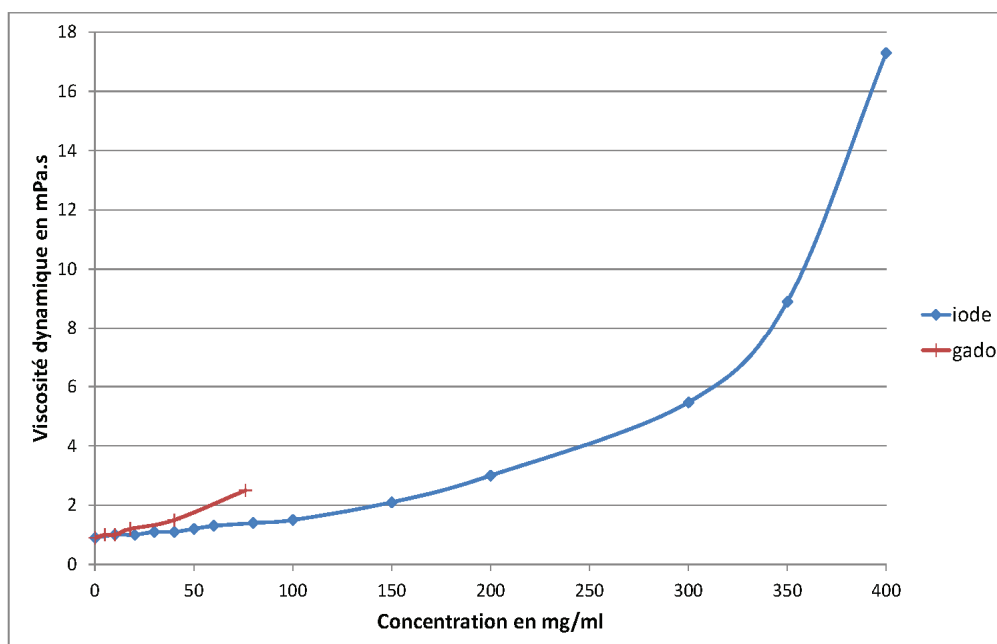


Figure 89 : Courbes de viscosité dynamique en fonction de la concentration en agent de contraste iodé ou en gadolinium. Les viscosités ont été estimées expérimentalement par Sébastien Besse sauf pour les viscosités à 300, 350 et 400 mg/ml qui proviennent des viscosités annoncées par le fabricant, ajustées à la température de 20 degrés par le rapport des viscosités de l'eau à 37 degrés et 20 degrés, température à laquelle les mesures ont été effectuées ses mesures.

Les courbes « gamma » :

Les figures suivantes représentent les courbes ajustées par une variable gamma, réalisées sous le logiciel μ vasc. Elles ont la même allure suivant les deux protocoles d'acquisition. On retrouve le fait que la largeur à mi-hauteur est plus importante dans le cas des acquisitions spirales que dans le cas des acquisitions synchrotrons.

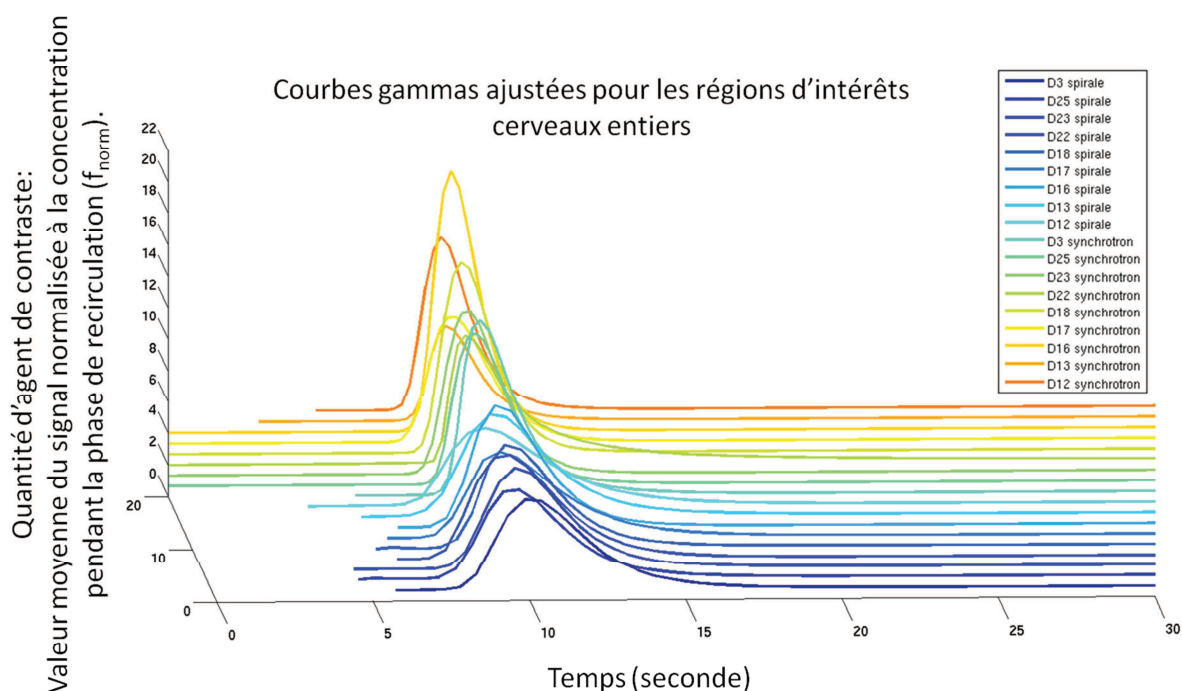


Figure 90 : Représentation des différentes courbes d'évolution de la quantité d'agent de contraste moyennées sur l'ensemble de la ROI cerveau entier après ajustement gamma et normalisées par le facteur f_{norm} (valeur moyenne de la région cerveau entier sur les données brutes à $t = 35s$).

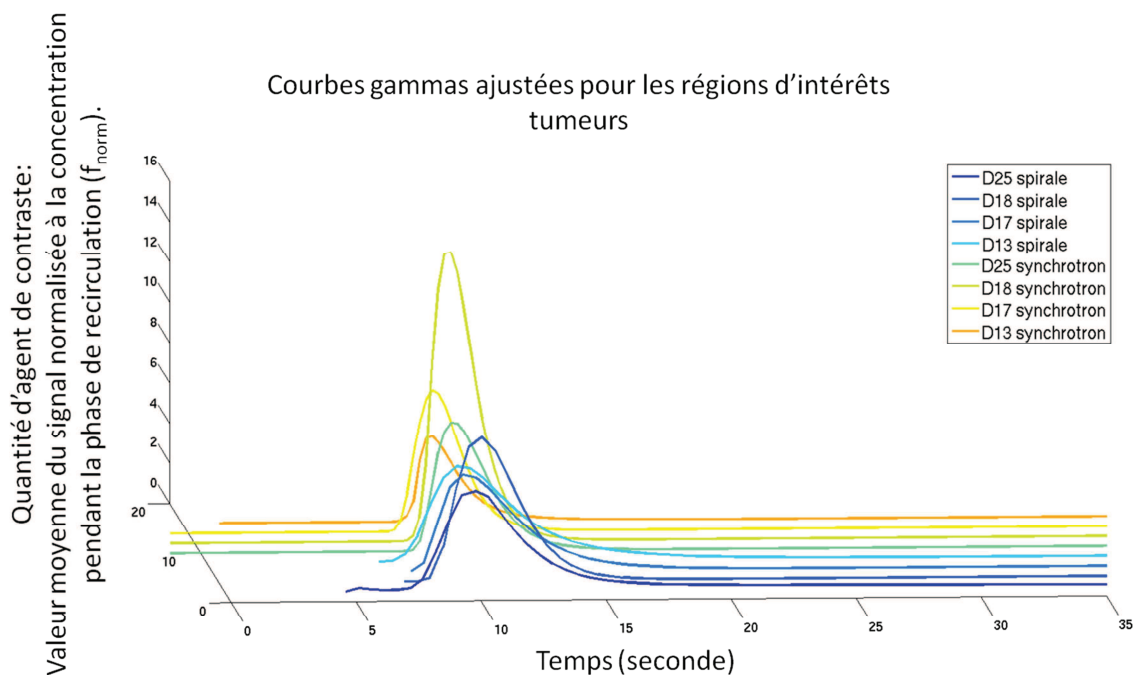


Figure 91 : Représentation des différentes courbes d'évolution de la quantité d'agent de contraste moyennées sur l'ensemble de la ROI tumeur après ajustement gamma et normalisées à la valeur moyenne du cerveau entier (données brutes) à $t = 35s$ en fonction du temps.

Courbes moyennées :

La figure 92 représente les courbes de concentrations moyennées sur toute la ROI cerveau entier et moyennées sur l'ensemble des rats, normalisées à la concentration injectée dans le cas d'une acquisition spirale et d'une acquisition synchrotron. On observe à nouveau la différence de largeur à mi-hauteur et de recirculation.

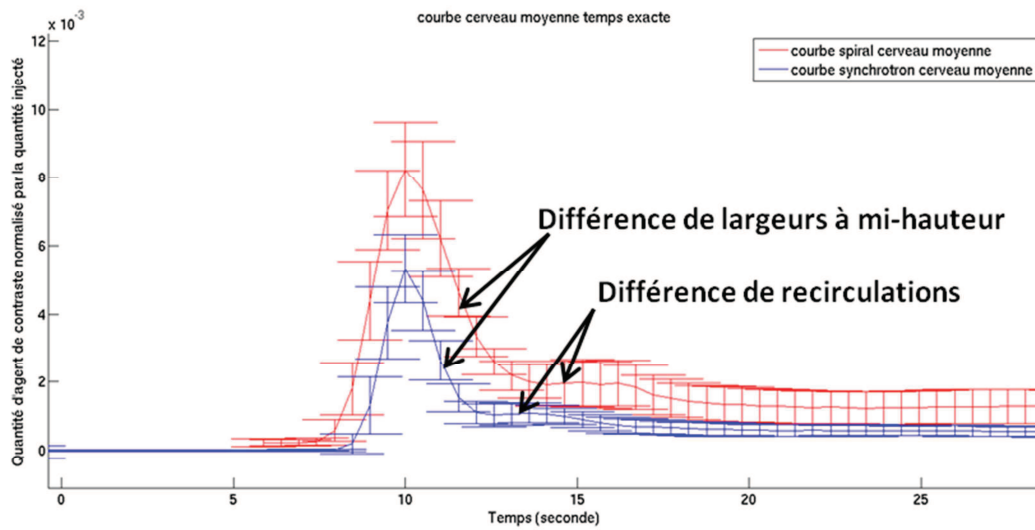


Figure 92 : Signal synchrotron (concentration en iode) et IRM (ΔR_2^{GE}) normalisé à la concentration d'agent de contraste injectée en fonction du temps. Les valeurs correspondent à la valeur moyenne sur la ROI cerveau entier.

Cette différence de largeur à mi-hauteur s'observe encore une fois sur les courbes gammas. La valeur au pic de la courbe obtenue pour les acquisitions spirales a été ajustée afin de correspondre à la valeur au pic pour les acquisitions synchrotron afin de mieux observer cette différence (figure 93).

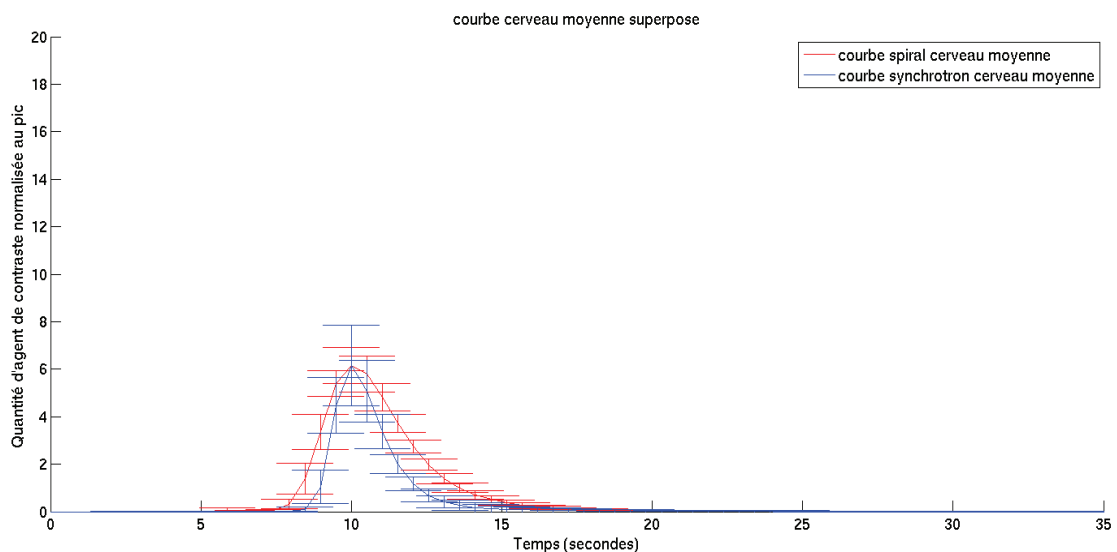


Figure 93 : Signal synchrotron (concentration en iode) et IRM (ΔR_2^{GE}) ajustées par une variable gamma en fonction du temps. Les valeurs correspondent à la valeur moyenne sur la ROI cerveau entier. Les valeurs de la courbe spirale ont été divisées par le rapport pic_synchrotron/pic_spiral pour pouvoir mieux comparer leur évolution temporelle.

La largeur à mi-hauteur sur ces courbes a été estimée à 1.9 secondes et 2.7 secondes pour les acquisitions synchrotrons et spirales respectivement, ce qui équivaut à une différence entre les deux de 0.8 secondes. Ceci équivaut à une erreur relative d'environ 42% si l'on prend l'acquisition synchrotron comme référence (puisque qu'avec une viscosité plus importante, on est moins sensible à une dispersion du produit de contraste dans le sang). La dispersion d'une molécule dans un fluide

en régime laminaire dans un tube est donnée par l'équation suivante d'après Bate *et al.* (Bate, Rowlands et al. 1973) :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} + \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right] - 2\bar{u} \left[1 - \frac{r^2}{a^2} \right] \frac{\partial c}{\partial x} \text{ et } D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad \text{Equation 44 et 43}$$

c est la concentration de la molécule, t le temps, D le coefficient de diffusion, r la distance par rapport au centre du tube, x la distance le long du tube, \bar{u} la vitesse moyenne de la molécule, a le diamètre du tube, k_b la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité et r_h le rayon hydrodynamique de la molécule de l'agent de contraste. La dispersion est donc directement reliée à la viscosité de l'agent de contraste.

Calamante *et al.* ont étudié la dispersion théorique en modélisant des courbes artérielles et tissulaires à partir du modèle de la variable gamma puis en les analysant par déconvolution (Calamante, Gadian et al. 2000). Pour simuler la dispersion, la fonction artérielle est convoluée avec une fonction exponentielle décroissante de constante de temps ($\beta \exp(-\beta t)$) (figure 94).

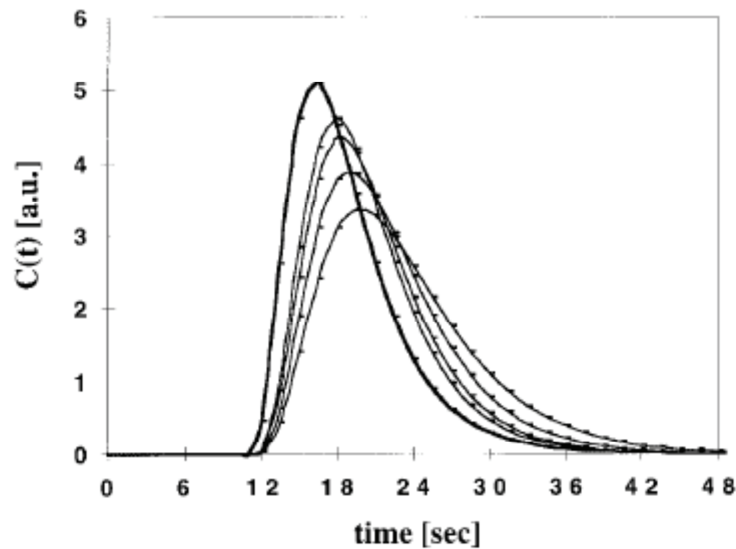


Figure 94 : effet de la dispersion d'après Calamante et al. Courbes tissulaires pour différente valeur de β représentant la dispersion. (Calamante, Gadian et al. 2000).

On observe le même type d'effet sur les fonctions gamma que ce que l'on observe entre les courbes acquises par synchrotron et les courbes acquises par IRM spiral.

Afin de corriger cet effet de dispersion, la courbe moyenne des acquisitions spirales a été corrigée de cet étalement. La méthode consiste est la suivante :

- $t_{spiral_corrige} = t_{spiral} * \frac{FWHM_{synchrotron}}{FWHM_{spiral}}$
- $S_{spiral_corrige} = S_{spiral} * \frac{FWHM_{spiral}}{FWHM_{synchrotron}}$

$t_{spiral_corrige}$ correspond aux nouveaux pas temporels après correction de t_{spiral} . $FWHM_i$ est la largeur à mi-hauteur de l'acquisition de type i .

Cette méthode consiste donc à réduire le pas temporel et à multiplier la valeur du signal par le facteur opposé. On conserve donc la même aire sous la courbe par intégration par rectangle (figure 95), soit une conservation de la quantité d'agent de contraste mesurée.

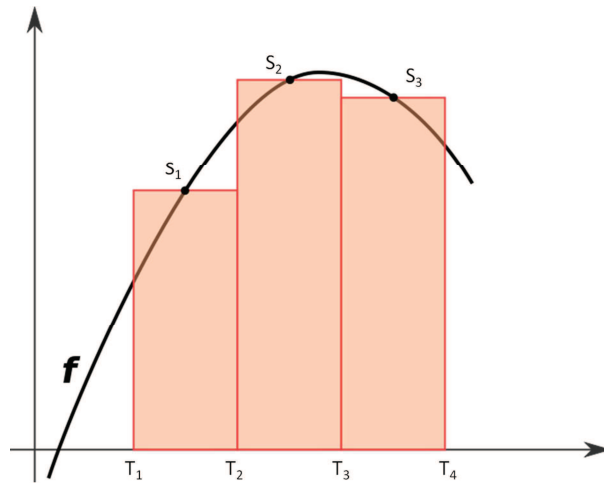


Figure 95: Représentation de la méthode d'intégration numérique par rectangle.

$$\text{Aire} = (T_{i+1} - T_i) * S_i = (T_{i+1} - T_i) * \frac{FWHM_{\text{synchrotron}}}{FWHM_{\text{spiral}}} * S_i * \frac{FWHM_{\text{spiral}}}{FWHM_{\text{synchrotron}}}$$

En normalisant ces valeurs à la quantité d'agent de contraste injectée dans chaque cas (concentration x volume) on obtient alors la figure suivante (figure 96) :

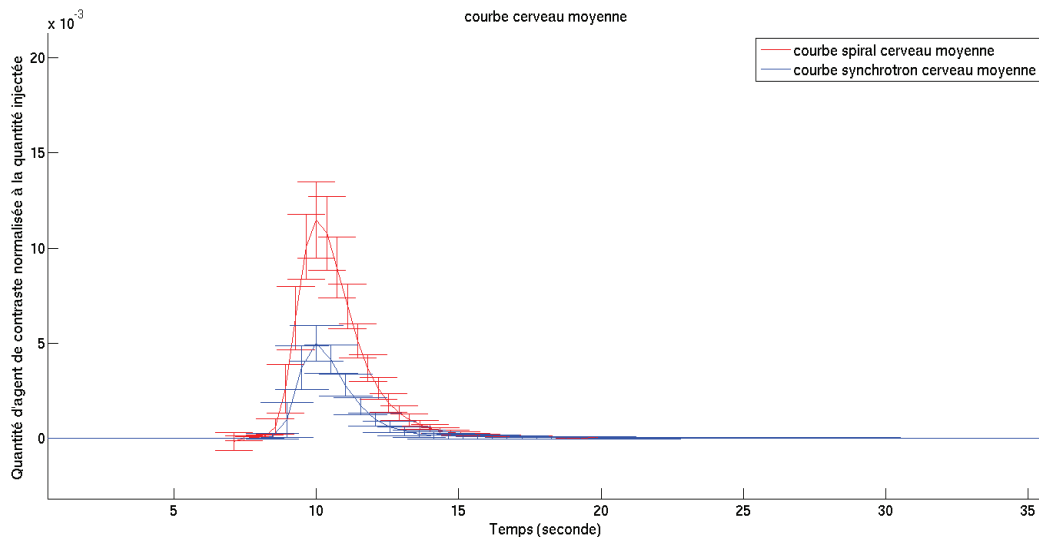


Figure 96 : Signal synchrotron (concentration en iode) et IRM (ΔR_2^*) ajustés par une variable gamma en fonction du temps. Les valeurs correspondent à la valeur moyenne sur la ROI cerveau entier. Les valeurs de la courbe spirale ont été corrigées de la viscosité (largeur à mi-hauteur ajustée par le rapport largeur à mi-hauteur synchrotron/largeur à mi-hauteur spirale). Les valeurs des (ΔR_2^*) ont été multiplié par le facteur inverse.

En traçant les valeurs IRM (ΔR_2^{GE}) en fonction des valeurs synchrotron ([I]) après correction de la différence de largeur à mi-hauteur on obtient ainsi la courbe suivante, représentant l'hystérésis des valeurs de ΔR_2^{GE} en fonction des concentrations normalisées obtenues en synchrotron : $\Delta R_2^{\text{GE}} = f([I])$ (figure 97).

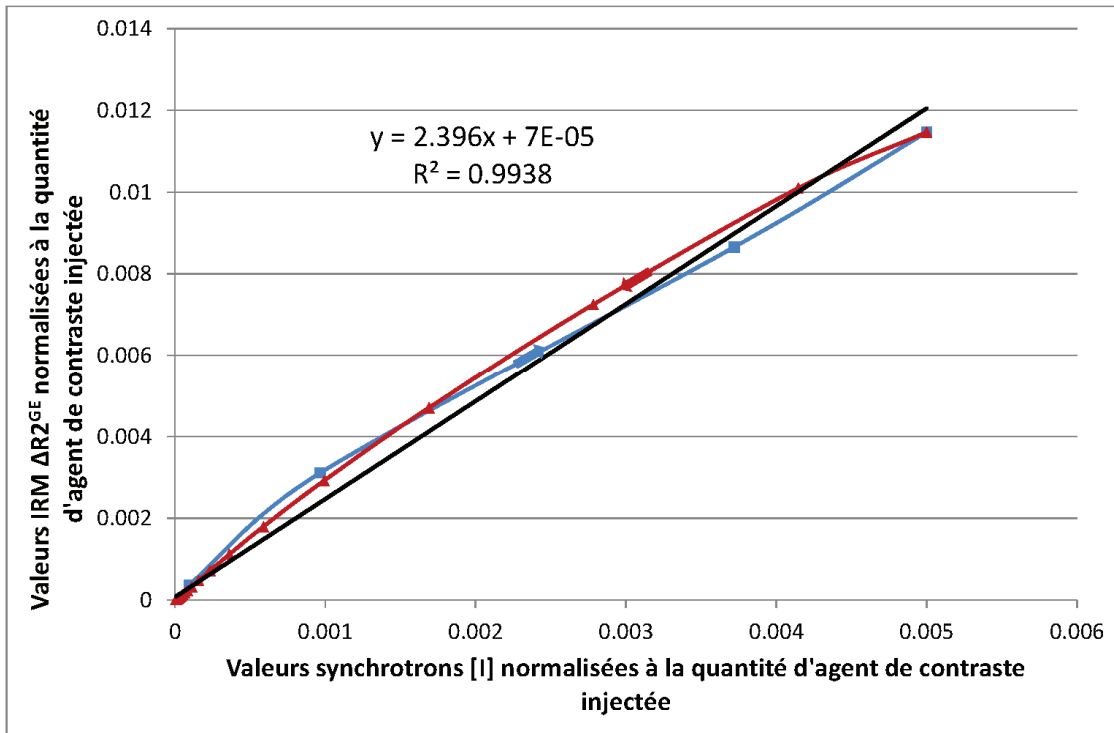


Figure 97 : Relation entre la valeur spirale (ΔR_2^{GE}) normalisée à la concentration d'agent de contraste injectée corrigé de la différence de viscosité entre les deux agents de contraste, en fonction des valeurs synchrotron normalisée à la concentration d'agent de contraste injectée. En bleu la partie correspondant à l'arrivée de l'agent de contraste, en rouge la partie correspond à l'évacuation de celui-ci.

Cet hystérésis est ajusté par une fonction linéaire avec un très bon coefficient R^2 : $R^2 = 0.9938$. L'équation de la droite obtenue est : $\Delta R_2^{GE} = [I_{\text{normalisé}}] * 2.4 + 7e^{-5}$. Vu que la quantité d'agent de contraste injectée est faible (concentration divisée par 2 par rapport au produit clinique), que l'on ne mesure pas le signal IRM dans les gros vaisseaux et qu'il y a une précharge de l'agent de contraste dans la tumeur (donc peu d'extravasation supplémentaire, pas d'effet T_1 voir figure 83), il semble cohérent que l'on ait une relation linéaire entre le ΔR_2^{GE} et la concentration associée mesurée sur les acquisitions synchrotron. Cette droite passe par 0 comme on pouvait s'y attendre. Cet ajustement nécessite de faire l'hypothèse que les deux agents de contraste utilisés ont le même comportement dans le corps en dehors de leur différence de viscosité (c'est-à-dire mêmes osmolarité, même comportement ionique, etc ...).

Valeurs des paramètres de perfusion obtenues :

Les valeurs de perfusion CBV et CBF mesurées sur la région d'intérêt du cerveau (valeur moyenne et écart-type) sont représentées sur les figures ci-dessous (figure 98 et 99). Elles sont normalisées à la quantité d'agent de contraste injecté. Les valeurs synchrotron et IRM correspondent aux mesures effectuées à partir d'un ajustement de la variable gamma sans utiliser la corrélation entre la mesure de ΔR_2^{GE} et la concentration de l'agent de contraste décrit ci-dessus. Les valeurs correspondant à l'appellation spirale corrigées, correspondent aux valeurs de CBV ou CBF multipliées par le coefficient de corrélation linéaire obtenu : $2.4 \text{ ms}^{-1}/(\text{mg}/\text{ml})$.

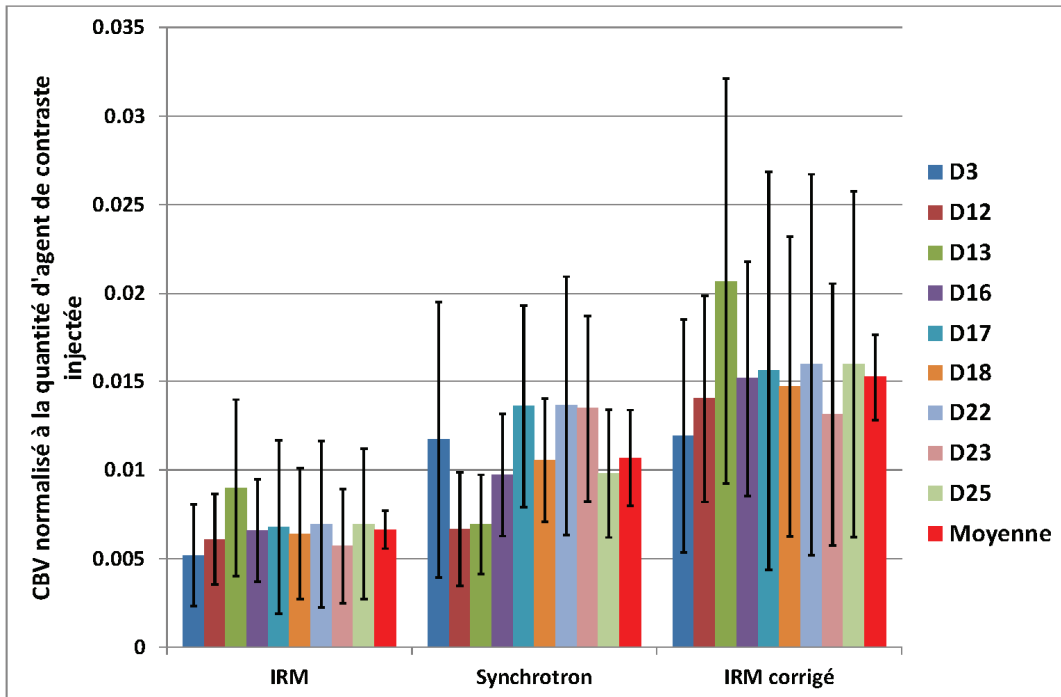


Figure 98 : Valeurs moyennes et écarts-types des CBV mesurées sur les ROI « cerveau » pour les différents rats. Les valeurs représentées sont celles obtenues par les mesures spirales, synchrotrons, et les valeurs des mesures spirales multipliées par le coefficient de relation ΔR_2^{GE} /concentration synchrotron.

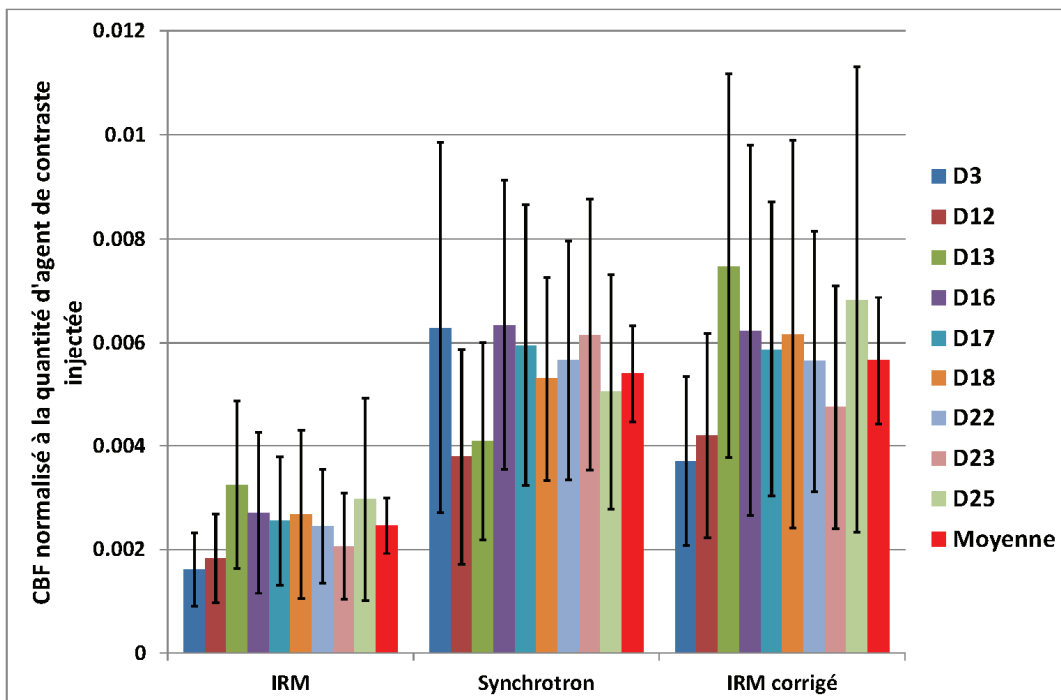


Figure 99 : Valeurs moyennes et écarts-types des CBF mesurées sur les ROI « cerveau » pour les différents rats. Les valeurs représentées sont celles obtenues par les mesures spirales, synchrotrons, et les valeurs des mesures spirales multipliées par le coefficient de relation ΔR_2^{GE} /concentration synchrotron.

Les valeurs moyennes sur les différents rats sont :

$0.0066 \pm 1.1 \times 10^{-3}$; $0.0106 \pm 2.7 \times 10^{-3}$; $0.0153 \pm 2.4 \times 10^{-3}$ pour le CBV (IRM, Synchrotron et IRM corrigé respectivement)

$0.00246 \pm 5.3 \times 10^{-4}$; $0.0054 \pm 9.3 \times 10^{-4}$; $0.0057 \pm 1.2 \times 10^{-3}$ pour le CBF (IRM, Synchrotron et IRM corrigé respectivement). Ils semblent que les rats D12 et D13 réagissent différemment, sans ces rats les valeurs moyennes sont :

$0.0064 \pm 6.7 \times 10^{-4}$; $0.0118 \pm 1.8 \times 10^{-3}$; $0.0147 \pm 1.5 \times 10^{-3}$ pour le CBV (IRM, Synchrotron et IRM corrigé respectivement)

$0.0024 \pm 4.6 \times 10^{-4}$; $0.0058 \pm 5 \times 10^{-4}$; $0.0056 \pm 1 \times 10^{-3}$ pour le CBF (IRM, Synchrotron et IRM corrigé respectivement)

Les valeurs moyennes des écart-types relatifs sont de 56.7 % et 43.8 % pour les CBV et de 51.9 % et 45.9 % pour les CBF, pour les acquisitions IRM et synchrotrons respectivement.

Un t-test bilatéral apparié a été réalisé sur les rats des groupes IRM et Synchrotron et Synchrotron et IRM corrigé avec ou sans l'exclusion des rats D12 et D13. Les valeurs p du test sont les suivantes :

Sans exclusion des rats D12 et D13 :

IRM/Synchrotron : CBV $p = 0.006$; CBF $p = 7.27 \times 10^{-5}$.

Synchrotron/IRM corrigé : CBV $p = 0.013$; CBF $p = 0.012$

Avec exclusion des rats D12 et D13 :

IRM/Synchrotron : CBV $p = 0.0003$; CBF $p = 4.88 \times 10^{-5}$.

Synchrotron/IRM corrigé : CBV $p = 0.023$; CBF $p = 0.7$

Les valeurs de CBV et CBF obtenues sont trop bruitées pour conclure précisément sur la comparaison entre les deux méthodes d'imageries. Le CBV obtenue par l'estimation du ΔR_2^{GE} n'est pas directement comparable au CBV obtenue par le synchrotron puisque le ΔR_2^{GE} n'est pas une mesure de la concentration de l'agent de contraste. Celui corrigé par la relation entre le ΔR_2^{GE} et la concentration obtenue en synchrotron l'est puisque la relation entre les deux quantités est linéaire et que la mesure du CBV repose sur une intégrale donc une fonction linéaire. Il n'en est pas de même pour le CBF où la relation pour l'estimer n'est pas linéaire, cependant la correction donne une première approximation de la valeur qu'aurait le CBF si la correction était faite avant ajustement par la variable gamma. On observe que les valeurs de CBV mesurées avec le synchrotron sont comprises entre les valeurs estimées par l'acquisition spirale non corrigées et les valeurs corrigées. Le facteur de correction est peut être sur estimé, en mettant les différences de largeurs à mi-hauteur des courbes uniquement sur le fait de la différence de la viscosité. La mesure du CBF grâce aux acquisitions synchrotron quant à elle est plus proche des valeurs obtenues par les acquisitions spirales une fois corrigées. Les valeurs du t-test excluant les rats D12 et D13 sont assez concluants concernant le CBF entre le groupe IRM corrigé et le groupe synchrotron (probabilité de 70% que les groupes soient identiques).

La déconvolution avec une entrée artérielle n'a pas pu être effectuée puisque l'algorithme de déconvolution n'est pas encore suffisamment stable pour être utilisé et que la mesure d'une entrée artérielle en IRM est difficile (résolution spatiale, non linéarité du signal notamment dans les gros vaisseaux, ...). Les mesures de paramètres de perfusion sont donc dépendantes de l'injection du produit et de son évolution jusqu'aux artères alimentant les régions d'intérêt. L'effet de la viscosité a été sous-évalué, et les différences entre les deux modalités peuvent donc provenir de ce phénomène.

Cet effet devrait avoir moins d'influence lorsque l'on normalise les valeurs d'une région d'intérêt avec une autre. C'est le cas pour les mesures de CBV et CBF dans la tumeur normalisées aux

valeurs estimées dans la région controlatérale. Ces valeurs sont représentées sur les figures suivantes (100 et 101) :

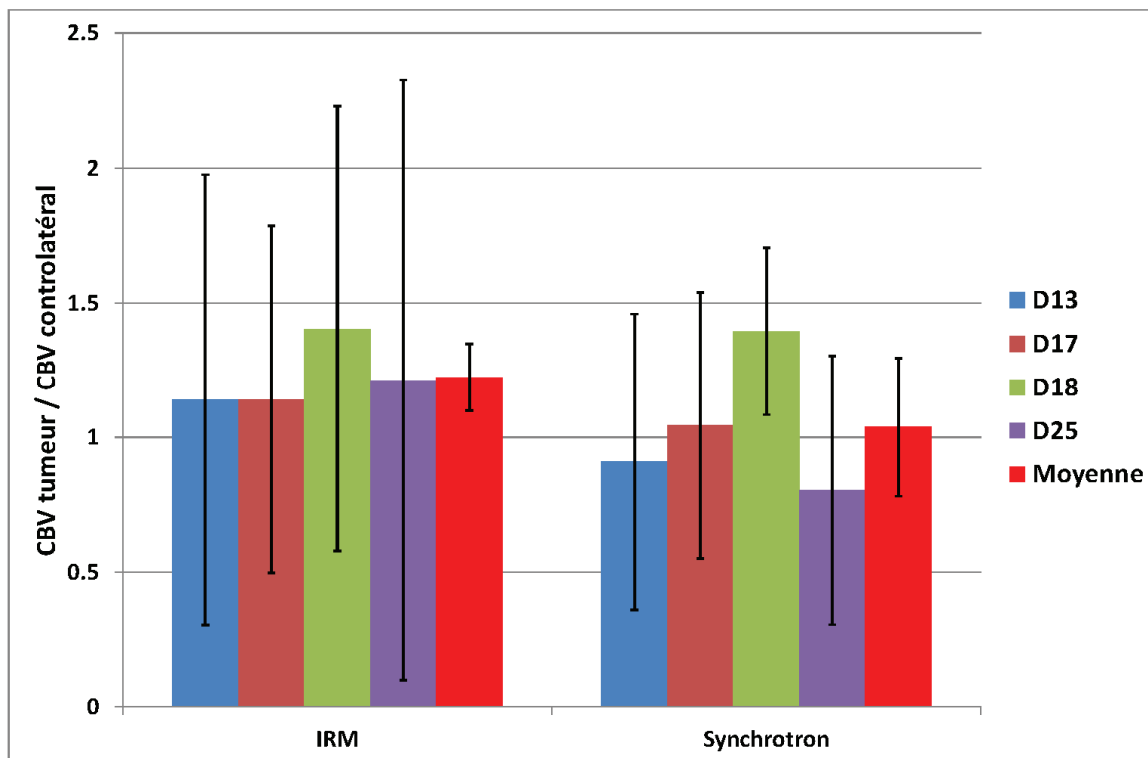


Figure 100 : Valeurs moyennes et écarts-types des CBV mesurées sur les ROI « tumeurs » et normalisées sur les ROI « controlatérale » pour les différents rats. Les valeurs représentées sont celles obtenues par les mesures spirales et synchrotrons.

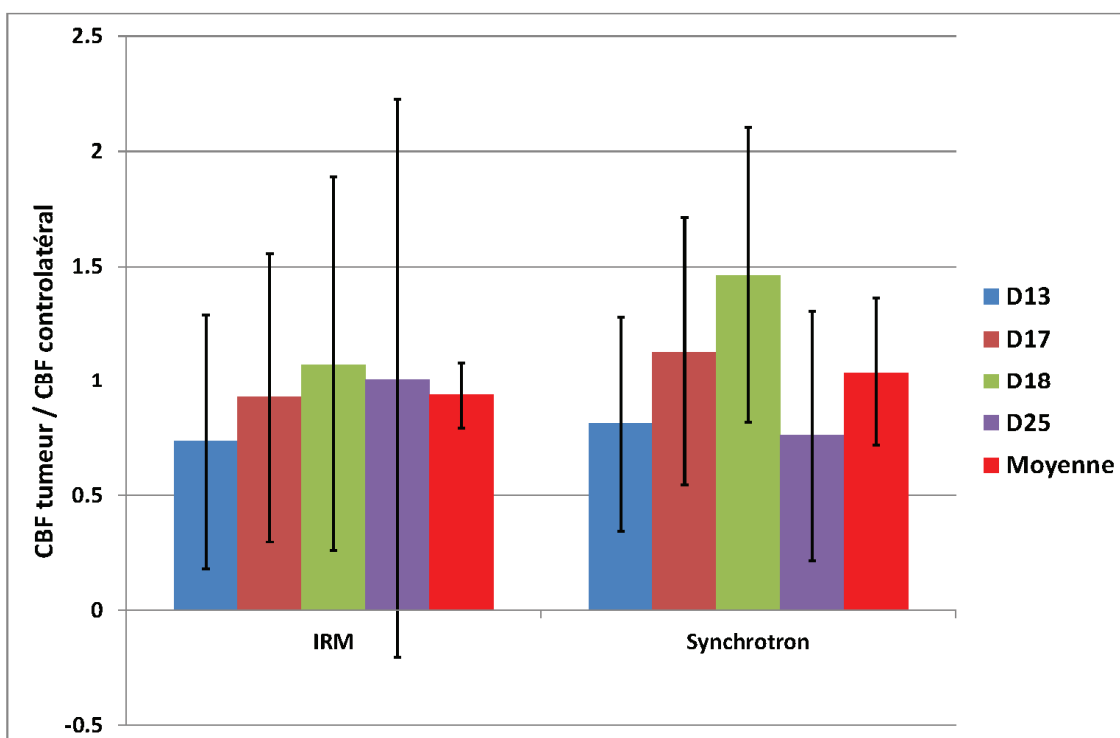


Figure 101 : Valeurs moyennes et écarts-types des CBV mesurées sur les ROI « tumeurs » et normalisées sur les ROI « controlatérale » pour les différents rats. Les valeurs représentées sont celles obtenues par les mesures spirales et synchrotrons.

Les valeurs moyennes sont pour le CBV : 1.23 ± 0.12 et 1.04 ± 0.26 (respectivement IRM et synchrotron) et pour le CBF : 0.94 ± 0.15 et 1.04 ± 0.32 (respectivement IRM et synchrotron).

Un t-test bilatéral apparié a été réalisé sur les rats des groupes IRM et Synchrotron. Les valeurs p du test sont 0.12 et 0.49 pour le CBV et le CBF respectivement.

Les valeurs moyennes des écart-types relatifs pour les CBV sont 70.1 % et 48.1 % pour les acquisitions spirales et synchrotrons respectivement. Pour les CBF elles sont de 84.9 % et 56.4 % pour les acquisitions spirales et synchrotrons respectivement. Les mesures « tumeur normalisé au controlatéral » par variable gamma pour les acquisitions spirales sont donc plus bruitées que celles pour les acquisitions synchrotrons.

Les valeurs relatives de CBV et CBF semblent plus proches entre les deux modalités de mesure mais les importantes barres d'erreur ne permettent pas de conclure. Des tests de student (t-test) ont été effectués et les probabilités que les groupes ne soient pas différents sont faibles (12 % pour le CBV et 49 % pour le CBF) mais il n'y avait que peu de rats dans les groupes, alors que ce test nécessite un grand nombre d'échantillons. Ceci va dans le sens de l'hypothèse que les différences sur les mesures obtenues sans la normalisation viennent du fait qu'il n'y a pas de correction avec une entrée artérielle.

5.3 Discussion

Cette étude de comparaison de modalité d'imagerie de perfusion a permis de développer un logiciel acceptant aussi bien les acquisitions par tomographie par rayon X et par IRM. Le traitement des données entre les deux modalités, utilisant le modèle de la variable gamma, est le plus proche possible pour que les différences de résultats viennent majoritairement de la modalité d'imagerie, est donc de la relation entre la concentration en agent de contraste et la mesure du ΔR_2^{GE} en IRM. Le protocole de cette expérience est très complexe puisqu'il nécessite une technique d'imagerie à la pointe de ce qui se fait dans les deux modalités (tomographie synchrotron et imagerie IRM par spirale), et une intervention chirurgicale invasive pour la pose du cathéter. La position verticale du rat aurait tendance à augmenter le temps de transit moyen de l'agent de contraste du fait d'une circulation sanguine perturbée, plus lente et atteignant plus difficilement le cerveau. Le fait qu'on mesure un temps de transit moyen plus faible en synchrotron laisse supposer que l'injection intra jugulaire permet d'éviter ce problème, ou tout du moins que les conséquences sont beaucoup plus faibles que la différence de viscosité des agents de contraste.

Des courbes de suivi de quantité d'agent de contraste ont pu être obtenues avec les deux modalités sur 4 rats portant une tumeur et 5 rats sains. L'analyse de ces courbes a mis en évidence l'importance de la viscosité d'un agent de contraste. En effet la viscosité des deux agents de contraste est très différente (environ un facteur 10) et semble être responsable d'une dispersion de celui-ci dans le sang très différente dans chacun des cas. Le phénomène est notamment observé sur les largeurs à mi-hauteur des courbes. Il est l'une des hypothèses pour expliquer les différences de CBV et CBF estimées par l'ajustement avec une variable gamma. Pour remédier à cette différence de viscosité, deux pistes sont à explorer :

- La première consiste à refaire les expériences avec des agents de contraste de viscosité identique. Cependant si l'on augmente la concentration de l'agent de contraste utilisé en IRM on risque de ne plus être dans la gamme de valeurs où la relation entre le ΔR_2^{GE} et la concentration de celui-ci n'est plus linéaire. Avec les concentrations utilisées il semble qu'on respecte cette condition.

Si l'on diminue la concentration de l'agent de contraste utilisé en synchrotron, pour avoir un rapport signal sur bruit suffisant il faudrait augmenter le volume. On aurait alors des volumes différents dans les deux modalités d'injection ce qui risque d'avoir une influence sur les paramètres de perfusion aussi. Dans l'étude de Korporaal et *al.* des volumes différents ont été utilisés lors de la comparaison de mesure de perfusion entre l'IRM et le scanner (Korporaal, van den Berg et al. 2011). Pour diminuer l'influence de cette différence, ils ont injectés les agents de contrastes à des débits choisis pour que le temps de passage de l'agent de contraste soit identique dans les deux modalités d'imagerie. Il est aussi possible d'ajouter des éléments de type sucrose, pour augmenter la viscosité de l'agent de contraste IRM sans changer la concentration en élément paramagnétique. Cette solution paraît réalisable, cependant au vu de la difficulté de réalisation de l'expérience, il serait intéressant de pouvoir corriger cette différence de viscosité dans le traitement de données déjà acquise.

- La deuxième méthode pour diminuer l'influence de la viscosité des agents de contraste consiste à déconvoluer le signal tissulaire avec une entrée artérielle comme il a été présenté dans le chapitre 4. Cependant les méthodes de déconvolution sont très sensibles au bruit. La déconvolution par SVD est en cours d'implémentation sur le logiciel de traitement de données mais nécessite encore des ajustements pour qu'elle soit moins dépendante des paramètres d'entrées, notamment pour les courbes tissulaires provenant des acquisitions synchrotrons. Ne pouvant pas mesurer d'entrée artérielle sur les acquisitions IRM, elle pourrait être modélisée en modifiant l'entrée artérielle mesurée par synchrotron et corrigée de la largeur à mi-hauteur avec la même méthode que celle implémentée pour les courbes sur les ROI du cerveau, la statistique sur ces courbes étant assez conséquente avec 9 rats.

Si les courbes de suivi de bolus sont très sensibles à cette viscosité, cela devrait être moins le cas pour les analyses en steady-state, dont la dispersion de l'agent de contraste est déjà réalisée par l'injection lente.

Seul le modèle gamma a pu être utilisé dans cette étude. Cependant il serait intéressant de pouvoir tester d'autres modèles acceptant une lésion de la barrière hémato-encéphalique pour comparer les deux méthodes d'imagerie avec un modèle pharmacocinétique plus approprié.

Des mesures sur fantôme ont aussi été tentées pour comparer les deux modalités d'imagerie durant mon stage de master et celui de M.Vincent. Cependant des difficultés techniques subsistent pour caractériser correctement ces fantômes. Les résultats sont présentés en annexe.

Les courbes tissulaires mesurées par synchrotron (mg/ml) sont proches de celles mesurées par IRM (s^{-1}). Une fois corrigé de la largeur à mi-hauteur (dont la différence a été supposé du à la différence de viscosité des produits contenant les agents de contraste), on observe que la relation entre les deux signaux est linéaire. Si ceci est exact, cela validerait l'utilisation de l'IRM et des séquences spirales pour réaliser un suivi de traitement par imagerie de perfusion.

Concernant la reproductibilité des deux méthodes, c'est-à-dire la capacité à donner des résultats identiques lors de mesures d'échantillons à priori identique. Les séquences spirales semblent plus reproductibles pour les mesures de CBV sur les régions d'intérêt du cerveau (16 % contre 25,2 %, plus la valeur est faible, plus la mesure est reproductible). Concernant les CBF c'est l'inverse : 21.7% contre 17.3 %. Concernant les mesures sur la tumeur normalisées au controlatéral,

la reproductibilité en IRM semble meilleure : 10.1 % contre 24.7 % pour le CBV et 15.7 % contre 31.1 % pour le CBF (respectivement acquisitions spirales et synchrotrons). Les analyses de suivi de traitement utilisent en général ce type de mesure de barres d'erreurs groupes par groupes.

Concernant les erreurs de mesure rat par rat pour les mesures sur la région d'intérêt cerveau entier, les mesures synchrotron semblent plus précises.

La reproductibilité est dépendante de l'injection, contrairement à la précision. On peut se demander si le fait d'avoir une viscosité importante limite la reproductibilité. Ou est-ce le fait que l'animal soit dans une position verticale ? Il semble important de pouvoir effectuer une prochaine série de mesure avec des agents de contrastes de viscosités identiques.

Au vue de cette étude, l'utilisation d'un IRM pour réaliser des mesures de perfusion dans l'optique d'un suivi de traitement semble être suffisante dans les conditions testées malgré la difficulté de faire le lien entre le signal et la concentration en agent de contraste. Dans le chapitre suivant sont décrits les suivis de traitement réalisés sur les expériences décrites dans le chapitre 3. Les séquences spirales n'ont pas pu être utilisées car elles n'étaient pas encore implémentées sur les IRM. Des séquences EPI ont donc été utilisées. Lors des séquences d'imagerie, les mesures de perfusions en suivi de bolus ont été réalisées après une première injection d'agent de contraste et donc, l'agent de contraste injecté ne passe pas ou peu la barrière hémato-encéphalique. Les séquences EPI amènent donc à des résultats proches de ceux des séquences spirales.

- Adam, J. F., H. Elleaume, et al. (2003). "Absolute cerebral blood volume and blood flow measurements based on synchrotron radiation quantitative computed tomography." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism **23**(4): 499-512.
- Adam, J. F., C. Nemoz, et al. (2005). "High-resolution blood-brain barrier permeability and blood volume imaging using quantitative synchrotron radiation computed tomography: study on an F98 rat brain glioma." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism **25**(2): 145-153.
- Ahn, C. B., J. H. Kim, et al. (1986). "High-speed spiral-scan echo planar NMR imaging .1." Ieee Transactions on Medical Imaging **5**(1): 2-7.
- Barbier, E. L., J. A. den Boer, et al. (1999). "A model of the dual effect of gadopentetate dimeglumine on dynamic brain MR images." Jmri-Journal of Magnetic Resonance Imaging **10**(3): 242-253.
- Bate, H., S. Rowlands, et al. (1973). "Influence of diffusion on dispersion of indicators in blood-flow." Journal of Applied Physiology **34**(6): 866-872.
- Beaumont, M., L. Lamalle, et al. (2007). "Improved k-space trajectory measurement with signal shifting." Magnetic Resonance in Medicine **58**(1): 200-205.
- Beaumont, M. (2007). Développements en imagerie RMN spirale et application à la caractérisation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique sur deux modèles de tumeurs intracérébrales. Grenoble, Université Grenoble I - Joseph Fourier.
- Block, K. T. and J. Frahm (2005). "Spiral imaging: A critical appraisal." Journal of Magnetic Resonance Imaging **21**(6): 657-668.
- Calamante, F., D. G. Gadian, et al. (2000). "Delay and dispersion effects in dynamic susceptibility contrast MRI: Simulations using singular value decomposition." Magnetic Resonance in Medicine **44**(3): 466-473.
- Delattre, B. M. A., R. M. Heidemann, et al. (2010). "Spiral demystified." Magnetic Resonance Imaging **28**(6): 862-881.

- Elleaume, H., A. M. Charvet, et al. (2000). "In vivo K-edge imaging with synchrotron radiation." Cellular and Molecular Biology **46**(6): 1065-1075.
- Herman, G. T., R. W. Lewitt, et al. (1989). SNARK89, Medical Image Processing Group, department of radiology, University of Pennsylvania. USA.
- Kiselev, V. G. (2001). "On the theoretical basis of perfusion measurements by dynamic susceptibility contrast MRI." Magnetic Resonance in Medicine **46**(6): 1113-1122.
- Kiselev, V. G., R. Strecker, et al. (2005). "Vessel size imaging in humans." Magnetic Resonance in Medicine **53**(3): 553-563.
- Klarhofer, M., M. Barth, et al. (2002). "Comparison of multi-echo spiral and echo planar imaging in functional MRI." Magnetic Resonance Imaging **20**(4): 359-364.
- Korporaal, J. G., C. A. van den Berg, et al. (2011). "Phase-based arterial input function measurements in the femoral arteries for quantification of dynamic contrast-enhanced (DCE) MRI and comparison with DCE-CT." Magn Reson Med **66**(5): 1267-74.
- Mansfield, P. (1977). "Multi-planar image-formation using nmr spin echoes." Journal of Physics C-Solid State Physics **10**(3): L55-L58.
- Meyer, C. H., B. S. Hu, et al. (1992). "Fast spiral coronary-artery imaging." Magnetic Resonance in Medicine **28**(2): 202-213.
- Pannetier, N., B. Lemasson, et al. (2011). "Vessel size index measurements in a rat model of glioma: comparison of the dynamic (Gd) and steady-state (iron-oxide) susceptibility contrast MRI approaches." NMR Biomed.
- Pannetier, N. (2010). Développement méthodologique en IRM pour la mesure de la perfusion cérébrale. Grenoble, Université de Grenoble.
- Pollard, V. and D. S. Prough (1996). "Cerebral near-infrared spectroscopy: A plea for modest expectations." Anesthesia and Analgesia **83**(4): 673-674.
- Pollard, V., D. S. Prough, et al. (1996). "Validation in volunteers of a near-infrared spectroscope for monitoring brain oxygenation in vivo." Anesthesia and Analgesia **82**(2): 269-277.

6. Suivi de traitement minifaisceaux par imagerie IRM:

Dans ce chapitre sont présentés les résultats du suivi des rats traités par minifaisceaux présentés dans le chapitre 3. Le suivi de traitement a consisté en l'imagerie anatomique et de perfusion de la tumeur en fonction du temps.

Pour rappel les différents groupes de rats toutes expériences confondues sont les suivants :

- Témoins (non traités)
- Minifaisceaux 15 Gy
- Minifaisceaux 15 Gy + irradiation panencéphalique 10 Gy
- Minifaisceaux 25 Gy
- Minifaisceaux 25 Gy + irradiation panencéphalique 10 Gy
- Minifaisceaux 35 Gy
- Minifaisceaux 50 Gy
- Minifaisceaux 54 Gy

Les doses sont les doses prescrites à la tumeur dans le cas des irradiations minifaisceaux. Dans le cas de l'irradiation panencéphalique il s'agit de la dose à 1 cm de profondeur. Les volumes et conditions d'irradiations sont détaillés dans le chapitre 3.

Le suivi de traitement en suivi de bolus a été réalisé en IRM avec des séquences EPI et le modèle de la variable gamma. Ces séquences et modèles ne sont pas les plus adaptés mais il s'agit des seules disponibles et d'utilisation suffisamment robuste à l'époque des expériences.

6.1 Protocole d'imagerie pour réaliser le suivi :

Les protocoles d'imagerie pour réaliser le suivi de traitement diffèrent entre l'expérience avec une irradiation minifaisceaux 54 Gy à la tumeur et avec l'expérience sur l'escalade de dose. Les raisons sont purement logistiques. Le nombre de groupes étant beaucoup plus important pour l'escalade de dose, il a fallu raccourcir le temps d'acquisition IRM par rat. Les acquisitions ont été réalisées sur un IRM 7 T (Advance III systems) avec un couple d'antenne volumique/surfacique (émission/réception).

Les protocoles d'imageries sont les suivants :

Partie commune à tous les groupes :

1-Anesthésie de l'animal : induction de l'anesthésie par inhalation d'isoflurane 5% dans un mélange air/O₂ (fraction inspirée en O₂=30 %) puis maintien de l'anesthésie par inhalation d'isoflurane 2% dans le même mélange.

2-Pose d'un cathéter dans la veine de la queue pour injections à distance d'agents de contraste IRM (l'animal devant rester dans la même position dans l'IRM).

3-Mise en place du rat dans le berceau (position ventrale) pour une durée de 15 min dans l'IRM.

4-Imagerie de repérage pour positionnement, carte de champ et homogénéisation du champ magnétique sur la zone de mesure.

5-Imagerie pondérée T_2 pour imagerie anatomique (TR = 4000 ms, TE = 33 ms, taille de la matrice = 256 x 256). Le champ de vue est de 4 x 4 cm^2 pour l'expérience « minifaisceaux 54 Gy » et de 3 x 3 cm^2 pour l'expérience « escalade de dose ».

6-Carte de diffusion pour différenciation de la tumeur, des zones d'œdème et nécrotiques (séquence EPI, 3 directions orthogonales, $b = 1000 \text{ s/mm}^2$ + référence ($b = 0 \text{ s/mm}^2$), champ de vue = 3 x 3 cm^2 , taille de la matrice = 128 x 128).

Protocole de suivi de traitement pour les groupes de l'expérience « minifaisceaux 54 Gy » :

7a-Acquisition d'extravasation de l'agent de contraste en steady-state (injection de produit de contraste et suivi à l'équilibre, voir chapitre 4) : DCE (Dynamic contrast enhanced), succession d'image pondérée T_1 (TR = 500 ms, TE = 4.81 ms, champ de vue = 3 x 3 cm^2 , taille de la matrice = 128 x 128). La résolution temporelle est d'une image toute les 15 secondes, pendant 15 min. Après l'acquisition de 4 images (pour constituer une ligne de base soustraite aux valeurs suivantes) 200 $\mu\text{mol/kg}$ de Gd-DOTA (Dotarem®) ont été injectés dans le prolongateur manuellement en 2-3 secondes, suivi de 0.5 ml de sérum physiologique en guise de flush.

Protocole de suivi de traitement pour les groupes de l'expérience « escalade de dose » :

7b-Image pondérée T_1 avant et après cinq minutes après injection de 200 $\mu\text{mol/kg}$ de Gd-DOTA (TR = 800 ms, TE = 4.2 ms, champs de vue : 3 x 3 cm^2 , taille de la matrice : 128 x 128).

Imagerie de perfusion en suivi de bolus commune à tous les groupes :

8- Imagerie DSC (Dynamic Susceptibility Contrast) telle que présentée au chapitre 5. Ces acquisitions ont été réalisées en séquence EPI et non en séquence spirale qui n'était pas encore disponibles. La tumeur étant préalablement chargée en agent de contraste, les séquences spirales ont un intérêt moindre puisqu'il n'y a pas ou peu d'extravasation supplémentaire par rapport à la première injection, donc pas de modification importante du T_1 lors du suivi de bolus. Des images pondérées T_2^* sont acquises toutes les 0.5 s pendant 3 min. (séquence EPI, TR = 250 ms, TE = 11.20 ms, FOV = 3 x 3 cm^2 , taille de la matrice = 128 x 128). Après l'acquisition de 30 images, 200 $\mu\text{mol/kg}$ de Gd-DOTA sont injectés manuellement en 2-3 secondes suivi de 0.5 ml de sérum physiologique en guise de flush.

9-Réveil de l'animal.

Analyse des résultats :

Les ROIs sur lesquelles ont été effectuées les mesures ont été réalisées sur les cartes de diffusion (ADC), sur la coupe où la tumeur est la plus large. Une ROI représente le contour de la tumeur totale, une autre ROI représente l'équivalent côté controlatéral. Dans le cas de l'expérience avec l'irradiation de 54 Gy à la tumeur, une autre ROI a été dessinée autour d'une zone tumorale

ressortant en hyperdiffusion. Les valeurs fonctionnelles moyennes (CBV, CBF, ADC, etc ...) des ROIs sont mesurées, puis la valeur de chaque ROI tumeur est normalisée par celle de la ROI controlatérale, rat par rat. Les valeurs fonctionnelles aberrantes ont été supprimées (>4 fois la valeur moyenne). Celles-ci peuvent être du à la normalisation par le controlatérale qui peut être très compressé par l'hémisphère où il y a la tumeur lorsque celle-ci a un volume important. Du fait de la compression les valeurs fonctionnelles dans cet hémisphère peuvent être modifiées. Les valeurs moyennes et les écart-types des paramètres sont alors calculés pour tous les rats d'un groupe, pour tous les groupes. L'estimation du volume tumoral est réalisée par la mesure de l'aire de la ROI tumeur et est appelée index de taille tumorale (en mm²).

La mesure DCE (acquisition à l'équilibre, 7a) a été traitée comme suit : le signal des quatre premières images a été moyenné pour obtenir la valeur du niveau de base (appelé base), pour chaque pixel. Le maximum de la courbes T₁ en fonction du temps est détecté. Le pourcentage d'augmentation du signal est alors défini comme égal à : (valeur au pic – base)/base*100.

L'estimation des paramètres de perfusion est réalisée par un ajustement des courbes tissulaires temporelles par une variable gamma comme décrit dans les chapitres 4 et 5.

6.2 Résultats du suivi de traitement :

6.2.1 Irradiation minifaisceaux 54 Gy :

Ci-dessous un rappel des résultats de survie de cette expérience :

| Groupe | Témoin | 54 Gy |
|----------------|----------------|---|
| Survie moyenne | 23.3 ± 2 jours | 49 ± 12.5 jours (%ILS _{moyenne} = 110 %) |
| Survie médiane | 23 jours | 45 jours (%ILS _{médiane} = 90 %) |

Dans le cas du suivi de traitement pour les groupes de l'expérience « minifaisceaux 54 Gy », les IRM ont été réalisés à 4, 12, 21 et 31 jours après irradiation. Le nombre de rat imagé par groupe et temps est indiqué sur les figures de la section. Il peut changer en fonction du décès de certains rats ou de problèmes techniques durant la séquence d'imagerie.

Sur la figure 102 est représentée l'estimation de la taille de la tumeur en fonction du nombre de jours écoulés depuis l'implantation.

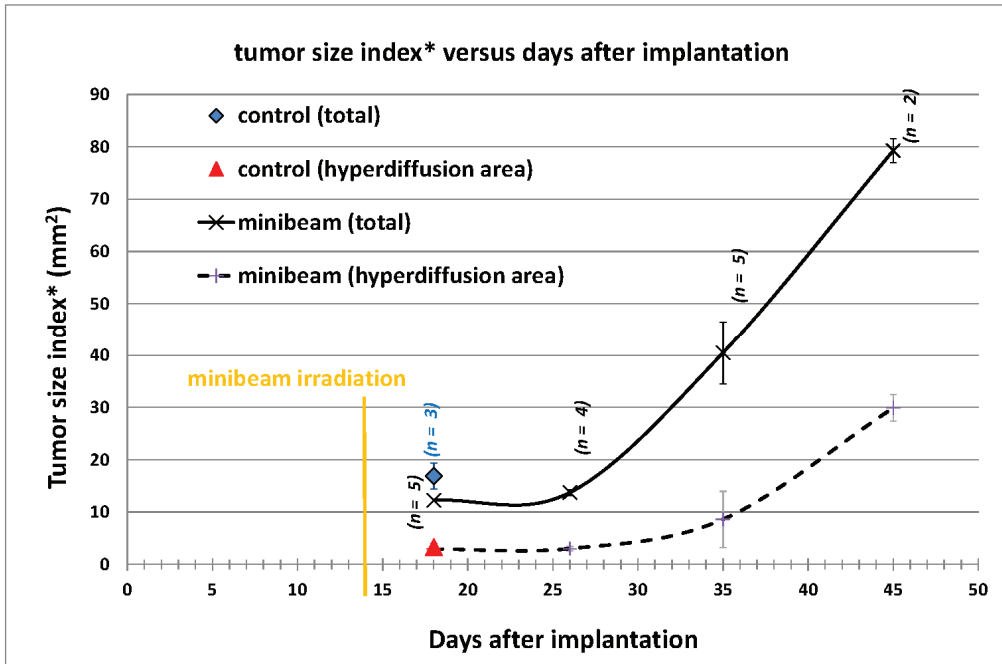


Figure 102 : Index de taille de tumeur en fonction du nombre de jours après l'implantation. En trait plein la mesure du volume total de la tumeur pour le groupe traité par minifaisceaux. En trait pointillé la mesure d'une zone interne à la tumeur apparaissant en hyperdiffusion pour le groupe traité par minifaisceaux. Le triangle rouge et le losange bleu correspondent aux points de mesures identiques sur le groupe témoin.

On y observe un arrêt de la progression du volume tumoral d'environ 12 jours alors que celui-ci est censé croître exponentiellement. Passé ces 12 jours, la croissance tumorale repart.

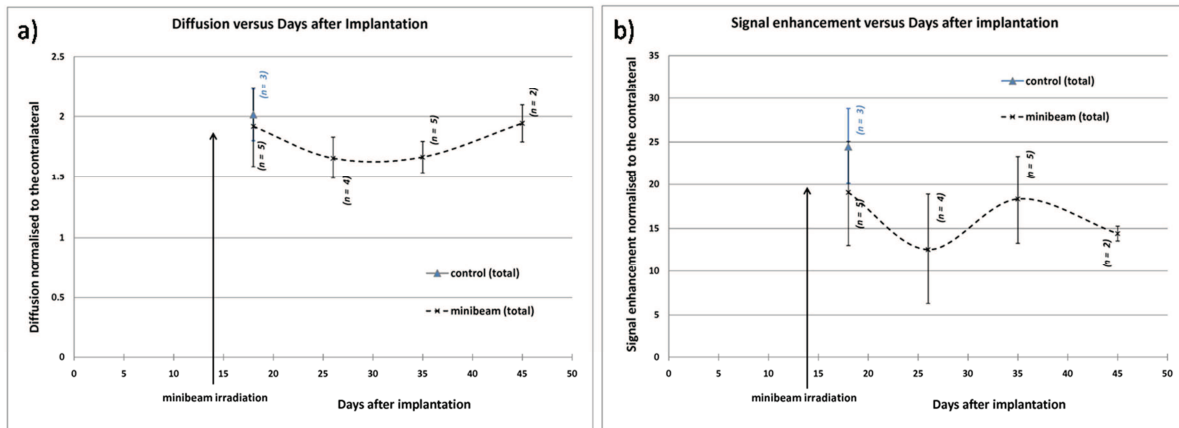


Figure 103 : a) diffusion dans la tumeur normalisée au controlatéral en fonction du temps. b) Pourcentage d'augmentation du signal lors de l'injection d'un agent de contraste, normalisé au controlatéral, en fonction du temps.

Sur la figure 103a on observe que l'ADC a tendance à décroître après l'irradiation avant d'augmenter à nouveau, à peu près à la même période que la reprise de la croissance tumorale. Le pourcentage d'augmentation du signal T_1 dû à l'extravasation de l'agent de contraste ne présente pas de tendance particulière en fonction du temps au vu des barres d'erreur (figure 103b).

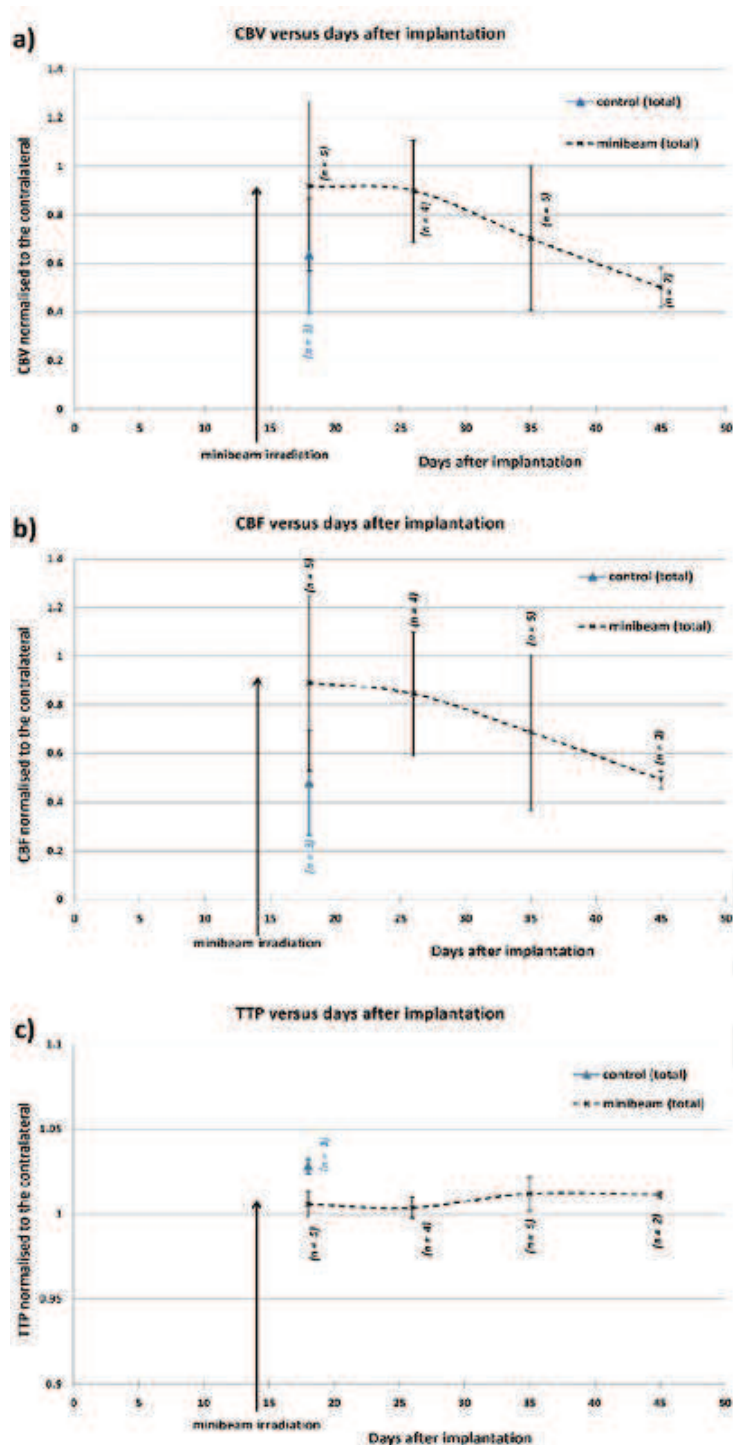


Figure 104 : valeurs des paramètres de perfusion mesurées dans la tumeur, normalisées au controlatéral, en fonction du temps. a) volume sanguin (CBV), b) débit sanguin (CBF), c) Time to Peak (TTP)

La figure 104 représente l'évolution des paramètres de perfusion mesurés dans la tumeur, normalisés par le controlatéral en fonction du temps. Les barres d'erreurs sont importantes du fait du faible nombre de rats et mais surtout de l'hétérogénéité du modèle tumoral F98. Les paramètres de perfusion ont tendance à rester stables pendant la phase d'arrêt de la croissance tumorale, puis le CBV et le CBF décroissent à nouveau, tandis que le temps au pic augmente. Ceci est cohérent avec le fait que la croissance tumorale est caractérisée par une croissance d'un cœur nécrotique non perfusé. Les valeurs en fin de vie des rats traités tendent vers les valeurs mesurées sur les rats témoins peu de temps avant leur mort.

6.2.2 Escalade de dose :

Ci-dessous un rappel des résultats de survie de cette expérience :

| Groupe | Moyenne | Ecart-type | %ILS _{moyenne} | Médiane | %ILS _{médiane} |
|--------|---------|------------|-------------------------|---------|-------------------------|
| Témoin | 27.2 | 2.58 | 0 | 27 | 0 |
| 15 Gy | 44.25 | 2.77 | 62.7 | 47 | 74.07 |
| 25 GY | 52.71 | 3.17 | 93.79 | 57 | 111.11 |
| 35 Gy | 76.43 | 12.07 | 180.99 | 77 | 185.19 |
| 50 Gy | 113.43 | 20.97 | 317.02 | 113 | 318.52 |

Dans le cas du suivi de traitement pour les groupes des expériences escalade de dose, et minifaisceaux + cerveau entier, les IRM ont été réalisés à 22, 35, 53, 70, 88, 90, 115 jours après implantation (soit 8, 21, 39, 56, 74, 86, 101 jours après irradiation). Le nombre de rat est initialement de 3 par groupes, et évolue en fonction de leur mort et des valeurs aberrantes exclues.

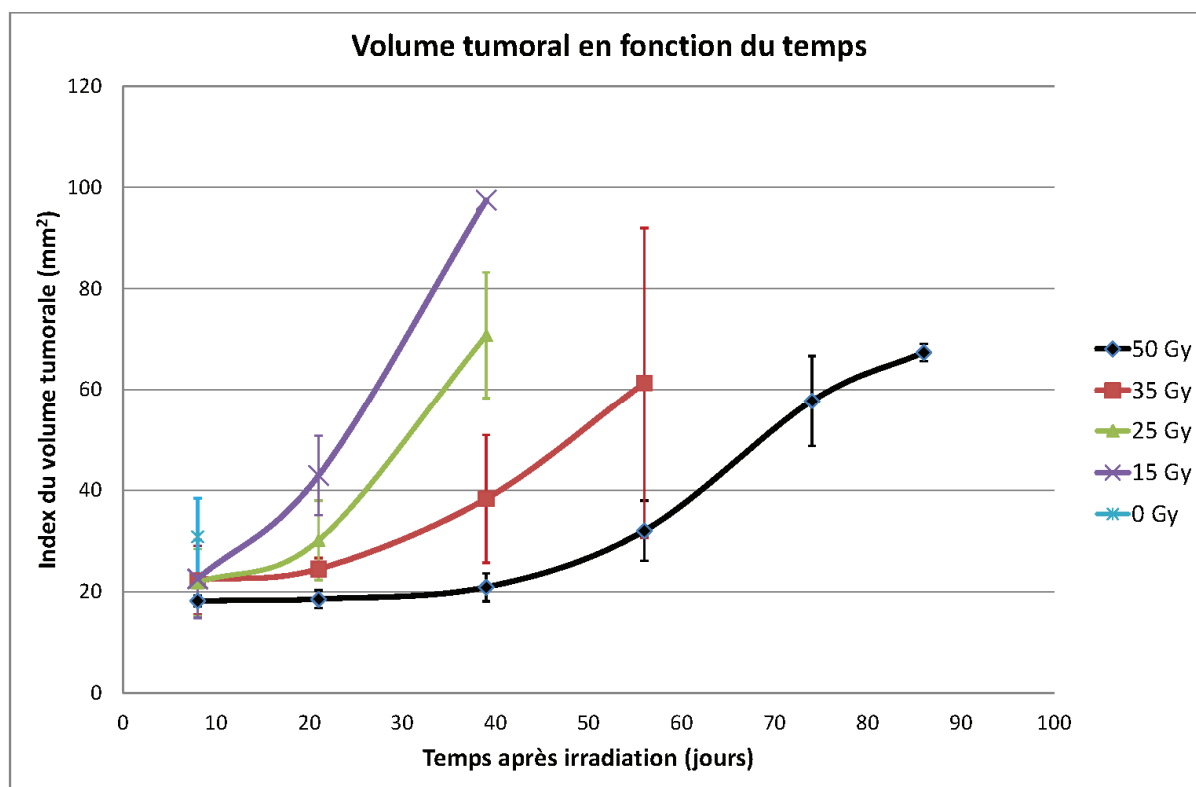


Figure 105 : Index de taille de tumeur en fonction du nombre de jours après irradiation

Sur la figure 105 sont représentés les index de volumes tumoraux des différents groupes de rats. Plus la dose délivrée à la tumeur est importante, plus la stagnation du volume tumoral est importante. On observe les périodes de stabilisation de la croissance tumorale suivantes :

- 15 Gy : 0 jours
- 25 Gy : ≈ 7 jours
- 35 Gy : ≈ 10 jours
- 50 Gy : ≈ 30 jours

La stagnation de la croissance tumorale observée pour la dose 50 Gy est nettement plus importante que celle observée précédemment avec une dose de 54 Gy. Si la différence de dose ne semble pas pouvoir expliquer cette différence de résultat, la différence de volume irradié pourrait l'expliquer. En effet dans l'expérience où ont été déposés 54 Gy le volume irradié était de $7 \times 7 \times 7.8 \text{ mm}^3$ tandis que dans l'expérience où ont été déposés 50 Gy, il était de $8 \times 8 \times 10 \text{ mm}^3$.

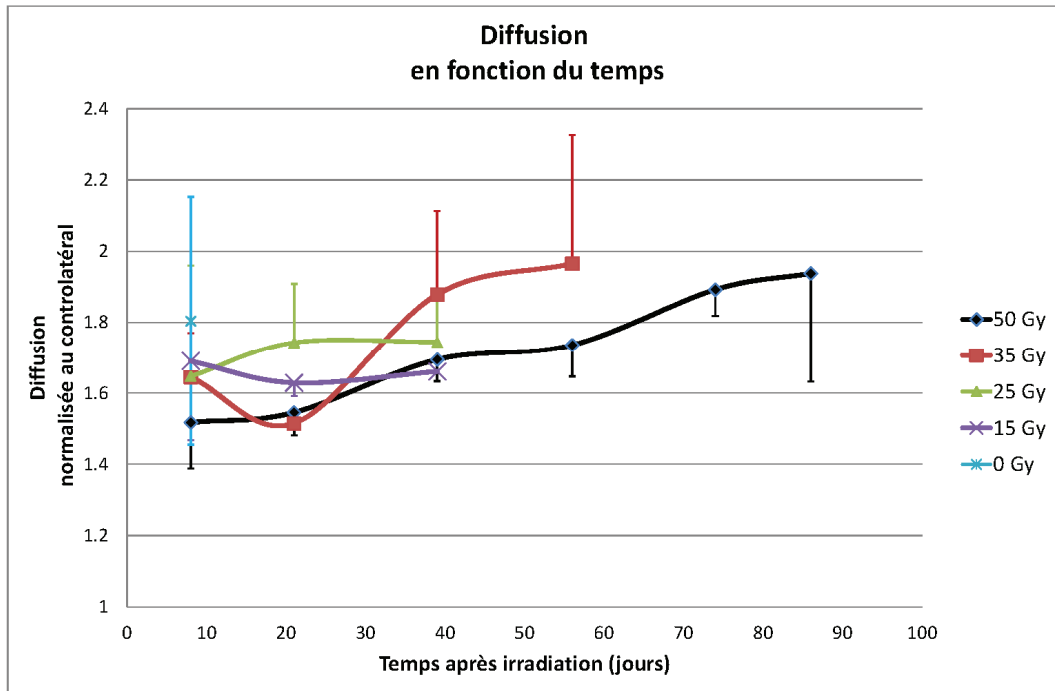


Figure 106 : diffusion dans la tumeur normalisée au controlatéral en fonction du temps.

Malgré l'importance des barres d'erreur qui empêchent de tirer des conclusions définitives, il semble que la diffusion augmente globalement en fonction du temps (figure 106). Ceci est cohérent avec l'aspect très nécrotique, et l'existence de zone de type « liquidienne » (et donc fortement diffusible) qui ont été observées en fin de vie en histologie (chapitre 3).

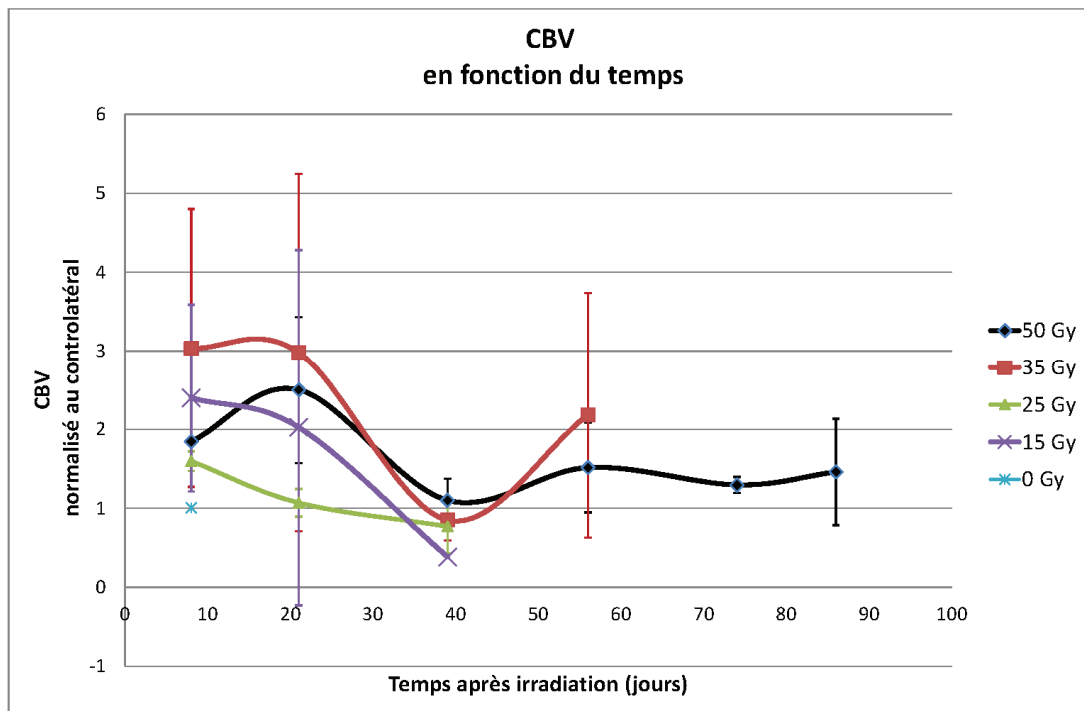


Figure 107 : Volume sanguin (CBV) mesurées dans la tumeur, normalisées au controlatéral, en fonction du temps.

Les volumes sanguins tumoraux, normalisés au controlatéral sont représentés sur la figure 107. Ceux-ci semblent décroître après une stagnation d'une dizaine de jour, mais l'importance des barres d'erreurs empêchent à nouveau toute conclusion définitive et ceux ne sont là que des tendances. Dans le cas du groupe avec la dose à la tumeur de 50 Gy, qui a la survie la plus longue, il semble que la valeur du CBV normalisé, stagne aux alentours de 1 au bout d'un moment.

L'hypothèse est que le CBV important dans les zones tumorales est moyenné par les zones de nécroses où le CBV est proche de 0.

Il ne ressort aucune tendance en fonction du temps des autres paramètres de perfusions.

6.2.3 Irradiation « protocole clinique de radiothérapie stéréotaxique » :

Ci-dessous un rappel des résultats de survie de cette expérience :

| Groupe | Moyenne | Ecart-type | %ILS _{moyenne} | Médiane | %ILS _{médiane} |
|-----------|---------|------------|-------------------------|---------|-------------------------|
| 15 Gy | 44.25 | 2.77 | 62.7 | 47 | 74.07 |
| 15 Gy + W | 52.71 | 3.31 | 93.79 | 52 | 92.59 |
| 25 Gy | 52.71 | 3.17 | 93.79 | 57 | 111.11 |
| 25 Gy + W | 66.86 | 4.22 | 145.81 | 66 | 144.44 |
| 35 Gy | 76.43 | 12.07 | 180.99 | 77 | 185.19 |

Dans le cas du suivi de traitement pour les groupes des expériences escalade de dose, et minifaisceaux + panencéphale, les IRM ont été réalisées à 8, 21, 39, 56, 74, 86, 101 jours après irradiation.

Sur la figure 108 sont représentés les index de volumes tumoraux des différents groupes de rats. Le nombre de rat est initialement de 3 par groupes. On retrouve la même conclusion que dans l'étude précédente, plus la dose délivrée à la tumeur est importante, plus la stagnation du volume tumorale est importante. On observe les périodes de stabilisation de la croissance tumorale suivante :

- 15 Gy : 0 jours
- 25 Gy : ≈ 7 jours
- 15 Gy + 10 Gy cerveau entier: ≈ 7 jours
- 35 Gy : ≈ 10 jours
- 25 Gy + 10 Gy cerveau entier : ≈ 7 jours

De même que pour la survie des animaux, on observe des comportements identiques entre les groupes 35 Gy minifaisceaux et 25 Gy minifaisceaux + 10 Gy panencéphale, et pour les groupes 25 Gy minifaisceaux et 15 Gy minifaisceaux + 10 Gy panencéphale.

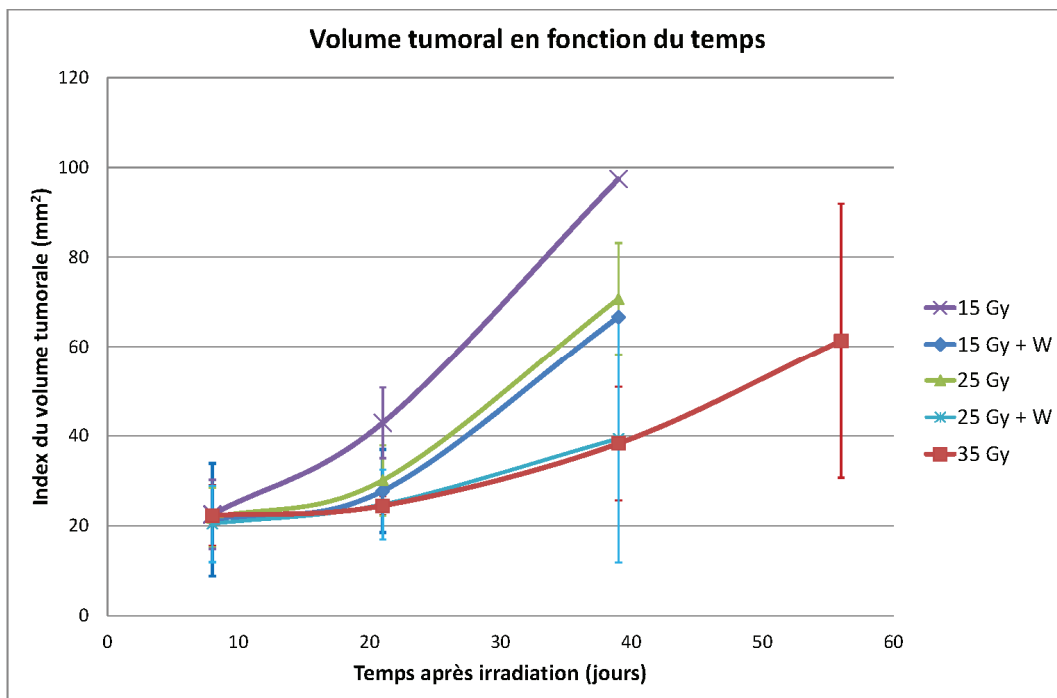


Figure 108 : Index de taille de tumeur en fonction du nombre de jours après irradiation

Le coefficient de diffusion apparent dans la tumeur, normalisé au controlatéral, ne semble pas évoluer en fonction du temps, sauf pour le groupe 35 Gy où comme il a été vu, il a tendance à augmenter (figure 109). Cette augmentation étant tardive, il est possible que les animaux suivis dans les autres groupes n'aient pas survécu assez longtemps pour présenter la même augmentation de la diffusion.

L'évolution du volume sanguin cérébrale, représenté figure 110, montre une tendance à la décroissance pour tous les groupes.

Il ne ressort aucune tendance en fonction du temps des autres paramètres de perfusion.

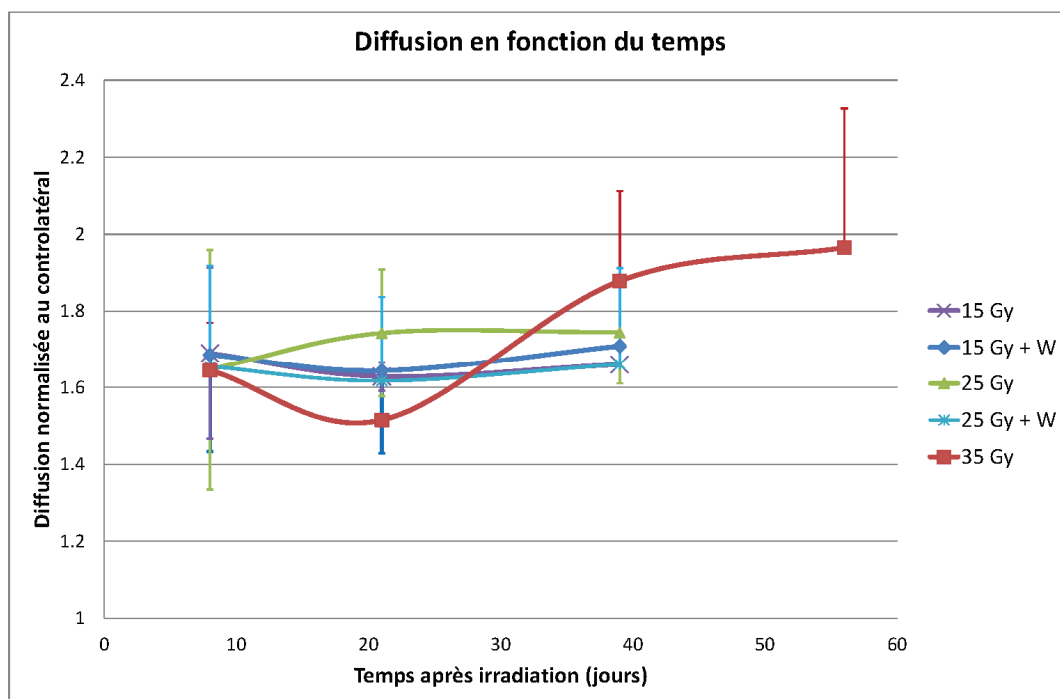


Figure 109 : diffusion dans la tumeur normalisée au controlatéral en fonction du temps.

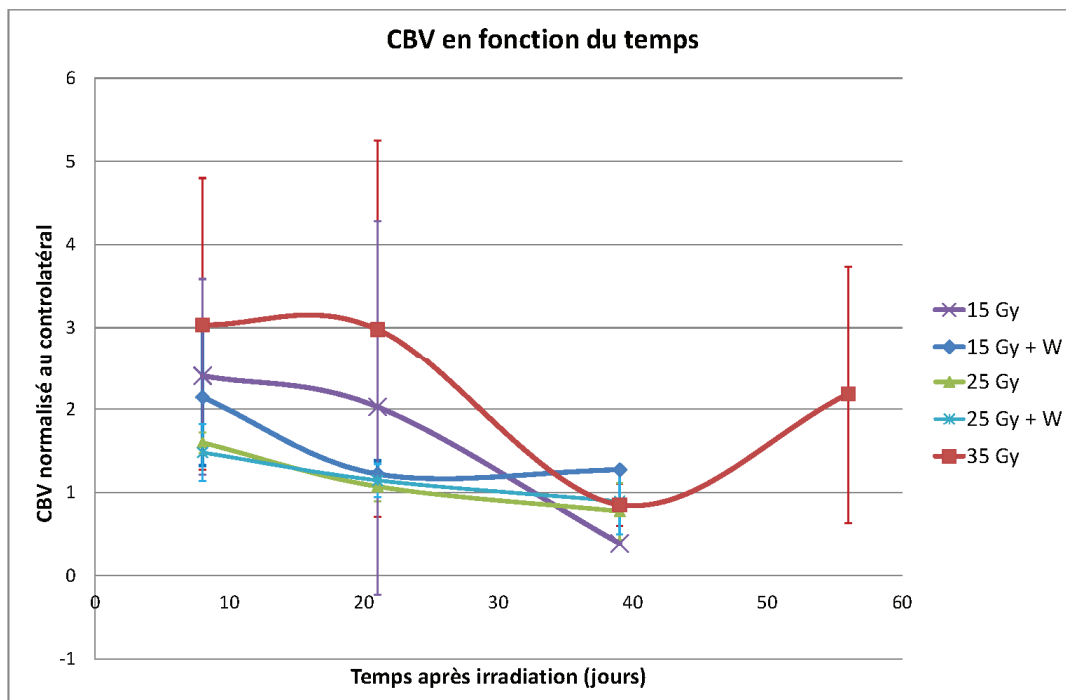


Figure 110 : Volume sanguin (CBV) mesurés dans la tumeur, normalisés au controlatéral, en fonction du temps.

6.3 Discussion :

Les mesures des volumes tumoraux et des paramètres fonctionnels tel que le coefficient de diffusion apparent et le volume sanguin cérébral, corrèle avec les survies obtenues dans le chapitre 3. A savoir, si l'augmentation de la dose permet d'augmenter la survie des animaux, la tumeur évolue toujours de la même façon, c'est-à-dire un volume très important et une nécrose très importante en fin de vie. Il n'y a pas de différence significative en fin de vie entre les différents groupes.

Les mesures de perfusions réalisées sont trop bruitées et le nombre de rats trop faible pour pouvoir tirer autre chose que des tendances. Le nombre de rat est faible parce qu'il s'agit d'expériences préliminaires concernant la mise au point de la radiothérapie par minifaisceaux monochromatique et non d'une réelle optimisation thérapeutique. L'hétérogénéité tumorale est un paramètre sur lequel il n'est pas possible d'intervenir. Le modèle F98, s'il est très intéressant d'un point de vue agressivité et infiltration, n'est peut-être pas le modèle le plus adapté au suivi de traitement par imagerie de perfusion. D'importantes zones nécrotiques et « liquidiennes » sont présentes au cours de l'évolution tumorale. De même, le traitement par minifaisceaux semble aussi augmenter la nécrose du tissu, rendant extrêmement difficile des mesures de perfusion puisque la circulation sanguine y est très altérée.

Le choix de la région d'intérêt sur laquelle on fait la mesure influence beaucoup les résultats obtenus. Dans cette étude, les ROIs ont été réalisées sur l'ensemble de la région cérébrale altérée par la tumeur, visible sur la carte du coefficient de diffusion apparent (ADC). Les ROIs englobent donc la tumeur mais aussi une partie de l'œdème. Comme on peut le voir sur la figure 111, représentant la colocalisation de différents paramètres mesurés lors du suivi IRM, ce choix de ROI peut convenir pour certains paramètres fonctionnels mais est plus discutable pour d'autres. Il n'est pas acceptable non plus de définir une région d'intérêt différente pour chaque modalité de carte. Réaliser les ROIs sur les cartes T₁ après injection de gadolinium permettrait peut-être d'obtenir de meilleurs résultats pour le suivi de traitement par mesure de perfusions. Cependant on sélectionne alors non pas toute la zone

modifiée par la tumeur mais seulement une partie. Il est aussi possible de définir des ROIs en prenant en compte plusieurs paramètres, par exemple une ROI définie sur la carte T_1 où les zones d'hyperdiffusion observées sur la carte d'ADC serait exclu car non vascularisé, le contraste ne provient que de la diffusion de l'agent de contraste des zones périphériques.

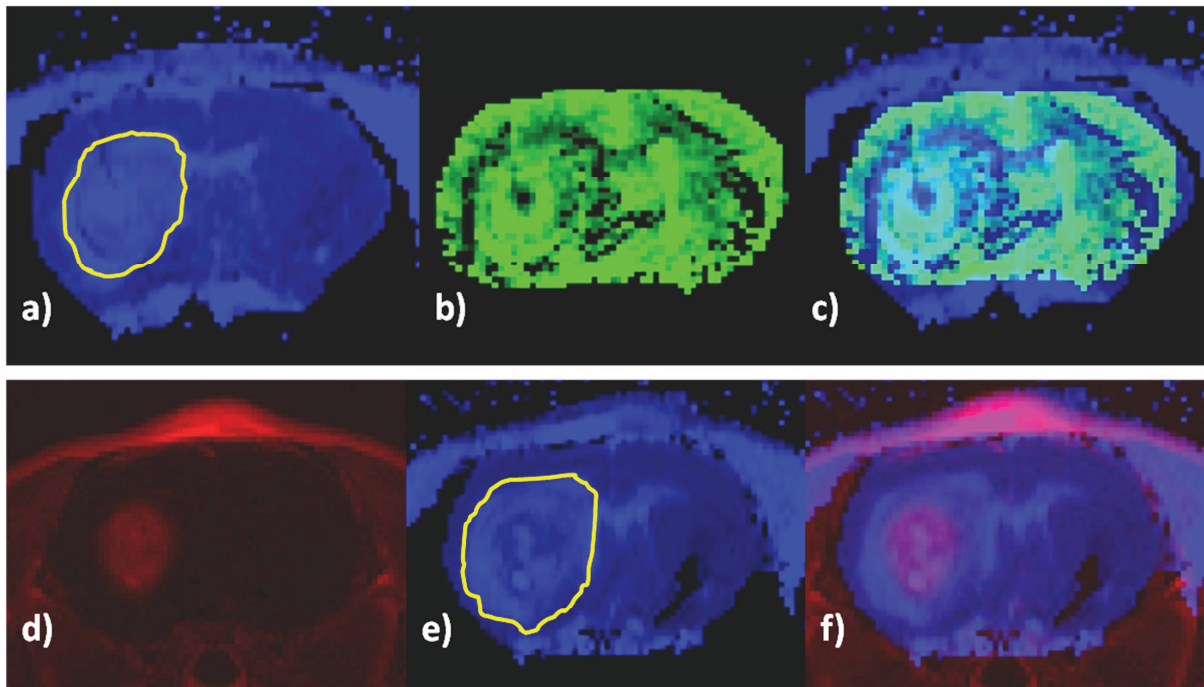


Figure 111 : Superpositions de différentes images IRM (non quantitatives, ajustement des échelles de couleur pour visualisation), le module de colocalisation a été programmé pour le logiciel uvasc. a)b)c) rat du groupe 15 Gy + irradiation cérébrale totale, 8 jours après irradiation. a) carte ADC, b) carte CBV, c) superposition ADC et CBV. d)e)f) rat du groupe 15 Gy, 8 jours après irradiation. d) Image pondérée T_1 5 min après injection d'un agent de contraste, e) carte de diffusion, f) superposition des deux. En jaune sont représentés un exemple des ROIs tracées sur les cartes d'ADC.

La mesure de la valeur moyenne d'une ROI et de son écart-type fait perdre une partie des informations. Il a été proposé des critères d'évaluation des histogrammes des ROI pour des suivis de traitement (Tofts, Benton et al. 2007; Tozer, Jaeger et al. 2007). Il s'agit notamment de la hauteur et de la localisation du pic de l'histogramme, et de la taille de la queue de l'histogramme, ou des paramètres de qualités comme le coefficient d'asymétrie, le coefficient d'aplatissement et le coefficient de variation représentés sur la figure 112 provenant du rapport de stage de Pierre Dillisenger (ancien stagiaire de l'institut des neurosciences de grenoble, équipe 5). Il y a une légère amélioration dans la distinction de groupes par rapport aux tests sur la valeur moyenne seule.

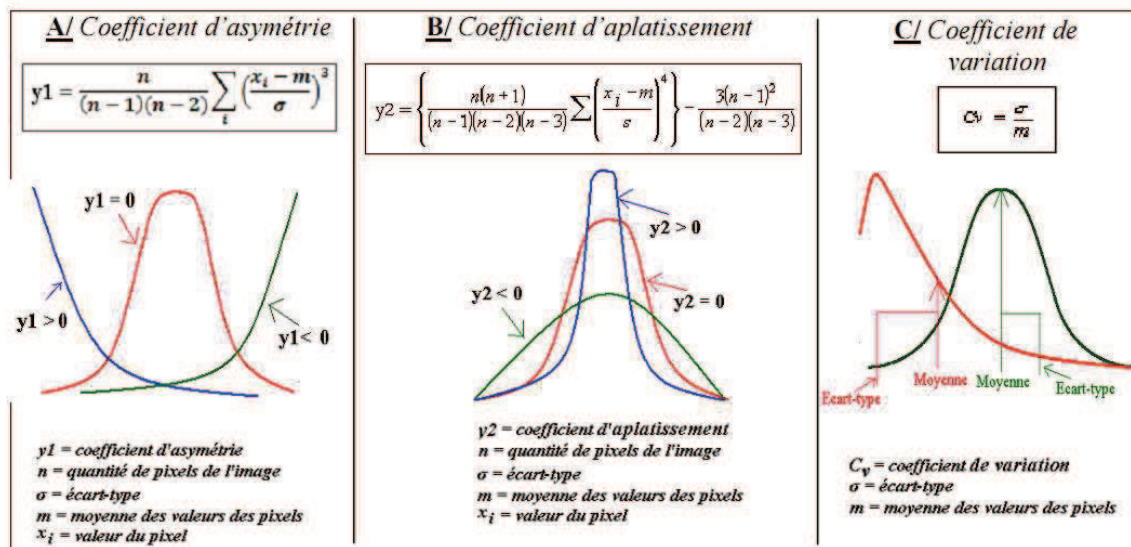


Figure 112 : Figure provenant du rapport de Pierre Dillisenger, ancien stagiaire de l'équipe 5. A) coefficient d'asymétrie, B) coefficient d'aplatissement, C) coefficient de variation.

Galbán *et al* proposent quand à eux de comparer l'ensemble des pixels de la région d'intérêt avant et après traitement et de réaliser une régression linéaire dessus (Galban, Chenevert et al. 2009) (figure 110). L'étude qu'il propose se base alors sur 3 facteurs, les histogrammes du volume sanguin cérébral aux différents temps du traitement, la carte paramétrique du CBV (après recalage des cartes aux différents temps, les valeurs des pixels sont soustraites), et sur une régression linéaire des valeurs des pixels du volume sanguin après traitement en fonction de ceux avant traitement. Cette étude nécessite de pouvoir recalibrer les images des différentes acquisitions au cours du suivi de traitement puisque les pixels se retrouvant dans les deux régions d'intérêt tumeur sont soustraits d'une carte paramétrique à l'autre. Le recalage nécessaire à cette méthode est d'ailleurs la difficulté de cette méthode, notamment lors d'étude chez le rongeur, où peu d'algorithmes de recalage sont disponibles et où la fiabilité a été éprouvée. L'étude paramétrique a pu prédire de façon significative la survie des patients tandis que l'analyse sur la valeur moyenne des ROIs non.

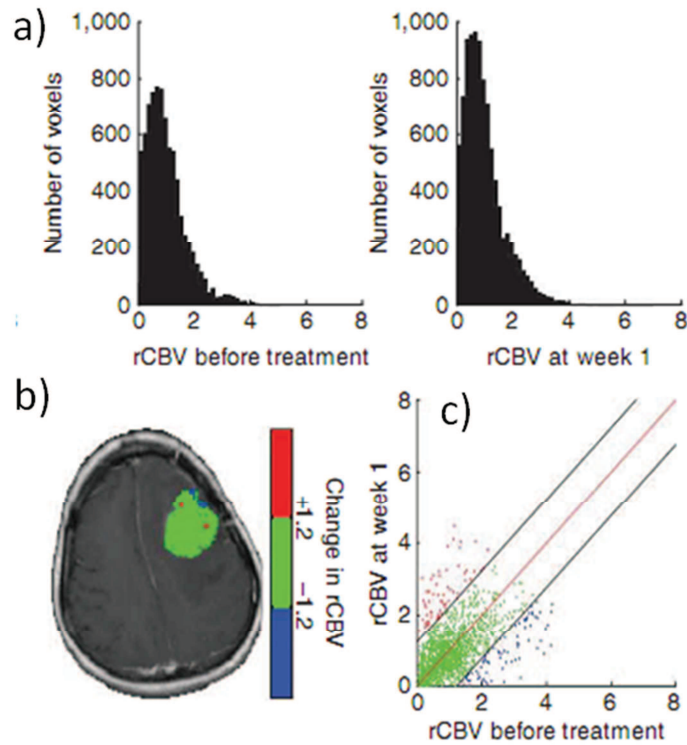


Figure 113 : Figure d'après (Galban, Chenevert et al. 2009). A) histogramme du volume sanguin cérébrale dans la tumeur avant traitement et une semaine après. B) carte paramétrique du changement du volume sanguin dans la tumeur (rCBV après – rCBV avant). C) Régression linéaire des rCBV après traitement en fonction du rCBV avant traitement.

Ce genre d'étude sur histogramme permettrait de traiter de façon plus complète les données sur des cas de tumeur très hétérogènes comme c'est le cas pour les tumeurs F98 utilisées dans la thèse. Elles sont de plus moins sensibles au bruit de mesure, qui comme il a été vu est important pour les mesures de perfusion, même lorsqu'on utilise des séquences d'imageries optimales.

Les résultats de l'histologie avaient montré que l'ensemble de côté irradié dans l'expérience d'escalade de dose était plus clair en coloration H/E que le côté controlatéral, laissant supposer un œdème péri tumoral important. Cependant au vu du volume qu'occupe la tumeur, et de la basse résolution des acquisitions de diffusions, il n'est pas possible de dessiner des régions d'intérêts autour de la tumeur sur les cartes ADC. Si l'on souhaite observer l'évolution de cet œdème peritumoral, comment il se forme, etc ... il faudrait réaliser des analyses histologiques post euthanasie à différent temps..

Les études d'escalade de dose ont permis cependant de définir que les phénomènes mises en jeu après irradiations par minifaisceaux étaient peu dépendants de la dose déposée puisque qu'à part la survie, les autres paramètres semblent très proches dans tous les groupes (évolution du CBV et de la diffusion, quantité de nécrose en fin de vie et présence de l'œdème péri-tumoral). Il semble donc intéressant de réaliser une expérience avec beaucoup plus d'animaux cette fois-ci, peu importe la dose, avec un suivi IRM sur plus d'animaux, et des sacrifices pour des mesures histologiques aux mêmes dates que les séquences d'imagerie IRM. Augmenter le nombre d'animaux suivi en IRM permettrait d'améliorer la statistique sur les mesures de perfusion qui a été faible dans cette étude. Afin d'améliorer le suivi de traitement d'autres modèles pharmacocinétiques respectant l'hypothèse d'une barrière hémato-encéphalique lésée pourraient être implémentés.

Grâce à des améliorations de modalités d'examen (séquences spirales au lieu d'EPI), de traitement de données (modèles pharmacocinétiques respectant l'hypothèse d'une BHE lésée) et de choix de ROIs, des différences significatives de l'évolution des paramètres de perfusions en fonction du traitement pourraient être observés comme dans les études citées au chapitre 4 (Cao, Tsien et al. 2006; Serduc, Christen et al. 2008; De Keyzer, Vandecaveye et al. 2009; Bouchet, Lemasson et al. 2010; Cao 2011)

- Bouchet, A., B. Lemasson, et al. (2010). "Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy on intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **78**(5): 1503-1512.
- Cao, Y. (2011). "The Promise of Dynamic Contrast-Enhanced Imaging in Radiation Therapy." Seminars in Radiation Oncology **21**(2): 147-156.
- Cao, Y., C. I. Tsien, et al. (2006). "Clinical investigation survival prediction in high-grade gliomas by MRI perfusion before and during early stage of RT." International Journal Of Radiation Oncology Biology Physics **64**(3): 876-885.
- De Keyzer, F., V. Vandecaveye, et al. (2009). "Dynamic contrast-enhanced and diffusion-weighted MRI for early detection of tumoral changes in single-dose and fractionated radiotherapy: evaluation in a rat rhabdomyosarcoma model." European Radiology **19**(11): 2663-2671.
- Galban, C. J., T. L. Chenevert, et al. (2009). "The parametric response map is an imaging biomarker for early cancer treatment outcome." Nature Medicine **15**(5): 572-576.
- Serduc, R., T. Christen, et al. (2008). "Brain tumor vessel response to synchrotron microbeam radiation therapy: a short-term in vivo study." Physics in Medicine and Biology **53**(13): 3609-3622.
- Tofts, P. S., C. E. Benton, et al. (2007). "Quantitative analysis of whole-tumor Gd enhancement histograms predicts malignant transformation in low-grade gliomas." Journal of Magnetic Resonance Imaging **25**(1): 208-214.
- Tozer, D. J., H. R. Jaeger, et al. (2007). "Apparent diffusion coefficient histograms may predict low-grade glioma subtype." Nmr in Biomedicine **20**(1): 49-57.

Conclusion et Perspectives :

Le traitement des tumeurs cérébrales est un enjeu de santé publique et un domaine de recherche très actifs avec de nombreuses techniques de radiothérapie, chimiothérapie (ou la combinaison des deux) testées. Cependant en trente ans de recherche la médiane de survie n'a augmenté que de 6 mois et les traitements restent pour la plupart du temps palliatif. Les meilleurs résultats sur glioblastomes ont été obtenus par Stupp *et al.* grâce à un traitement combiné témozolomide et de radiothérapie (Stupp, Mason et al. 2005). La survie médiane obtenue avec ce traitement n'est que de 14.6 mois, alors qu'elle est de 12.1 dans le cas d'une radiothérapie seule. La principale limite de la radiothérapie de ce cas de figure, est la dose déposée dans les tissus sains environnant la tumeur. En effet la distribution de dose n'est pas encore assez précise pour atteindre des doses potentiellement curatives à la tumeur tout en restant inférieur aux doses de tolérances du tissu sain environnant qui sont de l'ordre de la dizaine de gray (Emami, Lyman et al. 1991) (Flickinger, Lunsford et al. 1992a; Niranjana and Flickinger 2008). La limite de la chimiothérapie est quant à elle de pouvoir cibler le plus spécifiquement possible les tumeurs cérébrales, et l'apport de la drogue vers les cellules tumorales. En effet le cerveau est un organe doté d'un réseau vasculaire très imperméable aux grosses molécules du fait en outre d'une jonction serrées des cellules endothéliales le composant (barrière hémato-encéphalique).

L'ensemble de ce réseau vasculaire, que ce soit la barrière hémato-encéphalique, la quantité de vaisseaux sanguins, leurs tailles et leur organisation est altéré dans les tumeurs cérébrales. Un des moyens de mesurer cette altération est la mesure de perfusion. Ces mesures consistent à suivre la concentration d'un traceur en fonction du temps dans le tissu, puis d'en déduire des paramètres sanguins tel que le volume sanguin, le débit sanguin, le temps de transit moyen, la perméabilité des vaisseaux au traceur, ... Ce type de mesure est très intéressant dans le cas des tumeurs cérébrales puisque des études montrent qu'il est possible d'en déduire, le type de gliome (pour le diagnostique), et de suivre l'évolution d'un traitement.

Dans cette thèse a été étudié un nouveau type de radiochirurgie basée sur des caractéristiques du rayonnement synchrotron, à savoir la possibilité de le monochromatiser en gardant un flux élevé, et le fait que le faisceau soit faiblement divergent. Cette technique, appelée minifaisceaux, est basé sur deux autres techniques de radiothérapie synchrotron déjà testées en préclinique, la radiothérapie par microfaisceaux (MRT), et la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT). Elles ont fournis des résultats encourageant mais ne sont pas pour autant curatives sur les essais précliniques réalisées, même si des combinaisons radiothérapie chimiothérapie ont donnés des survies intéressantes (plus de 100 jours) (Rousseau, Boudou et al. 2007a; Regnard, Brauer-Krisch et al. 2008; Le Duc, Miladi et al. 2011).

La combinaison des deux traitements, qui a été mis en place dans cette thèse, utilise donc un faisceau monochromatique fractionnée spatialement. La largeur des faisceaux utilisée est d'un ordre de grandeur supérieur à celle utilisée en MRT pour diminuer les difficultés de positionnement. Ceci permet de réaliser sans trop de contrainte de moteur et de dosimétrie, un entrelacement dans la tumeur. Avec deux incidences, on peut donc définir un volume cible homogène, et conserver le fractionnement spatial dans le tissu sain.

L'aspect dosimétrique a été étudié durant cette thèse à la fois par de la dosimétrie expérimentale sur gel polymère et par des simulations Monte Carlo réalisées sous Penelope. La

comparaison des deux méthodes est concluante (pas de différence significative) sur les expériences réalisées : irradiation d'un volume d'eau correspondant au volume d'un cerveau de rat par une ou deux incidences entrelacées. Ces études ont montré que le rendement de dose sur l'axe des faisceaux est très proche de celui prévu par la Loi de Beer-Lambert. La dose à la vallée est la principale préoccupation dans ce type d'irradiation, elle doit rester sous le seuil de tolérance du tissu sain. Le nombre de minifaisceaux par incidence est un facteur influençant de manière importante la dose à la vallée. Il a été vu qu'avec les paramètres testés dans cette thèse il est difficile d'irradier un volume supérieur à 30 cm³ avec une dose suffisamment importante pour espérer approcher des traitements curatifs. Afin de surmonter cette limite, il serait intéressant de réaliser des études avec ajout d'un élément lourd dans le volume cible pour y augmenter l'effet électrique (environ 10 % d'augmentation par mg/ml d'iode lors d'une irradiation à 80 keV en mode SSRT par exemple). Gokeri *et al.* ont fait une étude Monte Carlo sur l'augmentation de dose due à un élément lourd (Gokeri, Kocar *et al.* 2010). Ils ont choisi pour cette étude de l'or comme élément lourd (7 mg/ml dans la tumeur), un faisceau polychromatique et une géométrie d'irradiation humaine. Ils ont obtenu environ 35 % d'augmentation de dose à la tumeur. Les simulations Monte Carlo actuelles sur le sujet ne considèrent que la dose physique, et non une dose équivalente biologique prenant en compte des effets tel que l'effet dose/volume. Des études sur le sujet présentent des modélisations basées sur la théorie de sous-unité fonctionnelle, qui stipule que l'organe peut mieux résister à l'irradiation tant que quelques sous-unités ne sont pas ou peu touchées par l'irradiation (Withers, Taylor *et al.* 1988; Marks 1996; Thames, Zhang *et al.* 2004). Cette théorie semble adaptée aux conditions d'irradiation des minifaisceaux et mériterait d'être investiguée. La dosimétrie expérimentale par gels utilisée dans cette thèse est car elle permet des études en trois dimensions du volume irradié, nécessaire pour la technique des minifaisceaux avec entrelacement. Cependant, le rapport signal sur bruit des mesures est important malgré un temps d'acquisition de plus de 10h sur un IRM, machine rarement disponible aussi longtemps. D'autres techniques de lecture des gels méritent d'être mieux investiguées tels que tomographie optique malgré qu'elle n'ait pas été concluante lors des essais réalisés.

Des études *in vivo* ont été réalisées afin de valider l'effet protecteur du fractionnement spatial sur les tissus sains. Ces études sur rats sains ont été réalisées avec une incidence et une dose à 1 cm de 123 Gy et avec un entrelacement dans le cortex de 4.8 x 4.8 x 5 mm³ et une dose à 1 cm de 54 Gy. Le suivi a duré un an, avec un suivi IRM à différentes dates, imagerie pondérée T₂, de diffusion et imagerie pondérée T₁ avant et après injection de gadolinium en intraveineux. Dans le cas avec une seule incidence, aucune modification n'a été observée que ce soit lors d'exams cliniques rapides ou sur les images IRM. Dans le cas avec deux incidences, des modifications du T₂ (hyposignal) et une perméabilité des vaisseaux au gadolinium ont été observées à partir de 200 jours après irradiation sur une faible zone située au niveau de l'entrelacement. Malgré cela, les rats n'ont montré aucune modification lors d'exams cliniques rapides. L'analyse histologique (coloration H&E) des cerveaux prélevés environ un an après irradiation a corrélé ces résultats. L'absence de dommage important a validé l'effet protecteur des minifaisceaux sur le tissu sain. Cependant il aurait été intéressant de réaliser d'autres conditions d'irradiations, notamment des volumes entrelacés plus importants. Une attention particulière doit être portée à la potentielle formation d'un œdème et de nécrose. Les irradiations de rats porteurs de tumeur ont d'ailleurs soulevées de nombreuses questions à ce sujet.

En effet, lors des différents tests d'irradiation minifaisceaux sur rats porteurs de tumeur (modèle F98), la quantité de tissu nécrotique et la présence d'un œdème péritumoral important laissent penser que les dégâts dûs aux minifaisceaux ne sont pas aussi faible que l'étude sur rat sain

pourrait laisser penser. Les essais in vivo ont notamment montré que si la dose augmente, la survie augmente et le volume tumoral a une phase d'arrêt de croissance plus longue. Cependant dans tous les cas, il y a toujours présence de cellules tumorales en fin de vie du rat comme l'ont révélé les histologies (H&E). Et l'état de la tumeur en fin de vie semble être tout le temps identique (nécrose aux alentours de 70 % sur tout l'hémisphère, œdème peritumoral important, CBV, etc ...). Pour mieux comprendre cette nécrose importante, il serait intéressant de réaliser des histologies à différents temps après irradiation et d'observer la présence ou non de cet œdème, la prolifération des cellules, la quantité de vaisseaux, etc. Ces mesures sont difficiles par IRM car le volume tumoral est tellement important qu'à partir d'un moment il n'est plus possible de dessiner des régions d'intérêts du tissu sain environnant suffisamment grandes pour avoir une mesure statistiquement acceptable.

Les mesures de perfusion réalisées à différents temps après irradiation ont notamment montré une chute du CBV (volume sanguin cérébrale) après une période de stagnation. Cependant les erreurs statistiques de ces mesures sont très importantes. S'il n'a pas été possible de réaliser ces mesures sur un grand nombre d'animaux dans ces études de faisabilité. Il est maintenant possible de définir des conditions types à tester sur des cohortes plus grandes. Il serait notamment intéressant d'utiliser des doses importantes pour compléter les études, permettant de mieux répartir les temps d'imagerie et d'histologie du fait de la croissance tumorale plus lente.

L'étude portant sur la calibration de l'imagerie de perfusion IRM par celle réalisée en synchrotron (tomodensitométrie quantitative) a montré une relation linéaire entre le signal IRM et la mesure de concentration en synchrotron, validant ainsi la séquence d'imagerie spirale pour réaliser un suivi de perfusion. Cependant une correction du signal est nécessaire à cause d'un effet de dispersion différent dans les deux cas, attribué à la différence de viscosité entre les deux produits de contraste injectés. Les mesures de paramètres de perfusion ont montré des résultats proches entre les deux techniques, que ce soit en termes de résultat, de reproductibilité ou de précision. Cependant les données de l'entrée artérielle n'ont pas encore pu être utilisées en IRM, ce qui permettrait de s'affranchir des différences d'arrivées de l'agent de contraste dans le cerveau et d'améliorer la fiabilité de cette étude. Pour éviter la différence de viscosité des agents de contrastes, l'ajout de molécule type sucrose dans la solution de gadolinium pour en augmenter la viscosité semble intéressante (Perlstein, Ram et al. 2008). Des données de perfusion à l'état d'équilibre (steady-state) ont été acquises en IRM et synchrotron. Ces images sont acquises sur une intégration plus longue du signal, et présentent donc une meilleure qualité (plus important rapport signal sur bruit). Si les modèles de traitement sont différents, tous donnent accès au CBV. Si l'estimation du CBV est meilleure en injection lente, il peut être intéressant de fixer la valeur du CBV dans le modèle de traitement en suivi de bolus à celle mesurée à l'équilibre (steady-state) et étudier si cela mène à une mesure plus précise des autres paramètres, une inconnue ayant été éliminée du système d'équation.

Il est important d'améliorer la précision de mesure des paramètres de perfusion afin de pouvoir réaliser un suivi de traitement fonctionnel plus fiable avec cette méthode. Des méthodes d'analyse portant sur les histogrammes plutôt que les valeurs moyennes des régions d'intérêt seules semblent être plus appropriées pour l'analyse de volumes aussi hétérogènes que les gliomes de haut grade.

En conclusion le traitement des tumeurs cérébrales par minifaisceaux n'a pas été curatif mais à permis d'obtenir des résultats de survie très intéressants. Si tous les phénomènes en jeu lors de ce

traitement n'ont pas encore été bien compris, il a été défini que de forte dose ne permettaient que de ralentir le processus de croissance tumorale. L'amélioration des mesures de perfusions par IRM et de traitement des données permettrait d'améliorer le suivi de traitement. Pour cela l'étude de comparaison des mesures de perfusion IRM/synchrotron a fourni de nombreux renseignements permettant de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu.

Bibliographie :

- Abbott, N. J., A. A. K. Patabendige, et al. (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." Neurobiology of Disease **37**(1): 13-25.
- Abbott, N. J., L. Ronnback, et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nature Reviews Neuroscience **7**(1): 41-53.
- Abraham, T. and J. Feng (2011). "Evolution of Brain Imaging Instrumentation." Seminars in Nuclear Medicine **41**(3): 202-219.
- Adam, J. F., S. Bayat, et al. (2009). "Quantitative functional imaging and kinetic studies with high-z contrast agents using synchrotron radiation computed tomography." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **36**(1): 95-106.
- Adam, J. F., H. Elleaume, et al. (2003a). "Synchrotron radiation therapy of malignant brain glioma loaded with an iodinated contrast agent: First trial on rats bearing F98 gliomas." International Journal Of Radiation Oncology Biology Physics **57**(5): 1413-1426.
- Adam, J. F., H. Elleaume, et al. (2003b). "Absolute cerebral blood volume and blood flow measurements based on synchrotron radiation quantitative computed tomography." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism **23**(4): 499-512.
- Adam, J. F., A. Joubert, et al. (2006). "Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy." International Journal Of Radiation Oncology Biology Physics **64**(2): 603-611.
- Adam, J. F., C. Nemoz, et al. (2005). "High-resolution blood-brain barrier permeability and blood volume imaging using quantitative synchrotron radiation computed tomography: study on an F98 rat brain glioma." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism **25**(2): 145-153.
- Adams, F. H., A. Norman, et al. (1977). "Effect of radiation and contrast-media on chromosomes - preliminary report." Radiology **124**(3): 823-826.
- Ahn, C. B., J. H. Kim, et al. (1986). "High-speed spiral-scan echo planar NMR imaging .1." Ieee Transactions on Medical Imaging **5**(1): 2-7.
- Aronen, H. J., I. E. Gazit, et al. (1994). "Cerebral Blood-Volume Maps Of Gliomas - Comparison With Tumor Grade And Histologic-Findings." Radiology **191**(1): 41-51.
- Axel, L. (1980). "Cerebral Blood-Flow Determination By Rapid-Sequence Computed-Tomography - A Theoretical-Analysis." Radiology **137**(3): 679-686.
- Baldock, C., Y. De Deene, et al. (2010). "Polymer gel dosimetry." Physics in Medicine and Biology **55**(5): R1-R63.
- Barajas, R. F., Jr., J. S. Chang, et al. (2009). "Differentiation of Recurrent Glioblastoma Multiforme from Radiation Necrosis after External Beam Radiation Therapy with Dynamic Susceptibility-weighted Contrast-enhanced Perfusion MR Imaging." Radiology **253**(2): 486-496.
- Barbier, E. L., J. A. den Boer, et al. (1999). "A model of the dual effect of gadopentetate dimeglumine on dynamic brain MR images." Jmri-Journal of Magnetic Resonance Imaging **10**(3): 242-253.
- Barth, R. F. (1998). "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas." Journal Of Neuro-Oncology **36**(1): 91-102.
- Barth, R. F., J. C. Grecula, et al. (2004). "Combination of boron neutron capture therapy and external beam radiotherapy for brain tumors." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **58**(1): 267-277.
- Bate, H., S. Rowlands, et al. (1973). "Influence of diffusion on dispersion of indicators in blood-flow." Journal of Applied Physiology **34**(6): 866-872.

- Baumert, B. G., I. A. Norton, et al. (2004). "Dose conformation of intensity-modulated stereotactic photon beams, proton beams, and intensity-modulated proton beams for intracranial lesions." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **60**(4): 1314-1324.
- Beaumont, M. (2007). Développements en imagerie RMN spirale et application à la caractérisation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique sur deux modèles de tumeurs intracérébrales. Grenoble, Université Grenoble I - Joseph Fourier.
- Beaumont, M., L. Lamalle, et al. (2007). "Improved k-space trajectory measurement with signal shifting." Magnetic Resonance in Medicine **58**(1): 200-205.
- Beaumont, M., B. Lemasson, et al. (2009). "Characterization of tumor angiogenesis in rat brain using iron-based vessel size index MRI in combination with gadolinium-based dynamic contrast-enhanced MRI." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **29**(10): 1714-1726.
- Berezcki, D., L. Wei, et al. (1993a). "Hypoxia increases velocity of blood-flow through parenchymal microvascular systems in rat brain." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **13**(3): 475-486.
- Berezcki, D., L. Wei, et al. (1993b). "Hypercapnia slightly raises blood volume and sizably elevates flow velocity in brain microvessels." The American journal of physiology **264**(5 Pt 2): H1360-9.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nature Reviews Cancer **3**(6): 401-410.
- Besse, S. (2010). Ecoulement et transport convectif lors d'injections locales dans le tissu cérébral sain et tumoral : Quantifications par imagerie et développements prédictifs. Grenoble, Université de Grenoble.
- Bidros, D. S. and M. A. Vogelbaum (2009). "Novel Drug Delivery Strategies in Neuro-Oncology." Neurotherapeutics **6**(3): 539-546.
- Bland, J. A. and D. G. Altman (2004). "The logrank test." British Medical Journal **328**(7447): 1073-1073.
- Block, K. T. and J. Frahm (2005). "Spiral imaging: A critical appraisal." Journal of Magnetic Resonance Imaging **21**(6): 657-668.
- Bobo, R. H., D. W. Laske, et al. (1994). "Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(6): 2076-2080.
- Bobyk, L. (2010). Renforcement de la dose par rayonnement synchrotron et atomes lourds dans le cadre du traitement des gliomes. Grenoble, Université de Grenoble.
- Bondy, M. L., M. E. Scheurer, et al. (2008). "Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium." Cancer **113**(7): 1953-1968.
- Bouchet, A., B. Lemasson, et al. (2010). "Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy on intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **78**(5): 1503-1512.
- Boudou, C., J. Balosso, et al. (2005). "Monte Carlo dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy of brain tumours." Physics in Medicine and Biology **50**(20): 4841-4851.
- Boudou, C., I. Tropres, et al. (2007). "Polymer gel dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy and iodine dose-enhancement measurements." Physics In Medicine And Biology **52**(16): 4881-4892.
- Brauer-Krisch, E., R. Serduc, et al. (2010). "Effects of pulsed, spatially fractionated, microscopic synchrotron X-ray beams on normal and tumoral brain tissue." Mutation Research-Reviews in Mutation Research **704**(1-3): 160-166.
- Brenner, D. J. (2008). "The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining isoeffective doses at large doses per fraction." Seminars in Radiation Oncology **18**(4): 234-239.

- Butson, M. J., P. K. N. Yu, et al. (2003). "Radiochromic film for medical radiation dosimetry." Materials Science & Engineering R-Reports **41**(3-5): 61-120.
- Calamante, F., D. G. Gadian, et al. (2000). "Delay and dispersion effects in dynamic susceptibility contrast MRI: Simulations using singular value decomposition." Magnetic Resonance in Medicine **44**(3): 466-473.
- Cao, Y. (2011). "The Promise of Dynamic Contrast-Enhanced Imaging in Radiation Therapy." Seminars in Radiation Oncology **21**(2): 147-156.
- Cao, Y., C. I. Tsien, et al. (2006). "Clinical investigation survival prediction in high-grade gliomas by MRI perfusion before and during early stage of RT." International Journal Of Radiation Oncology Biology Physics **64**(3): 876-885.
- Cao, Y., C. I. Tsien, et al. (2005). "Use of magnetic resonance imaging to assess blood-brain/blood-glioma barrier opening during conformal radiotherapy." J Clin Oncol **23**(18): 4127-36.
- Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." Nature **438**(7070): 932-936.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-57.
- Cha, S. (2009). "Neuroimaging in Neuro-Oncology." Neurotherapeutics **6**(3): 465-477.
- Charles, N. A., E. C. Holland, et al. (2011). "The Brain Tumor Microenvironment." Glia **59**(8): 1169-1180.
- Choyke, P. L. (2005). "Science to practice - Contrast agents for imaging tumor angiogenesis: Is bigger better?" Radiology **235**(1): 1-2.
- Christen, T., B. Lemasson, et al. (2011). "Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation." Nmr in Biomedicine **24**(4): 393-403.
- Clavier, J. B., J. Voirin, et al. (2010). "Systematic review of stereotactic radiotherapy for high-grade gliomas." Cancer Radiotherapie **14**(8): 739-754.
- Clendenon, N. R., R. F. Barth, et al. (1990). "Boron neutron-capture therapy of rat glioma." Neurosurgery **26**(1): 47-55.
- Coderre, J. A., G. M. Morris, et al. (2006). "Late effects of radiation on the central nervous system: Role of vascular endothelial damage and glial stem cell survival." Radiation Research **166**(3): 495-503.
- Crone, C. and N. A. Lassen (1970). Capillary Permeability: The Transfer of Molecules and Ions Between Capillary Blood and Tissue. Copenhagen, Munksgaard Scandinavian University.
- Daube-Witherspoon, M. E., I. G. Zubal, et al. (2003). "Developments in instrumentation for emission computed tomography." Seminars in Nuclear Medicine **33**(1): 28-41.
- De Deene, Y., C. Hurley, et al. (2002). "A basic study of some normoxic polymer gel dosimeters." Physics in Medicine and Biology **47**(19): 3441-3463.
- De Deene, Y., R. Van de Walle, et al. (1998). "Mathematical analysis and experimental investigation of noise in quantitative magnetic resonance imaging applied in polymer gel dosimetry." Signal Processing **70**(2): 85-101.
- De Keyzer, F., V. Vandecaveye, et al. (2009). "Dynamic contrast-enhanced and diffusion-weighted MRI for early detection of tumoral changes in single-dose and fractionated radiotherapy: evaluation in a rat rhabdomyosarcoma model." European Radiology **19**(11): 2663-2671.
- de Lussanet, Q. G., S. Langereis, et al. (2005). "Dynamic contrast-enhanced MR imaging kinetic parameters and molecular weight of dendritic contrast agents in tumor angiogenesis in mice." Radiology **235**(1): 65-72.
- Delattre, B. M. A., R. M. Heidemann, et al. (2010). "Spiral demystified." Magnetic Resonance Imaging **28**(6): 862-881.

- Deman, P., M. Edouard, et al. (2010). "[Synchrotron radiotherapy.]." Rev Med Interne **31**: 586-589.
- Deman, P., M. Vautrin, et al. (2011). "Monochromatic minibeam radiotherapy: theoretical and experimental dosimetry for preclinical treatment plans." Physics in Medicine and Biology **56**(14): 4465-4480.
- Dhermain, F. G., P. Hau, et al. (2010). "Advanced MRI and PET imaging for assessment of treatment response in patients with gliomas." Lancet Neurology **9**(9): 906-920.
- Di Nallo, A. M., A. Vidiri, et al. (2009). "Quantitative analysis of CT-perfusion parameters in the evaluation of brain gliomas and metastases." Journal of Experimental & Clinical Cancer Research **28**: 10.
- Dilmanian, F. A. (1992). "Computed tomography with monochromatic x rays." American journal of physiologic imaging **7**(3-4): 175-93.
- Dilmanian, F. A., T. M. Button, et al. (2002). "Response of rat intracranial 9L gliosarcoma to microbeam radiation therapy." Neuro-Oncology **4**(1): 26-38.
- Dilmanian, F. A., P. Romanelli, et al. (2008). "Microbeam radiation therapy: Tissue dose penetration and BANG-gel dosimetry of thick-beams' array interlacing." European Journal of Radiology **68**(3): S129-S136.
- Dilmanian, F. A., X. Y. Wu, et al. (1997). "Single- and dual-energy CT with monochromatic synchrotron x-rays." Physics in Medicine and Biology **42**(2): 371-387.
- Dilmanian, F. A., Z. Zhong, et al. (2006a). "Microbeam radiation therapy in an interlaced geometry: Potential applicability to neuro-oncology and radiosurgery." Neuro-Oncology **8**(4): 484-485.
- Dilmanian, F. A., Z. Zhong, et al. (2006b). "Interlaced x-ray microplanar beams: A radiosurgery approach with clinical potential." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(25): 9709-9714.
- Doblas, S., T. He, et al. (2010). "Glioma Morphology and Tumor-Induced Vascular Alterations Revealed in Seven Rodent Glioma Models by In Vivo Magnetic Resonance Imaging and Angiography." Journal of Magnetic Resonance Imaging **32**(2): 267-275.
- Donahue, K. M., R. M. Weisskoff, et al. (1997). "Water diffusion and exchange as they influence contrast enhancement." Jmri-Journal of Magnetic Resonance Imaging **7**(1): 102-110.
- Duda, D. G., T. T. Batchelor, et al. (2007). "VEGF-targeted cancer therapy strategies: current progress, hurdles and future prospects." Trends in Molecular Medicine **13**(6): 223-230.
- Eastwood, J. D. and J. M. Provenzale (2003). "Cerebral blood flow, blood volume, and vascular permeability of cerebral glioma assessed with dynamic CT perfusion imaging." Neuroradiology **45**(6): 373-376.
- Edouard, M. (2010). Dosimétrie pour la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron : d'une vision macroscopique aux considérations microscopiques des dépôts d'énergie. Grenoble, Université de Grenoble.
- Edouard, M., D. Broggio, et al. (2010). "Treatment plans optimization for contrast-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy." Medical Physics **37**(6): 2445-2456.
- Elleume, H., A. M. Charvet, et al. (1999). "Instrumentation of the ESRF medical imaging facility." Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section A-Accelerators Spectrometers Detectors And Associated Equipment **428**(2-3): 513-527.
- Elleume, H., A. M. Charvet, et al. (2002). "Performance of computed tomography for contrast agent concentration measurements with monochromatic x-ray beams: comparison of K-edge versus temporal subtraction." Physics in Medicine and Biology **47**(18): 3369-3385.
- Elleume, H., A. M. Charvet, et al. (2000). "In vivo K-edge imaging with synchrotron radiation." Cellular and Molecular Biology **46**(6): 1065-1075.

- Ellegala, D. B., H. L. Poi, et al. (2003). "Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta(3)." Circulation **108**(3): 336-341.
- Emami, B., J. Lyman, et al. (1991). "Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **21**(1): 109-122.
- Fahraeus, R. (1929). "The suspension stability of the blood." Physiological Reviews **9**(2): 241-274.
- Fahraeus, R. and T. Lindqvist (1931). "The viscosity of the blood in narrow capillary tubes." American Journal of Physiology **96**(3): 562-568.
- Figarella Branger, D., C. Colin, et al. (2010). "Glioblastomas: Gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment." Neurochirurgie **56**(6): 441-448.
- Flickinger, J. C., D. Kondziolka, et al. (1997). "Complications from arteriovenous malformation radiosurgery: Multivariate analysis and risk modeling." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **38**(3): 485-490.
- Flickinger, J. C., L. D. Lunsford, et al. (1992a). "Dose prescription and dose-volume effects in radiosurgery." Neurosurg Clin N Am **3**(1): 51-9.
- Flickinger, J. C., L. D. Lunsford, et al. (1992b). "Radiosurgery and brain tolerance - an analysis of neurodiagnostic imaging changes after gamma-knife radiosurgery for arterio-venous malformations." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **23**(1): 19-26.
- Flohr, T. G., S. Schaller, et al. (2005). "Multi-detector row CT systems and image-reconstruction techniques." Radiology **235**(3): 756-773.
- Fournier, E., C. Passirani, et al. (2003). "Therapeutic effectiveness of novel 5-fluorouracil-loaded poly(methylidene malonate 2.1.2)-based microspheres on F98 glioma-bearing rats." Cancer **97**(11): 2822-2829.
- Galban, C. J., T. L. Chenevert, et al. (2009). "The parametric response map is an imaging biomarker for early cancer treatment outcome." Nature Medicine **15**(5): 572-576.
- Gastaldo, J., C. Boudou, et al. (2008). "Normoxic polyacrylamide gel doped with iodine: response versus X-ray energy." Eur J Radiol **68**(3 Suppl): S118-20.
- Gerber, D. E. and T. A. Chan (2008). "Recent advances in radiation therapy." Am Fam Physician **78**(11): 1254-62.
- Gobbel, G. T. and J. R. Fike (1994). "A Deconvolution Method For Evaluating Indicator-Dilution Curves." Physics In Medicine And Biology **39**(11): 1833-1854.
- Goh, V. and S. Halligan (2008). "CT perfusion imaging: Know its assumptions and limitations - Response." Radiology **246**(2): 650-650.
- Goh, V., S. Halligan, et al. (2007). "Quantitative tumor perfusion assessment with multidetector CT: Are measurements from two commercial software packages interchangeable?" Radiology **242**(3): 777-782.
- Gokeri, G., C. Kocar, et al. (2010). "Monte Carlo simulation of microbeam radiation therapy with an interlaced irradiation geometry and an Au contrast agent in a realistic head phantom." Phys Med Biol **55**(24): 7469-87.
- Gore, J. C., M. Ranade, et al. (1996). "Radiation dose distributions in three dimensions from tomographic optical density scanning of polymer gels .1. Development of an optical scanner." Physics in Medicine and Biology **41**(12): 2695-2704.
- Guerrero, M. and X. A. Li (2004). "Extending the linear-quadratic model for large fraction doses pertinent to stereotactic radiotherapy." Physics in Medicine and Biology **49**(20): 4825-4835.
- Haacke, E., R. Brown, et al. (1999). Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design, John Wiley & Sons.
- Hamilton, W. F., J. W. Moore, et al. (1928). "Simultaneous determination of the pulmonary and systemic circulation times in man and of a figure related to the cardiac output." American Journal of Physiology **84**(2): 338-344.

- Herman, G. T., R. W. Lewitt, et al. (1989). SNARK89, Medical Image Processing Group, department of radiology, University of Pennsylvania. USA.
- Hilts, M., A. Jirasek, et al. (2005). "Technical considerations for implementation of X-ray CT polymer gel dosimetry." Physics in Medicine and Biology **50**(8): 1727-1745.
- Hirata, M., K. Murase, et al. (2005). "A method for reducing radiation dose in cerebral CT perfusion study with variable scan schedule." Radiat Med **23**(3): 162-9.
- Hirata, M., Y. Sugawara, et al. (2005). "Measurement of radiation dose in cerebral CT perfusion study." Radiat Med **23**(2): 97-103.
- Hopewell, J. W. and K. R. Trott (2000). "Volume effects in radiobiology as applied to radiotherapy." Radiotherapy and Oncology **56**(3): 283-288.
- Huber, J. D., R. D. Egleton, et al. (2001). "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier." Trends in Neurosciences **24**(12): 719-725.
- Iwamoto, K. S., S. T. Cochran, et al. (1987). "Radiation-dose enhancement therapy with iodine in rabbit vx-2 brain-tumors." Radiotherapy and Oncology **8**(2): 161-170.
- Iwamoto, K. S., A. Norman, et al. (1993). "Diagnosis and treatment of spontaneous canine brain-tumors with a ct scanner." Radiotherapy and Oncology **26**(1): 76-78.
- Iwamoto, K. S., A. Norman, et al. (1990). "The CT scanner as a therapy machine." Radiotherapy and Oncology **19**(4): 337-343.
- Jain, R., S. K. Ellika, et al. (2008). "Quantitative estimation of permeability surface-area product in astroglial brain tumors using perfusion CT and correlation with histopathologic grade." American Journal Of Neuroradiology **29**(4): 694-700.
- Jain, R. K., E. Di Tomaso, et al. (2007). "Angiogenesis in brain tumours." Nature Reviews Neuroscience **8**(8): 610-622.
- Jirasek, A., M. Hilts, et al. (2006). "Investigation of tetrakis hydroxymethyl phosphonium chloride as an antioxidant for use in x-ray computed tomography polyacrylamide gel dosimetry." Physics in Medicine and Biology **51**(7): 1891-1906.
- Johnson, J. A. and T. A. Wilson (1966). "A model for capillary exchange." Am J Physiol **210**(6): 1299-303.
- Kamm, R. D. (2002). "Cellular fluid mechanics." Annual Review of Fluid Mechanics **34**: 211-232.
- Kargiotis, O., A. Geka, et al. (2010). "Effects of irradiation on tumor cell survival, invasion and angiogenesis." Journal of Neuro-Oncology **100**(3): 323-338.
- Kershaw, L. E. and D. L. Buckley (2006). "Precision in measurements of perfusion and microvascular permeability with T-1-weighted dynamic contrast-enhanced MRI." Magnetic Resonance In Medicine **56**(5): 986-992.
- Khuntia, D., W. A. Tome, et al. (2009). "Radiation Techniques in Neuro-Oncology." Neurotherapeutics **6**(3): 487-499.
- Kiselev, V. G. (2001). "On the theoretical basis of perfusion measurements by dynamic susceptibility contrast MRI." Magnetic Resonance in Medicine **46**(6): 1113-1122.
- Kiselev, V. G., R. Strecker, et al. (2005). "Vessel size imaging in humans." Magnetic Resonance in Medicine **53**(3): 553-563.
- Klarhofer, M., M. Barth, et al. (2002). "Comparison of multi-echo spiral and echo planar imaging in functional MRI." Magnetic Resonance Imaging **20**(4): 359-364.
- Klotz, E. and M. Konig (1999). "Perfusion measurements of the brain: using dynamic CT for the quantitative assessment of cerebral ischemia in acute stroke." European Journal Of Radiology **30**(3): 170-184.
- Ko, L., A. Koestner, et al. (1980). "Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell-lines and clones." Acta Neuropathologica **51**(1): 23-31.
- Kondziolka, D., L. D. Lunsford, et al. (1992a). "Radiobiology of radiosurgery, .1. The normal rat-brain model." Neurosurgery **31**(2): 271-279.
- Kondziolka, D., L. D. Lunsford, et al. (1992b). "Radiobiology of radiosurgery .2. The rat-C6 glioma model." Neurosurgery **31**(2): 280-288.

- Kondziolka, D., S. Somaza, et al. (1996). "Radiosurgery and fractionated radiation therapy: Comparison of different techniques in an in vivo rat glioma model." Journal of Neurosurgery **84**(6): 1033-1038.
- Korporaal, J. G., C. A. van den Berg, et al. (2011). "Phase-based arterial input function measurements in the femoral arteries for quantification of dynamic contrast-enhanced (DCE) MRI and comparison with DCE-CT." Magn Reson Med **66**(5): 1267-74.
- Krause, W. (1999). "Delivery of diagnostic agents in computed tomography." Advanced Drug Delivery Reviews **37**(1-3): 159-173.
- Kumar, T., J. Rakowski, et al. (2010). "Helical TomoTherapy versus stereotactic Gamma Knife radiosurgery in the treatment of single and multiple brain tumors: a dosimetric comparison." Journal of Applied Clinical Medical Physics **11**(4): 27-41.
- Laissue, J. A., G. Geiser, et al. (1998). "Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays." International Journal of Cancer **78**(5): 654-660.
- Lawrence, Y. R., X. A. Li, et al. (2010). "Radiation dose-volume effects in the brain." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **76**(3): S20-S27.
- Le Duc, G., I. Miladi, et al. (2011). "Towards an Image-Guided Microbeam Radiation Therapy Using Gadolinium-Based Nanoparticles." ACS Nano.
- Lee, K. Y., K. K. L. Fung, et al. (2006). "Application of high-resolution radiochromic film dosimetry in verifying a small-field stereotactic radiosurgery plan." Applied Radiation and Isotopes **64**(8): 934-939.
- Lee, R., R. T. F. Cheung, et al. (2004). "Use of CT perfusion to differentiate between brain tumour and cerebral infarction." Cerebrovascular Diseases **18**(1): 77-83.
- Lee, T., X. A. Zhang, et al. (2010). "In Vivo Imaging with a Cell-Permeable Porphyrin-Based MRI Contrast Agent." Chemistry & Biology **17**(6): 665-673.
- Lee, T. Y., T. G. Purdie, et al. (2003). "CT imaging of angiogenesis." Quarterly Journal Of Nuclear Medicine **47**(3): 171-187.
- Levegrun, S., L. Ton, et al. (2001). "Partial irradiation of the brain." Seminars in Radiation Oncology **11**(3): 259-267.
- Lopatiuk-Tirpak, O., K. M. Langen, et al. (2008). "Performance evaluation of an improved optical computed tomography polymer gel dosimeter system for 3D dose verification of static and dynamic phantom deliveries." Medical Physics **35**(9): 3847-3859.
- Mansfield, P. (1977). "Multi-planar image-formation using nmr spin echoes." Journal of Physics C-Solid State Physics **10**(3): L55-L58.
- Marks, L. B. (1996). "The impact of organ structure on radiation response." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **34**(5): 1165-1171.
- Maryanski, M. J., Y. Z. Zastavker, et al. (1996). "Radiation dose distributions in three dimensions from tomographic optical density scanning of polymer gels .2. Optical properties of the BANG polymer gel." Physics in Medicine and Biology **41**(12): 2705-2717.
- Mello, R. S., H. Callisen, et al. (1983). "Radiation-dose enhancement in tumors with iodine." Medical Physics **10**(1): 75-78.
- Mesa, A. V., A. Norman, et al. (1999). "Dose distributions using kilovoltage x-rays and dose enhancement from iodine contrast agents." Physics in Medicine and Biology **44**(8): 1955-1968.
- Meyer, C. H., B. S. Hu, et al. (1992). "Fast spiral coronary-artery imaging." Magnetic Resonance in Medicine **28**(2): 202-213.
- Miles K.A., Charnsangavej C., et al. (2007). Multi-Detector Computed Tomography in Oncology: CT Perfusion Imaging. U.K., Informa Healthcare.
- Miles, K. A. (1999). "Tumour angiogenesis and its relation to contrast enhancement on computed tomography: a review." European Journal of Radiology **30**(3): 198-205.

- Miles, K. A. (2004). "Brain perfusion: computed tomography applications." Neuroradiology **46**: S194-S200.
- Miles, K. A. (2006). "Perfusion imaging with computed tomography: brain and beyond." Eur Radiol **16 Suppl 7**: M37-43.
- Miles, K. A., J. D. Eastwood, et al. (2006). Multi-Detector Computed Tomography in cerebrovascular disease: CT perfusion imaging. U.K, Informa Healthcare.
- Munter, M. W., C. P. Karger, et al. (1999). "Delayed vascular injury after single high-dose irradiation in the rat brain: Histologic, immunohistochemical, and angiographic studies." Radiology **212**(2): 475-482.
- Murase, K., T. Nanjo, et al. (2005). "Effect of x-ray tube current on the accuracy of cerebral perfusion parameters obtained by CT perfusion studies." Physics In Medicine And Biology **50**(21): 5019-5029.
- Niemierko, A. and M. Goitein (1993). "Modeling of normal tissue-response to radiation - the critical volume model." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **25**(1): 135-145.
- Niranjan, A. and J. C. Flickinger (2008). "Radiobiology, principle and technique of radiosurgery." Prog Neurol Surg **21**: 32-42.
- Norman, A., F. H. Adams, et al. (1978). "Cytogenetic effects of contrast-media and triiodobenzoic acid-derivatives in human lymphocytes." Radiology **129**(1): 199-203.
- Norman, A., M. Ingram, et al. (1997). "X-ray phototherapy for canine brain masses." Radiat Oncol Investig **5**(1): 8-14.
- Olding, T., O. Holmes, et al. (2010). "Cone beam optical computed tomography for gel dosimetry I: scanner characterization." Physics in Medicine and Biology **55**(10): 2819-2840.
- Pannetier, N. (2010). Développement méthodologique en IRM pour la mesure de la perfusion cérébrale. Grenoble, Université de Grenoble.
- Pannetier, N., B. Lemasson, et al. (2011). "Vessel size index measurements in a rat model of glioma: comparison of the dynamic (Gd) and steady-state (iron-oxide) susceptibility contrast MRI approaches." NMR Biomed.
- Papadakis, A. E., G. Zacharakis, et al. (2010). "A New Optical-CT Apparatus for 3-D Radiotherapy Dosimetry: Is Free Space Scanning Feasible?" Ieee Transactions on Medical Imaging **29**(5): 1204-1212.
- Patlak, C. S. and R. G. Blasberg (1985). "Graphical Evaluation Of Blood-To-Brain Transfer Constants From Multiple-Time Uptake Data - Generalizations." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism **5**(4): 584-590.
- Patlak, C. S., R. G. Blasberg, et al. (1983). "Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **3**(1): 1-7.
- Pawlik, G., A. Rackl, et al. (1981). "Quantitative capillary topography and blood-flow in the cerebral-cortex of cats - an in vivo microscopic study." Brain Research **208**(1): 35-58.
- Paxinos, G. and C. Watson (2004). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.
- Perlstein, B., Z. Ram, et al. (2008). "Convection-enhanced delivery of maghemite nanoparticles: Increased efficacy and MRI monitoring." Neuro-Oncology **10**(2): 153-161.
- Podgorsak, E. B. and K. Kainz (2006). Radiation Oncology Physics : A Handbook for Teachers and Students.
- Pollard, V. and D. S. Prough (1996). "Cerebral near-infrared spectroscopy: A plea for modest expectations." Anesthesia and Analgesia **83**(4): 673-674.
- Pollard, V., D. S. Prough, et al. (1996). "Validation in volunteers of a near-infrared spectroscope for monitoring brain oxygenation in vivo." Anesthesia and Analgesia **82**(2): 269-277.

- Prezado, Y., G. Fois, et al. (2009a). "Biological equivalent dose studies for dose escalation in the stereotactic synchrotron radiation therapy clinical trials." Medical Physics **36**(3): 725-733.
- Prezado, Y., G. Fois, et al. (2009b). "Gadolinium dose enhancement studies in microbeam radiation therapy." Medical Physics **36**(8): 3568-3574.
- Prezado, Y., I. Martinez-Rovira, et al. (2011). "Dosimetry protocol for the preclinical trials in white-beam minibeam radiation therapy." Medical Physics **38**(9): 5012-5020.
- Prezado, Y., M. Renier, et al. (2009). "A new method of creating minibeam patterns for synchrotron radiation therapy: a feasibility study." Journal of Synchrotron Radiation **16**: 582-586.
- Prezado, Y., S. Thengumpallil, et al. (2009). "X-ray energy optimization in minibeam radiation therapy." Medical Physics **36**(11): 4897-4902.
- Prezado, Y., M. Vautrin, et al. (2011). "Dosimetry protocol for the forthcoming clinical trials in synchrotron stereotactic radiation therapy (SSRT)." Medical Physics **38**(3): 1709-1717.
- Pries, A. R., D. Neuhaus, et al. (1992). "Blood-viscosity in tube flow - Dependence on diameter and hematocrit." American Journal of Physiology **263**(6): H1770-H1778.
- Rahman, A. T. A., E. Brauer-Krisch, et al. (2011). "Sophisticated test objects for the quality assurance of optical computed tomography scanners." Physics in Medicine and Biology **56**(14): 4177-4199.
- Regnard, P., E. Brauer-Krisch, et al. (2008). "Enhancement of survival of 9L gliosarcoma bearing rats following intracerebral delivery of drugs in combination with microbeam radiation therapy." European Journal of Radiology **68**(3): S151-S155.
- Richardson, R. M., F. Gimenez, et al. (2011). "T2 Imaging in Monitoring of Intraparenchymal Real-Time Convection-Enhanced Delivery." Neurosurgery **69**(1): 154-163.
- Rink, A., I. A. Vitkin, et al. (2007). "Intra-irradiation changes in the signal of polymer-based dosimeter (GAFCHROMIC EBT) due to dose rate variations." Physics in Medicine and Biology **52**(22): N523-N529.
- Risser, L., F. Plouraboue, et al. (2007). "From homogeneous to fractal normal and tumorous microvascular networks in the brain." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism **27**(2): 293-303.
- Ritman, E. L. (2004). "Micro-computed tomography-current status and developments." Annual review of biomedical engineering **6**: 185-208.
- Ritman, E. L. (2011). "Current Status of Developments and Applications of Micro-CT." Annual review of biomedical engineering **13**: 531-52.
- Riviere, J. E. (2011). Comparative pharmacokinetics, John Wiley & Sons.
- Roberts, H. C., T. P. Roberts, et al. (2000). "Quantitative measurement of microvascular permeability in human brain tumors achieved using dynamic contrast-enhanced MR imaging: correlation with histologic grade." AJNR Am J Neuroradiol **21**(5): 891-9.
- Rong, Y., G. Tang, et al. (2011). "Helical tomotherapy versus single arc intensity modulated arc therapy: a collaborative dosimetric comparison between two institutions. ." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **81**(1): 284-296.
- Rose, J. H., A. Norman, et al. (1999). "First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx)." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **45**(5): 1127-1132.
- Rousseau, J., J. F. Adam, et al. (2009). "Intracerebral delivery of 5-iodo-2 '-deoxyuridine in combination with synchrotron stereotactic radiation for the therapy of the F98 glioma." Journal of Synchrotron Radiation **16**: 573-581.
- Rousseau, J., R. F. Barth, et al. (2009). "Efficacy of intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation for treatment of F98 glioma-bearing rats." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **73**(2): 530-536.

- Rousseau, J., C. Boudou, et al. (2007a). "Enhanced survival and cure of f98 glioma-bearing rats following intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation." Clinical Cancer Research **13**(17): 5195-5201.
- Rousseau, J., C. Boudou, et al. (2007b). "Convection-enhanced delivery of an iodine tracer into rat brain for synchrotron stereotactic radiotherapy." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **68**(3): 943-951.
- Ruben, J. D., M. Dally, et al. (2006). "Cerebral radiation necrosis: Incidence, outcomes, and risk factors with emphasis on radiation parameters and chemotherapy." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **65**(2): 499-508.
- Sadagopan, R., J. A. Bencomo, et al. (2009). "Characterization and clinical evaluation of a novel IMRT quality assurance system." Journal of Applied Clinical Medical Physics **10**(2): 104-119.
- Salvat, F., J. Fernández-Varea, et al. (2006). A Code system for Monte Carlo Simulation of Electron and Photon Transport. Issy-les-Moulineaux, Nuclear Energy Agency (OECD).
- Schultheiss, T. E., L. E. Kun, et al. (1995). "Radiation response of the central-nervous-system." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **31**(5): 1093-1112.
- Schulz-Ertner, D. and H. Tsujii (2007). "Particle radiation therapy using proton and heavier ion beams." Journal of Clinical Oncology **25**(8): 953-964.
- Serduc, R., A. Bouchet, et al. (2009). "Synchrotron microbeam radiation therapy for rat brain tumor palliation-influence of the microbeam width at constant valley dose." Physics in Medicine and Biology **54**(21): 6711-6724.
- Serduc, R., E. Brauer-Krisch, et al. (2010). "High-Precision Radiosurgical Dose Delivery by Interlaced Microbeam Arrays of High-Flux Low-Energy Synchrotron X-Rays." Plos One **5**(2).
- Serduc, R., T. Christen, et al. (2008). "Brain tumor vessel response to synchrotron microbeam radiation therapy: a short-term in vivo study." Physics in Medicine and Biology **53**(13): 3609-3622.
- Serduc, R., Y. V. de Looij, et al. (2008). "Characterization and quantification of cerebral edema induced by synchrotron x-ray microbeam radiation therapy." Physics in Medicine and Biology **53**(5): 1153-1166.
- Shaw, E., C. Scott, et al. (2000). "Single dose radiosurgical treatment of recurrent previously irradiated primary brain tumors and brain metastases: Final report of RTOG protocol 90-05." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **47**(2): 291-298.
- Siegbahn, E. A., J. Stepanek, et al. (2006). "Determination of dosimetrical quantities used in microbeam radiation therapy (MRT) with Monte Carlo simulations." Medical Physics **33**(9): 3248-3259.
- Silvennoinen, H. M., L. M. Hamberg, et al. (2006). Increasing contrast agent concentration improves enhancement in first-pass CT perfusion. 92nd Scientific Assembly and Annual Meeting of the Radiological-Society-of-North-America, Chicago, IL, Amer Soc Neuroradiology.
- Sneed, P. K., J. H. Suh, et al. (2002). "A multi-institutional review of radiosurgery alone vs. radiosurgery with whole brain radiotherapy as the initial management of brain metastases." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **53**(3): 519-526.
- Soares, C. G. (2006). "New developments in radiochromic film dosimetry." Radiation Protection Dosimetry **120**(1-4): 100-106.
- Solberg, T. D., K. S. Iwamoto, et al. (1992). "Calculation of radiation-dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain-tumors." Physics in Medicine and Biology **37**(2): 439-443.

- St Lawrence, K. S. and T. Y. Lee (1998). "An adiabatic approximation to the tissue homogeneity model for water exchange in the brain: I. Theoretical derivation." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism **18**(12): 1365-1377.
- Stupp, R., M. E. Hegi, et al. (2009). "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." Lancet Oncology **10**(5): 459-466.
- Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." New England Journal of Medicine **352**(10): 987-996.
- Suhonen, H., L. Porra, et al. (2008). "Simultaneous in vivo synchrotron radiation computed tomography of regional ventilation and blood volume in rabbit lung using combined K-edge and temporal subtraction." Physics in Medicine and Biology **53**(3): 775-791.
- Swenberg, J. A., W. Wechsler, et al. (1972). "Quantitative aspects of transplacental tumor induction with ethylnitrosourea in rats." Cancer Research **32**(12): 2656-&.
- Tajima, A., H. Nakata, et al. (1992). "Differences and similarities in albumin and red-blood-cell flows through cerebral microvessels." American Journal of Physiology **262**(5): H1515-H1524.
- Takasawa, M., P. S. Jones, et al. (2008). "How reliable is perfusion MR in acute stroke? Validation and determination of the penumbra threshold against quantitative PET." Stroke **39**(3): 870-877.
- Taphoorn, M. J. B., E. M. Sizoo, et al. (2010). "Review on Quality of Life Issues in Patients with Primary Brain Tumors." Oncologist **15**(6): 618-626.
- Taphoorn, M. J. B., M. J. van den Bent, et al. (2007). "Health-related quality of life in patients treated for anaplastic oligodendroglioma with adjuvant chemotherapy: Results of a European organisation for research and treatment of cancer randomized clinical trial." Journal of Clinical Oncology **25**(36): 5723-5730.
- Taschereau, R., R. W. Silverman, et al. (2010). "Dual-energy attenuation coefficient decomposition with differential filtration and application to a microCT scanner." Physics in Medicine and Biology **55**(4): 1141-1155.
- Tate, M. C. and M. K. Aghi (2009). "Biology of Angiogenesis and Invasion in Glioma." Neurotherapeutics **6**(3): 447-457.
- Teorell, T. (1937a). "Kinetics of distribution of substances administered to the body I The extravascular modes of administration." Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie **57**: 205-225.
- Teorell, T. (1937b). "Kinetics of distribution of substances administered to the body II The intravascular modes of administration." Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie **57**: 226-240.
- Thames, H. D., M. Zhang, et al. (2004). "Cluster models of dose-volume effects." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **59**(5): 1491-1504.
- Thompson, H. K., R. E. Whalen, et al. (1964). "Indicator Transit Time Considered As Gamma Variate." Circulation Research **14**(6): 502-&.
- Thoms, J. and R. G. Bristow (2010). "DNA Repair Targeting and Radiotherapy: A Focus on the Therapeutic Ratio." Seminars in Radiation Oncology **20**(4): 217-222.
- Tofts, P. S., C. E. Benton, et al. (2007). "Quantitative analysis of whole-tumor Gd enhancement histograms predicts malignant transformation in low-grade gliomas." Journal of Magnetic Resonance Imaging **25**(1): 208-214.
- Tofts, P. S., G. Brix, et al. (1999). "Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusible tracer: standardized quantities and symbols." J Magn Reson Imaging **10**(3): 223-32.
- Tozer, D. J., H. R. Jaeger, et al. (2007). "Apparent diffusion coefficient histograms may predict low-grade glioma subtype." Nmr in Biomedicine **20**(1): 49-57.

- Travis, E. L. (2001). "Organizational response of normal tissues to irradiation." Seminars in Radiation Oncology **11**(3): 184-196.
- Tubert-Bitter, P., A. Kramar, et al. (1994). "Linear rank-tests for comparing survival in 2 groupes with crossing hazards." Computational Statistics & Data Analysis **18**(5): 547-559.
- Van Dyk, J. (1999). The modern technology of radiation oncology, a compendium for medical physicists and radiation oncologists. Madison, Medical Physics Publishing.
- van Vulpen, M., H. B. Kal, et al. (2002). "Changes in blood-brain barrier permeability induced by radiotherapy: Implications for timing of chemotherapy? (Review)." Oncology Reports **9**(4): 683-688.
- Vautrin, M. (2011). Planification de traitement en Radiothérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron
Développement et validation d'un module de calcul de dose par simulations Monte Carlo. Grenoble, Université de Grenoble.
- Vicenzini, E., R. Delfini, et al. (2008). "Semiquantitative human cerebral perfusion assessment with ultrasound in brain space-occupying lesions - Preliminary data." Journal of Ultrasound in Medicine **27**(5): 685-692.
- Voglein, J., J. Tuttonberg, et al. (2011). "Treatment Monitoring in Gliomas Comparison of Dynamic Susceptibility-Weighted Contrast-Enhanced and Spectroscopic MRI Techniques for Identifying Treatment Failure." Investigative Radiology **46**(6): 390-400.
- Weichselbaum, R. R. (1984). "The role of DNA-repair processes in the response of human-tumors to fractionated radiotherapy." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **10**(7): 1127-1134.
- Wen, P. Y. and S. Kesari (2008). "Malignant gliomas in adults." New England Journal of Medicine **359**(5): 492-507.
- Winkler, P. (1998). "Advances in paediatric CNS ultrasound." European Journal of Radiology **26**(2): 109-120.
- Wintermark, M., R. Chioloro, et al. (2004). "Relationship between brain perfusion computed tomography variables and cerebral perfusion pressure in severe head trauma patients." Critical Care Medicine **32**(7): 1579-1587.
- Wintermark, M., M. Sesay, et al. (2005). "Comparative overview of brain perfusion imaging techniques." Stroke **36**(9): 2032-2033.
- Wintermark, M., R. Sincic, et al. (2008). "Cerebral perfusion CT: Technique and clinical applications." Journal of Neuroradiology **35**(5): 253-260.
- Wintermark, M., G. van Melle, et al. (2004). "Admission perfusion CT: Prognostic value in patients with severe head trauma." Radiology **232**(1): 211-220.
- Withers, H. R., J. M. G. Taylor, et al. (1988). "Treatment volume and tissue tolerance." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **14**(4): 751-759.
- Wong, C. J., T. Ackerly, et al. (2007). "High-resolution measurements of small field beams using polymer gels." Applied Radiation and Isotopes **65**: 1160-1164.
- Yu, C. X. and G. Tang (2011). "Intensity-modulated arc therapy: principles, technologies and clinical implementation." Physics in Medicine and Biology **56**(5): R31-R54.
- Zach, L., B. Stall, et al. (2009). "A dosimetric comparison of four treatment planning methods for high grade glioma." Radiation Oncology **4**.
- Zanzonico, P. (2004). "Positron emission tomography: A review of basic principles, scanner design and performance, and current systems." Seminars in Nuclear Medicine **34**(2): 87-111.
- Zeman, W., C. P. Baker, et al. (1961). "Histopathologic effect of high-energy-particle microbeams on visual cortex of mouse brain." Radiation Research **15**(4): 496-&.
- Zhao, J. B., H. Salmon, et al. (2007). "Effect of heterogeneous vasculature on interstitial transport within a solid tumor." Microvascular Research **73**(3): 224-236.

Annexe 1: Coloration de lame histologique H/E

Le protocole de coloration de lame histologique avec du H/E a été rédigé par Régine Farion (Grenoble Institut des Neurosciences, plateforme préclinique)

PREPARATION DES COLORANTS HEMATOXYLINE ERYTHROSINE (HE)

| | | |
|--------------|-------------|-------------|
| Hématoxyline | Noyau | Bleu violet |
| Erythrosine | Cytoplasmes | Rose |

Hematoxyline :

Solution mère :

-Dans un becher, dissoudre :

- Hématoxyline **5g**
- Ethanol absolu **50ml**

-Dans un gros bécher, dissoudre à chaud :

- Alun de potassium **100g**
- Eau distillée **1l**

Juste avant ébullition, ajouter doucement la solution d'hématoxyline (attention aux projections)

-Porter à ébullition 5 min. au moins

-Ajouter en gardant le chauffage :

- Oxyde de mercure **2,5g**
- Attention aux projections; la solution devient violet foncé

-Refroidir rapidement sous l'eau puis au frigo

-Ajouter :

- Thymol (conservation) **quelques cristaux**

- laisser vieillir minimum 1 mois

- se conserve plusieurs mois

Solution de travail :

- Hématoxyline **450ml**
- Alun de potassium 10% **150ml**

Filtrer cette solution quand on voit un film argenté à la surface

Erythrosine :

- Erythrosine **1g**
- Eau du robinet **600ml**

COLORATION POUR COUPES CONGELEES

Fixation :

- Méthanol / acétone (V/V) **2 min.**
- Rinçage à l'eau courante **5 min.**

Coloration :

- Eau courante **5 min**
- Hématoxyline de Harris **4 min.**
- Rinçage à l'eau courante **passage**
- HCl 0,5% dans H₂O **passage**
- Rinçage à l'eau courante **passage**
- Eau ammoniacuée 2,5ml/1l **30 sec**
- Rinçage à l'eau courante **passage**
- Erythrosine **1 min.**
- Rinçage à l'eau courante **passage**
- Ethanol 100 **3 bains**
- Toluène **3 bains**

Surtout ne pas laisser les lames à l'air libre avant le montage, elles peuvent rester 1/2h à 1h dans le dernier bain de toluène.

Montage :

- Montage au Pertex (le surplus peut être enlevé au toluène)
- Laisser sécher une nuit

Préencollage des lames :

| | | |
|-------------------------------|--------|----------------|
| acétone | 1 bain | 2 min |
| aminopropyl 2% dans l'acétone | 1 bain | 1 min |
| acétone | 1 bain | passage |
| acétone | 1 bain | passage |
| acétone | 1 bain | passage |

Bien égoutter les lames sur du sopalin et ensuite les placer dans l'étuve à 55° jusqu'au séchage complet.

Les stocker dans leur boîte et noter qu'elles ont été préencollées.

L'aminopropyl est dilué dans l'acétone.

Annexe 2 : Rapport de Master 2

Le document suivant correspond au matériel et méthode et aux résultats obtenus durant mon stage de master 2 portant sur l'utilisation d'un dialyseur comme fantôme de perfusion pour calibrer les modalités d'imagerie et estimer l'aspect quantitatif des modèles pharmacocinétiques.



Mesures absolues de la
perfusion cérébrale :
Réalisation d'un fantôme de
calibration pour l'évaluation et
la comparaison des modèles de
calcul.

DEMAN Pierre
du 04/02/08 au 26/09/08

Responsable de stage : Jean-François Adam
Projet de Fin d'Etude de l'ENSPG
Stage Master MPPC

Résumé :

L'équipe 6 de l'unité U836 de l'INSERM (« Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale ») a pour thématique de recherche le développement de techniques d'imagerie et de radiothérapie en utilisant le rayonnement synchrotron. Un programme de recherche clinique sur la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron renforcée par photoactivation d'éléments lourds est actuellement mis en place à l'ESRF. En parallèle de cette thématique, l'équipe travaille sur des modalités d'imagerie fonctionnelle (IRM, CT, Synchrotron) de la perfusion cérébrale qui peuvent apporter des informations pertinentes sur l'agressivité des tumeurs. Ces mesures sont donc utiles pour le diagnostic et le suivi des traitements. Ces mesures nécessitent l'application de modèles de la cinétique des traceurs qui sont malheureusement peu reproductibles. En effet les différentes méthodes varient selon les algorithmes de calculs, mais aussi selon la technique et le protocole d'imagerie. Ce projet de recherche a pour but de mettre au point un fantôme dont on connaît théoriquement les paramètres hydrodynamiques afin de pouvoir tester et comparer les différents algorithmes clinique de la mesure de perfusion. Un filtre de dialyse a été utilisé comme fantôme. Les paramètres hydrodynamiques ont été caractérisés pour nous fournir les valeurs théoriques du volume sanguin, débit sanguin et de la perméabilité des capillaires. Deux modèles de mesures de perfusion ont été comparés dans le cadre de cette étude. Le modèle de Johnson et Wilson est semblable à celui qui permet de se rapprocher le plus possible des valeurs théoriques.

Abstract :

The team 6 of Unit 836 INSERM, Synchrotron Radiation and Medical Research, work on Imaging and Radiotherapy Techniques to cure high grade gliomas, using heavy elements injection. These studies are almost all preclinical, on rats, but a clinical program is starting soon with an efficient protocol tested by the team. Some new chemotherapy drugs, heavy elements, delivered by innovative injection methods are still searched and tested on rats. To control the treatments, many critters have to be used. These critters must give reproducible and significant information to evaluate the glioma's grade and evolution. The hemodynamic parameters are discerning but the measures lack of reproducibility. Indeed, there are many protocols to calculate them, many imaging techniques (Scanner, MRI, PET, ...), mathematics models and algorithm treatments. The results of all these techniques can differ a lot because of the techniques their selves but because of the initial parameters too, which are difficult to estimate. A phantom has to be realizing in this training work, to evaluate three imaging modalities: MRI, Scanner X and Synchrotron Imaging, and some mathematical models (gamma fit, maximum slope, Johnson and Wilson, ...). Some algorithms have to be programmed in this training work and some other will be test by Ting Lee. The phantoms parameters will be determining physically and will be the reference for evaluate the results.

REMERCIEMENTS :

Il y a énormément de personnes que je tiens à remercier dans le cadre de ce stage. J'ai en effet travaillé de nombreux laboratoires pour pouvoir utiliser tout le matériel qui m'était nécessaire.

Je commencerais bien sur par remercier Jeff, mon maître de stage, bien qu'il m'ait emmené faire des sorties en ski nordique et en vtt desquels j'ai eu quelque peu de mal à revenir entier. Je remercie ensuite le boss François Estève pour m'avoir accueilli une fois de plus dans son équipe, m'avoir permis de travailler en collaboration avec le CHU de Grenoble et avec qui j'ai beaucoup de plaisir à travailler.

Je tiens aussi à dire un grand merci à Michel Bouriau, ingénieur d'étude au LSP, qui me permet de développer un fantôme par moulage de microcanaux en PDMS. Je le remercie pour m'aider à le réaliser alors que la technologie dont j'ai besoin n'est pas encore complètement maîtrisée par son équipe et qu'il fait de nombreux essais pour pouvoir faire avancer ce projet. Je remercie à ce titre aussi Danièle Centanni qui travaille avec Michel sur la réalisation de ces microcanaux. Je souhaite dire aussi un grand merci à Claude Verdier, chercheur au LSP qui m'a mis sur la voie, après plusieurs discussions, de cette technologie de microgravage sur canaux de PDMS et m'avoir aider sur des notions de microfluidiques.

Je souhaite aussi vivement remercier le Professeur Jean-François LeBas, responsable de l'unité de neuroradiologie du pôle imagerie du CHU de Grenoble, qui me permet, dans le cadre d'un projet commun entre son équipe et notre équipe INSERM, de faire des acquisitions sur le scanner de neuroradiologie et l'IRM clinique 1.5T. Je remercie aussi le Professeur Gilbert Ferretti, responsable de la clinique de radiologie médicale du pôle imagerie du CHU de Grenoble qui me permet d'utiliser le scanner de radiothérapie de son service lors de créneaux dédiés à la recherche. Je remercie aussi le docteur Paolo Malvezzi, chef de clinique-assistant de la clinique de néphrologie, dialyse et transplantation du CHU de Grenoble.

Je souhaite aussi dire merci aux pharmaciens du centre AURAL (Association pour l'Utilisation du Rein Artificiel de la Région Lyonnaise) de Villeurbanne et notamment Pascal Genet pour m'avoir fournit des dialyseurs me permettant ainsi d'effectuer mes expériences.

Je tiens aussi à remercier Etienne Pernot et Patrice Chaudouët pour les acquisitions en microscopie électronique et par microscope à force atomique.

Un grand merci à Ting-Yim Lee directeur de l'unité CT-perfusion à Imaging laboratories, Robarts Research Institute, London, Ontario, Canada, pour m'accueillir cet été dans son équipe pour continuer à travailler sur mon projet de stage et me permettre ainsi d'approfondir mes connaissances dans les modèles mathématiques de la perfusion et de réaliser de mesures avec des techniques d'imageries de perfusion à la pointe de ce qui se fait en ce moment. Je le remercie aussi pour le temps qu'il consacre au traitement des acquisitions que nous faisons avec le modèle de perfusion que son équipe développe.

Je remercie aussi Hélène Elleaume toujours de bon conseil et de bonne humeur, ainsi que Thierry Brochard et Christian Nemoz pour m'avoir aider sur des problèmes techniques et informatiques, de même un grand merci à Dominique Dallery et Géraldine Le Duc pour m'avoir permis d'utiliser le matériel de l'animalerie de l'ESRF. Je remercie aussi Raphaël Serduc pour m'avoir appris à utiliser le microtom et l'inclusion dans de la paraffine ... sur les capillaires du dialyseur

Merci à Hénifio et Jean-Louis, manipulateurs scanner, au service de radiologie central qui m'ont appris à configurer de nouvelles séquences sur le scanner de radiothérapie et aussi à Charline Voileau, stagiaire dans notre équipe, pour l'aide qu'elle m'a apporté lors des expériences.

Je tiens particulièrement à remercier aussi Sébastien Besse et Magalie Edouard, mais collègues de bureau, qui garantissent toujours une excellente ambiance. Je remercie aussi Laure Bobyk, Manuel Fernández avec qui j'ai beaucoup de plaisir à travailler.

SOMMAIRE :

| | |
|---|-----------|
| Le cadre de travail : | 5 |
| 1. INTRODUCTION : | 6 |
| 1.1. Physiologie des tumeurs cérébrales : | 6 |
| 1.1.1. La néoangiogénèse : | 6 |
| 1.1.2. La rupture de la BHE : | 7 |
| 1.1.3. Influence sur les paramètres hémodynamiques : | 7 |
| 1.2. Protocole de mesure de perfusion : | 8 |
| 1.3. Algorithmes de calcul des paramètres de perfusion : | 10 |
| 1.3.1. Les différents paramètres de perfusion : | 10 |
| 1.3.2. Introduction aux modèles : | 11 |
| 1.3.3. Modèle 1 : « maximum slope »: | 14 |
| 1.3.4. Modèle 2 : « Variables Gamma »: | 14 |
| 1.3.5. Modèle 3 : approximation adiabatique du modèle de Johnson et Wilson. | 16 |
| 1.3.6. Correction du volume partiel | 17 |
| 1.3.7. Utilisation de fantômes pour évaluer les modèles de perfusion | 18 |
| 2. Matériel et méthodes | 18 |
| 2.1. Caractérisation physique du fantôme : | 18 |
| 2.1.1. Paramètres volumiques | 20 |
| 2.1.2. CBV théorique | 20 |
| 2.1.3. CBF théorique | 20 |
| 2.1.4. MTT théorique | 21 |
| 2.1.5. PS théorique : | 21 |
| 2.1.6. Résumé des paramètres hémodynamiques: | 24 |
| 2.2 Protocole d'acquisition de CT-Perfusion | 25 |
| 2.3 Etudes réalisées | 27 |
| 2.4 Lien HU/concentration en iode | 28 |
| 2.5 Homogénéité et reproductibilité des mesures sur dialyseur | 29 |
| 2.5.1 Homogénéité | 29 |
| 2.5.2 Reproductibilité | 30 |
| 2.6 Implémentation des modèles | 30 |
| 3. Résultats : | 32 |
| 3.1 Acquisition de référence | 32 |
| 3.2 Variation de la perméabilité : | 33 |
| 3.3 Variation du débit : | 1 |
| 4. Discussion : | 2 |
| ANNEXE 1 : Microcanaux de PDMS | 5 |
| ANNEXE 1 : Microcanaux de PDMS | 5 |
| ANNEXE 2 : Les mesures par fluoroscopie : | 7 |
| ANNEXE 3 : Expérience Scanner : | 9 |
| Références : | 11 |
| Index des figures : | 13 |
| Index des tables : | 15 |

Le cadre de travail :

Ce stage de recherche se déroule dans l'équipe 6 de l'unité 836 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). L'unité 836, labellisée Grenoble-Institut des Neurosciences (GIN), est un centre de recherche regroupant 10 équipes pluridisciplinaires travaillant sur des thématiques variées, allant de la biologie fondamentale à la neurochirurgie, en passant par la physique et l'ingénierie biomédicale. Le point de convergence de ces thématiques sont les neurosciences, avec en particulier la neurologie, l'étude des maladies neurodégénératives, ainsi que les tumeurs cérébrales.

L'équipe 6 du GIN, appelée « Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale » (RSRM), a pour thématique de recherche principale le développement des applications médicales du rayonnement synchrotron et leur transfert vers la recherche clinique. Trois axes de recherches sont actuellement menés conjointement dans l'équipe :

- L'imagerie fonctionnelle quantitative de la perfusion cérébrale en tomographie par rayons x.
- Le traitement des tumeurs cérébrales en radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron.
- La microscopie par fluorescence x pour l'étude du rôle de certains métaux dans les maladies neurodégénératives.

Ce travail de master s'intègre dans le cadre d'une collaboration entre l'unité de neuroradiologie du pôle imagerie du CHU de Grenoble (Pr JF LeBas) ayant pour objectif principal de comparer les mesures de la perfusion cérébrale par scanner x (CT-perfusion) avec les mesures de perfusion obtenues en imagerie par résonance magnétique (IRM-perfusion) sur des outils d'imagerie clinique.

Cette collaboration est motivée par les discordances qui peuvent exister entre les mesures réalisées sur ces deux outils. Les mesures de perfusion sont réalisées sur scanner x, souvent couplées à un examen d'urgence, pour détecter certaines pathologies affectant l'hémodynamique cérébrale comme les accidents vasculaires cérébraux, les tumeurs et les traumatismes graves. L'IRM est un examen qui est utilisé pour le suivi de ces pathologies après leur prise en charge, ainsi que le diagnostic des tumeurs.

En plus des différences intrinsèques aux deux techniques d'imagerie, il existe des différences entre les modèles mathématiques permettant d'extraire les paramètres de perfusion des données CT ou IRM, ce qui complexifie d'autant plus les études comparatives

L'objectif est tout d'abord la réalisation d'un fantôme fiable qui permet de simuler un réseau de capillaires poreux et dont on connaît tous les paramètres influant sur la micro-fluidique de laquelle découle les paramètres de perfusion (volume sanguin, débit sanguin et perméabilité des capillaires). Il faut notamment que ce fantôme soit compatible aux mesures par rayon X et par IRM.

L'autre objectif est d'implémenter les principaux algorithmes qui permettent de calculer les paramètres de perfusion à partir des images acquises et de les comparer. Ceux-ci ont des degrés de complexité différents. Il s'agira donc d'évaluer leur capacité à retourner fidèlement les valeurs théoriques du fantôme.

Il s'agira enfin de faire une mesure de perfusion sur le fantôme en tomographie quantitative par rayonnement synchrotron qui nous servira de mesures de références car cette technique est la seule à fournir des cartographies absolues des paramètres clés de la perfusion.

1. INTRODUCTION :

Les tumeurs cérébrales malignes représentent un réel problème de santé publique. En effet, le traitement des gliomes malins reste un domaine de recherche préclinique et clinique très actif pour lequel de nombreux essais thérapeutiques innovants sont basés sur une association chimiothérapie- radiothérapie. Pour autant aucune solution thérapeutique n'offre à ce jour des possibilités curatrices significatives. C'est pourquoi, de tout progrès dans la compréhension fine des mécanismes de croissance tumoraux peut découler des perspectives thérapeutiques nouvelles et prometteuses.

1.1. Physiologie des tumeurs cérébrales :

Une particularité des tumeurs cérébrales est qu'elles modifient de façon importante les paramètres hémodynamiques à cause de deux phénomènes : la néoangiogénèse et la rupture de la Barrière Hémato-Encephalique (BHE). Ces phénomènes sont une étape clé du passage de la tumeur d'un état bénin à un état malin. La néoangiogénèse est un développement anarchique de la vascularisation locale permettant un apport nutritif et d'oxygène essentiel à la croissance de la tumeur. Le deuxième phénomène propre aux tumeurs cérébrales est la rupture de la BHE qui est une conséquence du développement anarchique et incomplet des vaisseaux sanguins tumoraux, la BHE, n'ayant pas le temps de se former complètement.

1.1.1. La néoangiogénèse :

L'angiogénèse est le phénomène physiologique consistant au développement du réseau vasculaire. Ce réseau est structuré pour que toutes les cellules se situent au maximum à 100-200 micromètres d'un vaisseau sanguin pour qu'elles puissent être approvisionnées en nutriments. Le facteur limitant est la diffusion de l'oxygène dans le milieu extravasculaire (Carmeliet and Jain 2000). Lorsque de nouveaux vaisseaux se forment, on parle de néoangiogénèse. Dans le cas de la plupart des tumeurs solides, il existe un phénomène appelé le « switch » angiogénique qui marque le début de cette néoangiogénèse tumorale et la fin de la phase dormante et microscopique de la tumeur. Le volume de la tumeur augmente exponentiellement, et la vascularisation doit s'adapter pour pouvoir la nourrir. Certaines molécules de type Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ou Angioprotéine (ANG) ont un rôle déterminant dans cette néoangiogénèse et sont donc des cibles potentielles pour les traitements des tumeurs. Il arrive souvent que la vascularisation ne croisse pas assez vite pour palier aux demandes colossales de la tumeur. Il se forme alors une nécrose dans les zones hypoxiques de la tumeur, principalement en son centre.

La nouvelle vascularisation est bien moins structurée que celles des tissus sains. Risser *et al.* (Risser, Plouraboue et al. 2007) ont caractérisé cette désorganisation en démontrant une augmentation significative de la dimension fractale du réseau vasculaire dans le cas d'un modèle de tumeur cérébrale du rat. La taille des capillaires est aussi plus importantes dans une tumeur solide que dans le tissu sain (en moyenne, d'un facteur 4 ou 5). D'un point de vue macroscopique, le débit sanguin est très irrégulier (Jain, Ellika et al. 2008) et le volume sanguin (Miles 1999) est très augmenté dans les tumeurs cérébrales malignes, par rapport au tissu sain.

1.1.2. La rupture de la BHE :

Le cerveau sain a la particularité d'avoir des cellules endothéliales très jointives. Ces cellules forment alors une barrière entre le milieu vasculaire et le milieu extravasculaire dans lequel baignent les cellules. Cette barrière, appelée barrière hémato-encéphalique (BHE) ne laisse passer que les molécules de faible taille, tels que les nutriments et autres métabolites nécessaires au cerveau. La BHE est lésée, c'est-à-dire perméable à de plus larges molécules, pour certains vaisseaux sanguins des tumeurs cérébrales. Cette plus grande perméabilité permet également un apport plus important en nutriments aux cellules tumorales qui sont très consommatrices du à leur croissance rapide (Figure 1). Tout comme la vascularisation, la lésion de la BHE est très hétérogène dans la tumeur.

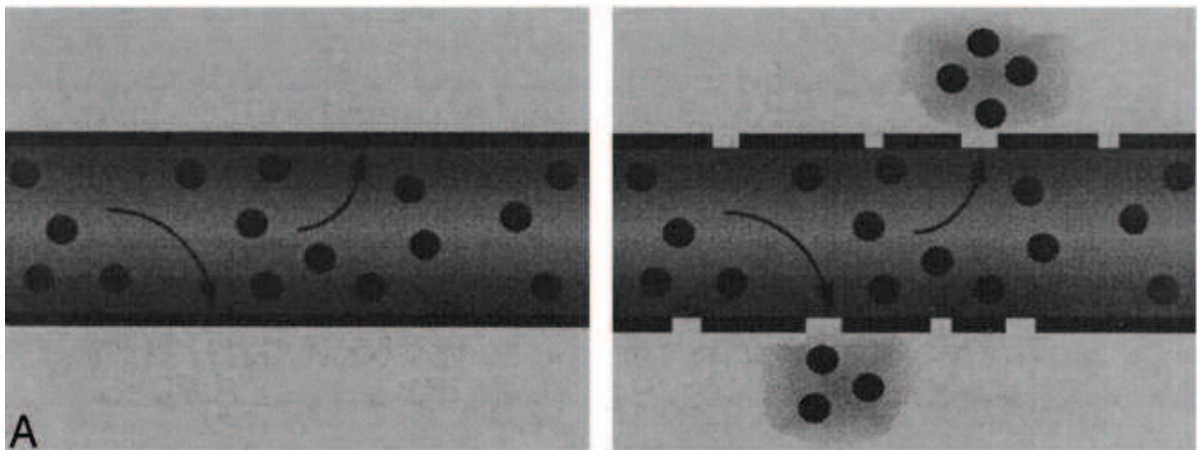


Figure 1 : à gauche, BHE intacte ; à droite, BHE lésée : des molécules de tailles importantes peuvent s'extravasater. Figure extraite de Roberts *et al* (Roberts, Roberts et al. 2000)

La rupture de la BHE s'évalue de manière quantitative avec les coefficients de perméabilité qui traduisent, pour une molécule donnée et un débit sanguin donné, le débit d'extravasation ou de réintégration de cette molécule. C'est à cause de cette perméabilité que les agents de contraste utilisés en scanner et en IRM s'extravasent préférentiellement dans les tumeurs et qu'elles deviennent ainsi visibles à ces techniques d'imagerie. Le degré de perméabilité peut aussi prédire la quantité de drogues chimiothérapeutiques qui peut atteindre les cellules tumorales.

1.1.3. Influence sur les paramètres hémodynamiques :

Les paramètres hémodynamiques que l'on considère pour les mesures de perfusion sont le débit sanguin cérébral (Cerebral Blood Flow, CBF), le volume sanguin cérébral (Cerebral Blood Volume, CBV), le temps de transit moyen (Mean Transit Time, MTT), et la perméabilité des capillaires (P) ou plus particulièrement pour ce dernier paramètre, le produit perméabilité x surface des capillaires sanguins (PS). Ces paramètres sont dépendants de l'architecture vasculaire et de l'état physiologique du patient. Dans le cas de tumeurs cérébrales, ces paramètres sont étroitement liés à la néoangiogénèse et au degré de rupture de la BHE. Globalement, dans un gliome malin, il y a une augmentation du volume sanguin, et un débit sanguin irrégulier. Roberts *et al* et Aronen *et al* (Roberts, Roberts et al. 2000) (Aronen, Gazit et al. 1994) ont corrélés les valeurs de volume sanguin aux grades des tumeurs (évalué par histologie), et donc à leur agressivité. Jain R *et al* (Jain, Ellika et al. 2008) a fait de même pour la perméabilité des capillaires. De plus, la pression interstitielle est bien plus

importante dans la tumeur que dans le tissu sain (Zhao, Salmon et al. 2007), ce qui peut modifier la perméabilité des capillaires.

La mesure absolue des paramètres clés de la perfusion cérébrale (CBF, CBV, MTT et PS) donne accès à un degré de connaissance supérieur sur chaque tumeur, par des cartographies fonctionnelles de ses paramètres hémodynamiques, et donc de son agressivité. Ces paramètres sont donc particulièrement intéressants pour optimiser la mise en place et rendre plus efficace le suivi de nouveaux traitements.

1.2. Protocole de mesure de perfusion :

Wintermark *et al* (Wintermark, Sesay et al. 2005), ont référencé les diverses techniques d'imagerie clinique existantes permettant de mesurer la perfusion, leurs avantages et inconvénients, principalement dans un souci de quantification absolue.

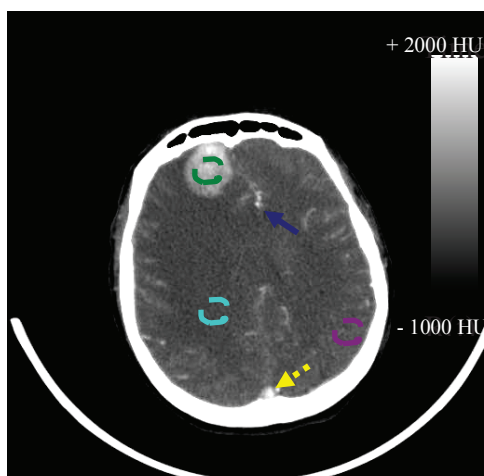
La référence absolue est la tomographie par émission de positons (PET) mais elle pose des problèmes de faible résolution spatiale, et de disponibilité de l'oxygène 15 (demi-vie de 2 min). Parmi les modalités plus disponibles, il y a notamment le scanner X avec la technique de CT Perfusion et l'IRM dynamique (MRI-DSC). Ce sont les techniques permettant de mesurer le plus de paramètres hémodynamiques en une seule acquisition (CBV, CBF, MTT, Perméabilité) et les plus adaptées à la caractérisation des tumeurs. L'IRM offre le contraste le plus intéressant et la possibilité de coupler ces images à de la spectrométrie et des images du tenseur de diffusion. Cependant il n'est pas possible de faire du quantitatif précis, notamment dans les zones de fort contraste comme dans les tumeurs ou près des vaisseaux sanguins importants. Le scanner est par ailleurs la technique d'imagerie la plus accessible à un patient, y compris en situation d'urgence. La seule limitation de la CT-Perfusion est la présence d'artéfacts du durcissement de faisceau et de rayonnement diffusé, inhérents à la géométrie d'acquisition et au spectre large du tube à rayon X. Ces artéfacts, bien que corrigés peuvent réduire la précision de la mesure. L'utilisation d'un faisceau monochromatique comme celui du synchrotron permettrait de faire des mesures quantitatives absolues, puisqu'il est possible de mesurer les coefficients d'atténuation avec précision sans artéfact du durcissement et de diffusion (Adam, Elleaume et al. 2003). Mais cette technique est limitée pour le moment à de la recherche préclinique.

La CT Perfusion et la MRI DSC sont basés sur le même principe. Le protocole consiste en l'injection d'un bolus d'un produit de contraste dans le système veineux du patient. Un bolus est l'injection rapide d'une petite quantité de produit pour mesurer la réponse impulsionnelle du système. On réalise ensuite avec la technique d'imagerie, le suivi dans le temps de l'évolution de la concentration du produit de contraste dans les zones d'intérêt. Le produit de contraste utilisé en CT-perfusion est un élément de numéro atomique élevé, de l'iode dans la plupart des cas (Eastwood, Lev et al. 2003). Dans le cas de l'IRM, on utilise un produit paramagnétique, le gadolinium. Ces traceurs intravasculaires restent intravasculaires dans le cerveau si la BHE est intacte. Lors de lésion de la BHE, comme dans le reste du corps où les vaisseaux sont perméables, le traceur peut diffuser dans l'espace interstitiel. Ils ne sont pour autant pas métabolisés par les cellules, et finissent par regagner le lit vasculaire par diffusion osmotique (loi de Fick). Ce type d'acquisition s'appelle de l'imagerie en premier passage.

Ce rapport présente la première partie de ce travail de recherche, se limitant aux mesures de perfusion faites en tomodensitométrie.

Une acquisition standard de perfusion en CT se fait à 80 kVp, 200 mAs, en une ou plusieurs phases. La première phase consiste en l'acquisition continue d'images pendant une minute (Hirata, Sugawara et al. 2005) à une image par seconde. Pour une mesure plus précise de l'extrasation (cas de la BHE lésée), on peut faire des acquisitions plus longues et ajouter d'autres phases (Lee, Purdie et al. 2003) en complétant l'acquisition continue de 60s par une acquisition plus étalée, d'une image toutes les 10 seconde, pendant 3 minutes. Ces deux phases sont essentielles dans le cas de la CT-perfusion, pour réduire la dose déposée au patient. Wintermark *et al* (Wintermark, Maeder et al. 2000) a montré qu'on obtenait les meilleurs contrastes en CT-perfusion avec une tension de 80kVp, ce qui explique le choix de la tension. En effet 80 kVp offre une énergie de rayons x équivalente plus proche du seuil K de l'agent de contraste que 120 kVp par exemple. Murase *et al* (Murase, Nanjo et al. 2005) ont par ailleurs montré quand à eux que le courant devait être de 200 mAs afin d'avoir des images avec un rapport signal sur bruit suffisant, permettant de calculer correctement les paramètres hémodynamiques. Dans ces conditions d'imagerie, la dose déposée au patient au cours des soixante premières secondes est d'environ 400 mGy dans le cerveau, 700 mGy à la peau et 22 mGy aux niveaux des yeux avec une imagerie 2 cm au dessus des yeux (Hirata, Sugawara et al. 2005). Entre 2 et 5 images sont acquises avant injection de produit de contraste puis on injecte chez l'homme, l'agent de contraste iodé 40cc ([I]=300-400 mg/mL, selon le patient), avec un débit de 4ml/s. Cette injection est suffisamment rapide pour être considéré comme un bolus. La concentration d'iode est ensuite suivie quantitativement dans chaque voxel du cerveau, en fonction du temps, dans le but d'utiliser les modèles de perfusion qui sont décrits au paragraphe suivant. La condition nécessaire pour appliquer ces modèles est qu'il existe une relation linéaire entre le signal CT (les unités Hounsfield, HU) et la concentration d'iode.

Un exemple d'image CT axiale d'un patient ayant une tumeur au cerveau est représenté sur la figure ci-dessous (figure 2). Cette image a été acquise environ 18 secondes après injection d'un bolus de produit de contraste iodé. On peut sur une série temporelle de ce type d'image, suivre la concentration en iode en fonction du temps dans chaque pixel de l'image. Les courbes obtenues dans différentes régions d'intérêt (~ 200 pixels pour la matière blanche, la matière grise et le tissu tumoral, 16 pixels pour la veine et 1 pixel pour l'artère) du cerveau sont représentées sur la figure 3. On observe un premier pic sur chacune des courbes, qui correspond au premier passage du produit de contraste. On peut aussi observer un second pic qui correspond au phénomène de recirculation. Après le premier passage, le produit de contraste fait tout le circuit sanguin, une partie étant éliminée via les reins. L'agent de contraste revient dans la zone d'observation, en moindre quantité et sur un front plus long : c'est la recirculation. On voit nettement que la tumeur prend plus le contraste que les zones saines du cerveau. Il y a deux phases après le maximum de concentration obtenu dans la tumeur, une décroissance rapide due à l'évacuation par les vaisseaux du produit de contraste non extravasé, puis une zone pour laquelle la concentration de produit de contraste décroît



plus lentement. C'est le retour par diffusion passive et l'évacuation par les vaisseaux de la fraction de produit de contraste qui a été extravasée par la BHE rompue.

Figure 2 : Coupe axiale du cerveau 18 secondes après l'injection d'un produit de contraste iodé. Sur l'image sont situées les différentes régions d'intérêts choisies pour les mesures représentées en figure 3. vert = tissu tumoral, bleu clair = matière blanche, violet = matière grise, jaune = veine, bleu foncé = artère

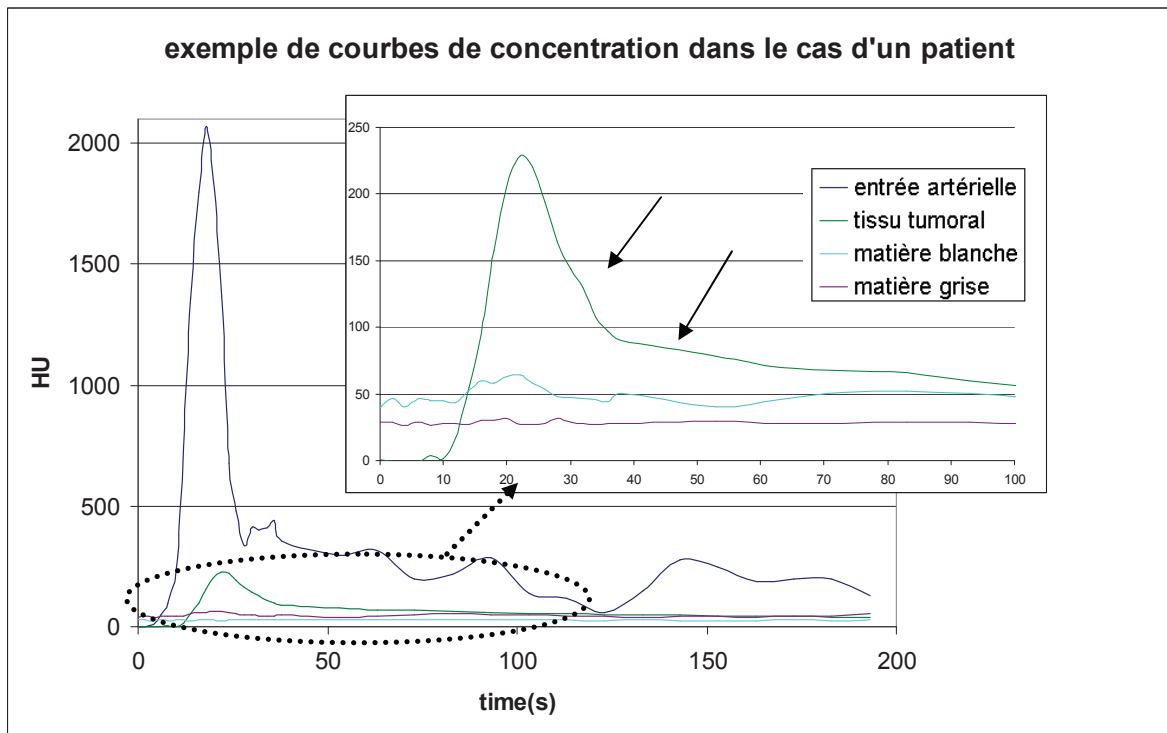


Figure 3 : Courbes de passage du produit de contraste dans différentes zones du cerveau mesurées au niveau des ROI situées sur la figure 2 (Unités Hounsfield (HU) en fonction du temps). En haut à droite un zoom sur la prise de contraste par le tissu tumoral, la matière blanche et la matière grise. La concentration en produit de contraste après le maximum dans le tissu tumoral diminue en deux phases (flèches en trait plein). La première phase est rapide, elle constitue l'évacuation du produit resté dans le compartiment intravasculaire. La deuxième phase constitue le retour par diffusion du produit extravasé dans le compartiment extravasculaire, puis à son évacuation par le flux sanguin.

1.3. Algorithmes de calcul des paramètres de perfusion :

1.3.1. Les différents paramètres de perfusion :

La vascularisation du cerveau se fait par capillaires, ceux-ci sont connectés aux artères et veines principales par l'intermédiaire des artérioles et veinules, comme le montre la figure ci-dessous (figure 4).

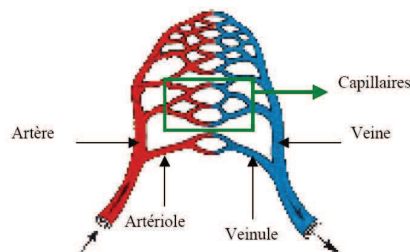


Figure 4 : représentation de l'arbre vasculaire. Les capillaires permettent l'apport en nutriment et en oxygène des tissus.

On va chercher à mesurer de manière macroscopique, les paramètres de perfusion liés aux capillaires qui ont une dimension microscopique. Ces paramètres sont les suivants :

- Le volume sanguin cérébral ou Cerebral Blood Volume (CBV) qui est le volume interne des capillaires fonctionnels par unité de masse de tissu cérébral (ml/100g)
- Le débit sanguin cérébral ou Cerebral Blood Flow (CBF) qui est le débit de sang circulant dans les capillaires fonctionnels par unité de masse de tissu cérébral (mL/100g/min).
- Le temps de transit moyen ou mean transit time (MTT) du sang dans un voxel de tissu (s).
- Si on considère qu'il y a une lésion de la BHE, et donc de la perméabilité, alors la cinétique des traceurs change. Il existe un nouveau paramètre hémodynamique qui est la perméabilité P . Il est utilisé plus fréquemment le produit PS (Permeability Surface-Area Product, PS en ml/min/100g). Ce produit correspond à la surface totale des pores présents dans la BHE lésée que multiplie le rapport entre le coefficient de diffusion et la profondeur moyenne des pores. Pour cela on ne considère que la phase de retour vers les vaisseaux du produit de contraste extravasé.
- D'autres paramètres de perméabilité peuvent être considérés tels que K_1 , le flux sortant (ml/min/100g) de produit de contraste (convection essentiellement) ou k_2 , le temps caractéristique de retour du produit du milieu extrvasculaire au milieu intracellulaire (min^{-1}).

1.3.2. Introduction aux modèles :

Le système nerveux central humain doit être considéré, pour les modèles mathématiques qui vont suivre, comme étant linéaire, stationnaire et fermé. C'est-à-dire que la réponse à plusieurs injections simultanées et identiques est la même que la réponse à une injection unique et que la quantité de produit de contraste sortant de chacune des veines est identique (les aires sous les courbes de concentrations tissulaires en fonction du temps sont identiques). De plus l'injection de produit de contraste doit être suffisamment faible pour ne pas modifier l'hydrodynamique du système. Il est aussi fait comme hypothèse que le mélange sang/produit de contraste est homogène.

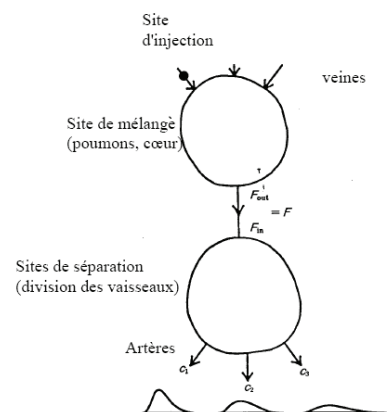


Figure 5 : propriété de linéarité de la cinétique des traceurs, hypothèse pour les modèles mathématiques de calcul des paramètres de perfusion.

Pour décrire la cinétique des traceurs, commençons par un modèle simple comme celui représenté sur la figure 5ci-dessus:

Soit m (en mg) la masse de l'élément lourd que l'on injecte, V (en ml) le volume de fluide du système, alors c (en mg/ml), la concentration en produit de contraste dans la zone homogène du système vaut :

$$c = m/V \quad \text{Equation 1}$$

Soit i la vitesse d'injection du produit de contraste (en mg/sec).

Dans un premier temps, le système vasculaire ne sera constitué que d'une entrée, d'un contenant homogène, et d'une sortie. La concentration en produit de contraste à l'équilibre vaut :

$$c = i/F \quad \text{Equation 2,}$$

avec F (en ml/sec) le débit du système.

Pour que le système ne soit pas biaisé par la recirculation, il faut que l'injection soit très rapide (type dirac), et que $c(t)$ revienne à son niveau de base (sans présence de produit de contraste) pendant un certain temps, avant que le phénomène de recirculation n'apparaisse et que $c(t)$ n'augmente à nouveau.

La masse de produit de contraste injecté est égale à l'intégrale du débit du système multiplié par la concentration en fonction du temps (Eq 3).

$$m = \int_0^{\infty} Fc(t)dt \quad \text{Equation 3}$$

Tout le produit injecté doit passer par l'artère, entrée du système, et par la veine, sortie du système, on doit donc avoir

$$m = \int_0^{\infty} FC_a(t)dt = \int_0^{\infty} FC_v(t)dt \quad \text{Equation 4}$$

Avec $C_a(t)$ et $C_v(t)$ les concentrations de produit de contraste dans l'artère et dans la veine au temps t .

L'équation 4 nous donne m , et on peut en déduire F à partir de l'équation 3 :

$$F = \frac{m}{\int_0^{\infty} c(t)dt} \quad \text{Equation 5}$$

On peut définir aussi le temps de transit moyen :

$$\bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} tc(t)dt}{\int_0^{\infty} c(t)dt} \quad \text{Equation 6}$$

qui d'après le théorème du volume central vaut aussi (Axel 1980):

$$\bar{t} = V / F \quad \text{Equation 7}$$

Cependant la taille des capillaires est inférieure à la résolution des appareils d'imagerie médicale. Un pixel représente à la fois la contribution au signal des capillaires, des cellules et du tissu interstitiel. Si le traceur est non diffusible, on peut alors définir un facteur d'échelle f :

$$f = \frac{V_{\text{vasc}}}{V_{\text{vasc}} + V_{\text{interstitium}} + V_{\text{cells}}} = \frac{V_{\text{vasc}}}{V}. \quad \text{Equation 8}$$

Avec V_{cells} , le volume pris par les cellules, $V_{\text{interstitium}}$, le volume interstitiel et V_{vasc} , le volume vasculaire. Si notre traceur occupe bien tout le volume vasculaire, f représente le CBV et les équations 7 et 8 permettent de le calculer si l'on connaît le CBF et le MTT.

Si les vaisseaux sont perméables au produit de contraste, on doit considérer deux compartiments distincts comme le montre la figure suivante:

- Le compartiment intravasculaire avec C_b , la concentration en agent de contraste et V_b le volume intravasculaire
- Le compartiment extravasculaire avec C_e et V_e , la concentration en agent de contraste et le volume extravasculaire

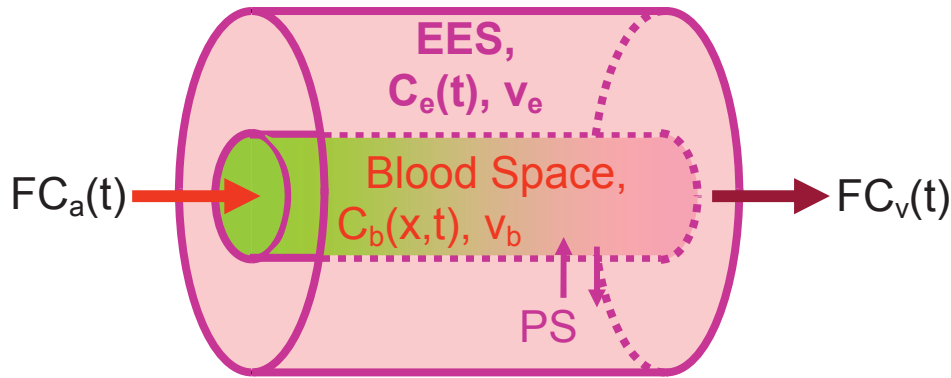


Figure 6 : Schéma représentant les paramètres hémodynamiques dans le cas d'un modèle à deux compartiments.

D'après le modèle de patlak (Patlak and Blasberg 1985), les échanges entre les deux compartiments sont caractérisés par deux constantes de transfert K_1 et k_2 . k_2 nul correspond à l'approximation que l'extravasation de l'agent de contraste, domine largement. Les valeurs de K_1 et k_2 dépendent directement de la perméabilité surfacique. La fraction de d'agent de contraste passant des vaisseaux au compartiment extra-vasculaire correspond à la fraction d'extravasation E .

Dans ce cas, la masse de produit de contraste présente dans le tissu du cérébral à l'instant T vaut : $Q(T) = F \int_0^T [C_a(t) - C_v(t)] dt$. **Equation 9**

Plusieurs algorithmes existent pour calculer les paramètres hémodynamiques à partir de $Q(t)$, $C_a(t)$ et $C_v(t)$ qui sont les trois valeurs mesurables sur les images tomodensitométriques. Parmi ces algorithmes, il y a ceux qui sont modèles dépendants

(hypothèse préliminaire sur la micro-fluidique) et ceux qui sont modèles indépendants (aucune hypothèse de faite).

1.3.3. Modèle 1 : « maximum slope »:

La méthode du maximum slope (Klotz and Konig 1999) est un des modèles les plus simples qui nécessite une hypothèse très contraignante : celle d'une BHE non lésée, c'est-à-dire qu'il n'y a pas (ou de façon négligeable) d'extravasation du produit de contraste de l'intra vers l'extravasculaire. Dans ce cas, la loi de Fick donne :

$$F/V = \frac{(dC(t)/dt)_{tissue}}{(C_a(t) - C_v(t))} \quad \text{Equation 10}$$

Cette relation est valable pour tout t, donc, pour avoir le meilleur rapport signal sur bruit et pour établir un critère reproductible permettant de mesurer la perfusion faire des cartes de perfusion automatiquement, la valeur de t choisie est la valeur où (dC(t)/dt)_{tissue} est maximum : t_{max_slope}. Si de plus à t_{max_slope}, le produit de contraste n'a pas encore commencé à ressortir par la veine (possible avec des injections rapides) alors on obtient :

$$F/V = \frac{(dC/dt)_{tissue}(t_{max_slope})}{C_a(t_{max_slope})} \quad \text{Equation 11}$$

On peut aussi calculer le CBV grâce à la relation suivante :

$$CBV = \frac{\int_0^{\infty} Ctissue(t)dt}{\int_0^{\infty} Ca(t)dt} \quad \text{Equation 12}$$

que l'on peut approximer par :

$$CBV = \frac{\max(Ctissue(t))}{\max(Ca(t))} \quad \text{Equation 13}$$

Le calcul de t_{max_slope} à partir C_{tissue}(t) est sensible au bruit. Les variations rapides du signal dû au bruit impliquent des valeurs de la dérivée importantes non représentatives de la fluidique mis en jeu. Il est nécessaire de filtrer les hautes fréquences des courbes temporelles avant d'effectuer ces calculs. Cet algorithme ne peut pas donner de résultats corrects dans les zones où la BHE est lésée. Cependant les valeurs obtenues dans les zones où elle est intacte sont une première approximation des valeurs réelles, que l'on peut obtenir avec un temps de calcul minimal. Ce calcul peut être utilisé dans une étape préliminaire pour initialiser des paramètres d'ajustement plus complexes comme par exemple, lorsqu'on utilise des variables gammas qui sont décrites dans le paragraphe suivant :

1.3.4. Modèle 2 : « Variables Gamma »:

Comme on le voit sur la figure 3, page 10, les courbes de concentrations en agent de contraste en fonction du temps présentent une augmentation brusque puis une décroissance qui peut être considérée comme mono-exponentielle. Il a été montré par Thompson *et al* que les variables gamma étaient des fonctions qui pouvaient décrire avec précision ce type d'évolution de la concentration de traceur dans le sang après l'injection d'un bolus. La variable gamma est une fonction du type:

$$Q(t) = Cp \left(\frac{e}{\alpha\beta} \right)^\alpha (t - t_a)^\alpha \exp\left(-\frac{t - t_a}{\beta}\right) \quad \text{Equation 14}$$

où Cp est la concentration au pic, α et β sont des paramètres influant la largeur à mi-hauteur de la fonction, le temps de montée et de redescente de la concentration. t_a est le temps d'apparition du produit de contraste (Thompson, Whalen et al. 1964). Une représentation de ce type de fonction est donnée sur la courbe suivante :

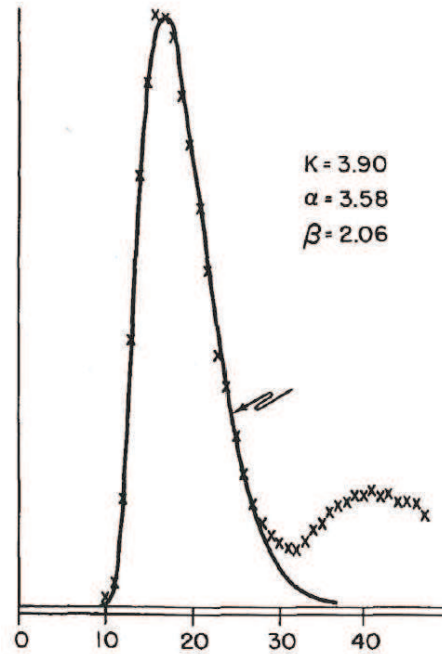


Figure 7 : Exemple d'ajustement par une variable gamma et suppression de la recirculation, d'après la publication de Thompson (Thompson, Whalen et al. 1964).

A partir de cette fonction, on peut calculer le CBF, CBV et MTT :

$$MTT = t_a + \beta(\alpha + 1) \quad \text{Equation 15}$$

$$\text{D'après l'équation 12 on a } CBV = \frac{\left[Cp \left(\frac{e}{\alpha\beta} \right)^\alpha \cdot \beta^{(\alpha+1)} \cdot \Gamma(\alpha+1) \right]_t}{\left[Cp \left(\frac{e}{\alpha\beta} \right)^\alpha \cdot \beta^{(\alpha+1)} \cdot \Gamma(\alpha+1) \right]_a} \quad \text{Equation 16}$$

Le dénominateur concerne les paramètres de la variable gamma obtenus sur une entrée artérielle de référence. Le numérateur représente les paramètres de la variable gamma obtenu dans le voxel d'intérêt. Γ , représente l'intégrale de la variable gamma de 0 à $+\infty$.

$$CBF = CBV / MTT \quad \text{Equation 17}$$

Pour ajuster les courbes $Q(t)$ avec les variables gamma, plusieurs méthodes ont été essayées : un algorithme utilisant la méthode des moindres carrés et les expressions analytiques des dérivées partielles de la fonction par rapport aux paramètres recherchés ; méthode du simplex implémentée par Adam *et al.* (Adam, Elleaume et al. 2003) ; et une méthode utilisant l'algorithme de Levenberg-Marquardt, basé lui aussi sur les moindres carrés

(<http://cow.physics.wisc.edu/~craigm/idl/fitting.html>). C'est cette dernière méthode qui semble donner les meilleurs résultats.

Les variables gamma permettent d'éliminer le phénomène de recirculation. Par contre pour implémenter une méthode d'ajustement qui converge, il est nécessaire de ne considérer que les points de concentration avant l'apparition de la recirculation (figure 7).

On peut anticiper le fait que la méthode de la variable gamma ne va pas être concluante lorsque la BHE est rompue car la décroissance de la courbe de concentration tissulaire est une combinaison d'un mécanisme actif vasculaire que modélise la variable gamma, avec un mécanisme de diffusion passive vers le milieu vasculaire de la fraction extravasée non pris en compte dans le modèle.

1.3.5. Modèle 3 : approximation adiabatique du modèle de Johnson et Wilson.

Les deux algorithmes précédents nécessitent des hypothèses contraignantes. La seule méthodologie permettant de mesurer tous les paramètres de perfusion en une seule acquisition et dans le cas d'une BHE rompue est l'approximation adiabatique (St Lawrence and Lee 1998) du modèle de Johnson et Wilson (Johnson and Wilson 1966). Nous ne parlerons pas ici de la méthode bi-compartimentale, bidirectionnelle de Patlak (Patlak, Blasberg et al. 1983) qui fonctionne dans le cas d'une BHE rompue, mais qui ne permet pas de mesurer le CBF.

La méthode présentée dans ce chapitre utilise la notion de fonction de résidu tissulaire (Lee, Purdie et al. 2003). Si $F.Ca(t)$ était exactement une fonction dirac alors la réponse impulsionnelle du système observée dans un voxel de tissu $R(t)$ (quantité de produit de contraste restant dans le tissu observé au temps t) en fonction du temps t serait comme suit :

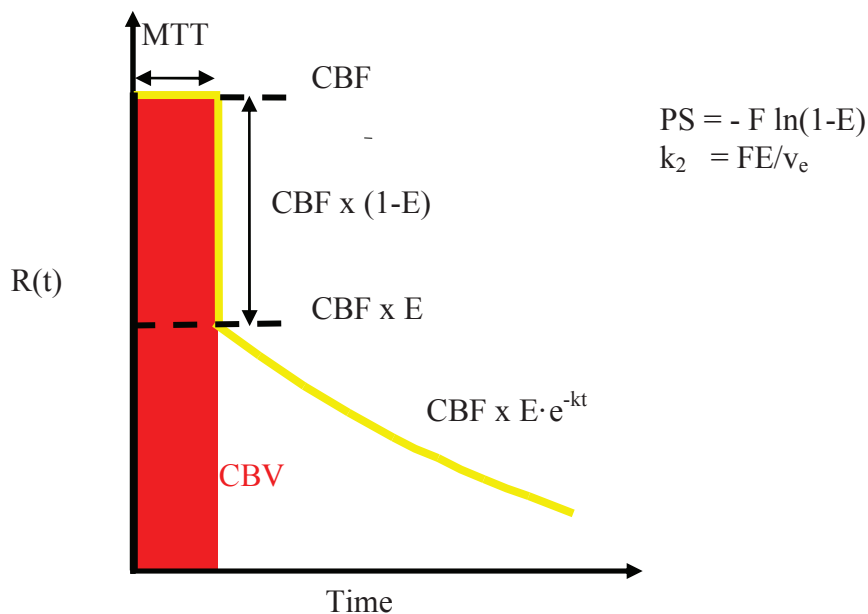


Figure 8 : Représentation de la réponse impulsionnelle et description des paramètres hémodynamiques à partir de cette fonction.

On appelle cette réponse impulsionnelle « BF scaled IRF » (Blood Flow scaled impulse residue function) ou fonction résidu. On obtient à partir de cette fonction tous les paramètres de perfusion souhaités à savoir CBV, CBF, MTT et PS.

Or $F.Ca$ n'est pas une fonction Dirac, mais peut être considéré comme une succession de Diracs. L'approximation adiabatique consiste à dire que dans ce cas, on a :

$$Q(t) = F.Ca(t) \otimes R(t) \quad \text{Equation 18}$$

Les paramètres mesurables sur une acquisition de perfusion sont $Q(t)$ et $Ca(t)$. Grâce à la déconvolution de ces deux fonctions, on obtient alors $F.R(t)$ et donc les paramètres hémodynamiques qui nous intéressent.

La convolution est un opérateur non bijectif. La déconvolution est donc une technique relativement instable, sensible au bruit et aux incertitudes sur les mesures temporelles. Pour effectuer la déconvolution, il y a deux méthodes possibles : une méthode utilisant la transformée de Fourier inverse ($x_n = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} X(k) e^{2i\pi \frac{kn}{N}}$, avec N le nombre total de points, x_n le signal temporel discret indexé n , k/N la k ième fréquence), ou une méthode analytique consistant à écrire le produit de déconvolution sous forme matricielle (Equation 19) puis effectuer une inversion matricielle.

$$\begin{pmatrix} Q(\Delta t) \\ Q(2\Delta t) \\ \vdots \\ Q((M-1)\Delta t) \\ Q(M\Delta t) \\ Q((M+1)\Delta t) \\ Q((M+2)\Delta t) \\ \vdots \\ Q((N-1)\Delta t) \\ Q(N\Delta t) \end{pmatrix} = F \cdot \Delta t \cdot \begin{pmatrix} C_p(0\Delta t) & 0 & 0 & \dots & \dots & 0 \\ C_p(\Delta t) & C_p(0\Delta t) & 0 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ C_p((M-2)\Delta t) & C_p((M-3)\Delta t) & \dots & C_p(\Delta t) & C_p(0\Delta t) & 0 \\ C_p((M-1)\Delta t) & C_p((M-2)\Delta t) & \dots & \dots & C_p(\Delta t) & C_p(0\Delta t) \\ C_p(M\Delta t) & C_p((M-1)\Delta t) & \dots & \dots & C_p(2\Delta t) & C_p(\Delta t) \\ C_p((M+1)\Delta t) & C_p(M\Delta t) & \dots & \dots & C_p(3\Delta t) & C_p(2\Delta t) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ C_p((N-2)\Delta t) & C_p((N-1)\Delta t) & \dots & \dots & C_p(N-M\Delta t) & C_p(N-M-1\Delta t) \\ C_p((N-1)\Delta t) & C_p(N-2\Delta t) & \dots & \dots & C_p(N-M-1\Delta t) & C_p(N-M\Delta t) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} R(\Delta t) \\ R(2\Delta t) \\ \vdots \\ R((M-1)\Delta t) \\ R(M\Delta t) \end{pmatrix} \quad \text{Equation 19}$$

Les méthodes utilisant les transformées de Fourier sont les plus rapides, mais les plus sensibles au bruit. On peut être amenés à utiliser des filtres passes bas adaptatifs (Gobbel and Fike 1994). Il existe des méthodes d'inversion matricielles moins sensibles au bruit telles que la décomposition en valeur singulière (SVD) où il est facile de filtrer le bruit sur la matrice diagonale résultante de la décomposition.

L'optimisation de la méthode faite par Lee *et al.*, consiste à faire une première déconvolution par SVD pour estimer des paramètres préliminaires de l'IRF, puis une technique de déconvolution itérative (succession de modification des paramètres recherché puis de reconvolution, pour retrouver la fonction tissulaire expérimentale. C'est pour cela qu'on parle de modèle dépendant. Si la notion de fonction résidu est discutable, il n'existe pas de méthodes basées sur un modèle indépendant qui permet de converger vers des paramètres de perfusion avec une stabilité suffisante.

1.3.6. Correction du volume partiel

On remarque dans tous les modèles précédemment cités que les mesures de perfusion impliquent les mesures d'une concentration artérielle de référence (cf figure 2 et 3). Ces artères sont de taille proche ou inférieure à la résolution des appareils d'imagerie médicale. Le signal de l'artère est moyenné avec le tissu environnant et est sous-estimé par rapport à sa valeur réelle: c'est l'effet de volume partiel. L'artère de référence, par laquelle on déconvolue la fonction $Q(t)$ dans le modèle de Johnson et Wilson par exemple, est donc sous-estimé d'un facteur k à cause de cette effet, et les mesures des paramètres hémodynamiques sont alors erronées. Il est donc nécessaire d'implémenter des méthodes de correction de volume partiel.

Une méthode indépendante du système d'imagerie consiste à trouver dans le volume observé, une veine suffisamment grosse pour qu'elle ne soit pas affectée par le volume partiel. Si C_a' est la courbe mesurée, alors la courbe "réelle" serait C_a tel que $C_a' = k.C_a$. k est le facteur de volume partiel.

On a alors :

$$C_v(t) = C_a(t) * h(t) = \frac{C_a'(t)}{k} * h(t) = C_a'(t) * \frac{h(t)}{k} \quad \text{Equation 20}$$

où

$$R(t) = [1 - \int_0^t h(\tau) d\tau] \quad \text{Equation 21}$$

La déconvolution de C_v avec C_a permet alors d'estimer $h(t)/k$.

Hors $R(\infty) = 0$ puisque le produit de contraste disparaît du tissu cérébral avec le temps, d'après la loi de Fick (par retour dans la vascularisation).

Donc

$$k = \frac{1}{\int_0^{\infty} h'(t) dt} \quad \text{Equation 22}$$

avec $h' = h/k = \text{deconvolution}(C_v, C_a)$

1.3.7. Utilisation de fantômes pour évaluer les modèles de perfusion

Ces modèles de perfusion sont donc très disparates et peuvent donner des résultats extrêmement différents en fonction des conditions physiologiques (recirculation, perméabilité des capillaires) et critères initiaux éventuels. Il existe une grande variabilité entre les résultats et des instabilités sont souvent constatées. Il est donc extrêmement difficile de quantifier les paramètres de perfusion.

Il n'existe dans la littérature aucun rapport concernant la réalisation d'un fantôme de perfusion, dont on connaîtrait de manière théorique les caractéristiques physiques théoriques précisément et qui nous permettrait d'évaluer objectivement les modèles de perfusion. L'objectif de ce projet de recherche est donc de proposer ou de réaliser un fantôme fiable qui permet de simuler un réseau de capillaires poreux et dont on connaît tous les paramètres influant sur la micro-fluidique de laquelle découle les paramètres de perfusion (volume sanguin, débit sanguin et perméabilité des capillaires).

2. Matériel et méthodes

2.1. Caractérisation physique du fantôme :

Le but du fantôme est de représenter un réseau de capillaires complexes de taille micrométrique et possédant une membrane poreuse. Jusqu'à présent dans la littérature, les seuls fantômes que l'on a référencés pour la perfusion sont des fantômes anthropomorphiques permettant de caractériser les scanners, et d'en faire le contrôle de qualité : résolution spatiale, effets de volume partiel, réponse en fonction de la concentration d'iode (Du, Umoh et al. 2007). Ou alors des fantômes permettant des mesures de dosimétrie pour évaluer les effets biologiques pour le patient de la dose de radiation reçue pour les examens de CT-perfusion

(Hirata, Sugawara et al. 2005). Dans le cas d'études d'angiographie, des fantômes ont été réalisés (Costalat, Lebars et al. 2006) mais ne modélisent pas un réseau important de capillaires, mais seulement quelques divisions vasculaires entre une l'entrée et la sortie. De plus la taille des vaisseaux était plus importante que celle des capillaires sanguins du cerveau, et ils n'étaient pas perméables. Au vu de la difficulté pour construire des capillaires poreux de l'ordre de la dizaine de micromètre (diamètre externe) dans des matériaux permettant l'imagerie CT et IRM (cette construction ne semble maîtrisée qu'avec du silicium pour le moment), nous avons opté pour un fantôme existant en l'état d'un rein artificiel (dialyseur).

Les dialyseurs que nous utilisons comme fantôme sont des dialyseurs commercialisés par la société Gambro. Il s'agit du modèle Polyflux 210H®. Ils sont constitués d'environ 12 000 capillaires perméables. Il y a deux circuits dans un dialyseur, comme le montre la figure 9 ci-dessous, l'un est le circuit sanguin et l'autre est le circuit du dialysat.

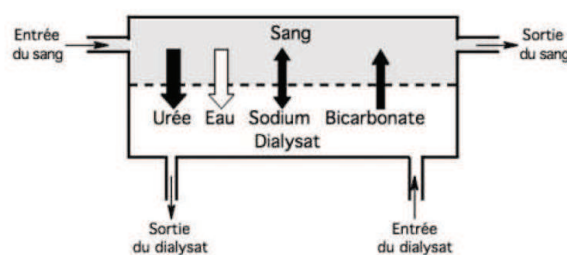


Figure 9 : Fonctionnement d'un dialyseur. Il y a deux compartiments distincts (dialysat et sang). Les échanges entre ces deux compartiments se font au travers d'une membrane poreuse.

L'intérêt principal du dialyseur dans notre cas, et d'être constitué de capillaires proches de la taille des gros vaisseaux sanguins du cerveau, ces capillaires ont des membranes avec des pores pour assurer la perméabilité. Le nombre de capillaires permet de modéliser un réseau "complexe", et la connectique entre l'entrée sang et les capillaires permet d'avoir un débit homogène dans tous les capillaires (figure 10).

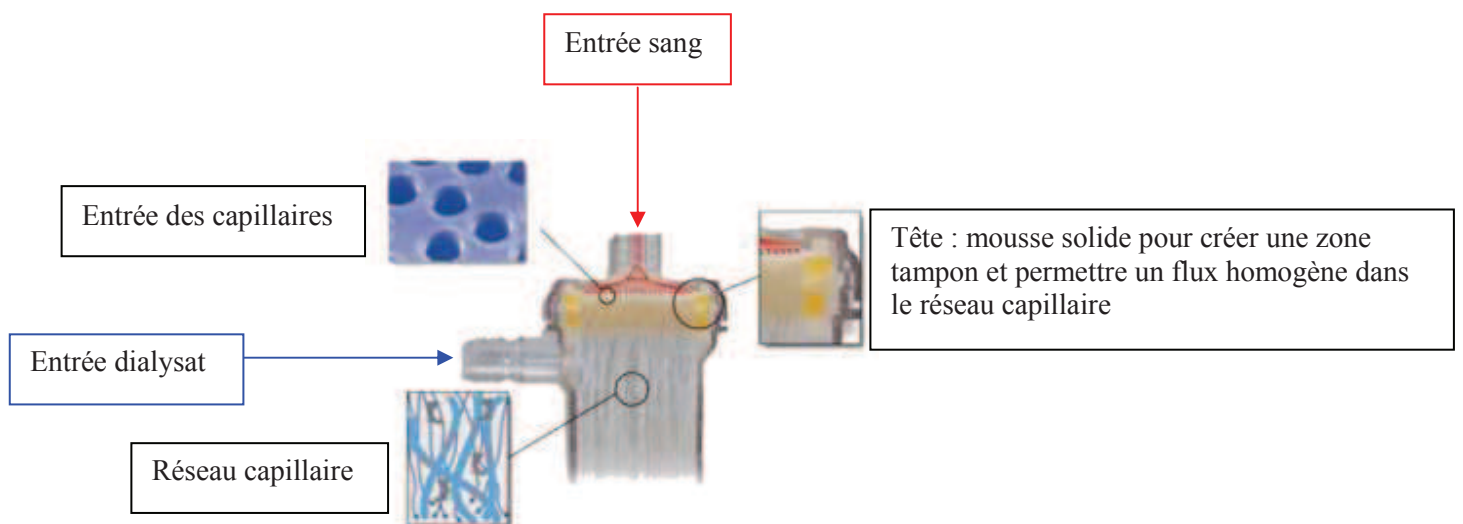


Figure 10 : Fonctionnement des dialyseurs Polyflux® de la société Gambro. L'entrée sang pénètre dans les capillaires après avoir traversé une mousse solide permettant d'homogénéiser le débit intracapillaire.

Pour valider le dialyseur comme étant un fantôme adapté pour évaluer quantitativement et théoriquement les paramètres de perfusion, il est nécessaire de contrôler parfaitement les paramètres physiques et hydrodynamiques de notre système.

2.1.1. Paramètres volumiques

Les caractéristiques du dialyseur fournis par le constructeur sont les suivantes :

- 4.8 cm de diamètre interne pour le contenant.
- 26.8 cm de long (sans les membranes de connectique capillaires/entrée et sortie sang)
- 12 000 capillaires de 315 μm de diamètre externe, et 215 μm de diamètre interne
- 5.7 nm de diamètre pour les pores dans les membranes de capillaires

A partir de ces données on peut calculer alors les paramètres suivants :

| | Volume (cm^3) | Pourcentage (%) |
|---------------------------------------|--------------------------|-----------------|
| Volume total | 485 | 100 |
| Compartiment intracapillaire | 115.67 | 23.85 |
| Compartiment extracapillaire | 235.97 | 48.65 |
| Membranes capillaires (polyamix®)* | 133.36 | 27.50 |

Tableau 1 : Volume des différents compartiments du dialyseur.

*Polyamix = polyaryléthersulfone + polyvinylpyrrolidone + polyamide (masse volumique : environ 1.15 g.cm^{-3}). La masse volumique moyenne du dialyseur rempli d'eau est donc d'environ 1.04 g.cm^{-3} , ce qui est similaire à la masse volumique du tissu cérébral.

A partir de ces paramètres il faut évaluer le volume sanguin dans le dialyseur, le débit sanguin, le temps de transit moyen ainsi que la perméabilité surfacique

2.1.2. CBV théorique

Pour estimer le CBV théorique, il faut connaître le volume intracapillaire par 100 g de dialyseur. 100 g de dialyseur représente un volume de 96.15 ml (masse volumique de 1.04 g.cm^{-3}). Le compartiment intracapillaire représente 23.85 % de ce volume. Cela représente donc un CBV théorique de 22.9 mL/100g

2.1.3. CBF théorique

Cette approche nécessite de connaître le débit D à l'entrée du dialyseur et que celui-ci soit identique au débit de sortie. Le CBF est le débit par 100 g de tissus concerné. Le CBF théorique est donc de $100D/M$, M étant la masse du dialyseur en grammes.

Pour un débit D classique de 150 ml/min, cela nous donne $\text{CBF} = 29.7 \text{ ml/min/100g}$.

Une approche plus réaliste consisterait à mesurer le débit unitaire par capillaire qui est de $D/12\,000$. Pour un débit D classique de 150 ml/min, cela représente un débit par capillaire de $1.25 \cdot 10^{-2} \text{ mL/min/capillaire}$

Pour connaître le débit théorique à obtenir en CT-perfusion, il est nécessaire d'évaluer le nombre de capillaires par voxel de coupe axiale de dialyseur. Si on considère un voxel de dimensions x,y,z (z étant l'épaisseur de coupe), le nombre de capillaires par voxel est égal à $12\,000xy/S$, S étant la surface interne d'une section axiale du dialyseur (18.1 cm^2).

Le CBF théorique est donc de $CBF = xyD/S = xyD/18.1 \text{ ml/min/voxel}$

Exemple :

Si on considère une acquisition typique de CT-perfusion (voxels de $0.422 \times 0.422 \times 5 \text{ mm}^3$), le nombre de capillaires par voxel est de 1.181 capillaires/voxel. Le débit serait donc de $9.84 \cdot 10^{-5} D \text{ ml/min/voxel}$. Pour un débit D classique de 150 ml/min, cela nous donne :

$CBF = 1.48 \cdot 10^{-2} \text{ ml/min/voxel}$.

2.1.4. MTT théorique

Le théorème du volume central nous donne :

$MTT = CBV/CBF$ ce qui nous donne $MTT = 46.3 \text{ s}$ pour un débit de 150 ml/min à l'entrée du dialyseur

2.1.5. PS théorique :

Si on considère une géométrie simple, telle que celle décrite à la figure 1 page 7, il faut se poser la question du mécanisme de transport des molécules à travers la membrane. Dans un modèle où la diffusion domine, ce qui est le cas quand le produit de contraste réintègre le lit vasculaire, la perméabilité surfacique théorique se calcule comme suit :

La perméabilité d'une membrane poreuse vaut $P = D/\delta$ avec D coefficient de diffusion de la molécule considéré dans le milieu considéré et δ la profondeur des pores. La constante de diffusion d'une molécule dans un milieu donné peut être calculée par la relation de Stoke-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad \text{Equation 23}$$

avec η la viscosité du produit environnant, r le rayon hydrodynamique de la molécule considérée, T la température et k_B la constante de Boltzmann.

Pour un milieu composé la viscosité se calcule avec la loi des mélanges suivante, qui suppose qu'il n'existe pas d'interactions particulières entre les divers composés (ce qui est valable pour un produit de contraste avec les constituants du sang)

$$\ln(\eta) = \sum_i X_i \ln(\eta_i) \quad \text{Equation 24}$$

Avec η_i la viscosité du constituant i du mélange et X_i la fraction molaire du constituant i dans le mélange.

Dans nos études, nous avons utilisé de l'Ioméron[®] qui est un produit de contraste de faible viscosité dont la molécule principale est l'ioméprol $C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$, de poids moléculaire valant 777.1 g/mol. Pour les expériences considérées ici, nous avons utilisé de l'ioméron 400 mg/mL ($\eta_{\text{ioméron, 400}} = 27.5 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$). Nous avons dilué ce produit pour obtenir des concentrations maximales de produit de contraste de 50 mg/ml d'iode, ce qui représente 102 mg/ml d'ioméprol ($1.28 \cdot 10^{-4} \text{ mol/ml}$). 1 ml d'eau ($\eta_{H_2O} = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$) contient $5.56 \cdot 10^{-2}$ moles d'eau. La masse molaire d'une telle solution fait donc environ 19.7 g/mol et on a $X_{\text{Eau}} = 0.998$

et $X_{\text{Ioméron}} = 0.002$. De plus à cause de cette dilution on aura $\eta_{\text{ioméron}, 50} \ll 27.5 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$. On peut donc négliger la contribution de l'ioméprol dans la viscosité totale du mélange et considérer $\eta_{\text{ioméron}, 50} = \eta_{\text{H}_2\text{O}} = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$.

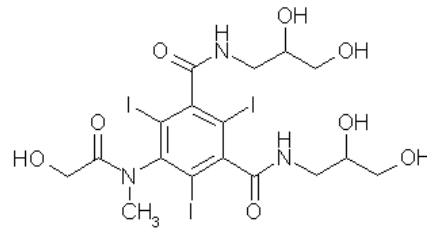


Figure 11 : Représentation 2D de la molécule d'ioméprol

Pour calculer D , il est nécessaire de connaître le rayon hydrodynamique de la molécule. Pour l'ioméprol $r \sim 0.38 \text{ nm}$ (information fabricant). Dans ce cas, le coefficient de diffusion dans l'eau à 20 C vaudra $D = 6.45 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Dans le cas des membranes du dialyseur, si les trous traversent la membrane de façon transversale, on a $\delta = 50 \mu\text{m}$, on obtient alors $P = 1.3 \cdot 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

Pour mesurer PS , il reste à connaître S , la surface totale occupée par les pores sur le dialyseur. La seule information dont nous disposons est une taille de pores de 5.7 nm de diamètre moyen. Pour connaître la densité des pores il est nécessaire d'avoir recours à des techniques d'analyse, permettant de détecter et compter ces trous sur les capillaires.

Les techniques utilisées sont la microscopie à force atomique (AFM) et la microscopie électronique à balayage muni d'un canon à émission de champ (MEB-FEG) au laboratoire des matériaux et du génie physique (LMGP) de l'école nationale supérieure de physique de Grenoble (ENSPG), en utilisant les moyens techniques de la plateforme du consortium des moyens technologiques communs (CMTC) de l'institut science et technologie des matériaux (ISTM).

Le microscope à force atomique est un AFM Dimension 3000 de chez Veeco fonctionnant en mode oscillant contact avec une pointe de 10 nm, ce qui nous permet de voir des trous de l'ordre de 5.7nm de diamètre mais pas de les mesurer. Le MEB-FEG est un appareil de type SEM ZEISS ultra 55, fonctionnant en mode électron secondaire à 3 kV, ce qui offre la meilleure résolution et permet de ne pas détruire l'échantillon. Pour le MEB, une métallisation a été effectuée par dépôt d'un film ultra mince d'au/Pd (1nm) sur l'échantillon afin de ne pas brûler les fibres et pouvoir évacuer les charges (dépôt PESC Gatan, vide secondaire).

Les premières mesures sur la surface externe en MEB ont montré que contrairement aux spécifications du constructeur, la taille des pores n'était pas de 5.7 nm de diamètre, ni homogène. Les images par microscopie électronique montrent une structure du capillaire en couches superposées. La membrane du capillaire n'est donc pas un bloc homogène troué comme nous avait dit le constructeur, mais un ensemble de membranes fines poreuses superposées. La surface extérieur des capillaires possèdent des pores de tailles très variables (figure 12 a)). Sur les images réalisées, on observe que la surface extérieure des capillaires possède des trous que l'on peut regrouper en 3 catégories, de tailles différentes. Les trous les plus grands ont une surface de $180 \mu\text{m}^2$ environ avec une densité de $1200 \text{ trous}/\text{mm}^2$ (0.22 cm^2 de trous par cm^2 de surface externe). Les pores de tailles moyennes (flèche sur figure

12b)), de surface environ égale à $4 \mu\text{m}^2$ (21 500 pores/ mm^2 de surface restante), ce qui représente une densité surfacique de 0.067 cm^2 pour 1 cm^2 de surface externe de capillaires.

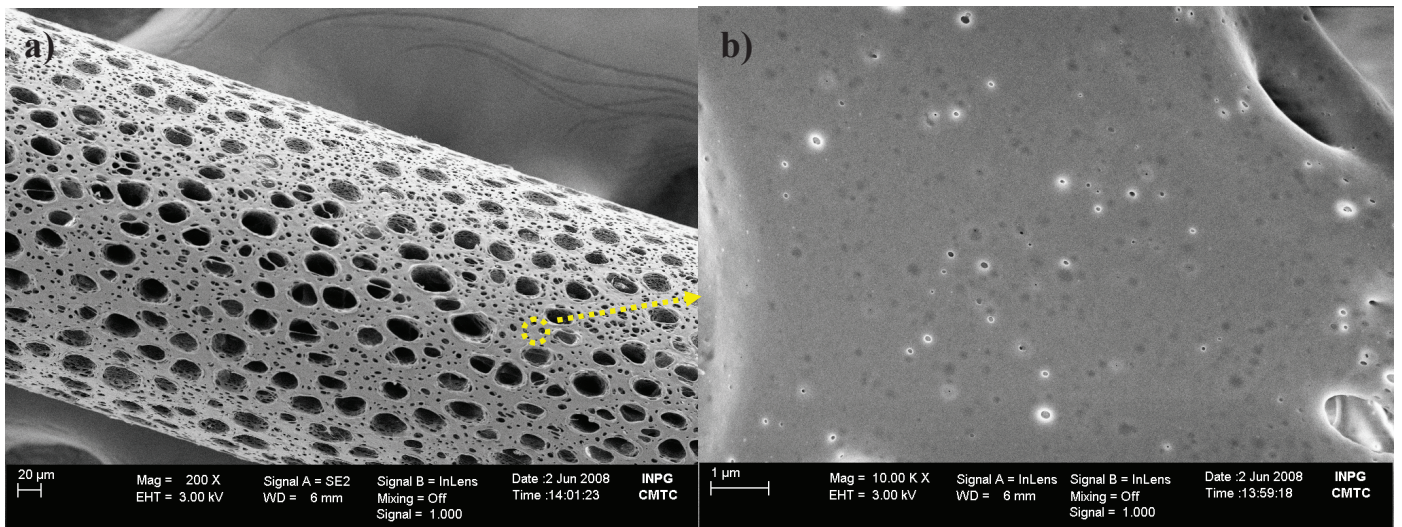


Figure 12 : Images de la surface externe des capillaires réalisées par MEB-FEG après métallisation. L'image b) est un grandissement de la zone contournée en jaune sur l'image a). On observe sur ces images trois catégories de tailles de pores distinctes.

La troisième catégorie de pores a une dimension proche de la limite de résolution du MEB utilisé (figure 12b)). Il est donc difficile de les compter. Ce comptage a été réalisé sur les images issues de l'AFM (Figure 13).

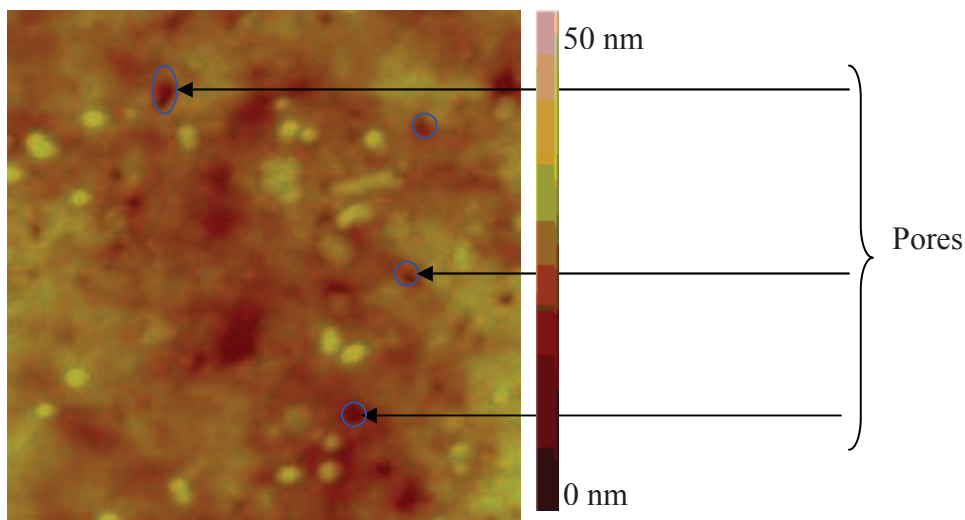


Figure 13 : Image de la surface externe des capillaires réalisées par AFM en mode oscillant contact permettant de compter la densité des trous les plus petits.

Sur ces images, nous voyons qu'il y a environ $20 \text{ trous}/\mu\text{m}^2$ de surface restante. On fait l'hypothèse que ce sont là les trous de 5.7 nm de diamètre. Ils occupent donc une surface de $5.1 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2$ par μm^2 de surface externe restante et donc $3.6 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ par cm^2 de surface externe de capillaires. Si les mesures à l'AFM sont concluantes, et que tous les petits trous sont bien détectés, la contribution de ces derniers est donc négligeable. Une mesure avec une pointe plus petite serait cependant intéressante pour conclure.

Des mesures en MEB-FEG ont été également réalisées sur la surface interne des capillaires (Figure 14 a) à c)). Dans ce cas de la surface interne il n'y a qu'un seul type de pores, et leur répartition est plus homogène. On mesure la densité surfacique des pores grâce aux images de la figure 14b). La taille du pore est d'environ $0.565 \mu\text{m}^2$ (mesuré sur le grossissement $\times 50$, figure 14c), en faisant l'hypothèse qu'il s'agit de deux trous qui ont fusionné. Sur l'image en grossissement $\times 20$, il a été mesuré environ 10 pores sur une surface de $12.5 \mu\text{m}^2$. La mesure de cette surface a été effectuée que sur la faible zone mesure, pour que le rayon de courbure intervienne de façon négligeable sur le calcul des surfaces. Cette mesure est certainement approximative, à cause de la faible statistique. Sous cette hypothèse, on aurait environ 0.8 pores par μm^2 . Soit 0.45 cm^2 de pores par cm^2 de surface interne.

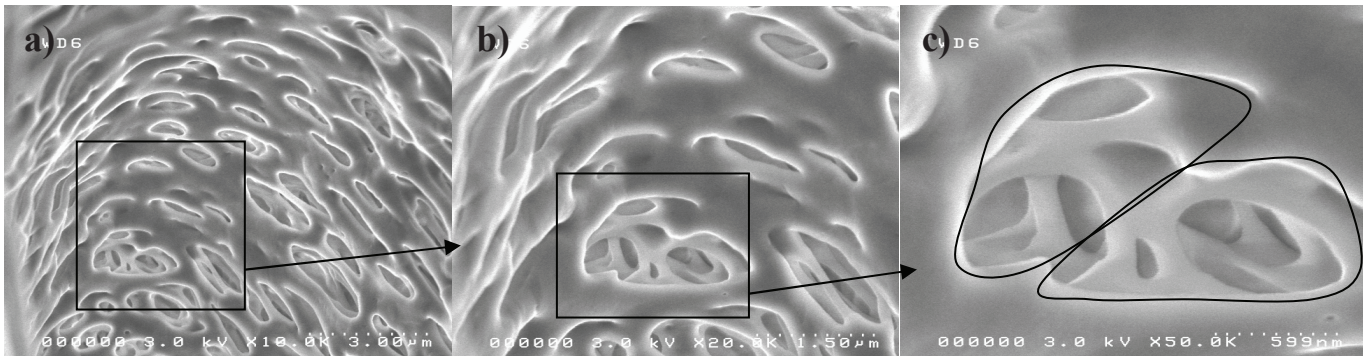


Figure 14 : Images réalisées par MEB-FEG de la surface interne des capillaires. Le grandissement augmente de gauche à droite. Ces images permettent de mesurer la taille des pores sur la surface interne des capillaires et leur densité surfacique.

Plusieurs hypothèses sont envisageables pour calculer le rapport PS. Soit on considère la surface interne pour la mesure de la surface totale de pore, soit on considère la surface externe.

La surface interne totale des capillaires est de 2.17 m^2 . La surface externe est de 3.2 m^2 . Dans le cas de la première hypothèse, cela équivaut à une surface sur tout le dialyseur de 0.97 m^2 de pores, et dans le cas de la seconde hypothèse on obtient 0.72 m^2 de pores sur tout le dialyseur.

On peut néanmoins faire l'hypothèse qui maximise PS en considérant que tous les pores de la surface externe du dialyseur conduisent directement de manière transverse à travers la membrane en $50 \mu\text{m}$, vers l'espace intracapillaire.

Dans ces conditions $\text{PS} = 560 \text{ ml/min}$. L'unité standard de PS doit être ramenée à la masse du dialyseur et on obtient $\text{PS} = 110 \text{ ml/100g/min}$.

La structure en couches de la membrane complexifie cependant nettement les choses et on a une grosse incertitude sur la distance réellement parcourue par les molécules à travers le capillaire. Cette distance est certainement bien supérieure à $50 \mu\text{m}$, et la perméabilité est très certainement bien inférieure à cette valeur.

2.1.6. Résumé des paramètres hémodynamiques:

Le tableau ci-dessous résume les valeurs théoriques des paramètres de perfusion théoriques que l'on devrait trouver pour notre dialyseur.

| Paramètre hémodynamique | Valeur théorique |
|-------------------------|---------------------|
| CBV | 22.9 ml/100g |
| CBF | 0.198xD ml/min/100g |
| MTT | 6940/D secondes |
| PS | < 110 ml/100g/min |

Tableau 2 : Récapitulatif des paramètres hémodynamiques théoriques du fantôme dialyseur. D est le débit appliqué par la pompe en entrée du circuit sang du dialyseur en ml/min.

2.2 Protocole d'acquisition de CT-Perfusion

Les acquisitions ont été réalisées pour correspondre à des mesures de CT-Perfusion standards telles que décrites dans l'introduction. Le scanner est un scanner Siemens Somatom Plus 4 Zoom Volum, 4 barrettes. Les acquisitions ont été réalisées à 80 kVp avec une exposition de 200mA.s (1 seconde par rotation de tube). Les 4 coupes font chacune 5 mm d'épaisseur. Le champ de vue est de 215 mm, avec une matrice de 512 x 512. Les pixels dans les images reconstruites sont donc isométriques (0.422 x 0.422 mm²). Le filtre de reconstruction est le filtre standard du protocole de perfusion cérébrale sur cet appareil : B30s (moyen/dur). Les mesures ont été effectuées en deux phases. La première est une phase continue de 70 s avec une image toutes les deux secondes. La deuxième phase consiste en une attente de 10 s puis 5 images (une image toutes les 2 seconde), ceci répété 10 fois. Le temps total d'acquisition est donc de 4 min et 30 s. Deux photos du setup expérimental sont présentées en annexe.

Le fantôme est branché en circuit ouvert pour ne pas inclure de recirculation dans un premier temps. Le circuit « sang » est connecté en permanence, afin que les capillaires soient toujours perfusés. Il est relié à un bac en entrée par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique et en sortie à un bac où se déverse la sortie veineuse. Les expériences avec le dialyseur sont réalisées avec la pompe Roth cyclo II[®] avec la tête à six galets pour assurer un débit contrôlé sur le circuit sang. Le site de l'injection se situe entre la pompe et l'injecteur sur l'entrée artérielle (figure 15). 20 ml d'ioméron à 50mg/ml sont injectés à 4 ml/s par un injecteur MedRad Mark5 contrôlé à distance. Cette concentration permet d'utiliser toute la dynamique du scanner.

Il existe également un circuit dialysat qui permet d'appliquer une pression hydrostatique extracapillaire à l'aide de poches de dialysat placées à différentes hauteurs, ou alors un débit extracapillaire à l'aide d'une 2^{ème} pompe.

Avant de faire les acquisitions scanner, un topogramme est réalisé (figure 16). Cela consiste en une acquisition par transmission monodirectionnelle, comme pour radiographie. L'objet à imager subit une translation pour pouvoir faire l'acquisition sur toute sa longueur avec le détecteur 4 barrettes. Le topogramme est réalisé à 120 kV, 100 mAs et avec des pixels de 1x1mm². Le placement du fantôme sur le scanner a été fait de façon à avoir sur le champ de vue, le dialyseur, les tubulures représentant l'entrée artérielle, la sortie veineuse et la sortie dialysat. Les pompes sont installées hors du champ de vue du scanner.

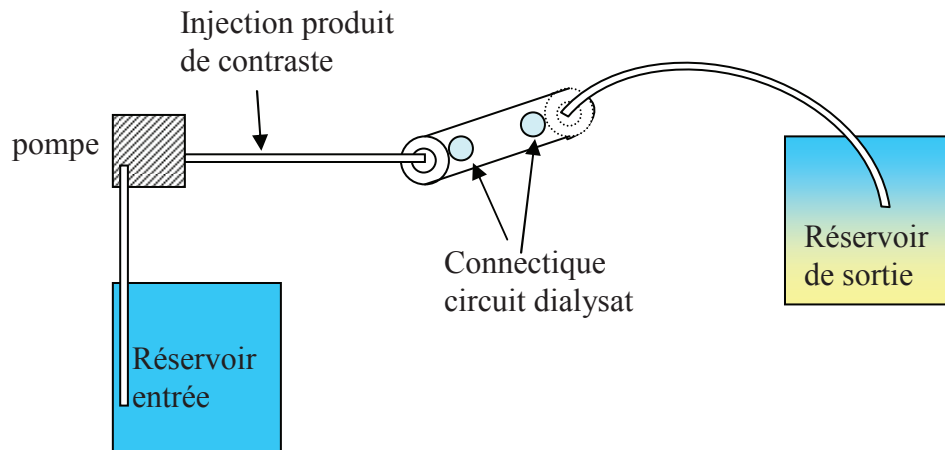


Figure 15 : Schéma représentant le montage expérimental. Le dialyseur est relié à un réservoir de fluide en entrée par l'intermédiaire d'une pompe. Entre la pompe et le dialyseur se situe le site d'injection. La sortie du dialyseur se vide dans un bas recueillant le fluide avec le produit de contraste.

Les tubulures d'entrée et sortie du sang, sur lesquels ont fait les mesures de $C_a(t)$ et $C_v(t)$ ont un diamètre interne suffisamment grand (> 5 mm, plus de 10 fois la taille du pixel) pour ne pas avoir d'effet de volume partiel. Il n'est donc pas nécessaire dans le cas du fantôme de faire la correction de volume partiel.

Le fluide utilisé est de l'eau, afin de pouvoir rincer facilement et réutiliser le fantôme. Le but est de contrôler les algorithmes de mesure de perfusion, qui sont sensés marcher, peu importe le fluide considéré. Une série d'acquisition a été néanmoins réalisée avec du Voluven[®] pour avoir un liquide qui mime le sang, notamment en terme de viscosité (2.2mPa.s à 24° C) (Costalat, Lebars et al. 2006). Dans tous les cas, le dialyseur a été purgé au mieux lors de l'insertion de ces fluides, de façon à n'avoir quasiment plus de bulles d'airs qui fausseraient les mesures. Il est néanmoins presque impossible d'éviter complètement la présence de bulles.

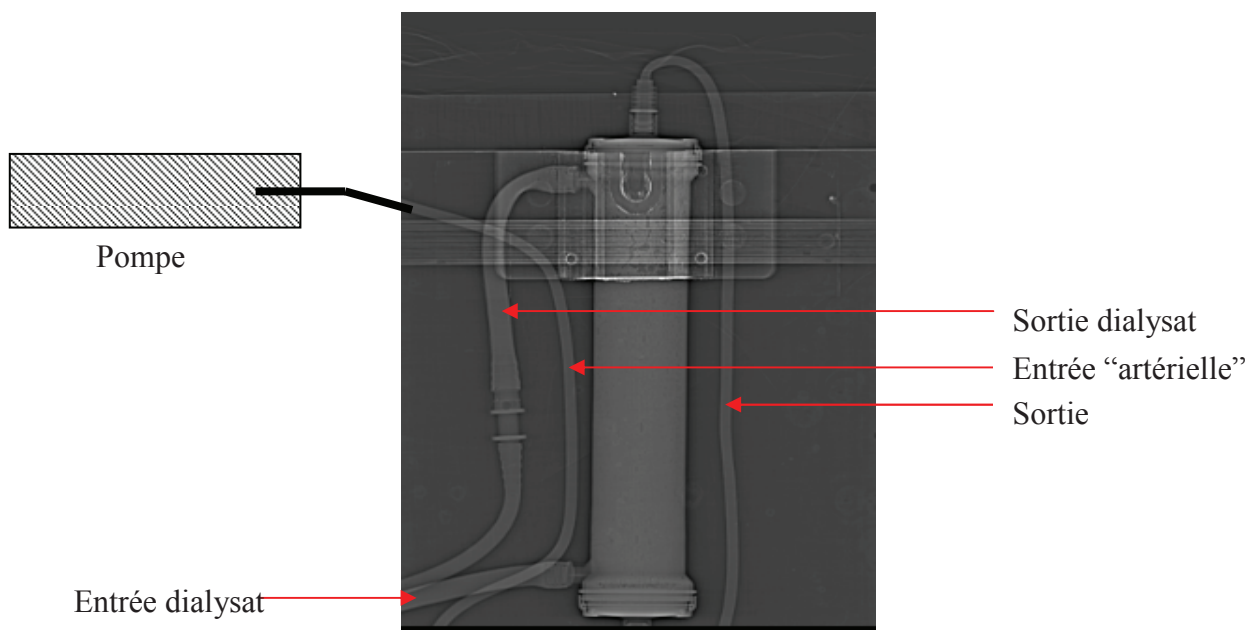


Figure 16 : Topogramme du dialyseur et des tubulures d'entrées et sorties des deux compartiments (sang et dialysat). Le rectangle noir représente le champ de vue en coupe lors de l'acquisition en CT-Perfusion. Paramètres d'acquisition : (120kV, 100mAs, pixels 1/1 mm)

La figure 17 suivante représente une coupe axiale du montage lors d'une des expériences.

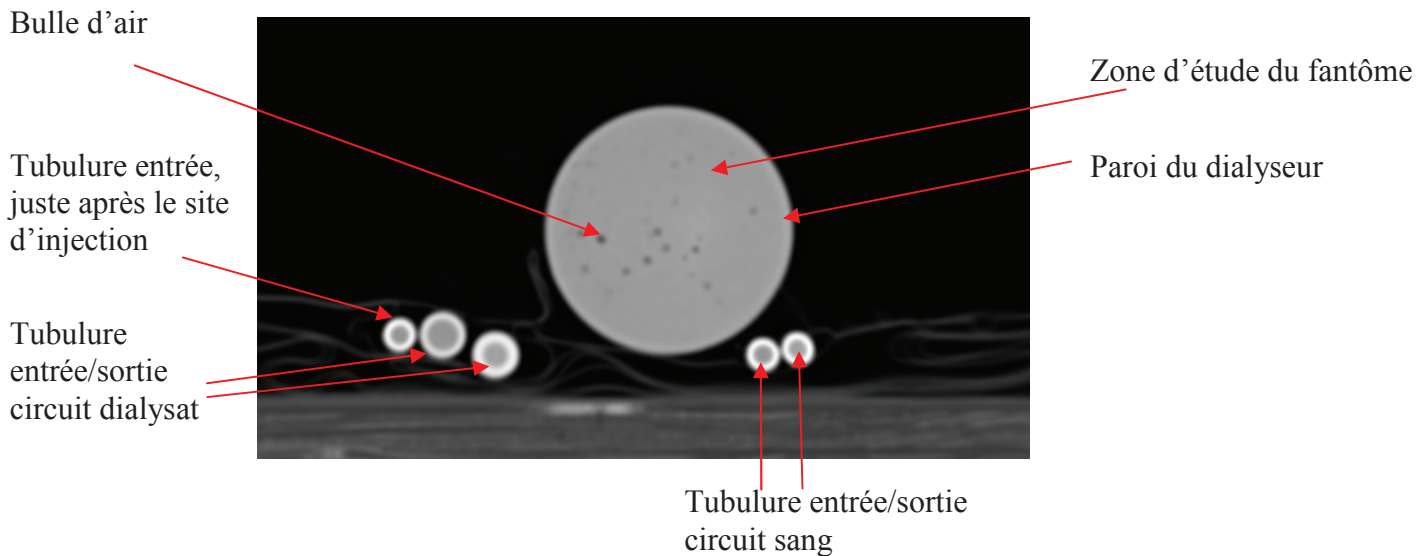


Figure 17 : Coupe axiale d'une acquisition en CT-Perfusion du montage expérimental avec le dialyseur et les tubulures d'entrées et sorties des deux compartiments. Paramètres d'acquisition : 80kV, 200 mAs, 1s/coupe, 4 coupes de 5 mm, pixels : 0.422x0.422 mm², filtre de reconstruction B30s

2.3 Etudes réalisées

Une étude multiparamétrique a été réalisée afin d'explorer les différents paramètres de perfusion sur notre fantôme.

Le seul paramètre qu'il n'est pas possible de faire varier avec le dialyseur est le CBV car il ne dépend que du nombre de capillaires et de leur diamètre.

Pour pouvoir modifier le facteur PS on souhaite faire varier l'extravasation. Trois approches peuvent être envisagées :

- Augmenter considérablement la taille de l'agent de contraste, en choisissant des complexes macromoléculaires. Cela a pour effet de modifier principalement le facteur D, mais également η . Cette approche sera réalisée dans une seconde phase du projet car elle nécessite de trouver un produit de contraste de diamètre micrométrique.
- Faire circuler le fluide du dialysat, permettant ainsi d'évacuer le produit de contraste qui s'extravase des capillaires. Si la vitesse d'évacuation est suffisamment rapide, on devrait voir passer un bolus comme s'il n'y avait pas d'extravasation. Dans tous les cas on modifie ainsi le phénomène de diffusion en jouant sur la loi de Fick. Nous avons testé 5 configurations :
 - une acquisition de référence avec un débit de 100 ml/min et le circuit de dialysat fermé
 - 4 acquisitions avec le circuit de dialysat ouvert et connecté à une pompe réglée successivement sur les positions 0, 4, 6 et max. Les débits mesurés sont présentés dans le tableau 3 et montrent que ceux-ci varient en fonction de la position de la pompe du milieu extracapillaire.
- Appliquer dans le milieu extracapillaire une force qui empêche le produit de contraste de sortir. Dans ce cas, le système va réagir comme si le facteur PS était inférieur à ce qu'il vaut réellement. Cette force peut être induite par exemple par une pression hydrostatique ou par une pression osmotique. Nous avons testé pour l'instant dans

notre étude l'application d'une pression hydrostatique. Pour cela nous avons réalisé l'expérience avec du Voluven et relié le circuit dialysat à des poches de Voluven placées à différentes hauteurs. La hauteur de ces poches est proportionnelle à la pression exercée. L'utilisation de Voluven permet que la différence de pression n'entraîne pas un flux de liquide du compartiment extracapillaire vers le compartiment intracapillaire, du à sa viscosité et son poids moléculaire élevé.

On peut également faire facilement varier le CBF, en modifiant le débit de la pompe en entrée. Nous avons réalisé une étude, avec les 3 débits suivants : 85 ; 100 ; 110 et 160 ml/min. Pour ces études nous avons maintenu le circuit du dialysat (extracapillaire) fermé.

| Position de la pompe dialysat | Débit circuit sanguin (ml/min) | Débit circuit dialysat (ml/min) |
|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Fermée | 100 | 0 |
| 0 | 100 | 50 |
| 4 | 150 | 135 |
| 6 | 165 | 165 |
| max | 210 | 230 |

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des débits dans le circuit sanguin et le circuit dialysat lors de la série d'expérience où le compartiment extracapillaire était relié à une pompe pour faire varier le facteur PS.

2.4 Lien HU/concentration en iode

Pour pouvoir appliquer correctement les modèles de perfusion, il faut que le signal produit par le scanner soit directement proportionnel à la concentration d'iode. Or le scanner fournit des images en unité Hounsfield (HU) avec :

$$HU = 1000 \frac{\mu_{tissu} - \mu_{eau}}{\mu_{eau}}$$

La réponse d'un scanner est directement proportionnelle à la concentration en iode si le faisceau était monochromatique, comme c'est le cas pour le faisceau synchrotron après le monochromateur, car les coefficients d'atténuation sont des grandeurs qui dépendent de l'énergie (Elleaume, Charvet et al. 2002). Ce n'est pas le cas d'un faisceau scanner clinique qui est polychromatique. Il faut donc vérifier que les unités hounsfield sont bien proportionnelles à la concentration d'iode. Pour vérifier et quantifier cela, nous avons réalisé des acquisitions à 80kVp et 200mA.s d'un fantôme contenant plusieurs tubes dans lesquels il y a des concentrations en iode différentes (Figure 18a)). Ces concentrations ont par la suite été mesurées précisément par spectrométrie de masse au centre d'analyse du CNRS à Lyon (résultats en attente). Les mesures ont été effectuées sur des régions d'intérêt de 385 pixels au centre des tubes de concentrations. Si on considère les concentrations prévues lors des dilutions, on obtient alors bien une relation linéaire entre la concentration d'iode et les nombres Hounsfield, comme le montre la figure 18b). On obtient la relation suivante :

$$HU = a [I] + b \quad \text{Equation 25}$$

avec $a = 36.85 \pm 1.385$ HU/(mg/ml) et $b = 10.68 \pm 17.01$ HU

Le coefficient de corrélation est $R^2=0.9987$. Le chi2 réduit vaut 1/6. Le coefficient b n'est pas significativement différent de 0, la valeur théorique pour l'eau, ce qui est conforme avec la théorie.

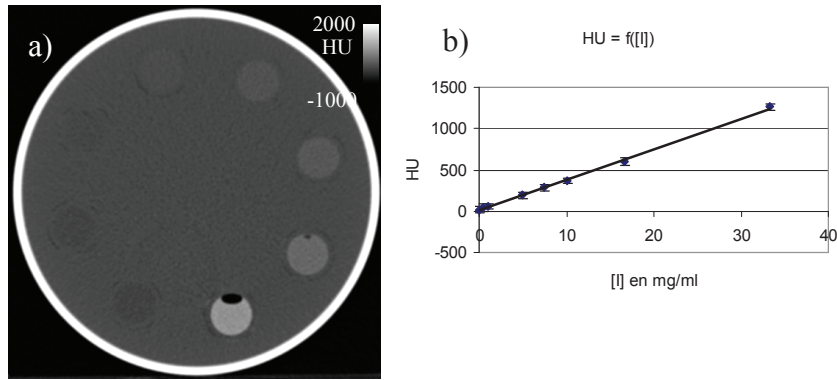


Figure 18 : a) Coupe axiale du fantôme de concentration en produit de contraste. 8 concentrations différentes ont été mesurées allant de 0 mg/ml à 33.33 mg/ml. b) Caractérisation de la réponse du scanner en fonction de la concentration en produit de contraste. La réponse peut être considérée comme linéaire avec une pente de 36.85 HU/[I]_{mg/ml}. Le chi2 réduit vaut 1/6.

2.5 Homogénéité et reproductibilité des mesures sur dialyseur

2.5.1 Homogénéité

Pour pouvoir valider des mesures de perfusion, il faut que l'on connaisse le débit dans les capillaires. Lors des expériences, on mesure le débit qui passe en entrée et en sortie du dialyseur. Le débit dans les capillaires est connu si la distribution du fluide est homogène dans tous les capillaires. En effet, le débit intracapillaire serait alors le débit d'entrée divisé par le nombre de capillaires.

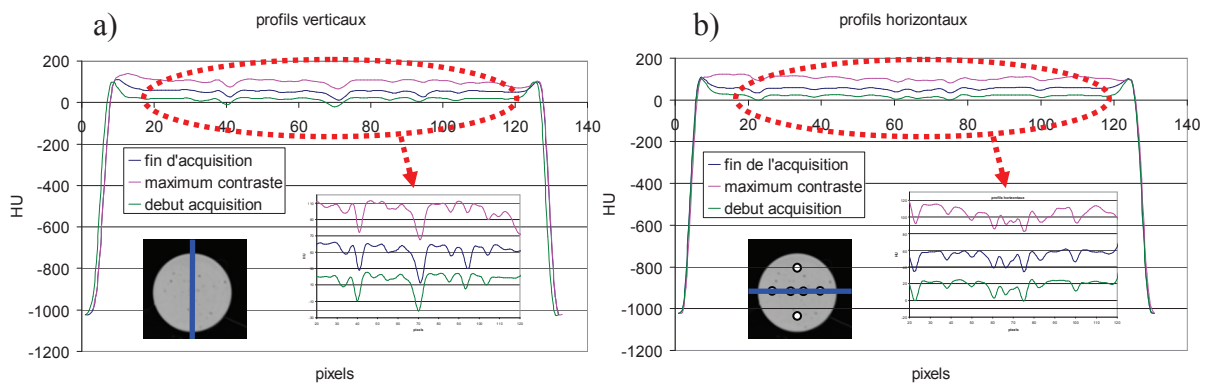


Figure 19 : Profils verticaux a) et horizontaux b) du dialyseur mesurés à trois moments caractéristiques du passage d'un bolus de produit de contraste iodé lors d'une acquisition de CT-perfusion. Le profil est représenté en bleu sur les coupes axiales correspondantes. En bas à droite de chaque profil est représenté un zoom sur la partie interne du dialyseur. Sur la coupe axiale de la figure 19b) sont représentées en blanc les régions d'intérêts où a été mesuré l'évolution temporelle du produit de contraste pour les tests de reproductibilité du paragraphe 2.5.2

Des mesures d'homogénéité de la distribution du produit de contraste ont été réalisées avec un débit d'eau à l'entrée et la sortie du dialyseur de 2.47 ml/s \pm 0.06 ml/s. Des profils horizontaux de HU ont été mesurés à trois périodes différentes, au début de l'acquisition avant l'arrivée du produit de contraste, au temps correspondant à la concentration maximale de produit de contraste, et à la fin de l'acquisition. Pour chaque mesure, le profil correspond à une moyenne sur 20 profils de 1 pixel d'épaisseur adjacents et sur trois images consécutives dans le temps (espacées de 2 secondes). Les résultats des profils verticaux et horizontaux sont représentés sur la figure 19a) et b). Les écarts types obtenus sur les mesures de concentrations

sur les profils sont tous inférieurs à 10 HU, ce qui est du même ordre de grandeur que la valeur du bruit dans un fantôme d'eau pour ce type d'acquisition (filtre B30s). Il n'y a donc pas d'hétérogénéités significatives, mis la part la présence de quelques bulles d'air qui n'ont pas pu être purgées.

Des mesures de la concentration du produit de contraste en fonction du temps ont également été effectuées sur des régions d'intérêt de 8x8 pixels à différents endroits du dialyseur (haut, bas, gauche, droite et deux au centre). Un exemple de courbes de concentration en fonction du temps est représenté sur la figure 20a). Un test t de student apparié bidirectionnel a été réalisé entre chaque courbe pour voir s'il existe une différence significative entre les courbes de concentration en fonction de la position dans le fantôme. Le seuil de significativité est fixé à 0.05. Les valeurs du test de student entre les différentes courbes sont comprises entre 0,176 et 0.641, cela montre que les mesures ne sont pas significativement différentes les unes des autres. S'il existait un effet de gravité subit par le produit de contraste on devrait observer des valeurs HU plus élevées en bas du dialyseur par rapport au haut du dialyseur. Or sur le profil vertical on observe des HU sont légèrement plus faibles sur le bas du dialyseur que sur le haut (environ 4 HU de moins). Ce phénomène est indépendant de la présence d'iode et est dû à la présence de la table du scanner sur laquelle est posé le fantôme, qui perturbe les mesures. Cet effet est néanmoins faible au vu du bruit. Il s'avère néanmoins que la répartition du produit de contraste dans le dialyseur n'est plus homogène pour des débits inférieurs à environ 1.25 ml/s (~ 75 ml/min), si le fluide utilisé est de l'eau. Il y a un effet de gravité qui apparaît, le produit de contraste décanse dans le dialyseur, et le débit ne peut plus être supposé homogène dans le dialyseur.

On peut conclure de ces mesures, que dans nos conditions d'acquisitions ($D > 75$ ml/min), la répartition du produit de contraste est homogène dans tout le dialyseur, et donc que les paramètres hydrodynamiques devraient l'être également.

2.5.2 Reproductibilité

Plusieurs expériences réalisées dans des conditions quasi identiques (débit, injection de produit de contraste et protocole scanner) ont montré une bonne reproductibilité et qu'il est possible de réutiliser le dialyseur après l'avoir bien purgé pour en évacuer complètement l'iode. La figure 20a) nous montre des courbes de concentration en fonction du temps dans le dialyseur pour 3 acquisitions avec des débits mesurés respectivement de $2.435 \text{ ml/s} \pm 0.015$; $2.407 \text{ ml/s} \pm 0.049$; $2.254 \text{ ml/s} \pm 0.022$. Les valeurs des tests de Student ont été calculés entre les différentes courbes et montrent qu'elles ne sont pas significativement différentes ($p > 0.5$ pour les courbes de concentration obtenues dans le dialyseur, l'entrée artérielle et la sortie veineuse).

2.6 Implémentation des modèles

Dans l'état actuel du projet, les modèles de perfusion sont en cours d'implémentation et les résultats présentés sont donc préliminaires. Le but étant d'implémenter les modèles présentés au paragraphe 1.3, de réaliser le calcul de paramètres de perfusion pixel à pixel pour obtenir les cartes paramétriques pour chaque modalité de calcul.

La méthode de la pente maximale n'est pas encore assez stable pour être présentée dans ce rapport. Des valeurs préliminaires ont été obtenues sur des courbes de concentration moyennes obtenues sur un ROI pour la méthode utilisant les ajustements gamma. Seule une

cartographie complète de perfusion a été réalisée pour le modèle de Johnson et Wilson pour l'acquisition de référence avec un débit de 100 ml/min et le circuit de dialysat fermé. Cette mesure a été réalisée par le Pr Ting Lee sur le logiciel CT-perfusion 4 (GE Healthcare, Buc, France), dans le cadre de la collaboration entre l'U836-6 et le laboratoire de CT-perfusion (Imaging laboratories, Robarts Research Institute, London, Ontario, Canada).

La seconde partie de ce projet de recherche (juin-septembre 2008), consistera à comparer les 3 méthodes de calcul de la perfusion cérébrale.

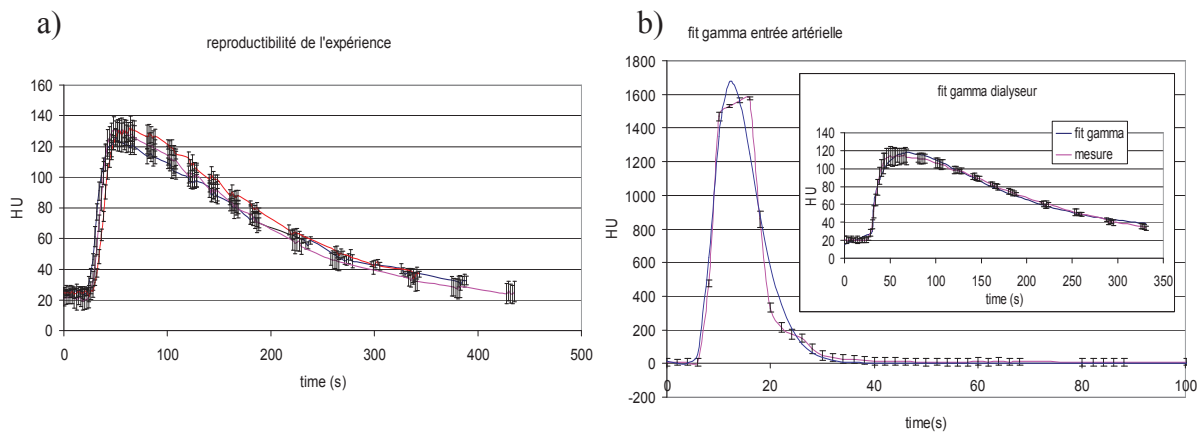


Figure 20 : a) Courbes représentant l'évolution temporelle en concentration de produit de contraste lors de trois acquisitions avec des paramètres hémodynamiques identiques. Les trois acquisitions donnent des résultats non significativement différents. b) Entrée artérielle et courbe tissulaire expérimentales (dans l'encadré) et avec ajustement par une variable gamma. Les ajustements concordent avec les courbes expérimentales.

En ce qui concerne la méthode du fit gamma, les différents paramètres à estimer sont α , β , C_p et t_a . L'ajustement des courbes par une variable gamma demande l'initialisation de ces paramètres, ce qui est fait de la façon suivante :

- $C_p = \max(Q(t))$, C_p étant la valeur maximum de la fonction gamma.

- t_a = temps à partir duquel la dérivée de $Q(t)$ en fonction du temps est supérieure à 2.5 HU. Cette valeur a été trouvée empiriquement, mais correspond bien au démarrage des courbes.

- α et β : ces deux paramètres sont les plus dur à estimer. Il n'y a qu'une autre équation simple permettant d'évaluer ces paramètres ; $t_p = \alpha\beta + t_a$. Supposant t_a initial proche de la valeur exacte, on peut estimer correctement le produit $\alpha\beta$. Il serait nécessaire d'avoir une autre équation pour dissocier α et β . Cependant toutes les autres équations disponibles sont complexes et nécessiteraient un temps de calcul trop important pour seulement estimer des paramètres initiaux. Le calcul des cartes de perfusion qui demande de calculer les paramètres de perfusion dans chaque voxel de la coupe prendrait alors trop de temps. Pour l'ajustement lui-même la méthode utilisée est celle de Levenberg-Marquardt qui est relativement stable.

Un exemple d'ajustement gamma est représenté figure 20b) et b'). On remarque que l'ajustement de la courbe représentant l'entrée artérielle du fantôme est moins bon que pour la courbe représentant une zone de capillaires micrométriques poreux. L'entrée artérielle correspond en effet, dans ce cas, plus à une fonction de type dirac que gamma. L'ajustement reste cependant encore acceptable. Une approche plus précise consisterait à faire une intégrale numérique de l'entrée artérielle et de ne modéliser que les courbes tissulaires.

3. Résultats :

3.1 Acquisition de référence

Les cartes de perfusion (CBF, CBV, MTT et PS) obtenues par l'approximation adiabatique du modèle de Johnson et Wilson pour l'acquisition de référence (débit de 100 ml/min et le circuit de dialysat fermé) sont représentées sur la figure 21.

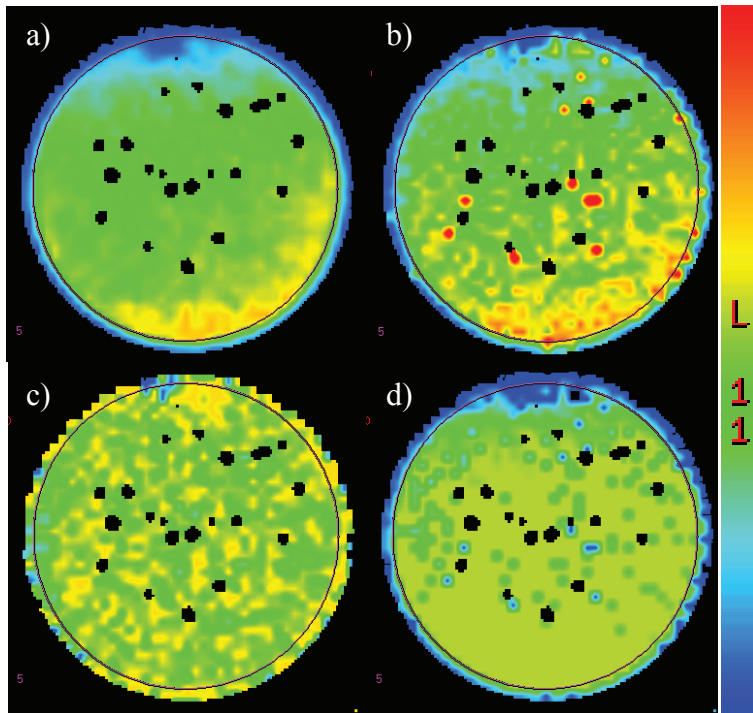


Figure 21 : Cartes de perfusion obtenues avec le modèle 3 : approximation adiabatique du modèle de Johnson et Wilson à partir d'une acquisition de CT-Perfusion sur le fantôme dialyseur avec un débit sanguin de 100 ml/min et le circuit dialysat fermé. a) CBF, b) CBV, c) MTT et d) PS. Les valeurs sont codées du bleu pour les plus faibles au rouge pour les plus fortes : CBF de 0 à 40 ml/100g/min, CBV de 0 à 40 ml/100g, MTT de 0 à 120 s et PS de 0 à 90 ml/min/100g.

Les résultats moyens sont représentés dans le tableau suivant :

| | Modèle | | |
|----------------------|-----------|----------------|-------------------|
| | Théorique | Gamma fonction | Johnson et Wilson |
| CBF (ml/100g/min) | 19.8 | 73.3 | 17.4 ± 4.5 |
| CBV (ml/100g) | 22.9 | 124 | 18.6 ± 5.5 |
| MTT (s) | 69.4 | 102 | 62.6 ± 9 |
| PS (ml/100g/min) | < 110 | --- | 44 ± 10 |

Tableau 4 : Valeurs des paramètres hémodynamiques dans le cas de l'acquisition de référence, obtenues avec l'approximation adiabatique du modèle de Johnson et Wilson et avec les fonctions gamma.

Les valeurs obtenues avec l'ajustement gamma proviennent d'une courbe moyenne de concentration dans le dialyseur comme montrées sur la figure 20b) et b'), c'est pourquoi il n'y a pas d'écart type mentionné. Les valeurs obtenues pour le modèle de Johnson et Wilson sont calculées en prenant tout le dialyseur comme région d'intérêt.

Les valeurs obtenues par le modèle utilisant l'ajustement gamma divergent complètement des valeurs théoriques. Le modèle de Johnson et Wilson quant à lui donne des valeurs très proches des valeurs théoriques pour les paramètres de perfusion, avec un erreur relative valant 12 % pour le CBF, 19 % pour le CBV et 10 % pour le MTT. La valeur de PS pose un peu plus problème car nous n'avons pas encore pu dégager de valeur théorique fiable. La valeur trouvée ici par le modèle de Johnson et Wilson suggère que la distance équivalente parcourue par les molécules dans les parois en sandwich est plutôt de 125 μm que de 50 μm , ce qui ne semble pas aberrant mais cette distance n'a pas pu être évaluée pour le moment.

3.2 Variation de la perméabilité :

3.2.1 Application d'un flux dans le circuit de dialysat :

Pour essayer de changer la perméabilité, nous avons mis un flux dans le circuit dialysat ouvert. Ce flux applique une pression sur les capillaires, et permet de nettoyer le dialysat de l'iode qui s'extravase. Il n'y avait ainsi pas d'iode extracapillaire, cela pourrait modéliser le cas de capillaire non perméable (donc simuler les capillaires du tissu sain). Cependant la limite est qu'une partie de l'agent de contraste arrivant par l'entrée artérielle ne passera pas par les capillaires et ne sera donc pas pris en compte par les modèles de mesure des paramètres de perfusion. La quantité totale d'agent de contraste permet notamment de calculer le CBV. Ce paramètre ne pourra donc pas être calculé avec précision dans le cas d'acquisition suivant ce protocole expérimental. Les courbes obtenues, respectivement les mesures dans le dialyseur et dans la sortie du dialysat, sont représentées sur la figure 22a) et b).

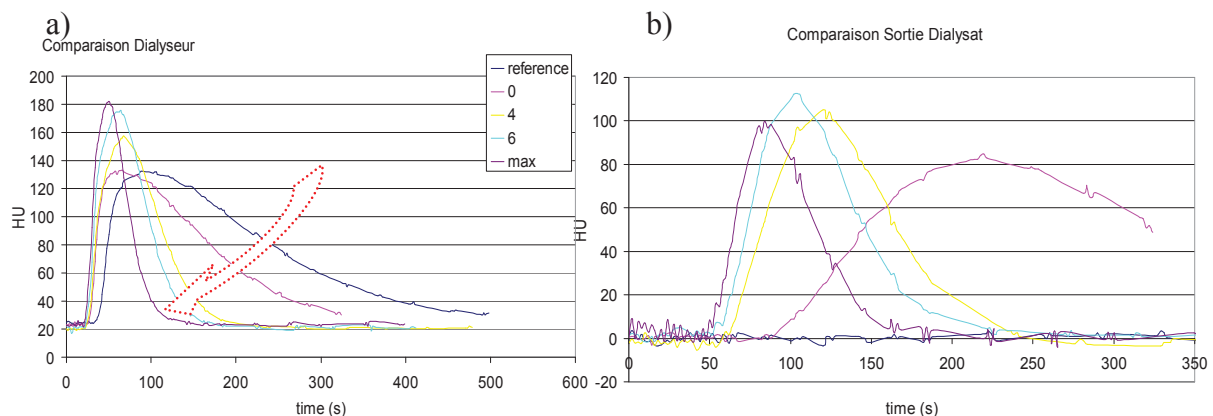


Figure 22 : Courbes tissulaires (a) et de la sortie du dialyseur (b) lors d'expériences avec différents flux dans le circuit dialysat. La flèche en pointillé rouge montre bien la diminution apparente de l'extravasation en fonction du débit de la pompe connectée au circuit de dialysat.

On observe bien le type de courbe correspondant à une diminution de la perméabilité au fur et à mesure que le débit augmente sur la figure 22a). En effet les courbes de concentration rejoignent bien le niveau de base plus rapidement au fur et à mesure que le débit extravasculaire augmente.

| Débit dialysat | Gamma function | | |
|----------------|------------------|----------------------|------------|
| | CBV (ml/100g) | CBF (ml/min/100g) | MTT (s) |
| Ref | 124 | 73.3 | 102 |
| 0 | 108 | 45 | 144 |
| 4 | 102 | 54.25 | 113 |
| 6 | 546 | 49.6 | 66 |
| Max | 75 | 62.5 | 72 |

Tableau 5 : Valeurs des paramètres de perfusion CBV, CBF, MTT calculées avec le modèle de la variable gamma lors des acquisitions avec un flux dans le circuit dialysat.

Les CBF théoriques pour ces expériences sont :

- 19.8 ml/100g/min, pour l'acquisition de référence
- 19.8 ml/100g/min, pour l'acquisition avec la pompe sur la position 0
- 29.7 ml/100g/min, pour l'acquisition avec la pompe sur la position 4
- 32.7 ml/100g/min, pour l'acquisition avec la pompe sur la position 6
- 41.6 ml/100g/min, pour l'acquisition avec la pompe sur la position max

Il est cependant assez difficile de tirer des conclusions des valeurs obtenues à l'aide du modèle utilisant les variables gamma car il y a une perte de matière par le dialysat. Ces données nécessitent une étude plus approfondie, en considérant par exemple un modèle à deux sorties.

3.2.2 Modification de la viscosité :

Pour contourner ce problème et faire varier la perméabilité, nous avons essayé de diminuer l'extravasion en appliquant une pression hydrostatique du milieu extracapillaire vers le milieu intracapillaire. Ces expériences ont été réalisées avec comme fluide, du voluvène qui est équivalent au sang pour l'osmolarité et la viscosité. Ce fluide permet d'appliquer une pression hydrostatique sans modifier le flux intracapillaire car il ne traverse quasiment pas les pores des membranes des capillaires, ce qui n'est pas le cas de l'eau qui diffuse librement.

Pour appliquer cette pression nous avons fait varier la hauteur des colonnes de voluven raccordées à l'entrée et la sortie du circuit dialysat. Trois hauteurs ont été testées : 50 cm, 80 cm et 150 cm. 150 cm de hauteur permet d'appliquer une pression hydrostatique du même ordre de grandeur que celle utilisée dans le cas d'une dialyse chez un patient (environ 200 mmHg). La figure 23a) représente les courbes obtenues dans le dialyseur avec de l'eau comparée à celle obtenue dans le dialyseur avec le voluven pour une acquisition avec les poches à une hauteur identique à celle du dialyseur. Pour cette expérience le CBF théorique vaut 26.7 ml/100g/min (2.26 ml/s en entrée et sortie du dialysat), le MTT théorique vaut 51.4 s, le CBV théorique reste inchangé. Les résultats obtenus pour le modèle utilisant la variable gamma nous donne :

| | Gamma function | | |
|---------|------------------|----------------------|--------|
| | CBV (ml/100g) | CBF (ml/min/100g) | MTT(s) |
| Eau | 81 | 35 | 139.5 |
| voluven | 37.5 | 35.4 | 64 |

Tableau 6 : Comparaison des paramètres CBV, CBF et MTT entre une acquisition réalisée avec le voluven et une réalisée avec de l'eau dans les mêmes conditions.

Le voluven a une viscosité $\eta = 2.2 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$, ce qui diminue en théorie le coefficient de diffusion d'un facteur 2.2 par rapport à l'eau et donc donnerait un PS 2.2 fois plus petit. On remarque sur la figure 23a) que d'augmenter la viscosité du liquide extravasculaire permet effectivement de diminuer la perméabilité, mais ne l'annule pas. On remarque également que le modèle de l'ajustement gamma s'approche des valeurs théoriques. On a notamment diminué le CBV d'un facteur 2.2, qui correspond à la diminution de PS.

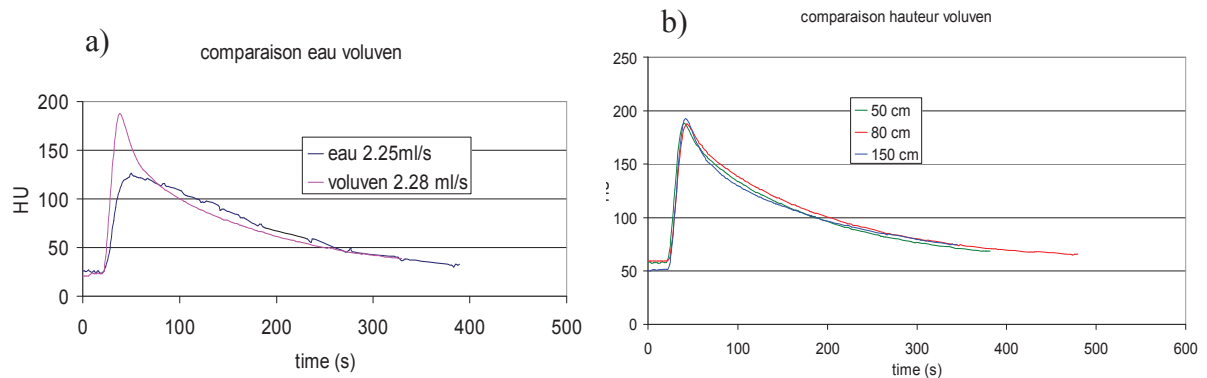


Figure 23 : a) Comparaison entre deux expériences réalisées avec le même CBF, CBV et la même pression hydrostatique appliquée dans le compartiment du dialysat mais avec un fluide différent (voluven et eau). La perméabilité a été réduite lors de l'expérience avec le voluven qui est plus visqueux que l'eau. b) Courbes tissulaires lors de trois acquisitions de CT-perfusion avec des débits identiques et une pression hydrostatique différente appliquée par des poches de voluven à des hauteurs différentes. Les trois courbes ne sont pas significativement différentes.

3.2.3 Augmentation de la pression :

Nous avons essayé de diminuer encore la perméabilité en augmentant la pression extracapillaire. Les résultats n'ont pas été concluants comme le montre la figure 23b). En effet les trois cas de figure donnent des résultats qui ne sont pas significativement différents, comme le montre les tests de student ($p > 0.5$ dans tous les cas). On peut émettre l'hypothèse que la structure en sandwich de la membrane masque l'effet de cette pression. Si l'on n'a pas réussi à faire varier la perméabilité des capillaires en jouant sur l'application hydrostatique par le moyen de colonne de fluide, cette expérience a permis de mettre en évidence l'influence du fluide considéré sur les phénomènes d'extravasation.

3.3 Variation du débit :

Pour valider la mesure de CBF, des acquisitions ont été réalisées à plusieurs débits 'sanguins'. Ces débits ont été choisis entre la valeur maximum que la pompe Roth cylco II© nous le permettait (2.70 ml/s) et un débit légèrement supérieur à celui à partir duquel on observe un phénomène de gravité (1.25 ml/s). Trois mesures ont pu être réalisées dans des conditions optimales, les débits correspondants sont : 1.44, 1.79, 2.70 ml/s. Les résultats sont représentés par les figures ci-dessous pour l'entrée artérielle et la mesure dans le dialyseur.

Ces mesures ont été effectuées avec le circuit dialysat fermé. Le temps de montée est représentatif des courbes obtenues dans le fantôme sont représentatifs du CBF, plus il est court, plus le débit est important. Nous observons un temps de montée de 16 s pour le débit de 2.7 ml/s ; 26 s pour le débit de 1.8 ml/s et 74 s pour le débit de 1.45 ml/s. Les résultats concernant la variable gamma ne sont pas représentés car nous avons montré qu'ils n'étaient pas représentatifs de la réalité lorsque le système est perméable.

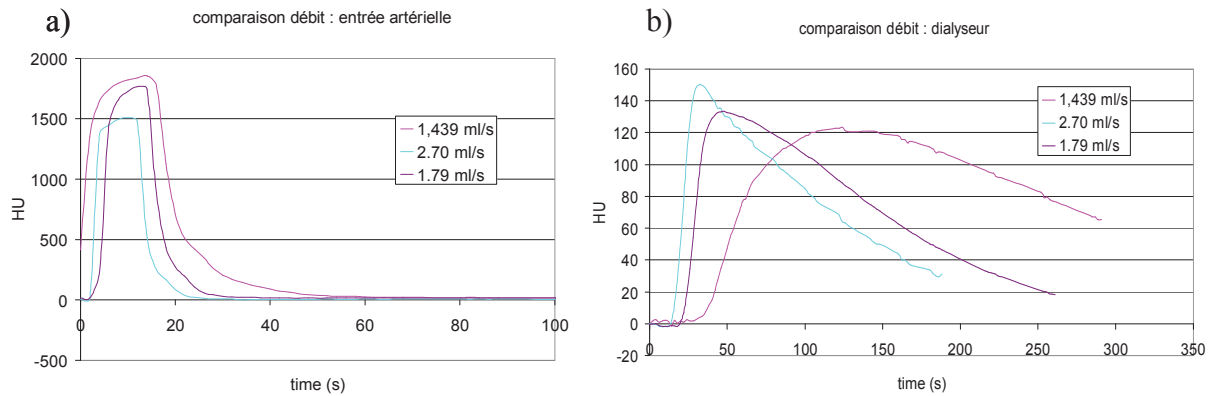


Figure 24 : Entrées artérielles (a), courbes tissulaires (b) lors de trois acquisitions de CT-Perfusion en faisant varier le débit du circuit sanguin. Le temps de montée diminue avec l'augmentation du débit, ce qui correspond à la théorie. Les courbes s'étalent avec la diminution du débit.

4. Discussion :

Les mesures de la perfusion cérébrale apportent de nombreux renseignements sur l'hémodynamisme local. Elles permettent une détection et la caractérisation de certaines pathologies comme les gliomes et les accidents vasculaires cérébraux. Devant l'intérêt de ces mesures, de nombreuses modalités de quantification des paramètres clés de la perfusion cérébrale ont été mises au point et se basent sur différentes techniques d'imagerie, modèles mathématiques et algorithmes de calculs (Wintermark, Sesay et al. 2005). A notre connaissance, aucune étude n'a pour le moment permis de quantifier l'efficacité de ces différents procédés, ni permis de définir clairement si les performances de chacun. C'est là le but de ce projet de recherche qui vise à mettre au point un fantôme dont on connaît de façon théorique les paramètres hémodynamiques desquels découlent les mesures de perfusion. L'objectif final est de comparer les techniques de CT-Perfusion, MRI-DSC et SRCT-Perfusion. Les deux premières techniques sont déjà utilisées en routine clinique et la dernière permet de faire des mesures absolues.

Le fantôme consiste en un rein artificiel (dialyseur) constitué d'environ 12 000 capillaires de 215 μ m de diamètre interne avec une membrane perméable de 50 μ m. Nous avons montré qu'il est possible de faire des mesures reproductibles et avec une circulation homogène dans le dialyseur. On peut ainsi connaître les paramètres hémodynamiques théoriques que sont censés nous donner les différents protocoles de mesure de perfusion (tableau 2). Il reste cependant à affiner le paramètre PS vu la complexité de la membrane des capillaires. Plusieurs acquisitions ont été réalisées avec des débits différents, des pressions hydrostatiques différentes dans le circuit dialysat, des fluides ayant une viscosité différente et enfin avec un flux dans le circuit dialysat permettant d'évacuer le produit de contraste de ce compartiment.

La pression hydrostatique appliquée dans le milieu extracapillaire ne semble pas avoir eu d'influence sur la perméabilité. La manière dont cette pression hydrostatique est appliquée en clinique lors de dialyse n'a pas pu être reproduit par notre équipe faute de matériel. De meilleurs résultats auraient peut être pu être obtenu avec un tel équipement. Les mesures à différents débits n'ont pas encore pu être analysées avec le modèle de Johnson et Wilson mais les courbes temporelles montrent bien un temps de montée qui diminue avec l'augmentation du débit, ce qui correspond bien à la théorie. Les expériences avec le voluven et l'eau dans des conditions identiques ont permis de montrer l'influence de la viscosité sur les mesures. Cette viscosité joue sur la perméabilité des capillaires en jouant sur le coefficient de diffusion

(proportionnelle à P). Les valeurs des paramètres hémodynamiques calculées avec le modèle de la fonction gamma sont plus proches de la réalité dans le cas de l'expérience avec le voluven qu'avec l'expérience avec de l'eau. En effet ce modèle suppose que le produit de contraste ne s'extravase pas et les valeurs qu'il retourne quand cette hypothèse n'est pas vérifiée ne sont pas représentatives de la réalité. Plus on se rapproche du cas non perméable, plus le modèle semble donner des valeurs proches des valeurs théoriques. La valeur de CBV retournée par le modèle de la fonction gamma a diminué d'environ un facteur 2.2 alors que la viscosité avait augmentée d'un facteur 2.2. Il faudrait cependant faire plus d'acquisitions pour vérifier ce phénomène sur plus que deux viscosités différentes. Une cartographie des paramètres de perfusion a pu être réalisée avec l'approximation adiabatique du modèle de Johnson et Wilson pour l'acquisition de référence. Cette analyse est très encourageante pour la suite de nos études puisque les valeurs des paramètres hémodynamiques calculées suivant ce modèle sont très proches des valeurs théoriques (erreur de 12 % pour le CBF, 19 % pour le CBV et 10 % pour le MTT). Il serait peut être possible de faire coïncider les valeurs retournées par le modèle de Johnson et Wilson encore plus avec les valeurs théoriques en jouant sur les paramètres initiaux du modèle qui est très sensible. De même, pour avoir de meilleur résultat il faudrait aussi pouvoir mesurer une courbe artérielle (entrée) plus près de la zone imagée dans le fantôme (tissu). Le pas temporel dans la deuxième phase d'acquisition a aussi une influence et il faut pouvoir le diminuer au maximum. Les valeurs de ces paramètres calculées par le modèle de la fonction gamma sont quand à elles très éloignées des valeurs théoriques. Ce modèle n'est pas valide lorsqu'il y a une perméabilité des capillaires. Cette affirmation est à nuancer puisque même si le fit gamma est convainquant, nous n'avons pas encore pu vérifier l'algorithme implémenté sur un cas où le modèle est censé être valide. Une validation de cet algorithme permettrait d'avoir plus d'assurance sur l'interprétation des résultats qu'il fournit. Seul le paramètre PS n'est pas encore parfaitement connu dans notre fantôme, ce qui ne nous permet pas de conclure sur l'efficacité du modèle de Johnson et Wilson sur ce paramètre. Cependant, la valeur moyenne fournie par la cartographie est bien inférieure à la valeur maximum que nous avons estimée. Pour pouvoir mieux estimer ce paramètre, il faudrait pouvoir estimer le chemin parcouru par les molécules de produit de contraste pour traverser la membrane. En effet l'hypothèse que nous avons faite, une traversée transversale de la membrane, n'est pas très réaliste du fait de la structure multicouche de cette membrane. Pour estimer le chemin que doit parcourir la molécule pour traverser la membrane, et donc réévaluer P et corriger le facteur PS, il serait peut être possible d'avoir recours à des techniques permettant de caractériser la diffusion comme le FRAP (Fluorescence Recovery after photobleaching). Cette piste va être explorée pour voir si cette technique peut nous donner une estimation de δ .

Ces résultats préliminaires ont permis d'identifier les possibilités du fantôme de dialyse et les expériences qui pourraient être concluantes. De nouvelles acquisitions vont être réalisées pour avoir plus de valeurs à comparer, notamment pour la viscosité du fluide utilisé et les débits sanguins. Des acquisitions vont aussi être faites avec des complexes micrométriques sur lesquels est fixé l'agent de contraste pour modéliser le cas de capillaire non perméables. Le Fenestra VC est envisagé pour réaliser ces expériences (Graham, Ford et al. 2008) (Chouker, Lizak et al. 2008).

Quelques acquisitions en protocole IRM sont réalisées en ce moment avec du gadolinium et seront réalisées dans les mêmes conditions et avec le même produit de contraste sur scanner, nous permettant ainsi des comparaisons entre les deux techniques non biaisées par la différence de taille de molécule. Les acquisitions scanner avec gadolinium pourront être comparées à celles avec iodes grâce aux expériences déjà réalisées. Cependant, du à la difficulté d'avoir des créneaux sur ce type d'appareil, ces mesures seront finies en septembre.

Des acquisitions SRCT-Perfusion seront réalisées pendant le temps de faisceau de l'équipe (du 27 juin au 55 juillet), permettant ainsi d'avoir un faisceau monochromatique nécessaire pour faire des mesures quantitatives.

Le fantôme de dialyse semble être un bon modèle pour pouvoir ensuite estimer la qualité des modèles de perfusion, paramétrer les logiciels de perfusion qui sont pour le moment très sensibles aux paramètres initiaux. Cela semble être aussi un bon modèle pour comparer les techniques d'imageries, les protocoles d'acquisitions. Cependant ce fantôme n'est pas parfait du fait de la taille des capillaires, plus d'un ordre de grandeur au dessus des capillaires du cerveau, et de la disposition extrêmement simplistes des capillaires (géométrie linéaire), c'est pourquoi nous présentons en annexe 1, un autre fantôme dont nous explorons les possibilités et la technique pour le réaliser. Il s'agit de microcanaux en PDMS. Cette technique est prometteuse puisqu'elle permettrait de créer des réseaux de capillaires complexes de taille approchant les vascularisations fines du cerveau. La réalisation de "fausse 3D" est possible avec cette technologie malgré quelques difficultés d'alignement des différentes couches. La création de PDMS poreux est possible d'après la littérature mais n'a pas encore pu être essayé. L'une des principales limites pourrait être la faible quantité de produit de contraste passant dans le fantôme, mais nous n'avons pu pour le moment n'effectuer que des mesures sur fluoroscopes. Des mesures sur scanner, beaucoup plus sensible, vont être réalisé dans la semaine qui vient. Il pourrait être cependant envisagé de faire plus de couche ou d'augmenter le courant du scanner pour avoir un meilleur rapport signal sur bruit.

Nos efforts se sont concentrés pour le moment sur le protocole de CT-Perfusion puisque c'est la technique la plus facilement accessible pour un patient et qu'elle permet de faire des mesures pseudo-quantitatives des paramètres hémodynamiques intéressant pour la caractérisation des gliomes et le suivi des traitements cliniques de ces tumeurs solides. Cependant il existe une limite non négligeable à la généralisation de ce protocole en clinique. Il s'agit de la dose qu'elle dépose au patient du fait de son temps d'acquisition prolongée. Il ne semble pas, pour le moment, envisageable de faire toutes les acquisitions que nécessiterait un suivi de traitement de tumeur. Il faudrait en effet répéter plusieurs fois cette acquisition. Il en est de même dans le cas des attaques cérébrales où l'on fait plusieurs acquisitions avec seulement quelques jours d'écart entre elles. En effet Hirata *et al* estime à environ 400 mGy la dose déposée dans le cerveau, 700 mGy à la peau et 22 mGy aux niveaux des yeux avec une imagerie 2 cm au dessus des yeux (Hirata, Sugawara et al. 2005). Si l'on considère qu'à environ 2Gy il y a un phénomène d'épilation temporel sur la peau, et à environ 3Gy il y a une formation de cataracte aux yeux, on observe que l'on ait seulement à un facteur 3 environ de ces valeurs pour la peau, et au moindre mouvement du patient il y a un risque pour ses yeux. De plus ces mesures ont été faites, sans tenir compte de la présence momentanée d'iode dans le cerveau dû à l'injection. Un fantôme va être mis au point par l'équipe permettant de faire de la dosimétrie 3D avec des concentrations locales d'iode durant l'été. Les caractéristiques du fantôme ont été définies et la réalisation devrait se faire durant l'été si possible (suivant la date à laquelle on recevra le barex), et nous espérons pouvoir faire quelques mesures de dosimétrie quand je reviendrais du canada en septembre pour finir mon stage.

Références :

- Adam, J. F., H. Elleaume, et al. (2003). "Absolute cerebral blood volume and blood flow measurements based on synchrotron radiation quantitative computed tomography." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism 23(4): 499-512.
- Aronen, H. J., I. E. Gazit, et al. (1994). "Cerebral Blood-Volume Maps Of Gliomas - Comparison With Tumor Grade And Histologic-Findings." Radiology 191(1): 41-51.
- Axel, L. (1980). "Cerebral Blood-Flow Determination By Rapid-Sequence Computed-Tomography - A Theoretical-Analysis." Radiology 137(3): 679-686.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature 407(6801): 249-57.
- Chouker, A., M. Lizak, et al. (2008). "Comparison of Fenestra VC Contrast-enhanced computed tomography imaging with gadopentetate dimeglumine and ferucarbotran magnetic resonance imaging for the in vivo evaluation of murine liver damage after ischemia and reperfusion." Invest Radiol 43(2): 77-91.
- Costalat, V., E. Lebars, et al. (2006). "In vitro evaluation of 2D-digital subtraction angiography versus 3D-time-of-flight in assessment of intracranial cerebral aneurysm filling after endovascular therapy." American Journal Of Neuroradiology 27(1): 177-184.
- Du, L. Y., J. Umoh, et al. (2007). "A quality assurance phantom for the performance evaluation of volumetric micro-CT systems." Physics In Medicine And Biology 52(23): 7087-7108.
- Eastwood, J. D., M. H. Lev, et al. (2003). "Perfusion CT with iodinated contrast material." American Journal Of Roentgenology 180(1): 3-12.
- Elleaume, H., A. M. Charvet, et al. (2002). "Performance of computed tomography for contrast agent concentration measurements with monochromatic x-ray beams: comparison of K-edge versus temporal subtraction." Physics In Medicine And Biology 47(18): 3369-3385.
- Gobbel, G. T. and J. R. Fike (1994). "A Deconvolution Method For Evaluating Indicator-Dilution Curves." Physics In Medicine And Biology 39(11): 1833-1854.
- Graham, K. C., N. L. Ford, et al. (2008). "Noninvasive quantification of tumor volume in preclinical liver metastasis models using contrast-enhanced x-ray computed tomography." Invest Radiol 43(2): 92-9.
- Hirata, M., Y. Sugawara, et al. (2005). "Measurement of radiation dose in cerebral CT perfusion study." Radiat Med 23(2): 97-103.
- Jain, R., S. K. Ellika, et al. (2008). "Quantitative estimation of permeability surface-area product in astroglial brain tumors using perfusion CT and correlation with histopathologic grade." American Journal Of Neuroradiology 29(4): 694-700.
- Johnson, J. A. and T. A. Wilson (1966). "A model for capillary exchange." Am J Physiol 210(6): 1299-303.
- Juchniewicz, M., D. Stadnik, et al. (2007). "Porous crosslinked PDMS-microchannels coatings." Sensors And Actuators B-Chemical 126(1): 68-72.
- Klotz, E. and M. Konig (1999). "Perfusion measurements of the brain: using dynamic CT for the quantitative assessment of cerebral ischemia in acute stroke." European Journal Of Radiology 30(3): 170-184.
- Lee, T. Y., T. G. Purdie, et al. (2003). "CT imaging of angiogenesis." Quarterly Journal Of Nuclear Medicine 47(3): 171-187.
- Lima, R., S. Wada, et al. (2008). "In vitro blood flow in a rectangular PDMS microchannel: experimental observations using a confocal micro-PIV system." Biomedical Microdevices 10(2): 153-167.
- Miles, K. A. (1999). "Tumour angiogenesis and its relation to contrast enhancement on computed tomography: a review." European Journal Of Radiology 30(3): 198-205.
- Murase, K., T. Nanjo, et al. (2005). "Effect of x-ray tube current on the accuracy of cerebral perfusion parameters obtained by CT perfusion studies." Physics In Medicine And Biology 50(21): 5019-5029.
- Patlak, C. S. and R. G. Blasberg (1985). "Graphical Evaluation Of Blood-To-Brain Transfer Constants From Multiple-Time Uptake Data - Generalizations." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism 5(4): 584-590.
- Patlak, C. S., R. G. Blasberg, et al. (1983). "Graphical Evaluation Of Blood-To-Brain Transfer Constants From Multiple-Time Uptake Data." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism 3(1): 1-7.
- Risser, L., F. Flouraboue, et al. (2007). "From homogeneous to fractal normal and tumorous microvascular networks in the brain." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism 27(2): 293-303.

- Roberts, H. C., T. P. Roberts, et al. (2000). "Quantitative measurement of microvascular permeability in human brain tumors achieved using dynamic contrast-enhanced MR imaging: correlation with histologic grade." AJNR Am J Neuroradiol 21(5): 891-9.
- St Lawrence, K. S. and T. Y. Lee (1998). "An adiabatic approximation to the tissue homogeneity model for water exchange in the brain: I. Theoretical derivation." Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism 18(12): 1365-1377.
- Thompson, H. K., R. E. Whalen, et al. (1964). "Indicator Transit Time Considered As Gamma Variate." Circulation Research 14(6): 502-&.
- Wintermark, M., P. Maeder, et al. (2000). "Using 80 kVp versus 120 kVp in perfusion CT measurement of regional cerebral blood flow." American Journal Of Neuroradiology 21(10): 1881-1884.
- Wintermark, M., M. Sesay, et al. (2005). "Comparative overview of brain perfusion imaging techniques." Stroke 36(9): 2032-2033.
- Zhao, J. B., H. Salmon, et al. (2007). "Effect of heterogeneous vasculature on interstitial transport within a solid tumor." Microvascular Research 73(3): 224-236.

Annexe 3 : Rapport de Marion Vincent

Le rapport suivant a été rédigé par Marion Vincent que j'ai encadré durant son stage de Master 2 de début février à fin août 2010. Elle a travaillé sur l'estimation de la perméabilité des capillaires des dialyseurs utilisés durant mon stage de master 2.

Characterization of a perfusion's phantom

Marion VINCENT

Supervisor: Pierre DEMAN

September 2010 – Master 2 of Medical Physics

KEYWORDS

Brain tumor, MRI,
Two photons microscopy,
Modelling by finite volume

Introduction: Brain tumors are an important public health problem. For the high grade tumors the best median of survival is only of 14.6 months. This disease is characterized by a group of cells with an uncontrolled and anarchic growth. The imaging of perfusion allows an anatomical and physiological estimation of brain tumor characteristics such as the grade, the response to treatment... Indeed this technique measures the hemodynamic anomalies of the brain microcirculation. Today various approaches have been attempted in order to study this important domain. The different approaches can return significantly different perfusion parameters. This study takes place within the aim to realize perfusion measurement more and more precise and quantitative. For that, an '*in vitro*' analysis is realized on a phantom, which is a dialyser, in order to validate capillaries from dialyser as a phantom adapted to evaluate perfusion models. Previous studies have been realized on a Polyflux dialyser (Gambro®), composed of several porous capillaries, to compare different models of bolus tracking (a method to measure perfusion parameters). Some hemodynamic parameters of this dialyser, such as the cerebral blood volume and the cerebral blood flow, were already estimated from the geometry of the artificial kidney. However a data remained missing: it's the permeability. The aim is to determine this hemodynamic parameter.

Material & Methods: During this study the capillary is inserted in a tank which is a finite volume. Then a continuous injection of an important volume of contrast agent (CA) is realized to study the CA extravasations of one capillary in the tank. The comportment of CA in the phantom is follow-up versus time with two photon fluorescence microscopy and magnetic resonance imaging. Different injection flows are performed: 200, 300, 400 and 500 μ L/h. The evolution of the CA concentration in the phantom is analysed by the Patlak model in order to determine the product of the permeability and the area of the pores of the capillary's membrane.

Results & Conclusion: Results are encouraging even if the two photons microscopy experiment must be performed again to increase the signal to noise ratio. The MRI sequences were optimized to measure quantitatively the CA concentration. The setup-up is now optimized to measure the permeability by two methods to correlate the results. Some analyses are still in progress and they are necessary to understand some results observed. Values of permeability were found but not verified yet.



Introduction

A lot of pathologies lead to modifications of the cerebral blood circulation (cerebrovascular accident, stroke, tumor...) (1, 2). In particular malignant brain tumors have singular vascular characteristics owing to their fast growth, nutritive and oxygen needs. This leads to significantly different hemodynamic parameters compared to the healthy brain. The two phenomena involved are a tumor angiogenesis and a Blood Brain Barrier (BBB) breakdown (3, 4).

The angiogenesis is a physiological process involving the anarchical growth of new blood vessels from pre-existing vessels (Figure 1). This stage is necessary for oxygen and nutritive supply and constitutes the angiogenic switch. The second phenomenon, which is typical of the brain tumors, is an important BBB breakdown. This is a consequence of anarchical and incomplete development of tumor blood vessel. A leakage of low-molecular-weight chelates is so possible in the tumor (Figure 2). A large panel of contrast agent (CA) exists for functional imaging (5, 6). In this study we will only focus on molecules not metabolised by cells (7, 8), the exchanges are only between intravascular and interstitial spaces.

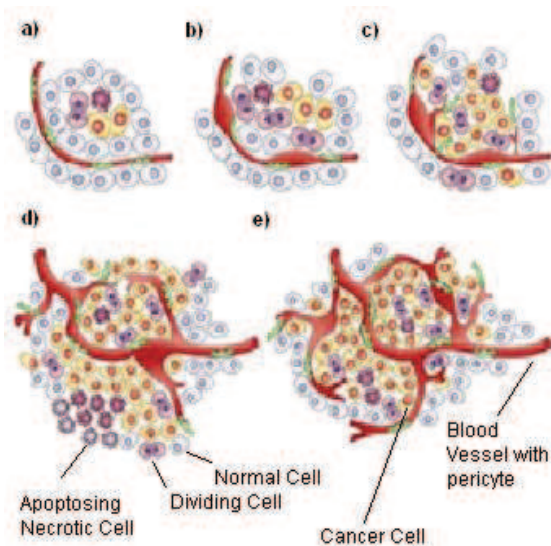


Figure 1: Various stages of brain tumor's evolution: a) Dormant b) Perivascular detachment and vessels dilatation c) Onset of angiogenic sprouting d) Continuous sprouting; new vessels formation and maturation; recruitment of perivascular cells e) Tumor vasculature.

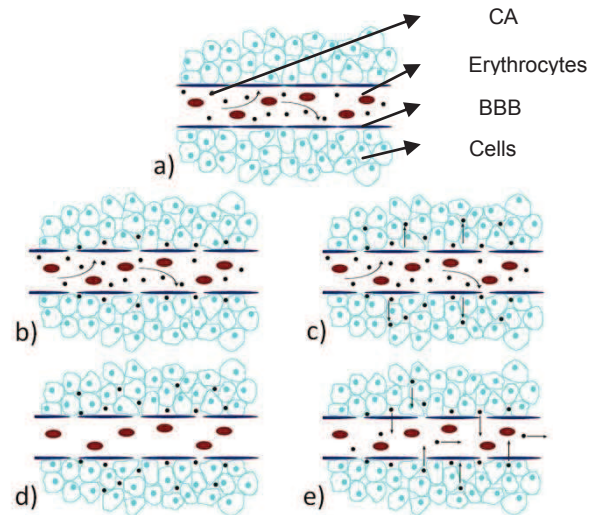


Figure 2: Comparison between a) an intact BBB (healthy brain) and b-e) a BBB with leakage (as in a glioma). From b to e) is the decomposition of the CA extravasation and the return in the capillaries.

Some hemodynamic parameters, such as the cerebral blood volume (CBV), the cerebral blood flow (CBF) and the permeability of blood vessels for a specific contrast agent (P), are modified by these phenomena. They are an indicator of the tumor metabolism as the glioma's grade (9, 10). They can predict the quantity of drugs which can be delivered by systemic injection. These parameters have also a correlation with the tumor response to therapy (anti angiogenic, x-ray therapy ...) (11-13). They can be estimated by macroscopic imaging techniques such as magnetic resonance imaging (MRI) and computer tomography (CT). All imaging techniques use a temporal follow-up of a CA concentration after intravenous injection (except spin arterial labelling) (x-ray: heavy element, MRI: paramagnetic molecules, spin labelled; ...). The functional imaging techniques to measure perfusion parameters were listed by Wintermark *et al* (14).

Two methods allow the estimation of most of the perfusion parameters: the steady state and the first pass bolus. The first pass bolus follows the concentration of a CA when it reaches the brain with a high temporal resolution. The temporal resolution has to be fast enough to determine convection effect. A bolus is an intravenous injection of CA as quick as possible to mimic a Dirac impulsion. The fall of signal caused by CA (due to magnetic effect (MRI) or to an increase of the differential attenuation (X-Ray tomography)) is responsible for the tumor contrast uptake

(Figure 3 a) and b)). Indeed in the healthy tissue no significant increase of the contrast is observed except in important artery and veins due to the BBB. In tumor tissue the extravasation of the CA from intravascular space to extravascular and extracellular spaces is due to two phenomena: the convection and the diffusion. In the capillaries, the blood flow transports the CA (mainly phenomenon of convection). The flow is non-Newtonian and turbulent. A perpendicular flow exists and helps the CA to cross the pored BBB. The second phenomenon is the diffusion gradient (Fick's laws). In the healthy brain tissue the CA can't cross the BBB and so it passes very fast and in low quantity in a voxel imaged. That's why contrast-enhancement is visible only in tissue with important vascularisation if there is no leakage. In tumor tissue the extravasation takes place as described in figure 2. Firstly the CA passes in high concentration in capillaries. Perpendicular flows and diffusion, due to an important diffusion gradient, allow the CA to cross the BBB. The CA diffuses slowly in the interstitial space around capillaries. As a bolus is a short and fast injection, quickly the CA concentration inside the capillaries comes back to 0. Then a concentration gradient is created and favours diffusion of CA from interstitial space to capillaries. The blood flow maintains the intracapillar CA concentration to 0, so it maintains the diffusion gradient.

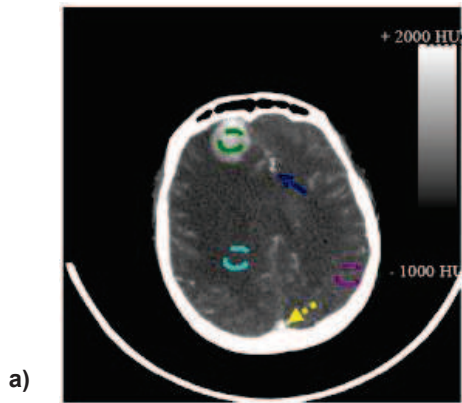


Figure 3: a) An axial section of a patient's brain after an injection of an iodinated CA. The different ROI represented are: green= tumoral tissue, cyan= white matter, purple= grey matter, yellow= vein and blue= artery.

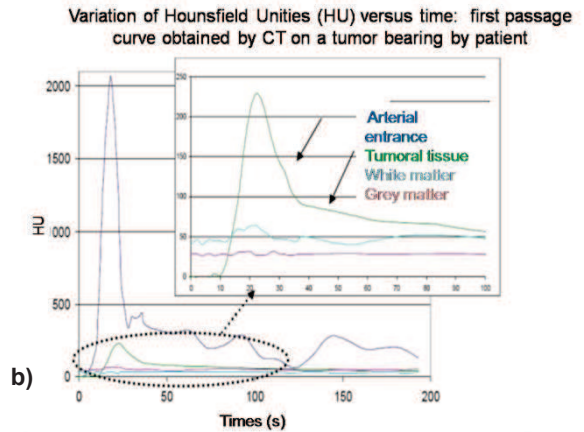


Figure 3: b) First passage curve obtained by CT on the different areas of brain measured in ROI drawn on the figure 3a). On the right top, it's a zoom of the contrast taking in white and grey matter. The CA concentration, after the maximum in tumoral tissue, is decreasing in two phases (arrows): firstly, fast evacuation of the CA remained in the intravascular space; secondly, there is the return by diffusion of CA which is in the extravascular space before being evacuated by the blood flow.

Various approaches have been operated in order to study this large and important domain. The aim is to be more and more precise and quantitative. This last point is very important for pathologies evolution, response to treatment follow-up. Many experimental studies have been realized on this topic, not only 'in vitro' (15) but also 'in vivo' (14, 16). Some studies more theoretical are done too. Mathematic approaches have been operated following different approaches : performing finite volume method (17) and using macroscopic approaches (18). Some research aim at solving this subject analytically too (19). As a result of all these studies, there are a lot of hemodynamic physiological models (gamma variate, Johnson & Wilson, Patlak, two compartments ...). They can lead to different significant results (20). There is a necessity of a phantom to estimate objectively the models of perfusion.

'In vitro' studies have been realized on a Polyflux® dialyser (Gambro) to study first pass bolus perfusion measurement. It is an artificial kidney constituted of around 12 000 nearly parallel capillaries (inner diameter 215µm, outside diameter 315µm) with porous membranes. The blood passes into capillaries after having crossed into solid foam allowing homogenization of the intra capillaries flow (Figure 4).

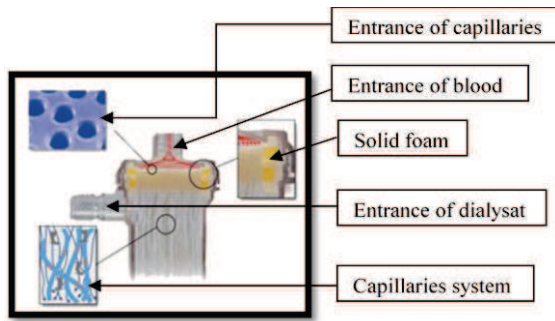


Figure 4: Working of the Polyflux® dialyser (Gambro).

The aim is to validate the dialyser as a phantom adapted to evaluate perfusion models. The dialyser has to be characterized to know the fluidic parameters and estimate quantitatively and theoretically parameters of perfusion. First pass bolus acquisitions are proceeded and images are computed with the different physiological models. The correlation between estimated parameters from the physics about the phantom and the parameters returned by the perfusion models are studied.

It's necessary to control physical and hemodynamic parameters of this system as precise as possible. Previous experiments have been able to determine CBV and CBF of this phantom. A data remains missing: the permeability.

The goal of this paper is to determine the permeability (P) of one of the capillaries. The CA extravasations of one capillary are studied by two methods, two-photons fluorescence microscopy (2PF) and magnetic resonance imaging (MRI). Often the models do not estimate P but the permeability area product (P*A), where A is the total area of pores. Indeed PA is a physical quantity easier to evaluate by macroscopic imaging. For a porous membrane P is equal to the free diffusion coefficient in the surround liquid (D) divided by the mean depth of pores (δ).

$$P * A = \frac{D}{\delta} * A \text{ ml/min/100g} \quad [1]$$

The experimental results to estimate PA are also compared with results obtained by finite volume resolution performed with the commercial software 'ANSYS' (21, 22).

Material & Methods

Setup Geometry

The phantom containing the porous fiber has to be a tank with a knowing and finite volume to realize a quantitative study. To avoid optical phenomena (refraction, fluorescence ...) during 2PF imaging it's necessary to use glass or an equivalent material for the part crossed by the laser. The 2PF microscopy imposes a depth of two millimetres (limit of depth measurement in water). A homemade setup is created. It's composed of two parts with holes at the entrance and outlet in order to install easily the capillary (Figure 5). The tank has a length of 40mm, a width of 10mm and a depth of 2mm. This capillary (Gambro®) has a micrometrical size (internal diameter: 215µm & external diameter: 315µm) and a porous membrane. These extremities are connected outside the tank at two catheters without porous membrane (polyurethane pipe: PE20, internal diameter: 380µm). This setup is put on a glass slide and covered by a glass slide in order to make a finite volume (Figure 6).

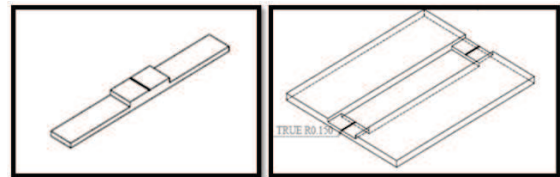


Figure 5: Plans (Solidworks ®) of the two parts of the tank.

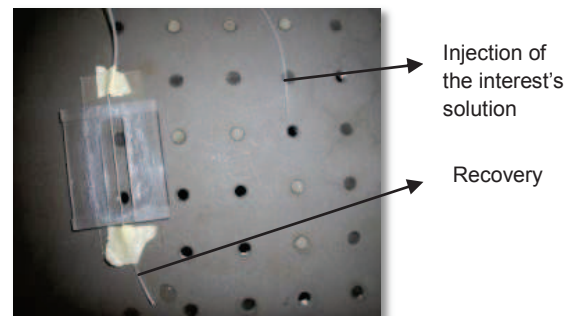


Figure 6: The setup with two connexions between the capillary Gambro® and the polyurethane pipe.

Various experiments have been realized for flows, close to these in brain capillaries, allowing a laminar flow. A laminar flow is characterized by the Reynolds number (Re) smaller than 1 for a cylindrical geometry:

$$Re = \frac{\rho v L}{\eta} \quad [2]$$

ρ is the density of the fluid (kg/m^3), v is the mean fluid velocity (m/s), L is a characteristic linear dimension (m) and η the dynamic viscosity of the fluid ($\text{Pa}\cdot\text{s}$). The flows more important than $500\mu\text{L/h}$ are corresponding to turbulent flows ($Re > 1$) regards to our capillary's geometry. For flows smaller than $200\mu\text{L/h}$, it was impossible to differentiate the convection phenomenon to the diffusion phenomenon (Figure 7, equation 3) (it's called a flow limited condition in the perfusion models).

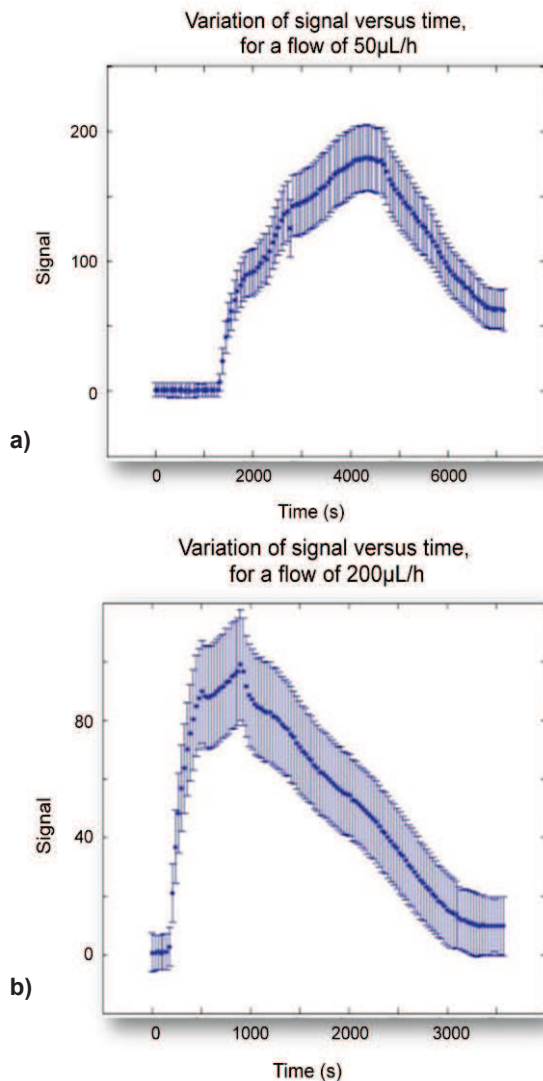


Figure 7: Experiment realized by two-photons fluorescence microscopy. Signal versus time for an SRB's injection of $20\mu\text{L}$ at a concentration of 1mmol/L and for a flow of $50\mu\text{L/h}$ (a) or $200\mu\text{L/h}$ (b).

The experiments are then performed with the following flows: 200, 300, 400 and $500\mu\text{L/h}$.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \text{grad}^2 c - v \text{grad} c \quad [3]$$

The first term corresponds to diffusion while the second describes the convection. The constant D is the diffusion coefficient, c is the CA's concentration and v is the velocity.

Two photons fluorescence microscopy

The 2PF microscopy uses the simultaneous absorption of two photons by the fluorophore (here the Sulfurhodamine B (SRB)). This technique has a high spatial and vertical resolution and a high depth limit measurement. SRB has an excitation wavelength of 800nm in two photons microscopy against 585nm in single photon microscopy. This fluorophore has been chosen because its size is close to the one of the CA used in MRI and CT (around 600Da). After this excitation the fluorophore returns in the ground state by desexcitation emitting a fluorescent ray (Figure 8).

In Two photons microscopy all experiments are realized with a gain and a laser power constant, at the depth of the centre of the capillaries (around 1mm). A calibration was performed at these imaging conditions to be quantitative. Solutions with different concentrations of SRB filled homogeneously the volume of the phantom and images were taken. Two regions of interest (ROI) on each acquisition were drawn with ImageJ, one corresponds to the inside of the capillaries, and the other corresponds to an area $200\mu\text{m}$ outside the capillary.

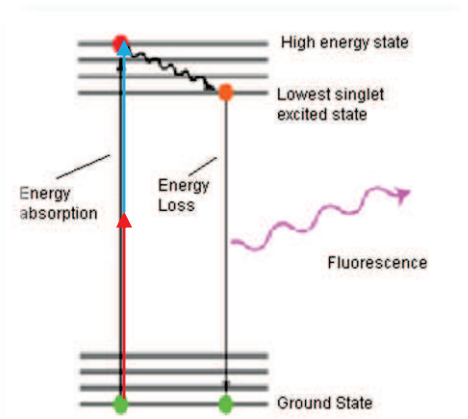


Figure 8: Desexcitation of a fluorophore by emission of a fluorescent ray after the simultaneous absorption of two photons (red and blue). This technique allows having an excitation's wavelength more important, that is to say a ray which crosses better the organic matter.

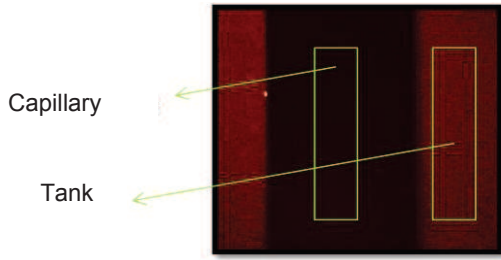


Figure 9: Picture obtains by two-photons microscopy for a SRB's concentration of 0.033mmol/L. The two ROI are presented.

Mean value and standard deviation were measured. A previous study shows that the signal of capillary is similar to the signal of a SRB concentration equal to 0. To eliminate the electronic noise the signal of capillary's ROI were substrate to the signal of the ROI outside the capillary.

For dynamical studies the tank is filled with distilled water. A continuous injection of 400 μ L of SRB at 0.033mmol/L was realized with a pump (Kd Scientific) equipped with a syringe Terumo® of 5ml. This syringe is connected to the entrance of PE20. The solution is retrieved thanks to a reservoir which is located at the extremity of the second PE20. This reservoir contains initially 10ml of distilled water in order to avoid the phenomenon of evaporation. The variation of signal versus the time is acquired with an interval of 60s between two images. The calibration curve allows estimating the variation of the SRB's concentration versus time. Then the Patlak model, which is described further on, is used to deduce the permeability. This experiment is realized for the different flows.

MRI :

The same kind of experiment is realized by MRI. This imaging technique allows bigger field of view and it is possible to image a whole slice of the phantom (figure 15). This experiment is realized on a 4.7T preclinical magnet (Bruker Avance III systems) using volume/surface cross coil configuration. The CA used is a Gadolinium (Gd) based on molecule used in clinic MRI Dotarem®. It was diluted 400 times to arrive at a concentration of 1.3mmol/L. This dilution allows to have a Gd concentration in the capillary close to the one observed in the capillaries of a patient during clinic perfusion measurement. Moreover the T2* effects are reduced with low concentration of magnetic component.

For this study, an agar gel at 0.6% is put in the tank. The concentration of this gel is chosen to reach porous properties of the healthy brain: porosity \approx 20% (fraction between the interstitial volume and the total volume) (23).

Different sequences are used for this study:

- An anatomic sequence to install correctly the sample in the magnet and select an area where the capillary is the most straight.

- 6 Flash sequences to obtain quantitatively the reference (before CA injection) of the longitudinal relaxation time (T1ref). These sequences consist in to move the magnetization of a small angle (smaller than the Nernst angle). From mappings at different angles it's possible to estimate the T1 as describe by Cheng *et al* (24), this method was computed on a homemade software. The 6 angles used are 5°, 10°, 15°, 20°, 30° and 40°. The characteristics of the flash acquisitions are: TE (echo time) = 1.8ms, TR (repetition time) = 15ms, matrix size = 64x32, resolution = 250x250 μ m², slice thickness = 5mm, number of accumulation = 100.

- The last sequence is a Flash sequence too, with the same slice geometry as the flash used for estimate the T1ref. A short TE (0.8ms) and a TR of 200ms were used. The flip angle is equal to 20 degrees. Four accumulations per image were done for a better signal to noise ratio. One image is acquired in 25.6s and the total time acquisition was the time need to pass the 400 μ L of CA more some images to do a baseline. Indeed the CA arrives in the capillary only few images after the acquisition start. The relation between the signal measured and the T1 is the following:

$$S(t) = M_0 * \frac{1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1(t)}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1(t)}\right) * \cos\theta} \quad [4]$$

This sequence uses a gradient echo very short which permits to decrease the T2* effects. Indeed the spin echo acquisitions are more used but a spin echo can't be short enough in our phantom to avoid magnetic susceptibility effect. Reduce the T2* effect is necessary to obtain the most quantitatively the concentration of Gadolinium.

Circular ROIs are drawn all around the capillary on the map of T1ref and on the images of the follow-up versus time. Contrary to the 2PF microscopy, the spatial resolution is too small to differentiate an area only in the

capillary. The longitudinal relaxation time varies versus Gadolinium concentration as describes in the equation 5:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1ref}} + r_1 * C[Gd] \quad [5]$$

The relaxivity (r1) of Gd at 4.7T was supposed to be equal at 4.2mM/s but will be measured in a phantom next time.

From the equation 4 and 5 it was possible to compute the gadolinium concentration versus time.

Then, like in 2PF microscopy the solution is retrieved thanks to a reservoir which is located at the extremity of the second PE20. This reservoir contains initially 2ml of distilled water in order to avoid the phenomenon of evaporation. Moreover, this experiment is realized for the different flows. Finally, the Patlak's model is applied on these results in order to deduce the value of permeability for each flow.

Patlak Analysis

Patlak *et al* describe a perfusion model in 1985 (25). The Patlak's model is a graphical analysis technique based on the compartment model. The model estimates that the amount of CA in a volume is accumulating according to this equation:

$$R(t) = K * \int C_{capillary} * dt + V_0 * C_{capillary}(t) \quad [6]$$

In this two compartment models the first term $K * \int C_{capillary} * dt$ represents the CA uptake in the peripheral compartment (in the interstitial volume). The second term $V_0 * C_{capillary}(t)$ represents the CA in the capillaries. Then the CBV and the PA are estimated by this method. In this equation t is the time; R(t) is the amount of CA in the defined ROI at a time t. $C_{capillary}(t)$ is the concentration of CA in the capillary at a time t. K is the clearance, which determines the rate of an extravasation from the capillaries to the interstitial volume. V_0 is the distribution volume of the CA in the central compartment (capillaries) divided by the total volume of the region of interest. The unknown constants are K and V_0 . They are obtained by linear regression of:

$$\frac{R(t)}{C_{capillary}(t)} = K \frac{\int C_{capillary}(t) * dt}{C_{capillary}(t)} + V_0 \quad [7]$$

In our case, $C_{capillary} = 0$ before the arrival of the CA in the ROI and is equal to a constant C_a (1.3mmol/L for MRI experiments and 0.033mmol/L for 2PF experiments) after. Then,

$$\frac{\int C_{capillary}(t) * dt}{C_{capillary}(t)} = t \quad [8]$$

The equation 7 becomes:

$$\frac{R(t)}{C_a(t)} = K * t + V_0 \quad [9]$$

This model doesn't consider the CA return from the interstitial space to the intravascular space (unidirectional exchange). That's why we used an important injection of CA and not a bolus. There is also always CA in the capillaries during the acquisition. That's preventing the apparition of a gradient of CA concentration which could allow the CA to return in the capillaries.

Then in this model:

$$P * A = K \quad [10]$$

In consequences the variation of permeability area product (PA) versus flows can be obtained.

Analysis by a spectrometer

In parallel, another method is used to measure the variation of permeability versus the flow. This method consists in deducing the CA quantity which crosses the membrane (extravasation) from the injected quantity (Qi) and the quantity which not cross the membrane (then which is retrieved after the second PE20) (Qo). These measures are done for each flow.

Two photons fluorescence microscopy

A reference curve is defined. It represents the value of absorbance which is obtained with a spectrometer (wavelength 585nm) according to the SRB's concentration. After that, each solution which is recovered (containing Qo) is measured by the spectrometer in order to determine its concentration. Knowing the total volume of the reservoir, the outside quantity of SRB is then estimated. It's important to put in this reservoir the content of the PE20 located after the capillary and to consider the water (10ml in 2PF or 2ml in MRI) which is initially in the reservoir. Knowing the flow (F) and the injected quantity of SRB, the PA can be deduced by the following relations (26): E is the extravasation.

$$E = 1 - e^{-\left(\frac{PA}{F}\right)} \quad [11]$$

$$E = Q_o - Q_i \quad [12]$$

This same experiment is realized for the different flows.

MRI

The same kinds of measures are done for the MRI experiments. But to know the concentration of the recovered solution, samples of the solutions will be analysed by a mass spectrometer.

Results

Two photons fluorescence microscopy

The variation of signal with the concentration of SRB follows a linear rule (Figure 10) (Signal = 5901.3 x [SRB], $R^2 = 0.99$). This is coherent because the study is realized in domain of small reabsorption.

The dynamic study is realized for the different flows. The variations of signal versus time after the SRB injection are measured (figure 11) and converted into concentration of SRB versus time. At the beginning the signal is constant for each flow. The SRB solution still doesn't reach the capillary and this constitutes the base line. Then the signal increases versus the time until saturation before decreasing. This decrease results of the end of the SRB injection before the end of the acquisition. When the injection is stopped there is no more input of SRB in the ROI. But there is a diffusion of the SRB in the whole tank, so the SRB concentration in the ROI decreases.

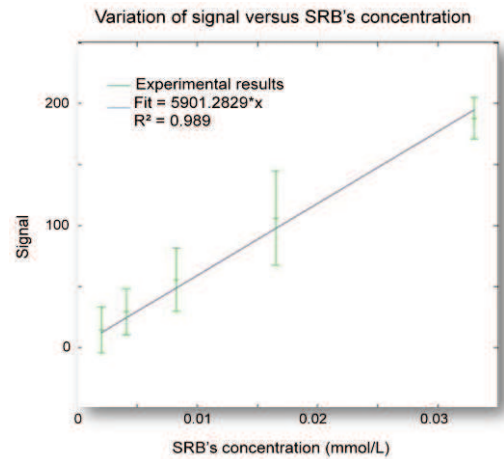


Figure 10: 2PF signal versus the SRB's concentration. The variation of the signal versus the concentration follows a linear rule ($R^2 = 0.99$).

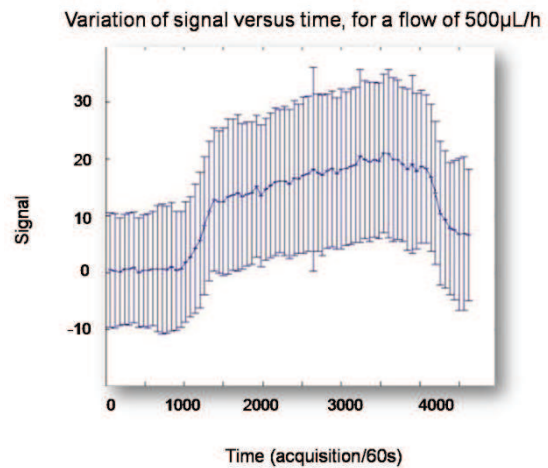


Figure 11: Variation of signal versus time obtained by 2PF microscopy for a flow of 500µL/h

These results allow to know the maximal permeability of capillary in each case according to the Patlak's model (equation 9, Figure 12). More the flows are important, more the physical phenomena are fast, and so the characteristic times are short. Then the fit were done on the 3 first points for the flow of 500µL/h, on the 4 first points for 400µL/h and the 5 first points for 300µL/h. In consequence the variation of PA versus flows is obtained thanks to the Patlak's model (equation 10, Figure 13). The PA increases with the flow. This is coherent because at low flows the system can be flow limited. This means that the blood brings the CA in the ROI slower than the extravasation.

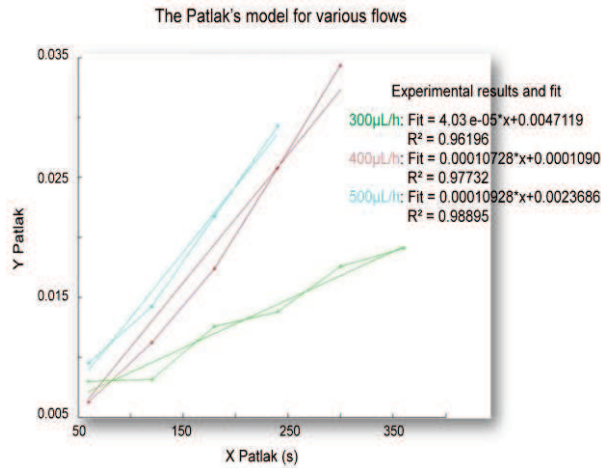


Figure 12: The Patlak's model parameters obtained by two photons fluorescence microscopy for 300 μL/h (in green), 400 μL/h (in red) and 500 μL/h (in cyan).

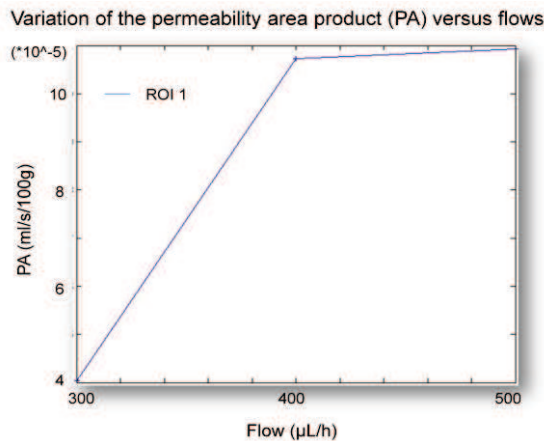


Figure 13: Variation of the Permeability Area product (PA) versus the flow for various flow rates.

However these results obtained by two photons fluorescent microscopy are not conclusive. The error bars are too important (figure 11). A problem during photomultipliers adjustment appeared.

The other method to know the permeability uses the difference between the quantities of SRB injected and retrieved at the outlet of the capillary (equation 11 and 12). To estimate the quantity of SRB retrieved, a calibration was performed. The calibration curve is represented figure 14. The absorbance versus the SRB's concentration follows a linear rule (fit = $4.42 \times [\text{SRB}]$, $R^2 = 0.996$). This is in appropriateness to the Beer-Lambert's law.

Then for each experiment the various retrieved solution of SRB are analyzed with the spectrometer and the quantities of SRB stay intracapillary are deduced.

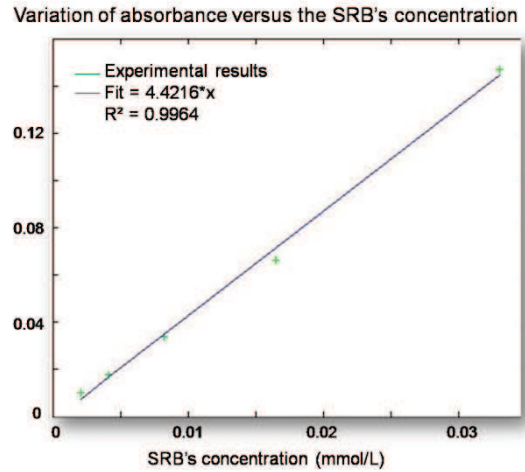


Figure 14: Absorbance measured by a spectrometer (wavelength 515nm) for different concentrations of SRB. The absorbance versus the SRB's concentration follows a linear rule as predicted by the Beer-Lambert's law.

For each flow the extravasation E was found negative. This is impossible in theory and this is the result of a problem still unknown.

MRI

The same kind of study is realized by MRI. From the 6 first Flash's sequences, a map of T1ref is obtained (figure 15a). Some circular ROIs in the tank and containing the capillary are drawn in order to know the mean value of T1ref (Figure 15b). So, for each flow, the concentration of Gd versus the time is deduced from the dynamic flash acquisition (equation 5). Then, the Patlak's model is applied on these results in order to deduce the value of permeability for each flow (equation 9, Figure 16).

a)



b)

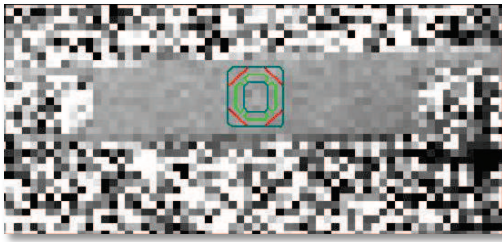


Figure 15: a) The T1ref map obtains by flash acquisition with α flip angles b) The same map with the different ROI (ROI 1: blue ROI 2: green ROI 3: red ROI 4: cyan)

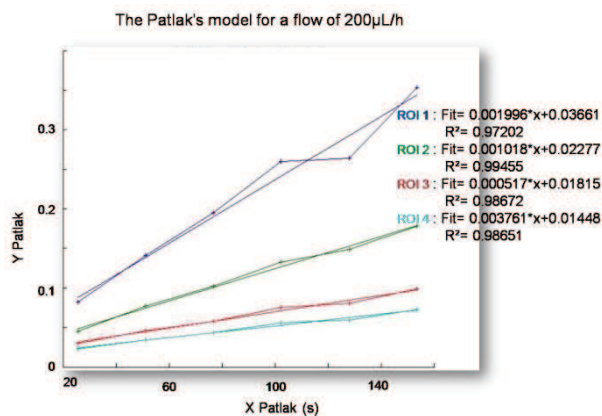


Figure 16: The Patlak's model for a flow of 200µL/h and different ROI obtained by α R. The ROI are drawn on the figure 15b. The linear fit represents the perfusion parameter (fit = PA * x + V₀).

In consequence the variation of permeability area product (PA) versus the flows can be obtained (equation 10, Figure 17). The PA seems constant with the flow for a laminar flow. But, this hemodynamic parameter increases for a flow of 500µL/h. It could be because this flow is near turbulent flows. There is a more perpendicular flow in this case. This observation is similar for various ROI which are been defined.

Moreover the PA increases when the size of the ROI surrounding the capillary decreases. The unit of this parameter is ml/s/100g. This unity comes from the volume fraction between the volume intracapillary and the total volume of the ROI (V₀) and the volume fraction between the interstitial space and the total volume of the ROI (usually called V_e). The relation between V_e and PA is:

$$PA = K = k_{pe} * V_e \quad [13]$$

In our case, more the ROI is small more the V₀ is important as shown on figure 16.

PA is a flow of CA trough capillaries versus a volume. For the same quantity of CA which goes to the interstitial space, more the volume of this interstitial space is important; more the PA is low (figure 17).

Variation of the permeability area product (PA) versus flows, for different ROI

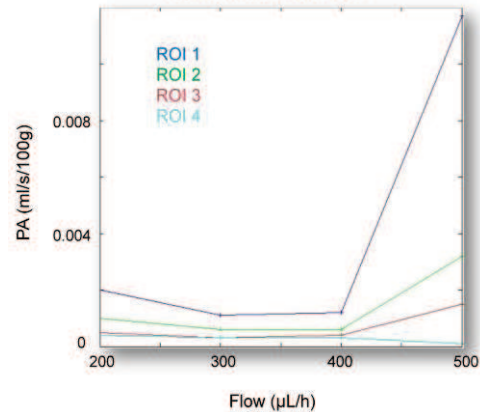


Figure 17: Variation of the Permeability area product (PA) with the flow for various ROI. More the ROI is small more the PA is important. The PA is stable versus the flow from 200 to 400µL/h.

In parallel the second method to estimate PA (as for the 2PF acquisitions) is in progress. The extravasation E is estimated by the subtraction of Q₀ and Q_i. To know Q₀ the solution retrieved were sent to a laboratory using a mass spectrometer. Actually we are waiting for the results.

Discussions

Two methods are used to estimate the last parameters needed to use the dialyser as a perfusion phantom. Indeed the PA is still not characterized for these capillaries with molecules as the ones of the clinical contrast agents.

The 2PF has a good spatial and temporal resolution, but doesn't allow to measure in the same time the CA in the capillaries and outside the capillaries. The SRB concentrations are too different to setup-up the laser power and the photomultipliers correctly for both. The field of view is very small and only allows to measure on a small area close to the capillary.

The MRI has a field of view large enough to see an entire slice of the phantom. But the spatial resolution is too low to detect what happens in the capillary. Moreover it is more difficult to measure quantitatively the CA concentration with the MRI due to a competition of numerous phenomena. Indeed the T1 is influenced by the T2* for example.

These two methods use the Patlak's model which is usually criticized in vivo for its assumption of the non return of the CA in the capillaries after the extravasation. The two compartment models or the model of Ketty take in consideration the possible return. But taking into account the return adds a degree of complexity. We prefer physically to limit the return than use these models. That's why in our study the injection is an important volume of CA and the acquisition is made only during the pass of CA into the capillaries and does not continue after. As long as there is a higher concentration of CA into the capillary than in the interstitial space, the concentration gradient prevents diffusion from the extracapillary space to the intracapillary space.

The results obtained are not directly comparable because for setup reason the 2PF acquisitions are performed in water and the MRI acquisitions in an agar's gel. But the PA obtained with 2PF acquisitions are lower than those obtained with MRI acquisitions. This is the opposite of what we thought we would obtain. Indeed the diffusion coefficient of the CA in the water is higher than in agar's gel, and then the extravasation should be higher.

A third method is in progress and uses only the measure of the CA quantity injected and the CA quantity which crosses the phantom without extravasation. A first try was performed for 2PF experiments but for an unknown reason the results are incoherent. For the MRI experiments, this method was tried too. We are waiting for an analysis by mass spectrometer to know exactly the concentration of the solution retrieved. This method should confront the results of the Patlak's model for 2PF and MRI, which did not correlate.

The two photons fluorescent microscopy's experiments require to be realized again with a gain better optimized than the one used during the experiment. Indeed 400 μ L of SRB has been injected during the dynamical study. It's important to adjust the gain with a tank which contains less of 400 μ L of SRB diluted in water because a part of the CA will not cross the

membrane. For more exactitude, it will be interesting to realize the 2PF microscopy's experiment in a tank full of an agar's gel like in MRI. The diffusion into the gel is not the same than a diffusion into water.

Conclusion

The experiment results are encouraging even if some experiments must be performed again. The different methods used are micro and macroscopic. These methods allow to characterize a perfusion phantom and the experiments already performed on the dialyser with bolus tracking protocols constitute an important step to understand better the perfusion phenomena and models.

The modelling began on ANSYS should confront experimental results. The transport of CA across a non porous pipe has been made. The geometry (number and style of the elements) optimized. Symmetries of the phantom were used to reduce the calculation duration. The modelling in a porous pipe is in progress.

It will be interesting to compare these experiment results with results obtained by other imaging techniques like X-Ray tomography. It is easier to be quantitative with X-ray than with MRI.

Acknowledgments

I thank Pierre, my supervisor, for his precious help and his kindness. I also thank J.F Adam for having allowed me to make this training course and for the X-ray tomography's experiments. I thank not only N. Pannetier & C.Debacker for the MRI's experiments but also JC.Vial & F.Appaix for the two photons microscopy's experiments, as well as S.Besse for the initiation of ANSYS too. I also thank M.Edouard and P.Deman, my office colleagues, who always guarantee an excellent atmosphere. Thank to the whole team 6 for the reception and advice.

References

1. Eastwood JD, Lev MH, Provenzale JM. Perfusion CT with iodinated contrast material. Am J Roentgenol 2003; 180: 3-12.
2. Miles KA. Brain perfusion: computed tomography applications. Neuroradiology 2004; 46: S194-S200.

3. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-57.
4. Tate MC, Aghi MK. Biology of Angiogenesis and Invasion in Glioma. *Neurotherapeutics* 2009; 6: 447-57.
5. O'Connor JPB, Jackson A, Asselin MC, Buckley DL, Parker GJM, Jayson GC. Quantitative imaging biomarkers in the clinical development of targeted therapeutics: current and future perspectives. *Lancet Oncology* 2008; 9: 766-76.
6. Rudin M. Noninvasive structural, functional, and molecular imaging in drug development. *Current Opinion in Chemical Biology* 2009; 13: 360-71.
7. Krause W. Delivery of diagnostic agents in computed tomography. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999; 37: 159-73.
8. Lee T, Zhang XA, Dhar S, Faas H, Lippard SJ, Jasanoff A. In Vivo Imaging with a Cell-Permeable Porphyrin-Based MRI Contrast Agent. *Chemistry & Biology*; 17: 665-73.
9. Roberts HC, Roberts TP, Brasch RC, Dillon WP. Quantitative measurement of microvascular permeability in human brain tumors achieved using dynamic contrast-enhanced MR imaging: correlation with histologic grade. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 891-9.
10. Di Nallo AM, Vidiri A, Marzi S, et al. Quantitative analysis of CT-perfusion parameters in the evaluation of brain gliomas and metastases. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 10.
11. Barajas RF, Jr., Chang JS, Segal MR, et al. Differentiation of Recurrent Glioblastoma Multiforme from Radiation Necrosis after External Beam Radiation Therapy with Dynamic Susceptibility-weighted Contrast-enhanced Perfusion MR Imaging. *Radiology* 2009; 253: 486-96.
12. De Keyzer F, Vandecaveye V, Thoeny H, et al. Dynamic contrast-enhanced and diffusion-weighted MRI for early detection of tumoral changes in single-dose and fractionated radiotherapy: evaluation in a rat rhabdomyosarcoma model. *European Radiology* 2009; 19: 2663-71.
13. Takayama Y, Ohno T, Kishimoto R, et al. Prediction of early response to radiotherapy of uterine carcinoma with dynamic contrast-enhanced MR imaging using pixel analysis of MR perfusion imaging. *Magnetic Resonance Imaging* 2009; 27: 370-6.
14. Wintermark M, Sesay M, Barbier E, et al. Comparative overview of brain perfusion imaging techniques. *Journal of Neuroradiology* 2005; 32: 294-314.
15. Schmittmann G, Rohr UD. Comparison of the permeability surface product (PS) of the blood capillary wall in skeletal muscle tissue of various species and in vitro porous membranes using hydrophilic drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000; 89: 115-27.
16. Yang X, Liang J, Heverhagen JT, et al. Improving the pharmacokinetic parameter measurement in dynamic contrast-enhanced MRI by use of the arterial input function: theory and clinical application. *Magn Reson Med* 2008; 59: 1448-56.
17. Eloott S, Vierendeels J, Verdonck P. Optimisation of solute transport in dialysers using a three-dimensional finite volume model. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 2006; 9: 363-70.
18. Tofts PS, Brix G, Buckley DL, et al. Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusible tracer: standardized quantities and symbols. *J Magn Reson Imaging* 1999; 10: 223-32.
19. Erdogan ME, Imrak CE. On the flow in a uniformly porous pipe. *International Journal of Non-Linear Mechanics* 2008; 43: 292-301.
20. Goh V, Halligan S, Bartram CI. Quantitative tumor perfusion assessment with multidetector CT: Are measurements from two commercial software packages interchangeable? *Radiology* 2007; 242: 777-82.
21. ANSYS® Academic Research, Release 12.1, ANSYS CFX, ANSYS, Inc.
22. ANSYS® Academic Research, Release 12.1, ANSYS ICEM-CFD, ANSYS, Inc.
23. Chen ZJ, Gillies GT, Broaddus WC, et al. A realistic brain tissue phantom for intraparenchymal infusion studies. *J Neurosurg* 2004; 101: 314-22.
24. Cheng HL, Wright GA. Rapid high-resolution T(1) mapping by variable flip angles: accurate and precise measurements in the presence of radiofrequency field inhomogeneity. *Magn Reson Med* 2006; 55: 566-74.
25. Patlak CS, Blasberg RG. Graphical Evaluation Of Blood-To-Brain Transfer Constants From Multiple-Time Uptake Data - Generalizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 1985; 5: 584-90.
26. St Lawrence KS, Lee TY. An adiabatic approximation to the tissue homogeneity model for water exchange in the brain: I. Theoretical derivation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 1365-77.

Annexe 4 : Rapport de Layal Obeid

Le rapport suivant a été rédigé par Layal Obeid que j'ai co-encadré (encadrant principale Jean-François Adam) durant son stage de Master 2 de début février à septembre 2011. Elle a travaillé sur la relation entre les mesures de perfusion en suivi de bolus sur un patient, et la prise de contraste d'une injection lente destinée à charger la tumeur en iode pour une irradiation de type SSRT (stereotactique synchrotron radiation therapy).

Développements méthodologiques pour les mesures de perfusion en neuro-oncologie: applications à la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron

Loyal Obeid^{a,b,c}

Maître de stage: Jean François Adam^{a,b,c,d}

^a Inserm, U836, équipe 6 Rayonnement synchrotron et recherche médicale, Grenoble, France

^b European Synchrotron Radiation Facility Medical Beamline (ESRF-ID17), Grenoble, France

^c Université Joseph Fourier, Grenoble, France

^d Centre hospitalier universitaire, Grenoble, France

Février-Septembre 2011

Résumé

La radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT) renforcée par effet photoélectrique est une technique innovante et prometteuse. Elle a été proposée comme l'une des solutions pour dépasser la limitation en dose des traitements conventionnels des tumeurs cérébrales. Cette limitation empêche de délivrer une dose de rayonnement curative sans dépasser la tolérance du tissu sain environnant. Le principe de la SSRT repose sur l'accumulation sélective d'un élément lourd (Z élevé) dans la tumeur en premier temps. Puis d'une irradiation stéréotaxique avec des rayons X de faible énergie issus d'une source synchrotron. Des essais cliniques de phase I/II sont en préparation sur la ligne médicale de l'établissement européen de rayonnement synchrotron (ESRF) utilisant de l'iode ($Z=53$) sous forme d'agent de contraste comme élément lourd. Le succès de la SSRT est directement lié à la biodistribution de l'iode dans la tumeur pendant tout le temps du traitement.

Les objectifs de cette étude clinique sont d'abord l'analyse et la modélisation de la biodistribution d'iode dans les tumeurs chez des patients durant la durée du traitement. Ensuite de corréler les concentrations d'iode atteintes chez ces patients avec les mesures de perfusion. Ces paramètres de perfusion sont des éléments clés pour le recrutement de chaque patient. Ils permettront de réduire considérablement la durée de l'examen tomodensitométrique CT d'inclusion.

L'étude concerne cinq patients ayant eu deux injections successives de produit de contraste iodé par voie veineuse. Une première injection rapide (40 mL) pour les mesures de perfusion suivie d'une seconde injection lente (160 ml) qui permet de charger la tumeur en iode en augmentant sa concentration dans la tumeur de façon stable en fonction du temps. L'examen consiste en une succession d'images acquises sur un scanner de radiothérapie pendant la durée d'une irradiation SSRT. La concentration d'iode absolue ainsi que les paramètres de de perfusion sont mesurés dans la tumeur et les matières blanche (MB) et grise (MG). Un test de corrélation linéaire Pearson-Bravais a été effectué entre les paramètres de perfusion et la concentration d'iode. La distribution de l'iode a été ensuite modélisée en utilisant le modèle de perfusion de Johnson & Wilson.

La concentration moyenne d'iode atteinte chez les patients est égale à 1.98 ± 0.43 mg/mL ce qui correspond à un facteur d'augmentation du dépôt de dose de $19.8 \pm 4.3\%$. Le Temps de transit moyen ($r=0,85$) et la perméabilité ($r=0,83$) corrélent avec la concentration d'iode dans la tumeur et la MG en seconde injection ce qui permettra de prédire la prise de contraste et de recruter les patients en se basant sur ce critère.

Mots-clés : Perfusion cérébrale, Tumeurs cérébrales, Iode, Tomodensitométrie, Neuro-oncologie, Modélisation, Radiothérapie stéréotaxique, Rayonnement synchrotron



1 Introduction

Les tumeurs cérébrales malignes sont un problème de santé publique majeur avec une moyenne de survie avec traitement qui atteint seulement 14.6 mois pour les tumeurs de plus haut grade. Elles représentent à l'heure actuelle un défi thérapeutique important pour la radiothérapie externe. En effet, bien que ce soit le seul traitement augmentant significativement la survie des patients porteurs de ce type de pathologie [30, 29], il est impossible en utilisant un traitement conventionnel, de délivrer une dose de rayonnement curative sans dépasser la tolérance du tissu sain environnant [12, 13]. Plusieurs techniques innovantes et prometteuses ont été proposées dans la précédente décennie pour dépasser ces limitations et produire des dépôt de dose très localisés dont la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT) renforcée par effet photoélectrique.

Les fondements de la SSRT découlent directement des travaux de Norman *et al.* dans les années 80. Des études et observations ont montré que l'utilisation d'agents de contraste iodés lors des examen radiologique et les angiographies cardiaques spécifiquement induit des effets délétères et des aberrations chromosomiques [2, 7, 8, 22]. Cette toxicité a été expliquée par Callisen *et al.* [5] par une augmentation de la dose déposée dans le sang en présence de produit de contraste iodé. Il a été montré aussi que cette augmentation de dose a lieu uniquement avec des rayons-X [22, 10]. Ceci a confirmé que l'augmentation de dose est due à la plus grande section efficace des rayons-X de l'effet photoélectrique sur les atomes lourds d'iode aux basses énergies (<120 keV). Mello *et al.* ont également montré en 1983 [19] que l'exposition des cellules à un produit iodé ne provoque pas d'effets mutagènes. Il a paru rapidement intéressant de tirer parti de cette augmentation de dose pour des applications thérapeutiques sur des tumeurs cérébrales. En effet, on arrive à obtenir une accumulation spécifique de produit de contraste dans la tumeur par la rupture localisée de la barrière hémato-encéphalique BHE, inhérente à ce type de pathologie [6]. Le rendement en profondeur (PDD) d'un faisceau rayons-X d'énergie effective 60 keV dans une tête humaine contenant une tumeur chargée d'iode a été étudié et comparé à celui obtenu avec un faisceau de Cobalt (1.25 MeV) [19]. Le PDD est la dose à une certaine profondeur normalisée par rapport à une profondeur de référence à l'axe central. La figure 1 montre que la dose aux tissus sains a été fortement réduite avec un faisceau rayons-X plutôt qu'un faisceau de Cobalt. La dose absorbée par l'os est augmentée. Une solution pour réduire cette dose est de la répartir par arc-thérapie. Des essais précliniques ont été réalisés sur des tumeurs implantées chez le lapin [14] et sur des tumeurs spontanées du chien [24]. Un essai clinique de phase I a été réalisé à la fin des années 90 par Rose *et al.* [25] pour démontrer la faisabilité et la sécurité de la technique chez l'homme. Pour les irradiations un scanner dont le collimateur est modifiable d'un faisceau divergent de diagnostic en un faisceau fin de thérapie était utilisé : le

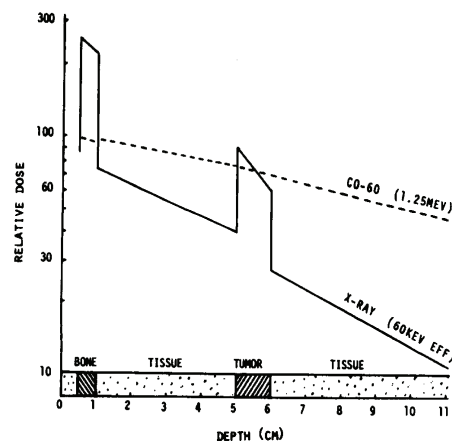


FIGURE 1 – Rendements en profondeur dans un cerveau obtenu pour une irradiation d'une tumeur perfusée d'iode avec un faisceau 60 keV et un faisceau de Cobalt [19]

CTX [15]. L'irradiation était réalisé en arc-thérapie dynamique pour protéger l'os des excédents de dose délivrés à basse énergie dans les matériaux denses. la technique en elle-même a été abandonnée à cause des temps d'irradiation extrêmement longs, nécessitant de surcroît plusieurs injections d'iode entre les phases de refroidissement du tube.

Les résultats de simulations Monte Carlo ont montré qu'utiliser un faisceau monochromatique permettrait d'optimiser la dose à la tumeur et supprimer le problème de durcissement du faisceau qui augmente la dose à l'os [26, 20, 4]. Cette dernière constatation fait du rayonnement synchrotron un outil de prédilection pour ce type de radiothérapie.

Le principe de la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT) renforcée par effet photoélectrique est identique à celui du CTRx si ce n'est l'utilisation des rayons X monochromatiques issus d'une source synchrotron (cf. fig.2). Ce rayonnement possède des caractéristiques intéressantes pour la radiothérapie telles que sa faible divergence et son flux intense permettant d'avoir un faisceau monochromatique dans une gamme d'énergie entre 25 et 100 keV.

Des essais cliniques de phase I/II sont en préparation sur la ligne médicale de l'établissement européen de rayonnement synchrotron (ESRF) utilisant de l'iode ($Z=53$) sous forme d'agent de contraste comme élément lourd. Ces essais cliniques découlent des résultats satisfaisants de nombreux essais in vitro [9, 17] et in vivo [1, 3] réalisés dans la dernière décennie. Des travaux d'optimisation de planification de traitement en SSRT publiés par Edouard *et al.* [11] et ont démontré qu'un faisceau de 80 keV est un bon compromis entre garder un facteur d'augmentation de dose satisfaisant et minimiser la dose à l'os.

Un des points clés du traitement est la biodistribution de l'iode pendant l'irradiation : l'iode doit rester à une concentration suffisante et stable dans la tumeur pendant tout le temps de l'irradiation [23]. Cela néces-

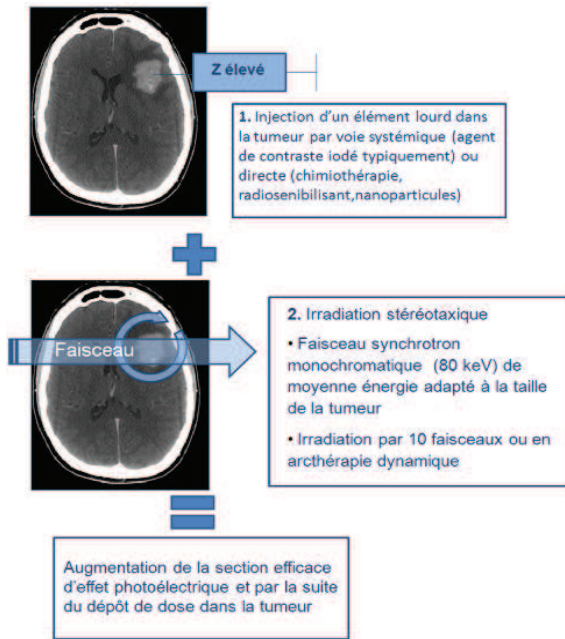


FIGURE 2 – Schéma du principe de la SSRT. 1ère étape : accumulation sélective d'un agent de contraste de Z élevé dans la tumeur, 2ème étape : irradiation stéréotaxique avec des rayons X de radiodiagnostic issus d'une source synchrotron

site d'étudier la cinétique de l'agent de contraste dans des tumeurs spontanées présentant différentes vascularisations. Il existe peu de données dans la littérature sur ce sujet et seul Rose *et al.* [25] donne une valeur approximative de 5mg/mL au maximum (injection de 1–2 ml d'agent de contraste par kg). Il est donc indispensable, pour la bonne réalisation des essais cliniques, d'étudier quantitativement la distribution de l'iode pour la modalité d'injection envisagée lors des essais cliniques. On peut également imaginer corrélérer cette biodistribution à l'imagerie de perfusion [31] qui est une modalité pertinente dans la compréhension des mécanismes de vascularisation tumorale et d'extravasation de l'agent injecté par voie systémique [21].

L'objectif de ce stage était de proposer une méthodologie d'analyse et de modélisation de la biodistribution d'iode dans les tumeurs suite à une injection de produit de contraste iodé par voie veineuse. Le premier objectif de l'étude est de déterminer la concentration d'iode et son homogénéité chez chaque patient, et la variabilité de cette concentration en fonction du temps, du type de métastase et de sa taille. Puis de chercher une corrélation statistique entre la concentration d'iode et les paramètres clés de la perfusion tels que le volume et le débit sanguin cérébral, la perméabilité des vaisseaux à l'iode et le temps de transit moyen du produit de contraste dans les capillaires. Une deuxième partie de l'étude a été consacrée à une modélisation de cette biodistribution. Celle-ci consiste à déterminer si la réponse impulsionnelle du tissu tumoral fournie par les analyses de perfusion peut nous servir à prédire la distribution obtenue dans la tumeur par convolution des données cinétiques d'une injection lente.

2 Matériels and Méthodes

2.1 Protocole d'imagerie et de perfusion des patients

Cinq patients porteurs de métastases cérébrales ont été recrutés avec consentement éclairé au service de radiothérapie du CHU de Grenoble selon la taille de la métastase (sustentorielle, de diamètre < 3 cm). La première étape de leur traitement fut la fabrication d'un masque stéréotaxique utilisé durant la durée du protocole d'imagerie scanner pour fixer le crâne et éviter par la suite les artefacts du mouvement.

L'objectif de ce protocole d'imagerie et de perfusion est d'acquérir les éléments nécessaires à la dosimétrie du patient pour le traitement au synchrotron (anatomie, organes à risques...), aux cartes de mesures de perfusion (volume sanguin cérébral, temps de transit moyen...) et à l'analyse de la biodistribution de l'iode dans la tumeur au cours du temps. Il comporte deux injections de produit de contraste et trois séquences d'imagerie scanner (cf. fig.3).

2.1.1 Imagerie Scanner (cf. fig.3)

Les images sont acquises au scanner de radiothérapie du CHU de Grenoble (*GE Healthcare LightSpeedTM RT¹⁶, GE medical systems, LLC, U.S.A.*).

- i Première étape : acquisition volumique avant injection d'iode : 77 coupes, 2,5 mm hélicoïdales, 120 kV, 376 mA.s nécessaire pour la dosimétrie.
- ii Seconde étape : acquisition cinématique : 4 coupes, 5 mm axiales, 80 kV, 125 mA.s, 30 min (3s pour l'acquisition d'un temps sans iode, 2 min 57s pour suivre la 1^{ère} injection et 27 min pour suivre la 2^{ème} injection). Le pas temporel est augmenté de 1 min à 2 min puis 2.5 min et enfin 5min.
- iii Troisième étape : acquisition volumique après injection d'iode : 77 coupes, 2,5 mm hélicoïdales, 120 kV, 376 mA.s nécessaire pour la dosimétrie.

2.1.2 Injections d'iode

Le produit de contraste iodé utilisé est l'*Ioméron* 400mg/mL.

- i Première injection rapide : 40ml à 4mL/s qui démarre 3 s après le début de l'acquisition cinématique du scanner. Cette injection permet de calculer les cartes de perfusion cérébrales en utilisant le modèle de Johnson & Wilson.
- ii Deuxième injection lente : 160ml à 0.5mL/s qui démarre 3 min après le début de l'acquisition cinématique du scanner. Cette étape permet de charger la tumeur en produit de contraste pendant toute la durée du traitement.

2.1.3 Dose au patient

La dose au patient ($CTDI_W$) du protocole a été estimée à 600 mGy totale : 100 mGy pour les deux acquisitions

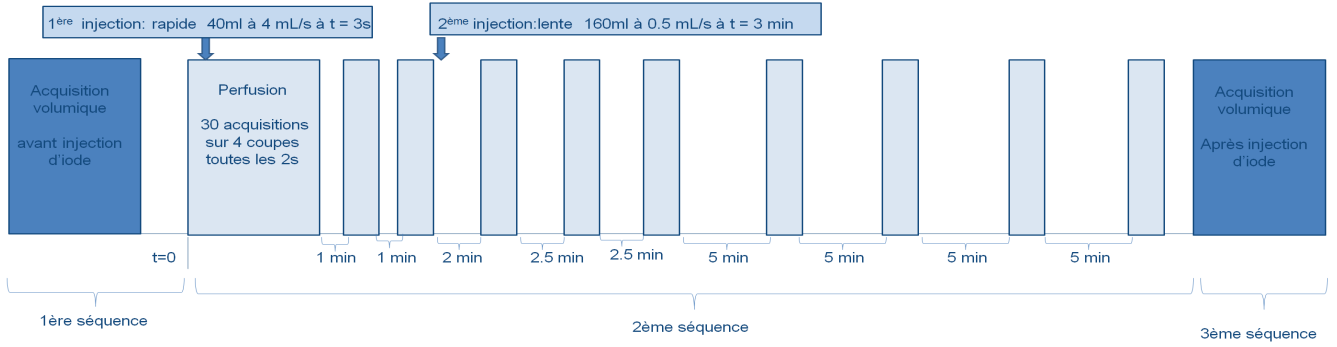


FIGURE 3 – Illustration du protocole de perfusion et d'imagerie des patients

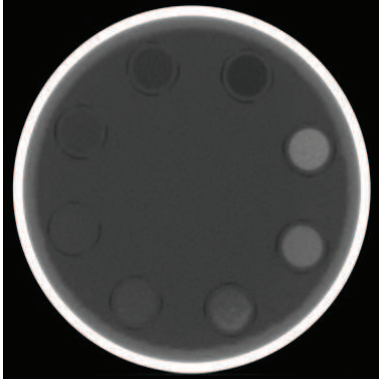


FIGURE 4 – Image scanner du fantôme utilisé pour l'étalonnage. Dans un plan situé à 5 cm en dessous se trouve le même fantôme avec eau seule. La variabilité d'atténuation est due aux différentes concentrations d'iodes

volumiques et 500 mGy pour le suivi de concentration.

2.2 Étalonnage du scanner en Unité Hounsfield (UH)/concentration d'iode

C'est une étape primordiale pour pouvoir traiter les données scanner acquises en UH et les convertir au paramètre intéressant de cette étude c'est à dire la $[I]$.

Un fantôme circulaire sur deux étages de taille équivalente à celle d'un crâne adulte est utilisé (cf. fig.4). Il est composé de plexiglas et entouré d'une couche d'aluminium pour représenter l'os du crâne. Dans ce fantôme sont disposés 8 tubes dans chaque étage de façon alignée : 8 tubes d'iode à des concentrations variables et 8 autres d'eau pour permettre de faire la soustraction et calculer le rehaussement en unité Hounsfield (ΔUH) dû à l'iode.

2.3 Traitement d'images, statistiques et mesure des concentrations d'iode

Pour traiter les images, effectuer les mesures de concentrations et créer des outils statistiques, plusieurs fonctions ont été développées et rajoutées à un environnement Matlab appelé $\mu vasc$ développé au sein des équipes 5 et 6 de l'institut des neurosciences de Grenoble.

2.4 Modèle de perfusion adiabatique de Johnson & Wilson [16]

Ce modèle est le seul qui permet de calculer tous les paramètres de perfusion cérébrale à la fois dans la condition de capillaire perméable. Ces paramètres sont :

- Le volume sanguin cérébral (CBV) : c'est le volume de sang circulant dans les capillaires autour de la tumeur par unité de masse de tissu cérébral (exprimé en mL/100g).
- Le débit sanguin cérébral (CBF) : c'est le débit volumique du sang circulant dans les capillaires autour de la tumeur par unité de masse de tissu cérébral (exprimé en mL/min/100g).
- Le temps de transit moyen (MTT) : c'est le temps moyen pour que le sang traverse les capillaires (exprimé en s). Ce paramètre représente une mesure indirecte de la pression cérébrale étant donné que quand la pression est élevée, les éléments du sang traversent plus rapidement les vaisseaux et résulte d'un temps de transit faible. Le MTT peut se calculer à partir du CBV et CBF selon le théorème du volume central :

$$MTT = 60 \times \frac{CBV}{CBF} \quad (1)$$

- Le produit perméabilité-surface (PS) : C'est le produit de la perméabilité et de la surface totale du capillaire endothélial par unité de masse de tissu cérébral (exprimé en mL/min/100g). Seul le modèle de Johnson & Wilson permet le calcul de ce paramètre. Cette perméabilité est due à la lésion de la BHE (cf. fig.5) entraînant une extravasation de l'agent de contraste du compartiment intra-vasculaire au compartiment extra-vasculaire puis une évacuation par un retour de l'agent de contraste dans le milieu intra-vasculaire.
- La fraction d'extravasation E : c'est la fraction de soluté présent dans les capillaires avec un potentiel de diffuser dans l'espace interstitiel. Ce facteur est calculé à partir du CBF et du PS en utilisant la relation :

$$E = 1 - \exp\left(-\frac{PS}{CBF}\right) \quad (2)$$

Ce modèle considère que la tumeur est composée de capillaires et de milieu tissulaire interstitiel (cf. fig.6). Tous

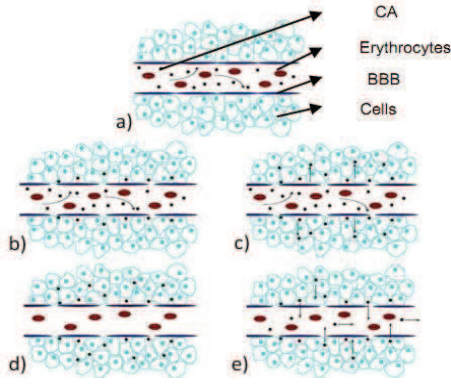


FIGURE 5 – Illustration de la BHE. Comparaison entre a) une BHE intacte (tissu sain) et une b-e) BHE lésée (tissu tumoral) : Extravasation et évacuation de l'agent de contraste

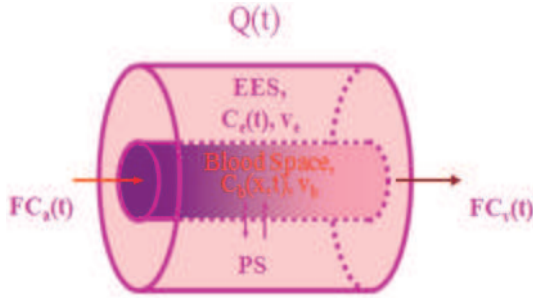


FIGURE 6 – Modélisation de la distribution du sang dans la tumeur d'après Johnson & Wilson

les capillaires sont regroupés ensemble dans un cylindre de longueur L et de volume V_b . Le milieu interstitiel est supposé comme un cylindre entourant les capillaires de volume V_e et de concentration interstitielle en soluté C_e dépendant que du temps. Lorsque le sang arrive dans le capillaire, une hypothèse d'équilibre immédiat entre les milieux extra-vasculaire et intra-vasculaire pendant tout le temps de transit. Après le temps de transit, le produit de contraste restant dans le capillaire et le milieu interstitiel diffuse : c'est l'approximation adiabatique de Johnson & Wilson [27, 28].

Pour simplifier le calcul des paramètres de perfusion, ce modèle utilise la notion de fonction résidu tissulaire [18] et l'opérateur mathématique de convolution.

En considérant une certaine masse tissulaire, la perfusion (CBF ou F) porte avec elle une concentration $C_a(t)$ de produit de contraste. La courbe de $[I]$ tissulaire est appelée $Q(t)$.

Dans le cas particulier où $F.C_a(t)$ est un dirac (la masse de produit de contraste est déposée instantanément en bolus), alors la fonction de transfert tissulaire a la forme montré dans la figure 7 et est appelée fonction résidue impulsionnelle (IRF). Or $F.C_a(t)$ n'est pas une fonction dirac mais une courbe étalée qui peut être considérée comme une succession de diracs. L'approximation adiabatique (la concentration extra-vasculaire en produit de contraste évolue lentement par rapport à celle dans la zone intra-vasculaire) consiste à dire dans ce cas que :

$$Q(t) = C_a(t) \otimes FR(t) \quad (3)$$

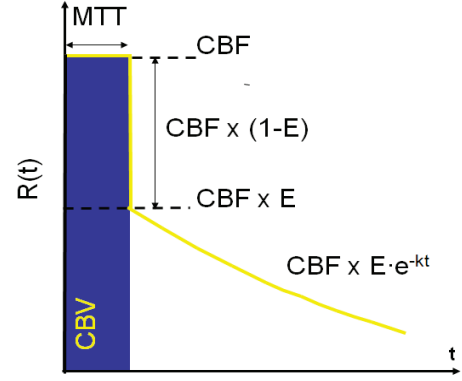


FIGURE 7 – Réponse impulsionnelle et paramètres hémodynamiques extraits de cette fonction. Phase I : équilibre, Phase II : évacuation du produit de contraste des vaisseaux après le MTT, Phase III : retour par diffusion du produit de contraste extravasé

Les paramètres mesurables sur une acquisition de perfusion sont $Q(t)$ et $C_a(t)$. Grâce à une opération de déconvolution de ces deux fonctions, l'IRF est obtenue. Elle est composée de trois phases (cf. fig.7) : D'abord une phase d'équilibre, ensuite une phase d'évacuation du produit de contraste des vaisseaux après le MTT et enfin un retour par diffusion du produit de contraste extravasé sous forme exponentielle.

Cette IRF permet l'extraction de tous les paramètres de perfusion souhaités. En effet, comme représenté sur la figure 7, le CBV correspond à l'aire sous la partie stable de la courbe, le CBF est le maximum de l'IRF dans la partie stable et le MTT correspond au temps où la courbe reste stable [21]. Le PS est calculé en utilisant l'équation 2.

2.5 Calcul des cartes de perfusion cérébrales

Le calcul des cartes de perfusion s'effectue semi-automatiquement sur une station *GE Healthcare (CT-perf4)* [21]. L'utilisateur a accès à certains paramètres tels que les paramètres de la segmentation, le filtrage, la correction du volume partiel, le déplacement de l'artère, le modèle de déconvolution souhaité. De plus, un mode recherche avancé a été installé pour récupérer l'IRF déconvoluée dans un fichier de données.

2.6 Corrélation statistique

Pour évaluer la corrélation entre la concentration d'iode atteinte en second phase et les paramètres de perfusion chez les patients, un ajustement selon la méthode des moindres carrés a été effectué sous *ROOT (CERN, Genève, Suisse)*. En outre, le coefficient de corrélation linéaire de Bravais-Pearson entre deux variables aléatoires $X(x_1, \dots, x_n)$ et $Y(y_1, \dots, y_n)$

$$r_p = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \tilde{x}) \sum_{i=1}^N (y_i - \tilde{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \tilde{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - \tilde{y})^2}} \quad (4)$$

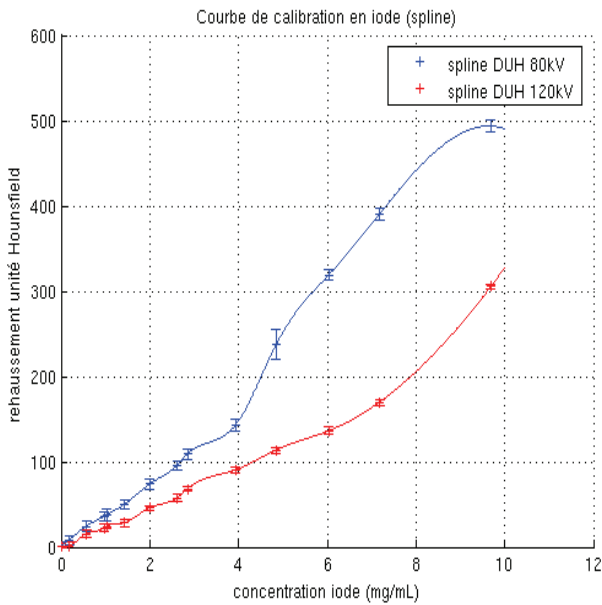


FIGURE 8 – Courbes d'étalonnage ΔUH des tensions 80 et 120 kV et modélisation par une interpolation de type spline

3 Résultats

3.1 Courbe de calibration

Quinze concentrations différentes ont été scannées allant de 0 à 10 mg/mL. Les ΔUH sont extraits des images scanners par soustraction entre la référence (l'eau) et l'échantillon (l'iode). Les concentrations exactes des tubes d'iode sont déterminées grâce à une imagerie synchrotron (pas de durcissement du faisceau). Les points expérimentaux sont représentés sur le graphe 8 pour les tensions 80 et 120 kV utilisées respectivement pour l'imagerie du patient et la thérapie au synchrotron. On remarque que la relation entre ΔUH et $[I]$ n'est pas linéaire. Cela est dû au large diamètre de l'anneau CT utilisé et à l'algorithme de reconstruction peu robuste. Pour relier ces deux paramètres, plusieurs ajustement ont été testé et l'algorithme d'interpolation par la méthode du spline a été adopté. Le bruit dans les images vaut $\sim 9\Delta UH$ à 80kV et $\sim 5\Delta UH$ à 120kV ce qui correspond à 0.5 mg/mL environ. Ainsi, les concentrations en dessous de 0.5 mg/mL sont imprécises.

3.2 Mesure de la biodistribution de l'iode

Les images scanners acquises au scanner sont traités sous Matlab. La conversion des images en $[I]$ s'effectue en soustrayant les images avec iode des images sans iode en appliquant la relation ΔUH vs $[I]$ dans chaque pixel (cf. fig.9). Cela revient à considérer que le tissu cérébral est constitué d'eau uniquement.

Les graphes de $[I]$ obtenus dans différentes régions d'intérêt ROI (artère, tumeur, matière blanche MB et matière grise MG) sont représentées sur les graphes 10. Le premier graphe montre les deux phases d'injections d'iode : le bolus et l'injection lente pour chaque courbe.

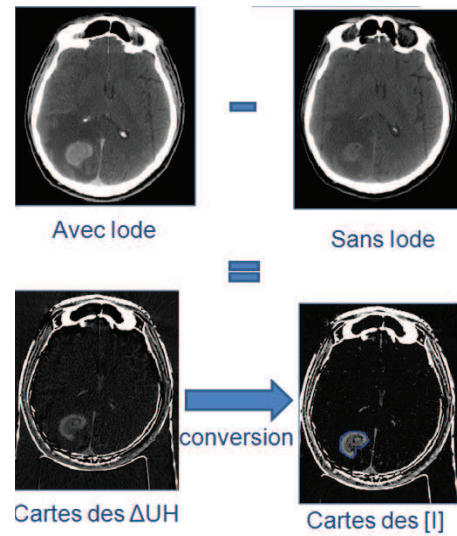


FIGURE 9 – Schéma de conversion des images unités Hounsfield en images de concentrations d'iode. La tumeur prend plus le contraste que les zones saines du cerveau

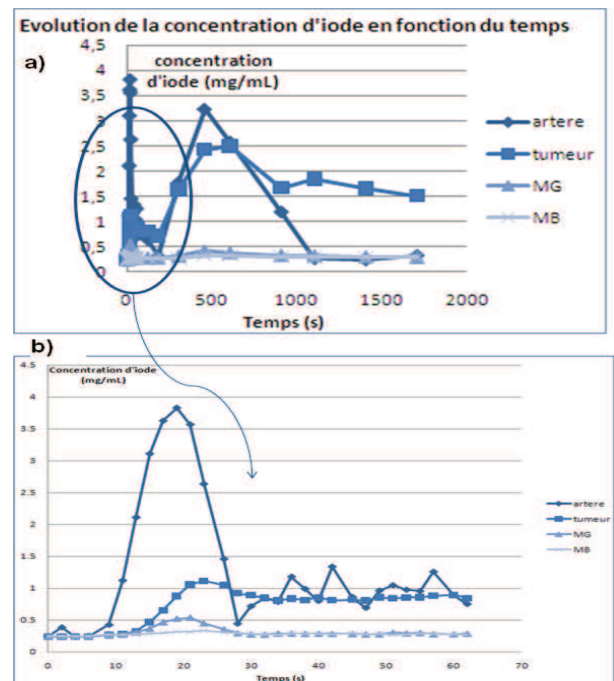


FIGURE 10 – Courbes temporelles des $[I]$ dans plusieurs régions d'intérêt. a) Les deux phases d'injection rapide (bolus) et lente sont visibles. b) Premier passage et recirculation

| Patient | Type de primaire | Volume (cm^3) | Rayon moyen (cm) | $[I]_{moyenne}(mg/mL)$ |
|-----------------------|---------------------------|-------------------|------------------|------------------------|
| 1 | adénocarcinome pulmonaire | 11.6 | 1.4 | 2.5 ± 1.3 |
| 2 | mélanome | 11.7 | 1.4 | 2.1 ± 0.8 |
| 3 | carcinome pulmonaire | 1.6 | 0.7 | 3 ± 1.1 |
| 4 | carcinome épidermoïde | 2.4 | 0.8 | 0.9 ± 0.8 |
| 5 | carcinome épidermoïde | 8.5 | 1.3 | 1.4 ± 0.64 |
| Moyenne $[I]$ (mg/mL) | | | | 1.98 ± 0.43 |

TABLE 1 – Données des patients

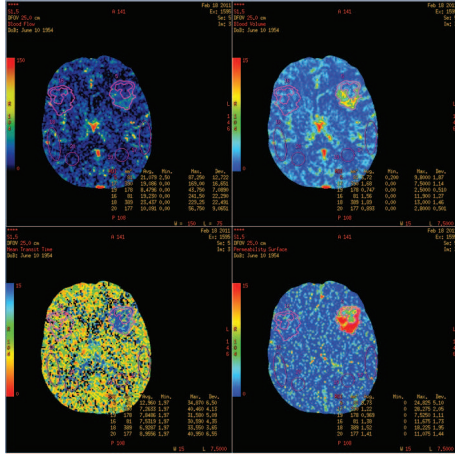


FIGURE 11 – Cartes de perfusion du CBF, CBV, MTT et PS

Un zoom sur le bolus permet d'observer un premier pic correspondant au premier passage du produit de contraste et un second pic illustrant le phénomène de recirculation : c'est quand l'agent de contraste revient en moindre quantité et sur un front plus long à cause de l'élimination par les reins et la dilution dans le volume sanguin total. Les valeurs de concentrations moyennes dans le volume de la tumeur atteintes chez chacun des cinq patients et les caractéristiques des tumeurs sont représentées dans le tableau 1.

3.3 Mesure des paramètres et des cartes de perfusion

Les cartes de perfusion sont calculées par la station GE. Des ROI sont dessinées pour contourner la tumeur, l'artère, la veine, la MB et la MG des côtés ipsilatéral et controlatéral (cf. fig.11). On remarque que la tumeur présente un CBV assez important du fait de sa vascularisation assez importante ainsi que une perméabilité élevée à cause de la rupture de la BHE. Les valeurs moyennes des paramètres de perfusion sur les cinq patients sont illustrées dans le tableau 2.

| ROI | CBF (mL/min/100g) | CBV (mL/100g) | MTT(s) | PS(mL/min/100g) |
|--------|-------------------|---------------|----------------|-----------------|
| Tumeur | 47.9 ± 23.9 | 7.3 ± 3.8 | 11.6 ± 2.7 | 13.1 ± 5.6 |
| MG | 21 ± 8.2 | 2 ± 0.9 | 7.7 ± 1.1 | 2.9 ± 1.2 |
| MB | 12.5 ± 7 | 1.5 ± 1.6 | 9.9 ± 2.8 | 2.3 ± 1.8 |

TABLE 2 – Valeurs moyennes des paramètres de perfusion pour plusieurs régions d'intérêt

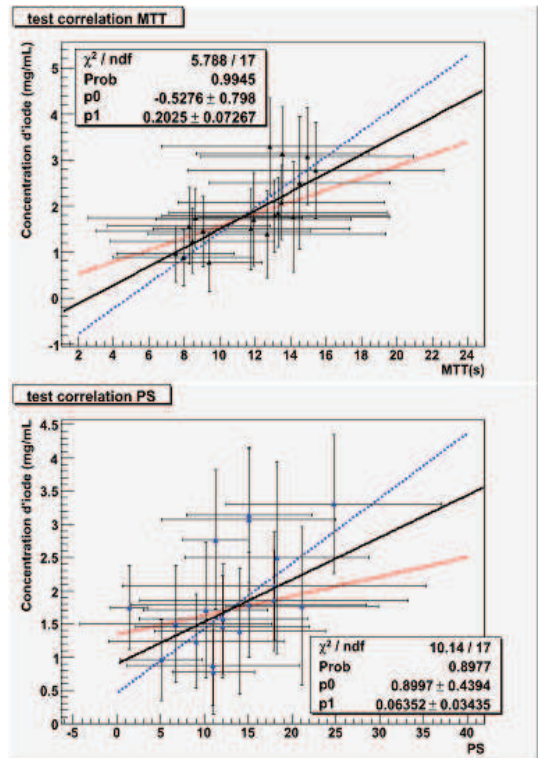


FIGURE 12 – Résultats d'ajustement linéaire pour le MTT et le PS. Les courbes rouges et bleues sont les lignes de régression pour la dépendance $x=gy(y)$ et $y=gx(x)$ respectivement. $[I]=p_0+p_1*\text{paramètre}$ où paramètre est le MTT ou le PS

3.4 Étude de corrélation

La corrélation linéaire entre la concentration d'iode atteinte dans la tumeur chez chaque patient et chaque paramètre de perfusion a été testée par un ajustement par la méthode du χ^2 sous ROOT et un calcul du facteur de Bravais-Pearson.

La concentration d'iode dans la tumeur corrèle bien avec le MTT donné par la station GE ($r=0.85$), le MTT calculé en utilisant l'équation (1) et PS ($r=0.83$). Les valeurs d'ajustement sont représentés sur la figure 12.

4 Discussion

Les résultats obtenus durant cette étude sont encourageants. Les courbes de calibration $UH/[I]$ ne sont pas linéaires comme dans la littérature [21]. Cela peut fausser les résultats de perfusion étant donné que le modèle de Johnson & Wilson fait l'hypothèse d'une dépendance linéaire. On pense que cela provient des paramètres de reconstruction du scanner non accessibles par l'utilisateur. Ce problème sera discuté prochainement avec le constructeur.

Les concentrations moyennes d'iode atteintes dans les tumeurs des patients suite à la seconde injection ne sont pas assez élevées (3 à 4 mg/mL max. dans certaines coupes). Or pour inclure le patient dans le protocole SSRT, il faut au moins 2.5 mg/mL d'iode dans la tumeur d'après les autorités de santé française (non spécifié si au niveau d'une coupe ou du volume entier). Avec les

valeurs de concentrations obtenues, on est limitée. Pour augmenter la $[I]$ dans la tumeur, les paramètres de la seconde injection d'iode ont été changés : l'injection se fera plus lentement avec un débit de 0.25 mL/s au lieu de 0.5 mL/s. En effet, en injectant plus lentement, on espère qu'une plus grande partie d'iode sera extravasée dans le milieu extra-vasculaire. Cette importante extravasation permettra de maintenir la $[I]$ intra-vasculaire élevée par la diffusion. Un premier patient a suivi cet examen mais les données n'ont pas encore été analysées.

Concernant les résultats de corrélation, une bonne corrélation a été mise en évidence entre la $[I]$ et le MTT, le PS et E. Ce type d'analyse n'a jamais été faite auparavant. Elle permettra d'optimiser la démarche de recrutement des patients pour la SSRT en clinique (temps d'examen diminué d'un facteur 10) et de diminuer la dose au patient (400 au lieu de 600 mGy). En effet, en n'effectuant que la première injection rapide (bolus) d'iode dont le suivi dure trois minutes, on aura une idée sur la $[I]$ qui sera potentiellement atteinte dans la tumeur dans une phase d'irradiation.

4.1 Modélisation de la biodistribution

Le second objectif de cette étude était de modéliser la variation de la $[I]$ en fonction du temps dans la tumeur. L'idée est de prédire cette variation pour la seconde phase sans réellement en faire l'acquisition en exploitant les données de la première injection uniquement. L'intérêt est de reconstruire en trois dimensions la variation de la $[I]$ dans la tumeur pendant une éventuelle irradiation à partir des données de la mesure de perfusion. Cela est théoriquement possible, si la fonction de réponse impulsionnelle IRF(t) et la concentration artérielle en iode au cours de la seconde injection $C_a(t)$ décrites dans l'équation 3 sont connues. En pratique, l'IRF est extraite par la station GE pour le calcul de perfusion dans chaque pixel. On peut modéliser $C_a(t)$ en seconde injection par une forme générale de droite ou de variable Gamma en observant les résultats obtenus sur cohorte de patients. Enfin, la convolution des deux fonctions selon l'équation 3 devrait donner une prédiction de la courbe tumorale $Q(t)$.

On a d'abord voulu vérifier cette hypothèse pour les premiers patients dont les données des deux injections sont connues. En convoluant l'IRF(t) extraite et $C_a(t)$ de la seconde injection dans le domaine de Fourier, on devrait retrouver la courbe tissulaire de la seconde injection mesurée durant l'examen. La figure 13 montre les graphes obtenus pour deux patients. On remarque que la courbe de convolution a la même forme et le même schéma de variations que la courbe tissulaire mais il existe un écart entre les deux.

Ce résultat est préliminaire et il faut comprendre cet écart. Pour cela, un modèle simplifié des fonctions a été construit. Il suppose que la courbe artérielle est une variable gamma pour la première injection et une droite pour le début de la seconde injection. Ce modèle est en cours d'analyse et devrait permettre de comprendre si les informations quantitatives sont perdues au cours de

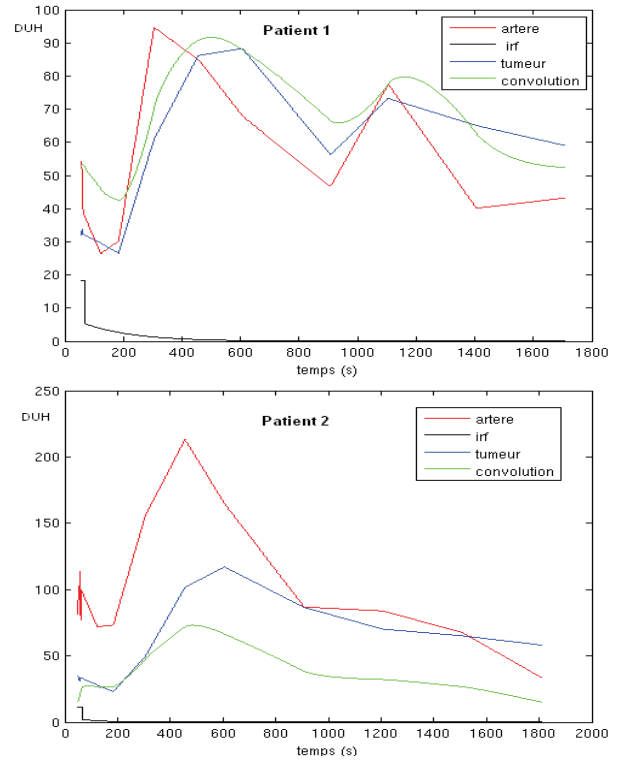


FIGURE 13 – Résultats de prédiction de la courbe tissulaire $Q(t)$ par la convolution de l'IRF(t) et $C_a(t)$ dans le domaine de Fourier

la deconvolution ou si l'irf est incomplète.

5 Conclusion

Cette étude a permis d'une part l'analyse de la biodistribution de l'iode pour une acquisition en injection standard. Elle a également permis de simplifier le protocole de recrutement des patients sur une acquisition de perfusion uniquement et l'évaluation du MTT et du PS. Enfin, des études plus poussées seront faites pour la modélisation en 3D de la biodistribution de l'iode.

6 Remerciements

Je tiens sincèrement à remercier mon maître de stage Dr. Jean François Adam pour son encadrement et les bonnes conditions de travail. J'exprime également ma gratitude à Pr. François Estève et Dr. Hélène Helleaume pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe. Un grand merci tout particulier au reste de l'équipe ID17 de l'ESRF : Christian Nemoz, Thierry Brochard, Pierre Deman, Mathias Vautrin, Florence Taupin, Dr. Mélanie Flaender, Dr. Emmanuel Brun, David Clement, Magda Przybylowski et Coralie le Deroff pour l'aide, les discussions très enrichissantes et la bonne ambiance qui ont rendu le travail très motivant et agréable. Je tiens aussi à remercier le service de radiothérapie du CHU de Grenoble : Pr. Jacques Balosso, Dr. Jean-Yves Giraud, Dr. Alexandre Tessier, Jean Louis Gilet et René Philibert.

Références

- [1] Adam J F, Biston M C, Joubert A, Charvet A A, Le Bas J F, Esteve F and Elleaume H 2005 Enhanced delivery of iodine for synchrotron stereotactic radiotherapy by means of intracarotid injection and bloodbrain barrier disruption : Quantitative iodine biodistribution studies and associated dosimetry *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 61 1173-82
- [2] Adams F H, Norman A, Mello R S and Bass D 1977 Effect of radiation and contrast media on chromosomes preliminary report *Radiology* 124 823-6
- [3] Biston M C, Joubert A, Adam J F, Elleaume H, Bohic S, Charvet A M, Esteve F, Foray N and Balosso J 2004 Cure of fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays *Cancer Research* 64 2317-23
- [4] Boudou, C., Balosso, J., Estève, F., and Elleaume, H. (2005). Monte carlo dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy of brain tumours. *Phys Med Biol*, 50(20) :4841-4851
- [5] Callisen H H, Norman A and Adams F H 1979 Absorbed dose in the presence of contrast agents during pediatric cardiac catheterization *Medical Physics* (Woodbury) 6 504-9
- [6] Carmeliet P and Jain R K 2000 Angiogenesis in cancer and other diseases *Nature* 407 249-57
- [7] Cochran S T, Khodadoust A and Norman A 1980 Cytogenetic effects of contrast material in patients undergoing excretory urography *Radiology* 136 43-6
- [8] Cochran S T and Norman A 1982 Cytogenetic effects of contrast material - Diatrizoate versus Iothalamate *Investigative Radiology* 17 178-82
- [9] Corde S, Joubert A, Adam J F, Charvet A M, Le Bas J F, Esteve F, Elleaume H and Balosso J 2004 Synchrotron radiation-based experimental determination of the optimal energy for cell radiotoxicity enhancement following photoelectric effect on stable iodinated compounds *British Journal of Cancer* 91 544-51
- [10] Dawson, P., Penhaligon, M., Smith, E., and Saunders, J. (1988). Synergistic cytotoxicity of iodinated contrast agents and x-radiation. *Invest Radiol*, 23 Suppl 1 :S110-S113
- [11] Edouard M, Broggio D, Prezado Y, Esteve F, Elleaume H and Adam J F Treatment plans optimization for contrast-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy *Medical Physics* 37 2445-56
- [12] Emami B, Myerson R J, Scott C, Gibbs F, Lee C and Perez C A 1991 Phase-I/II study, combination of radiotherapy and hyperthermia in patients with deep-seated malignant-tumors - report of a pilot - study by the radiation therapy oncology group *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 20 73-9
- [13] Flickinger J C, Lunsford L D, Kondziolka D, Maitz A H, Epstein A H, Simons S R and Wu A 1992 Radiosurgery and brain tolerance - an analysis of neurodiagnostic imaging changes after Gamma-Knife radiosurgery for arteriovenous-malformations *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 23 19-26
- [14] Iwamoto K S, Cochran S T, Winter J, Holburt E, Higashida R T and Norman A 1987 Radiation-dose enhancement therapy with Iodine in rabbit VX-2 brain tumors *Radiotherapy and Oncology* 8 161-70
- [15] Iwamoto K S, Norman A, Kagan A R, Wollin M, Olch A, Bellotti J, Ingram M and Skillen R G 1990 The CT scanner as a therapy machine *Radiotherapy and Oncology* 19 337-43
- [16] Johnson J A and Wilson T A 1966 A MODEL FOR CAPILLARY EXCHANGE *American Journal of Physiology* 210 1299-&
- [17] Joubert A, Biston M C, Boudou C, Ravanat J L, Brochard T, Charvet A M, Esteve F, Balosso J and Foray N 2005 Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells : Consequences for computed tomography therapy *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 62 1486-96
- [18] Lee T Y, Purdie T G and Stewart E 2003 CT imaging of angiogenesis *Quarterly Journal of Nuclear Medicine* 47 171-87
- [19] Mello R S, Callisen H, Winter J, Kagan A R and Norman A 1983 Radiation-dose enhancement in tumors with Iodine *Medical Physics* 10 75-8
- [20] Mesa A V, Norman A, Solberg T D, Demarco J J and Smathers J B 1999 Dose distributions using kilovoltage x-rays and dose enhancement from iodine contrast agents *Physics in Medicine and Biology* 44 1955-68
- [21] Miles K and Cuenod C A 2007 Multidetector computed tomography in oncology : CT perfusion imaging : Informa Healthcare)
- [22] Norman, A., Adams, F. H., and Riley, R. F. (1978a). Cytogenetic effects of contrast media and triiodobenzoic acid derivatives in human lymphocytes. *Radiology*, 129(1) :199-203
- [23] Norman, D., Stevens, E. A., Wing, S. D., Levin, V., and Newton, T. H. (1978b). Quantitative aspects of contrast enhancement in cranial computed tomography. *Radiology*, 129(3) :683-688
- [24] Norman A, Ingram M, Skillen R G, Freshwater D B, Iwamoto K S and Solberg T 1997 X-ray phototherapy for canine brain masses *Radiat Oncol Investig* 5 8-14
- [25] Rose J H, Norman A, Ingram M, Aoki C, Solberg T and Mesa A 1999 First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx) *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 45 1127-32
- [26] Solberg T D, Iwamoto K S and Norman A 1992 Calculation of radiation-dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain-tumors *Physics in Medicine and Biology* 37 439-43
- [27] St Lawrence K S and Lee T Y 1998 An adiabatic approximation to the tissue homogeneity model for water exchange in the brain : I. Theoretical derivation *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18 1365-77
- [28] St Lawrence K S and Lee T Y 1998 An adiabatic approximation to the tissue homogeneity model for water exchange in the brain : II. Experimental validation *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18 1378-85
- [29] Stupp R, Hegi M E, Mason W P, van den Bent M J, Taphoorn M J B, Janzer R C, Ludwin S K, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes A A, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht C J, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross J G, Mirimanoff R O, European Org R, Treatment, Canc Brain Tumour G, Radiat Oncol G and Natl Canc Inst Canada Clin T 2009 Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study : 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial *Lancet Oncology* 10 459-66
- [30] Wen P Y and Kesari S 2008 Malignant gliomas in adults *New England Journal of Medicine* 359 492-507
- [31] Wintermark M, Sesay M, Barbier E, Borbely K, Dillon W P, Eastwood J D, Glenn T C, Grandin C B, Pedraza S, Soustiel J F, Nariai T, Zaharchuk G, Caille J M, Dousset V and Yonas H 2005 Comparative overview of brain perfusion imaging techniques *Stroke* 36 E83-E99

Communications :

Publications:

Increase of Lifespan for glioma bearing rats by using Minibeam Radiation Therapy. Prezado Y, Sarun S, Gil S, **Deman P**, et al, Journal of Synchrotron Radiation. (accepted)

Dosimetry protocol for the preclinical trials in white-beam minibeam radiation therapy. Prezado Y, Martinez-Rovira I, Thengumpallil S, **P Deman**, Medical Physics, 38(8) 2011.

Monochromatic minibeam radiotherapy: theoretical and experimental dosimetry for preclinical treatment plans. **Deman P**, Vautrin M, Stupar V, *et al*, Physics in Medicine and Biology, 56(14), 4465-4480, 2011.

Monochromatic minibeam radiotherapy: from healthy tissue sparing effect studies towards first preclinical trials on glioma bearing rats. **Deman P**, Vautrin M, Edouard M, *et al*, International Journal of Radiation Oncology Biology Physics (in press).

Synchrotron Radiation Therapy from a Medical Physics point of view. Prezado Y, Adam JF, Berkvens P, *et al*, 6th International Conference On Medical Applications Of Synchrotron Radiation, proceedings, 1266, 2010

Synchrotron radiotherapy. **Deman P**, Edouard M, Besse S, *et al*, Revue de médecine interne, 8(31), 586-589, 2010

Intracerebral delivery of 5-iodo-2'-deoxyuridine in combination with synchrotron stereotactic radiation for the therapy of the F98 glioma. Rousseau J, Adam JF, **Deman P**, *et al*, Journal of synchrotron radiation, 16, 573-581, 2009

Oral Presentations:

Synchrotron Stereotactic Radiotherapy Clinical Trials: Development and Commissioning of a Treatment Planning System for Dose Computation. M. Vautrin, *et al*, (presenting author, Yolanda P), Medical Applications of Synchrotron Radiation, 2010, Melbourne, Australia.

Mini-beams radiotherapy preclinical trials: preliminary results on healthy rats using morphological and functional magnetic resonance imaging, **Deman P**, *et al*, (presenting author, Estève F), Medical Applications of Synchrotron Radiation, 2010, Melbourne, Australia.

A step towards perfusion benchmark measurements in clinical imaging devices, **Deman P**, *et al*, (presenting author, Deman P), European Congress of Radiology, 2009, Vienna, Austria


Poster Presentations:

MRI brain perfusion measurements in the follow-up of cutting-edge radiation therapy techniques. **Deman P**, et al, (presenting author, Deman P), Brain, 2011, Barcelona, Spain.

A step towards perfusion benchmark measurements in clinical imaging devices. **Deman P**, et al, (presenting author, Deman P), 2011, Brain, Barcelona, Spain.

Publications :



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
www.em-consulte.com



Lexique

Radiothérapie par rayonnement synchrotron

Synchrotron radiotherapy

P. Deman^{a,b,c}, M. Edouard^{a,b,c}, S. Besse^{a,b,c}, M. Vautrin^{a,b,c,d},
H. Elleaume^{a,b,c,e}, J.-F. Adam^{a,b,c,e}, F. Estève^{a,*,b,c,e}

^a Inserm, U836, équipe 6, BP 170, 38042 Grenoble cedex 9, France

^b Université Joseph-Fourier, BP 51, 38041 Grenoble cedex 9, France

^c European Synchrotron Radiation Facility, BP 220, 38043 Grenoble cedex 9, France

^d DOSIsoft, 45/47, avenue Carnot, 94230 Cachan, France

^e Centre hospitalier universitaire, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9, France

INFO ARTICLE

Mots clés :

Tumeur
Radiothérapie
Synchrotron
Minifaisceaux
Stéréotaxie

Keywords:

Tumor
Radiotherapy
Synchrotron
Minibeam
Stereotactic

RÉSUMÉ

Le traitement des cancers par radiothérapie est limité par l'impossibilité de déposer suffisamment de dose dans une tumeur tout en préservant les tissus environnants. Le rayonnement synchrotron possède des caractéristiques physiques permettant de tendre vers un meilleur effet. Le faisceau synchrotron est un rayonnement X de basse énergie, faiblement divergent et de très haute intensité. Trois méthodes sont en évaluation préclinique : la radiothérapie par microfaisceaux, par minifaisceaux, et stéréotaxique. Les deux premières s'appuient sur une géométrie fractionnée spatialement. La dernière méthode combine rayonnement de basse énergie monochromatique et présence d'élément lourd dans la zone cible. Les recherches effectuées ont montré des augmentations significatives de la survie sur des modèles de tumeurs cérébrales du rongeur. Un essai de phase I/II de radiothérapie stéréotaxique en présence d'agent de contraste iodé est en préparation sur la ligne médicale de l'établissement européen de rayonnement synchrotron.

© 2010 Société nationale française de médecine interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Radiation therapy is commonly used in the treatment of cancer. The normal tissue tolerance can be a limit to deliver enough dose to the tumor to be curative. The synchrotron beam presents some interesting physical properties, which could decrease this limitation. Synchrotron beam is a medium energy X-ray nearly parallel beam with high intensity. Three methods are under preclinical investigations: the microbeam, the minibeam and the stereotactic radiotherapy. The first two use a geometric irradiation effect called spatial fractionation. The last one use highly conformational irradiation geometry combined with a dose enhancement due to the presence of high-Z element in the target. Synchrotron radiotherapy preclinical experiments have shown some curative effect on rodent glioma models. Following these encouraging results a phase I/II clinical trial of iodinated enhanced stereotactic synchrotron radiotherapy is currently being prepared at the European Synchrotron Radiation Facility.

© 2010 Société nationale française de médecine interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

La radiothérapie est un élément majeur de l'arsenal thérapeutique dans la lutte contre le cancer. Son efficacité dépend de la

capacité à déposer des doses suffisamment importantes dans la tumeur pour la traiter tout en ne dépassant pas la tolérance des tissus sains environnants. Cette condition est critique pour certaines tumeurs comme les gliomes dont l'exérèse chirurgicale est difficile et rarement complète. De plus, l'efficacité de la chimiothérapie reste particulièrement faible pour cette pathologie à cause de la barrière hémato-encéphalique (BHE) limitant ou bloquant la propagation des drogues après injection systémique. L'incidence des gliomes est d'environ cinq nouveaux cas pour 100 000 habitants

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : esteve@esrf.fr (F. Estève).

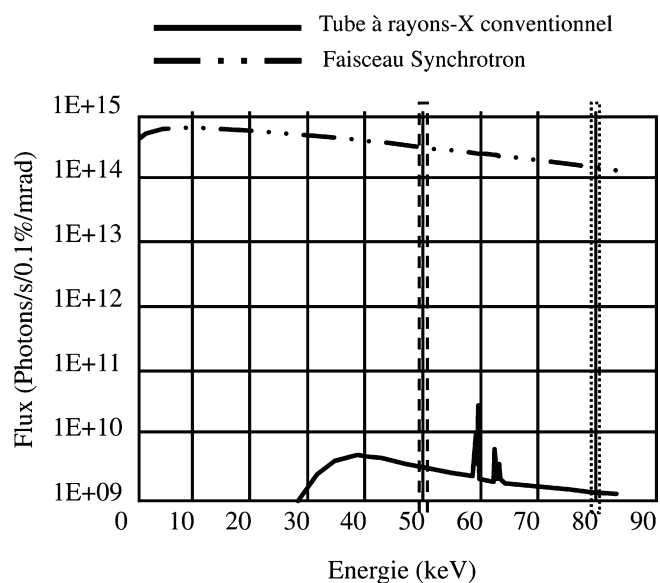


Fig. 1. Comparaison du flux d'un tube à rayons X conventionnel (trait plein) et d'un faisceau synchrotron (trait pointillé). En pointillé vertical les deux énergies principalement utilisées pour la radiothérapie utilisant des faisceaux monochromatique (50 keV et 80 keV).

par an et la survie médiane est de 14,6 mois pour les gliomes de haut grade dans le meilleur des cas (association radiothérapie/chimiothérapie sous forme de témozolomide). Il n'existe pas à ce jour de traitement curatif à proprement parler. Ainsi, le traitement des gliomes malins reste un domaine de recherche préclinique et clinique très actif pour lequel de nombreux essais thérapeutiques sont en cours. Certains reposent sur une association chimiothérapie-radiothérapie et sur l'utilisation de nouvelles sources de rayonnement potentiellement plus efficaces, ou permettant de mieux préserver les zones saines (effet différentiel accru) [1,2]. Le rayonnement synchrotron possède des caractéristiques physiques particulières intéressantes pour la radiothérapie. L'originalité de ce rayonnement par rapport aux sources conventionnelles repose sur sa gamme d'énergie (spectre d'environ 10 à 100 keV, Fig. 1) et son flux très élevé (source environ 10 000 fois plus intense qu'une source conventionnelle de rayons X). Le flux important permet de sélectionner une énergie donnée (longueur d'onde) tout en maintenant un flux résiduel élevé. La combinaison des basses énergies avec un élément lourd (typiquement un agent de contraste utilisé en radiologie) permet d'augmenter localement la section efficace de l'effet photoélectrique et donc d'augmenter localement le dépôt d'énergie. Ce rayonnement synchrotron est par ailleurs très faiblement divergent verticalement ce qui permet de développer des techniques utilisant des géométries d'irradiation complexes et très précises. Trois traitements de radiothérapie sont développés en recherche préclinique, dont deux sont en cours de transfert vers la recherche clinique.

2. Méthodes d'irradiation

2.1. Radiothérapie microfaisceaux

La Microbeam Radiation Therapy (MRT) est basée sur l'effet « dose-volume » que Zeman et al. ont mis en évidence dans les années 1960 en étudiant l'effet biologique de faisceaux de deutéron de taille micrométrique sur le tissu cérébral de souris [3]. La MRT consiste en effet en une irradiation de très haute dose (plusieurs centaines de Gray) fractionnée spatialement avec des faisceaux polychromatiques d'épaisseurs micrométriques générés à l'aide

d'un collimateur multifentes. Cette technique nécessite la divergence négligeable du rayonnement synchrotron et son flux intense. Il a été montré que les tissus sains ont une très grande résistance à ce type d'irradiation [4] ; de plus une très bonne réponse thérapeutique a été obtenue [5,6] sur le modèle de gliosarcome 9L du rat avec deux tiers de guérisons. De nombreux essais précliniques ont permis d'optimiser les paramètres de cette technique, en termes d'espacement de faisceaux et de largeur de faisceaux. Certaines associations chimiothérapeutiques sont en cours d'évaluation. Des études récentes ont montré que le réseau vasculaire cérébral sain n'était pas altéré dans les premiers mois suivant la MRT (continuité du réseau vasculaire, pas de modification de volume sanguin cérébral, modification réversible de la perméabilité de la BHE, œdème cérébral rapidement résorbé). Cette intégrité vasculaire permettrait d'expliquer l'absence de nécrose radio-induite et d'augmenter considérablement la dose déposée dans la lésion (jusqu'à 1 000 Gy en une fraction unique par microfaisceaux par rapport à 60 Gy délivrés en fractions de 2 Gy sur cinq à six semaines en radiothérapie conventionnelle). L'hypothèse d'un effet préférentiel de la MRT sur les vaisseaux tumoraux par rapport aux vaisseaux sains a déjà été évoquée en termes de perméabilité capillaire mais aucune étude n'a porté directement sur la radiosensibilité et la viabilité des vaisseaux tumoraux après MRT. En parallèle, des essais précliniques sur des chiens porteurs de tumeurs cérébrales spontanées sont prévus en MRT, en vue d'applications cliniques [7].

2.2. La radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron

La radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT) trouve ses fondements au début des années 1980 avec les travaux de l'équipe de Norman et al. [8]. Le principe est d'irradier une tumeur cérébrale par arc-thérapie hélicoïdale dynamique avec des rayons X de radiodiagnostic (énergie < 150 keV), en ayant au préalable injecté au patient, un agent de contraste qui s'accumule préférentiellement dans la tumeur du fait de la rupture localisée de

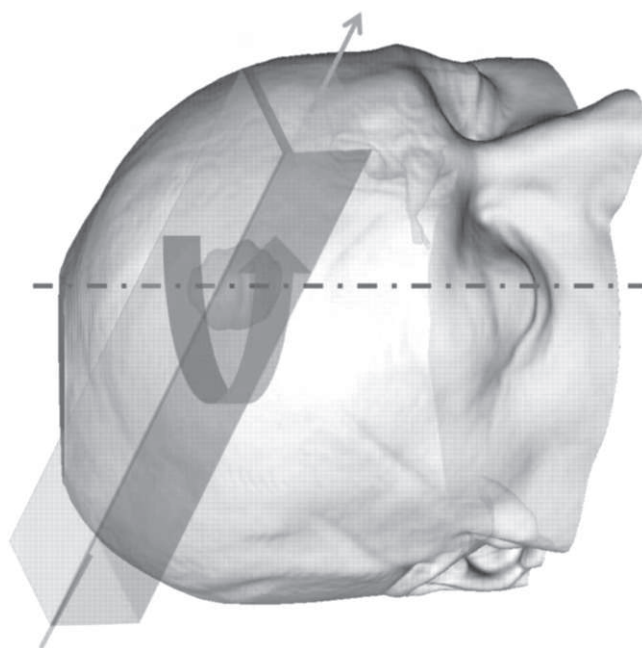


Fig. 2. Représentation 3D d'une tête humaine avec une zone comportant de l'iode (injection systémique d'un patient ayant une tumeur cérébrale) et une géométrie d'irradiation SSRT : irradiation continue sur 360 degré avec un faisceau de largeur adapté à la taille de la tumeur, translation du patient suivant l'axe AP pour irradier toute la tumeur.

la BHE (Fig. 2). La faisabilité et la sécurité pour le patient, de cette technique de thérapie a été démontrée lors d'essais de phase I aux États-Unis [9]. L'efficacité thérapeutique résulte de la combinaison d'un effet balistique dû à la géométrie hautement conformationnelle de l'irradiation et d'un effet physique d'augmentation du dépôt d'énergie par les particules secondaires (photons de fluorescence, photoélectrons, électrons Auger) générées par l'interaction du rayonnement avec les atomes lourds présents spécifiquement dans la tumeur [10]. Les rayons X de radiodiagnostic, bien que peu usuels en radiothérapie, sont essentiels pour l'efficacité d'un tel type de traitement à cause de la prévalence de l'effet photoélectrique à ces énergies. L'utilisation d'un rayonnement issu d'un accélérateur linéaire médical (énergies de l'ordre du MeV) ne produirait, en combinaison avec un agent de contraste, qu'une augmentation locale du dépôt de dose négligeable [11]. Un rayonnement monochromatique intense tel qu'il est produit par une source synchrotron est idéal pour un traitement plus efficace : on peut choisir l'énergie optimale d'interaction et s'affranchir des basses énergies du spectre conventionnel, irradiant inutilement l'os sans contribuer au gain thérapeutique. L'énergie qui permet la meilleure augmentation de dose induite par l'iode (agent de contraste de radiologie) est d'environ 50 keV. Cependant l'atténuation du faisceau est très importante à cette valeur, et il est nécessaire de faire un compromis entre l'effet de l'augmentation de la dose et l'atténuation du faisceau. Le choix de 80 keV est souvent utilisé pour ce compromis. Ces dix dernières années les recherches combinant l'injection systémique ou intracérébrale d'éléments lourds (comme la « *convection enhanced delivery* ») (agents de contraste iodés et drogues de chimiothérapie) suivie d'une irradiation aux rayons X de basses énergies (50–100 keV) se sont multipliées [12]. Cette technique, au vu des résultats de survie, est en cours de transfert vers des protocoles de recherche clinique [7].

2.3. Les minifaisceaux

Une nouvelle méthode de radiothérapie a été récemment proposée par Dilmanian et al. [13]. Cette méthode dite des « minifaisceaux synchrotron » emprunte des qualités intéressantes inhérentes aux deux méthodes de radiothérapie par rayonnement synchrotron :

- le pouvoir de préservation des tissus peu ou pas irradiés (hors de la cible) de la MRT par un fractionnement spatial micrométrique ;
- la couverture hautement conformationnelle et continue de la cible de la SSRT et l'utilisation d'éléments lourds renforçant l'effet du rayonnement.

Cette technique d'irradiation utilise alors un faisceau monochromatique, d'épaisseur submillimétrique afin d'utiliser l'effet dose/volume, et la présence d'élément lourd situé préférentiellement dans la tumeur. La géométrie d'irradiation (Fig. 3) utilise classiquement deux incidences orthogonales. Sur chaque incidence le faisceau est fractionné spatialement et la géométrie d'irradiation est décalée d'une épaisseur d'irradiation de façon à ce que l'endroit où se coupent les incidences on obtienne un entrelacement. Ainsi la zone cible reçoit une dose à peu près uniforme alors que le tissu sain environnant ne voit qu'un faisceau fractionné et y est peu sensible. La Fig. 4 représente une image de gel de dosimétrie nPAG [14] réalisé à l'IRM (protocole d'imagerie T2) sur laquelle on voit la zone entrelacée et la zone de fractionnement spatiale. L'énergie du faisceau utilisée pour cette technique est choisie de la même manière que pour la SSRT. C'est-à-dire qu'un compromis est fait entre l'augmentation de dose maximum dû à l'élément lourd et le pouvoir de pénétration des photons dans l'os et le cerveau.

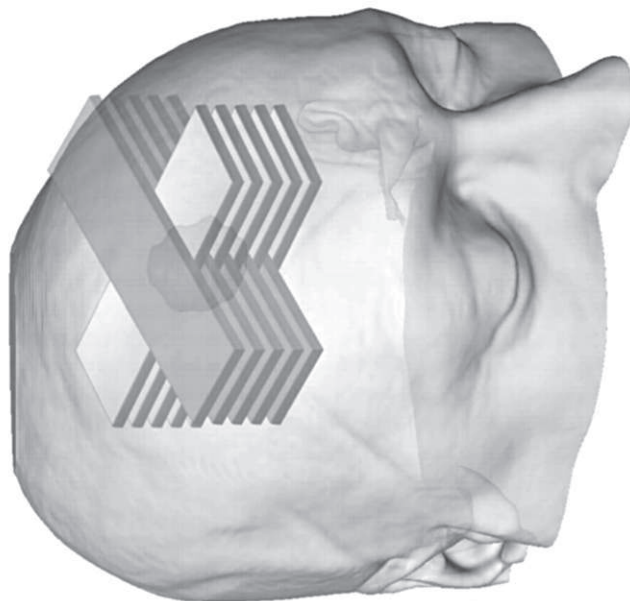


Fig. 3. Représentation 3D d'une tête humaine avec une zone comportant de l'iode (injection systémique d'un patient ayant une tumeur cérébrale) et une géométrie d'irradiation minifaisceaux proposant un fractionnement spatial hors de la zone iodée et un entrelacement dans cette zone de façon à avoir une couverture continue de toute la cible.

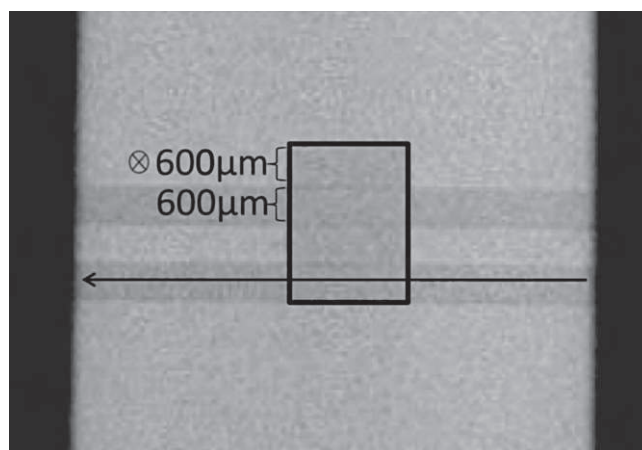


Fig. 4. Carte T2* d'un gel de dosimétrie irradiation avec une géométrie minifaisceaux entrelacée avec des faisceaux de 600 µm. Le carré en trait plein représente la zone d'entrelacement qui est irradiée de façon homogène.

3. Conclusion

L'intérêt du rayonnement synchrotron pour la radiothérapie a été démontré par les études précliniques réalisées ces dix dernières années. Le développement de techniques d'irradiation comme la MRT et la SSRT ont permis des augmentations significatives de la survie de rongeurs porteurs de gliomes. De très bons résultats ont notamment été obtenus lorsqu'ils sont associés à des drogues de chimiothérapie. La MRT va être testée sur des chiens porteurs de tumeur cérébrale spontanée à court terme. L'aboutissement de la technique SSRT et ses résultats ont permis la préparation d'un essai clinique de phase I/II à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble/France). Un logiciel de traitement de planning est en développement par notre équipe et par la société DOSIsoft. Il intégrera les caractéristiques propres au synchrotron et aux conditions d'irradiation définies pour les essais cliniques qui

se dérouleront à l'ESRF. Des recherches sont menées pour améliorer la distribution de drogues ou d'éléments lourds dans la tumeur [15] avec notamment le développement de la CED. Il en résulterait une augmentation de la quantité d'éléments lourds qui permettrait d'accroître l'efficacité de la SSRT et des minifaisceaux. L'ensemble des travaux utilisant l'axe radio-chimiothérapie ont contribué au développement de méthodes thérapeutiques en neuro-oncologie. Le développement de sources compactes générant un faisceau ayant de nombreuses caractéristiques communes avec celui des synchrotrons actuels est actuellement en plein essor. Ces sources seraient utilisables dans des structures de soins et rendent réaliste l'application clinique future de ces techniques d'irradiation si son efficacité thérapeutique est démontrée en clinique.

Conflit d'intérêt

Pas de conflit d'intérêt pour cet article.

Références

- [1] Applications of synchrotron X-rays to radiotherapy. Blattmann H, Gebbers JO, Brauer-Krisch E, Bravin A, Le Duc G, Burkard W, et al., editors. 4th Workshop on Medical Applications of Synchrotron Radiation (Mars 2004). 2004.
- [2] Yamamoto T, Nakai K, Matsumura A. Boron neutron capture therapy for glioblastoma. *Cancer Letters* 2008;262:143–52.
- [3] Zeman W, Curtis HJ, Baker CP. Histopathologic effect of high-energy-particle microbeams on the visual cortex of the mouse brain. *Radiat Res* 1961;15:496–514.
- [4] Laissue JA, Geiser G, Spanne PO, Dilmanian FA, Gebbers JO, Geiser M, et al. Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays. *Int J Cancer* 1998;78:654–60.
- [5] Serduc R, Brauer-Krisch E, Bouchet A, Renaud L, Brochard T, Bravin A, et al. First trial of spatial and temporal fractionations of the delivered dose using synchrotron microbeam radiation therapy. *J Synchrotron Radiat* 2009;16:587–90.
- [6] Regnard P, Le Duc G, Brauer-Krisch E, Tropres I, Siegbahn EA, Kusak A, et al. Irradiation of intracerebral 9L gliosarcoma by a single array of microplanar x-ray beams from a synchrotron: balance between curing and sparing. *Phys Med Biol* 2008;53:861–78.
- [7] Renier M, Brochard T, Nemoz C, Requardt H, Brauer E, Esteve F, et al. The radiotherapy clinical trials projects at the ESRF: technical aspects. *Eur J Radiol* 2008;68:S147–50.
- [8] Norman A, Iwamoto KS, Cochran ST. Iodinated contrast agents for brain-tumor localization and radiation-dose enhancement. *Invest Radiol* 1991;26:S120–1.
- [9] Rose JH, Norman A, Ingram M, Aoki C, Solberg T, Mesa A. First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45:1127–32.
- [10] Adam JF, Biston MC, Joubert A, Charvet AA, Le Bas JF, Esteve F, et al. Enhanced delivery of iodine for synchrotron stereotactic radiotherapy by means of intracarotid injection and bloodbrain barrier disruption: Quantitative iodine biodistribution studies and associated dosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61:1173–82.
- [11] Robar J, Riccio S, Martin M. Tumour dose enhancement using modified megavoltage photon beams and contrast media. *Med Phys* 2003;30:1952–3.
- [12] Rousseau J, Adam JF, Deman P, Wu TD, Guerquin-Kern JL, Gouget B, et al. Intracerebral delivery of 5-iodo-2'-deoxyuridine in combination with synchrotron stereotactic radiation for the therapy of the F98 glioma. *J Synchrotron Radiat* 2009;16:573–81.
- [13] Dilmanian FA, Zhong Z, Bacarian T, Benveniste H, Romanelli P, Wang RL, et al. Interlaced x-ray microplanar beams: a radiosurgery approach with clinical potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9709–14.
- [14] Boudou C, Tropres I, Rousseau J, Lamalle L, Adam JF, Esteve F, et al. Polymer gel dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy and iodine dose-enhancement measurements. *Phys Med Biol* 2007;52:4881–92.
- [15] Bidros DS, Vogelbaum MA. Novel drug delivery strategies in neuro-oncology. *Neurotherapeutics* 2009;6:539–46.

Monochromatic minibeam radiotherapy: theoretical and experimental dosimetry for preclinical treatment plans

This article has been downloaded from IOPscience. Please scroll down to see the full text article.

2011 Phys. Med. Biol. 56 4465

(<http://iopscience.iop.org/0031-9155/56/14/015>)

View [the table of contents for this issue](#), or go to the [journal homepage](#) for more

Download details:

IP Address: 160.103.2.224

The article was downloaded on 01/07/2011 at 08:29

Please note that [terms and conditions apply](#).

Monochromatic minibeam radiotherapy: theoretical and experimental dosimetry for preclinical treatment plans

P Deman^{1,2,3}, M Vautrin^{1,2,3,4}, V Stupar^{1,2}, E L Barbier^{1,2},
H Elleaume^{1,2,3,5}, F Esteve^{1,2,3,5} and J F Adam^{1,2,3,5,6}

¹INSERM, U836, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

²Université Joseph Fourier, Institut des neurosciences, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

³European Synchrotron Radiation Facility, BP 220, Grenoble Cedex 9, F-38043, France

⁴DOSIsoft, 45/47 avenue Carnot, Cachan, F-94230, France

⁵Grenoble University Hospital, BP 217, 38043 Grenoble Cedex, France

E-mail: adam@esrf.fr

Received 7 February 2011, in final form 17 May 2011

Published 30 June 2011

Online at stacks.iop.org/PMB/56/4465

Abstract

Monochromatic x-ray minibeam radiotherapy is a new radiosurgery approach based on arrays of submillimetric interlaced planar x-ray beams. The aim of this study was to characterize the dose distributions obtained with this new modality when being used for preclinical trials. Monte Carlo simulations were performed in water phantoms. Percentage depth–dose curves and dose profiles were computed for single incidences and interleaved incidences of 80 keV planar x-ray minibeam (0.6×5 mm) arrays. Peak to valley dose ratios were also computed at various depths for an increasing number of minibeam. 3D experimental polymer gel (nPAG) dosimetry measurements were performed using MRI devices designed for small animal imaging. These very high spatial resolution ($50 \mu\text{m}$) dose maps were compared to the simulations. Preclinical minibeam dose distributions were fully characterized. Experimental dosimetry correlated well with Monte Carlo calculations (Student *t*-tests: $p > 0.1$). F98 tumor-bearing rats were also irradiated with interleaved minibeam (80 keV, prescribed dose: 25 Gy). This associated preclinical trial serves as a proof of principle of the technique. The mean survival time of irradiated glioma-bearing rats increased significantly, when compared to the untreated animals (59.6 ± 2.8 days versus 28.25 ± 0.75 days, $p < 0.001$).

(Some figures in this article are in colour only in the electronic version)

⁶ Author to whom any correspondence should be addressed.

Introduction

The management of high-grade glioma remains mainly palliative despite the use of many combined strategies (surgery, chemotherapy and radiotherapy) (Wen and Kesari 2008). Stereotactic radiotherapy has been considered as an option to reach curative doses by many investigators (Clavier *et al* 2010, Nieder *et al* 2006). However, the success of this modality remains limited when compared to conventional radiotherapy due to the hypoxic and infiltrative patterns of the tumor (Clavier *et al* 2010). The dose that can be delivered in each fraction without adverse effects is also a crucial issue. For example, deleterious effects have been reported for more than 35% of the patients in a hypofractionated stereotactic radiotherapy clinical trial (Shepherd *et al* 1997). In order to raise the dose per fraction without adverse effects, one should lower the dose delivered to the surrounding healthy tissues (Kim *et al* 2008). A better local control can be expected if the planning target volume (PTV) dose conformation is improved while the doses to the organs at risk are significantly reduced. This would also open the door to optimized re-irradiation protocols on tumor recurrences.

Several radiation therapy protocols have been developed in the past 15 years in synchrotron radiation medical programs (Suortti and Thomlinson 2003). The main objective is to improve the dose distribution in the radiotherapy treatment of primary brain tumors and overcome the dose limitation per fraction. Contrast-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy (SSRT) is a first option, which is currently being transferred to clinical trials (Edouard *et al* 2010, Prezado *et al* 2009a). The aim is to significantly increase x-rays absorption in the target only. This can be achieved by incorporating a high-Z element in the tumor in the form of iodinated contrast agents prior irradiating with medium energy monochromatic x-rays from a synchrotron source (Adam *et al* 2006). The main limitation of this technique is the amount of contrast agent that can be loaded in the tumor through the impaired blood brain barrier.

The other option is to use microplanar arrays of high flux x-ray beams. This technique called microbeam radiotherapy (MRT) aims at optimizing the dose–volume effect with micrometric spatial fractionation irradiation patterns. High single doses (>100 Gy) can be reached in the beam paths due to the increase of the healthy tissue dose tolerance as the beam size reaches submillimetric sizes (Laiusue *et al* 1998, Serduc *et al* 2010). However, many problems have to be solved before the technique can be transferred to clinical trials. The beam-shaping procedure is complex. A dedicated safety system should be developed due to the MRT high dose rates (>10 kGy s⁻¹). A dedicated treatment planning system should also be benchmarked to take the MRT specificities into account (Martinez-Rovira *et al* 2010). Finally, the physician should learn how to prescribe the dose in microplanar x-ray beams. Dilmanian *et al* (2006b) have recently proposed a new technique, named minibeam radiotherapy (MBT). This irradiation modality is also performed with arrays of submillimetric (~600 μm height) and quasi parallel x-ray beams in the energy range of 50–150 keV. The beams are collimated in their lateral dimension to match the target size. The beams are separated with submillimetric non-irradiated gaps (~600 μm). At least two incidences are interleaved, as shown in figure 1, to obtain a homogeneous dose distribution on the target. As in SSRT, the tumor could be loaded with heavy elements to increase ratio dose on the target/dose on the surrounding tissue. The sparing effect on the healthy tissue is reduced when compared to MRT but is still interesting when compared to larger plain field sizes (without spatial fractionation of the dose) (Dilmanian *et al* 2006a, 2006b). Monte Carlo theoretical dosimetry (Gokeri *et al* 2010) and experimental polymer gel dosimetry (Dilmanian *et al* 2008) have been studied for MBT in clinical trial conditions. These studies clearly show that MBT is a more realistic option for clinical trials than MRT.

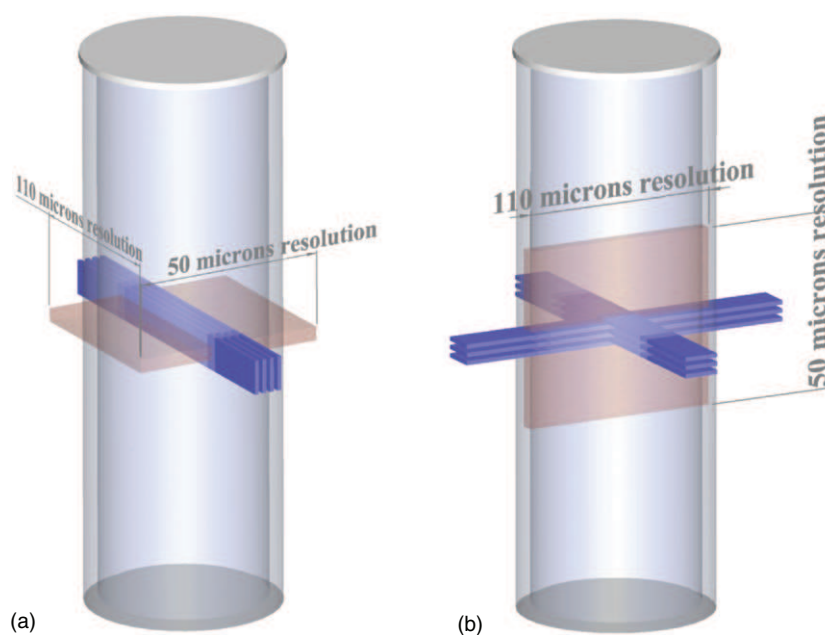


Figure 1. Irradiation geometries of polymer gels and associated MRI scanning protocol: (a) single-incidence irradiation (blue). The transverse relaxation time (T_2) map was acquired on a 2 mm thick slice (brown). The maximum resolution ($50\ \mu\text{m}$) was set perpendicularly to the beam width to study the percentage depth dose. (b) Two interleaved incidences' irradiation. The T_2 map was acquired in the interleaving area with a 2 mm thick slice. The maximum resolution ($50\ \mu\text{m}$) was set perpendicularly to the beam height to check the homogeneity of the dose deposition in the interleaved region.

However, extensive preclinical studies will be mandatory before MBT can be transferred to clinical trials. The aim of this paper was to study the theoretical and experimental dosimetry for monochromatic x-ray minibeam radiotherapy preclinical treatment plans. The main objective was to characterize the doses distributions with two complementary approaches: theoretical dosimetry with Monte Carlo simulations and high-resolution 3D experimental dosimetry measurements. F98 tumor-bearing rats were also irradiated with interleaved minibeam (prescribed dose: 25 Gy) as a proof of principle of the technique.

Material and methods

Polymer gel dosimetry

Normoxic polyacrylamide gelatine (nPAG) gels were used for high-resolution 3D experimental dosimetry measurements. The gels were prepared 24–48 h before irradiation according to the method described by Boudou *et al* (2007) using the following quantities.

- Acrylamide: 3%
- *N,N'*-Methylene-bis-acrylamide: 3%
- Porcine gelatin: 5%
- Tetrakis hydroxymethyl phosphonium chloride: $5\ \text{mmol l}^{-1}$.

The gels were poured in glass tubes (inner diameter: 2.6 cm, outer diameter: 2.8 cm, 8 cm high, plastic cap) in order to limit oxygen diffusion in the gels. The tubes were wrapped in aluminum foils to protect them from light.

The gels were irradiated with monochromatic x-ray minibeam (80 keV, 5 mm width and 620 μm height, 600 μm non-irradiated gaps between each minibeam) following two irradiation geometries foreseen to be used on rats (figure 1).

- (a) A single-incidence irradiation protocol (four minibeam) to obtain percentage depth-dose curves (PDDs), and lateral dose profiles to study the influence of penumbra regions (figure 1(a)).
- (b) To check the interlacing quality, two incidences of three minibeam were interleaved in the center of the tube to obtain a homogeneous dose distribution in a volume of $5 \times 5 \times 3.6 \text{ mm}^3$ (figure 1(b)).

In both protocols, 12 Gy were prescribed at 1 cm depth in the gels.

One of the ways to retrieve the dose from the gels is to measure the R2 (inverse of transverse relaxation rate (T_2)) with magnetic resonance imaging (MRI) devices. R2 is proportional to the dose (Baldock *et al* 2010). MRI was performed according to the MRI device availability: 15 and 50 days after irradiation for the two incidences and the single-incidence protocols, respectively. The imaging device was a 4.7 T MRI scanner (Bruker Biospec 47/40 USR AV III) equipped with 12 cm diameter actively shielded gradient systems (670 mT m^{-1} in 115 μs) (Preclinical MRI facility of Grenoble). MR probes consist in a volume coil for emission and reception. Multi-slice multi-echo (MSME) sequences were performed with the following parameters: 16 echo from 20 to 320 ms (one echo every 20 ms); repetition time $\text{TR} = 3100 \text{ ms}$; 64 accumulations.

One 2 mm thick T_2 map was acquired for each tube (see figure 1) in order to retrieve experimental percentage depth dose curves (PDDs) as well as dose profiles. The T_2 map resolution was $0.11 \times 0.05 \times 2 \text{ mm}^3$ ($256 \times 512 \times 1$ matrix size). The highest resolution (50 μm) was set in the direction perpendicular to the beam axis (figure 1). For unidirectional irradiations, the doses were normalized with the average dose obtained on a 3×3 pixels region of interest (ROI) positioned at 1 cm depth on the axis of the second minibeam from the left. For crossfired irradiations, the doses were normalized with the average dose obtained on a 3×3 pixels ROI positioned at the center of the interleaving region. All PDDs are in fact '7 pixels' thick PDDs obtained by averaging the dose values in the Y direction (the one with the highest spatial resolution). Thus, each point in the PDDs corresponds to a measurement obtained in a $0.11 \times 0.35 \times 2 \text{ mm}^3$ ROI.

All profiles presented in this study are '10 pixels thick' profiles, obtained by averaging the dose values in the X direction (the one with the lowest spatial resolution). Thus, each point in the profiles corresponds to a measurement obtained in a $1.1 \times 0.05 \times 2 \text{ mm}^3$ ROI.

The uncertainties are determined as one standard deviation on the ROI values.

Monte Carlo studies

All dose computations were performed with Monte Carlo simulations using the PENELOPE 2006 code system (Salvat *et al* 2006). Absorption energies were 1 keV for photons and electrons. The following materials were used: air, water, plate glass as already pre-defined in the Penelope code. For each material the values of the tracking parameters were the following: $C1 = C2 = 0.1$ and $W_{cc} = W_{cr} = 1 \text{ keV}$. Unless specified, simulations were performed until achieving a statistical uncertainty (3σ) of about 2% in the high dose bins.

Comparison with experimental gel dosimetry. The first irradiation geometry is depicted in figure 1(a) as described previously in the experimental dosimetry section. A simulation with 80 keV photons in four ideal non-divergent minibeam (each $0.6 \times 5 \text{ mm}^2$, separated by 0.6 mm) was performed through a geometry modeling the tube (glass wall and water) surrounded by air. The dose was recorded in a grid of $99 \times 99 \times 99$ bins in a $6 \times 6 \times 50 \text{ mm}^3$ total volume, which corresponds to a $60.6 \times 60.6 \times 505 \text{ }\mu\text{m}^3$ bin size. The voxel size is roughly eight times larger in the Z direction to faster reduce the simulation statistical uncertainties. It is however small enough so that the beam attenuation ($<0.1\%$) could be considered negligible in the voxel itself. To study preclinical irradiation protocols, PDDs were calculated on the axis of the second minibeam from the left. Dose profiles were calculated at 1 cm depth (the approximate position of the isocenter when treating rodent glioma models). Doses were normalized to the 1 cm depth dose on the axis of the second minibeam from the left ($3 \times 3 \times 3$ pixels ROI).

The second irradiation geometry is depicted in figure 1(b) and described previously in the experimental dosimetry section. A simulation with 80 keV photons in six interleaved minibeam (each $0.6 \times 5 \text{ mm}^2$, separated by 0.6 mm) was performed through a geometry modeling the tube (glass wall and water) surrounded by air. The dose was recorded in a grid of $100 \times 100 \times 100$ bins in a $6 \times 6 \times 6 \text{ mm}^3$ total volume at the tube center, which corresponds to a $60 \times 60 \times 60 \text{ }\mu\text{m}^3$ bin size. To study the interleaving quality for the irradiation of the two incidences, dose profiles were drawn perpendicular to the beam axis. Dose profiles (through the isocenter) were extracted from the simulations and compared to polymer gel dosimetry. In order to improve the accuracy and to retrieve the MRI voxel sizes, the data were averaged in the perpendicular directions, over 33×18 pixels. So each voxel on the profile corresponds to a $60 \times 1980 \times 1080 \text{ }\mu\text{m}^3$ bin size. The doses on the profiles were normalized to the dose averaged on 3 pixels: the isocenter and its neighbors.

Peak to valley dose ratio studies. The peak to valley dose ratio (PVDR) is a key value, commonly used to characterize spatially fractionated irradiation patterns (Siegbahn *et al* 2006). The following geometry was modeled: 1 mm glass slab followed by a 30 cm water slab, surrounded with air. This geometry was used to study the PVDR as a function of depth for an increasing number of minibeam (single incidence: 2, 4, 8, 16 and 32 minibeam) at higher depth than with the tube geometry. For these simulations, the dose was also recorded in a grid of $99 \times 99 \times 99$ bins in a volume of $6 \times 6 \times 50 \text{ mm}^3$ (bin size: $60.6 \times 60.6 \times 505 \text{ }\mu\text{m}^3$). Doses were normalized to the average dose at 1 cm depth, on the axis of the closest minibeam located on the left side from the geometry center ($3 \times 3 \times 3$ pixels ROI). At a given depth, the PVDR was calculated on dose profiles as the ratio between the average normalized dose on one of the central peaks ($3 \times 3 \times 3$ pixels ROI) and the average dose obtained in the valley between the two central peaks ($3 \times 3 \times 3$ pixels ROI), at the same depth. The simulation with four minibeam was performed separately at higher resolution (no ROI averaging) and at higher statistics in order to retrieve the PVDR profiles at various depths with an improved spatial resolution and with reduced uncertainties. For this simulation, the doses were normalized with the average dose at 1 cm depth, on the dose on the axis of the second minibeam from the left (ROI: 3 pixels in the Y direction, no averaging in the X and Z directions).

Absolute dosimetry for in vivo experiments.

Absolute dose measurements in air were performed with an ionization chamber calibrated in dose to water (PTW 23331, 1 cm^3 , PTW, Freiburg, Germany; $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$ field) at the

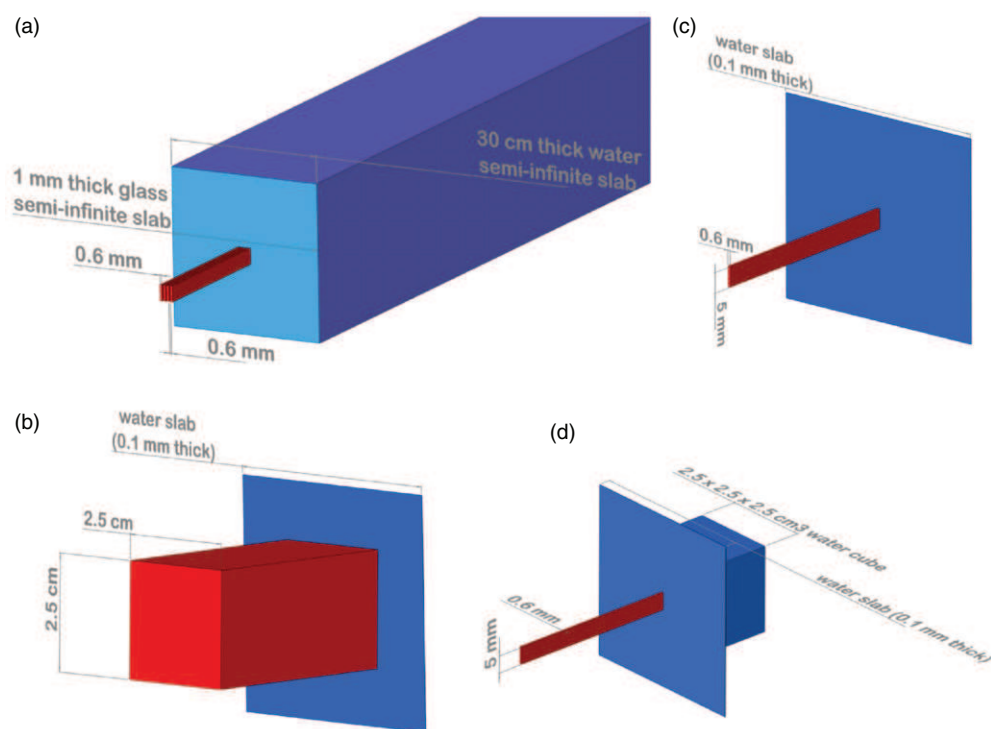


Figure 2. (a) Monte Carlo simulation geometry used for the simulation of peak to valley dose ratios. (b)–(d) Monte Carlo simulation geometries used for absolute dose retrieval in preclinical dosimetry. A broad beam on a water slab (b), a minibeam on a water slab (c) and a minibeam on a water slab followed by a water cube (d) were simulated.

position where the stereotactic frame is centered when irradiating the glioma-bearing rats. Three Monte Carlo simulations were performed in a semi-infinite 0.1 mm thick water slab to retrieve the prescribed dose from this measurement (figure 2). The first simulation (figure 2(b)) was modeling an ideal non-divergent broad beam ($2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$). The second (figure 2(c)) and third (figure 2(d)) simulations were modeling an ideal non-divergent minibeam ($0.6 \times 5 \text{ mm}^2$). For the first two simulations the water slab was placed in air to retrieve the dose in water measured in air at the electronic equilibrium. In the last simulation the slab was placed in front and adjacent to a $2.5 \times 2.5 \times 2.5 \text{ cm}^3$ water volume (modeling the rat head) in order to take into account the backscattering. The simulation time is maintained constant at $4.5 \times 10^4 \text{ s}$. The number of initial photons was 2.4×10^{10} , 2.45×10^{10} and 1.9×10^9 primary showers for the broad beam, the minibeam in air and the minibeam in front of the water volume, respectively, and the dose deposited on the beam axis was recorded in the water slab (in a $0.05 \times 0.05 \times 0.1 \text{ mm}^3$ voxel), as well as the PDD curve in the water volume for the last simulation. The doses are normalized with the entrance fluence and are thus expressed in $(\text{eV cm}^2)/(\text{g primary})$.

1924 ± 525 , 1925 ± 39 and 1929 ± 141 $(\text{eV cm}^2)/(\text{g primary})$ were recorded in the water slab, respectively, for the broad beam, the minibeam in air and the minibeam in front of the water volume. There is no difference in the dose to water measured in air in the broad beam and in the minibeam as the collimating devices are located 5 m from the sample; the

collimator scatter factor is negligible, as well as the backscattering effect. This is mainly due to the fact that when decreasing the field size to this extent (field sizes $< 1 \text{ mm}^2$), almost all the dose is due to primary photon interactions and is independent from any scatter effect.

The prescribed dose (at 1 cm depth in the rat) is obtained by multiplying the entrance dose in the rat head (which is obtained from the dose in water measured in air with the ion chamber) by the PDD at 1 cm (0.835) and by the heterogeneity correction factor to take into account the presence of 1 mm of skull bone before the prescription point (0.99).

In vivo experiments.

All *in vivo* experiments were conducted on male Fischer 344 rats 7/8 weeks old. The guidelines of the French government (decree 87-848, 1987, license 380534, A3851610008 and B3818510002) were respected for all procedures and animal care.

Tumor implantations. F98 glioma cells were implanted in 23 Fischer rats as described by Rousseau *et al* (2009). Briefly, 10^3 F98 cells in a $4 \mu\text{L}$ agarose suspension were injected ($20 \mu\text{L min}^{-1}$) into the right *striatum* according to the following stereotactic coordinates: 3.5 mm right from the bregma and 6 mm depth from the skull surface. After injection, the needle was withdrawn quickly to avoid the agarose drop to stick on the needle.

Irradiation and follow-up protocols. The irradiation was performed 14 days after tumor implantation and was similar to the one described in figure 1 with two incidences, except that the irradiated target corresponds to a $7 \times 7 \times 7.8 \text{ mm}^3$ parallelepiped (13 interlaced minibeam). The incidences were interleaved in the center of the right striatum to deliver a homogeneous dose in the tumor injection site. The prescribed dose was 24 Gy at 1 cm depth. After irradiation, rats were examined and weighted regularly until the endpoint.

Results

The PDDs of one minibeam incidence in a tube filled with water are shown in figure 3. It is normalized at 1 cm depth and includes the glass wall of the tube. There is no significant difference between the Monte Carlo simulation and the experimental dosimetry (unpaired bidirectional Student's *t*-test, independent series: $t = 0.164$ and $p = 0.87$). This result validates the use of nPAG gels for experimental dosimetry in minibeam irradiation, provided that enough data points are recorded for the *t*-test reliability. Indeed, the uncertainties on the measurements remain too high to perform a χ^2 test, when using the high-resolution MRI reading method. The simulated PDD was fitted by an exponential law (from the first point after the glass to the last point before the glass). The result was $\text{PDD}(z) = A \exp(-B^*z)$; with $A = 1.199 \pm 0.006$ and $B = 0.183 \text{ cm}^{-1} \pm 0.003 \text{ cm}^{-1}$; normalized chi square/degrees of freedom = $\chi^2/\text{ndf} = 10.4/46$.

We can retrieve the Beer-Lambert x-ray attenuation law with a linear attenuation coefficient of 0.183 cm^{-1} similar to the theoretical water linear attenuation coefficient μ at 80 keV: 0.1837 cm^{-1} .

Figure 4 shows simulated and experimental dose profiles at 1 cm depth for the irradiation protocol of the four minibeam. The simulated and experimental dose profiles show a good correlation (unpaired bidirectional Student's *t*-test, independent series: $t = 0.927$ and $p = 0.36$). This result validates the use of nPAG gels for dose profile measurements in minibeam irradiation. Here again, enough data points are recorded for the *t*-test reliability. The *t*-test

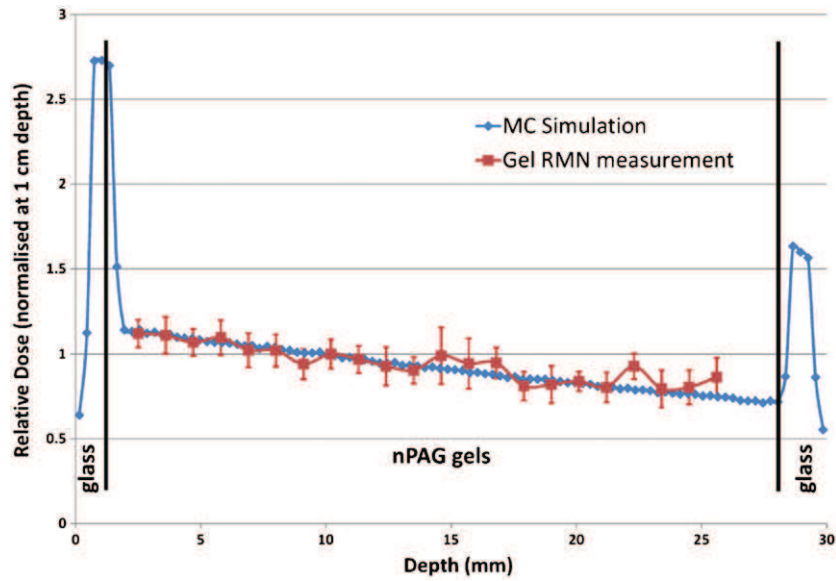


Figure 3. Comparison of simulated (Monte Carlo, in blue) and experimental (nPAG gels, in red, with error bars, uncertainties are equal to 1σ) depth-dose curves for minibeam irradiations in a glass tube. The two curves are normalized at 1 cm depth.

is lower than that for the PDDs as the experimental minibeam are $20\ \mu\text{m}$ larger than the simulated ones due to the small beam divergence which has not been taken into account in the Monte Carlo simulations. We retrieve a small scaling factor between the experimental and simulated profiles, leading to a small shift between experiment and simulation in the extreme peaks in figure 4.

Figure 5 shows dose profiles at various depths in water (Monte Carlo simulations). The peak dose versus depth curve follows a mono-exponential law ($\text{peak_dose} = 1.2 e^{-0.183z}$, $R^2 = 0.9985$, $A \exp(-B \cdot z)$, with $A = 1.199 \pm 0.007$ and $B = 0.183\ \text{cm}^{-1} \pm 0.001\ \text{cm}^{-1}$; normalized chi-square/degrees of freedom = $\chi^2/\text{ndf} = 0.4491/4$). The dose in the valleys decreases also with the depth and remains below 5% of the peak dose. Indeed, the valley dose is due to Compton scatter which is roughly proportional to the primary dose from which it originates. In figure 5, we can also see that the full width at half maximum of the dose profiles for each minibeam does not change with depth (within the $60\ \mu\text{m}$ pixel size). Thus, the sparing effect due to spatial fractionation will remain the same whatever the depth is.

The PVDR simulated with four minibeam decreases as a power law with the depth (figure 6): $\text{PVDR} = A \text{depth}^{-B}$, with the depth in mm, with $A = 33.81 \pm 0.76\ \text{mm}^B$ and $B = 0.108 \pm 0.007$; normalized chi-square/degrees of freedom = $\chi^2/\text{ndf} = 7.266/90$. This decrease should be lower than one unit per 3 cm of tissue after 50 mm, as extrapolated from the power law described above. This is encouraging, as the PVDR should remain high enough in the human brain, whatever the beam path would be. The minibeam sparing effect should thus be kept in clinical irradiation conditions. Figure 7 shows the decrease of PVDR (at 1 and 5 cm depth in water) as the number of minibeam increases from 2 to 32. The decrease follows a power law, which depends on the depth considered.

At 1 cm depth: $\text{PVDR} = A \times \text{nb_minibeam}^{-B}$, $A = 43.99 \pm 8.99$ and $B = 0.34 \pm 0.1$; normalized chi-square/degrees of freedom = $\chi^2/\text{ndf} = 0.6721/3$.

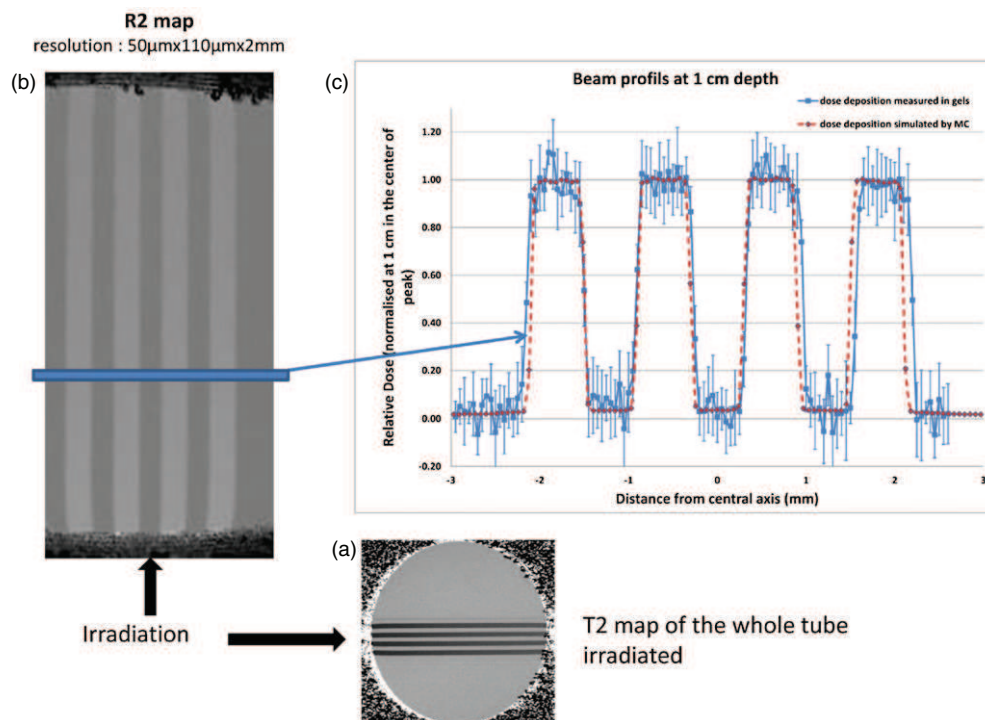


Figure 4. (a) T2 map of the whole tube. A line is drawn where the dose profiles were acquired. (b) R2 map focused on the four minibeam. (c) Comparison of simulated (dashed red) and nPAG gel experimental (solid blue curve with error bars, uncertainties are equal to 1σ) dose profiles at 1 cm depth in the tube. The doses were normalized with the dose recorded in the center of the peaks at 1 cm depth. All profiles presented in this study are '10 pixels thick' profiles, obtained by averaging the dose values in the X direction (the one with the lowest spatial resolution). Thus, each point in the profiles corresponds to a measurement obtained in a $1.1 \times 0.05 \times 2 \text{ mm}^3$ region of interest (ROI).

At 5 cm depth: $\text{PVDR} = A \times \text{nb_minibeam}^{-B}$, $A = 46.78 \pm 11.18$ and $B = 0.47 \pm 0.12$; normalized chi-square/degrees of freedom = $\chi^2/\text{ndf} = 0.5097/3$.

This is encouraging, as the PVDR would remain higher than 7 in the human brain, if irradiating a 3 cm diameter tumor with 32 minibeam. Figure 8 represents the interleaving area. In interleaved irradiations there is a small overlap at the beam junction ($<50 \mu\text{m}$) due to the beam divergence. Indeed, the sample movement between two adjacent beams is $600 \mu\text{m}$, leading to a theoretical $10 \mu\text{m}$ overlapping at the beam junctions. Unfortunately, the MRI resolution is $50 \mu\text{m}$ and cannot resolve the overlapping area better than with one single $50 \mu\text{m}$ pixel. This small margin (micrometric) avoids low dose regions at the beam junctions (or even worse, unirradiated areas), which could lead to tumor regrowth. In figure 7, the profiles are plotted from the same starting point on the left, so that the left penumbra can be compared. The shape of the penumbra appears to be the same. The difference that is seen on the right is due to the small overlapping of the minibeam for the experimental dosimetry, whereas the simulation was performed with non-divergent beams. With six minibeam, the difference between the simulated and experimental target width is about $200 \mu\text{m}$ (as measured with $50 \mu\text{m}$ pixels). Then, each overlapping area as derived from experimental gel dosimetry is at maximum $50 \mu\text{m}$.

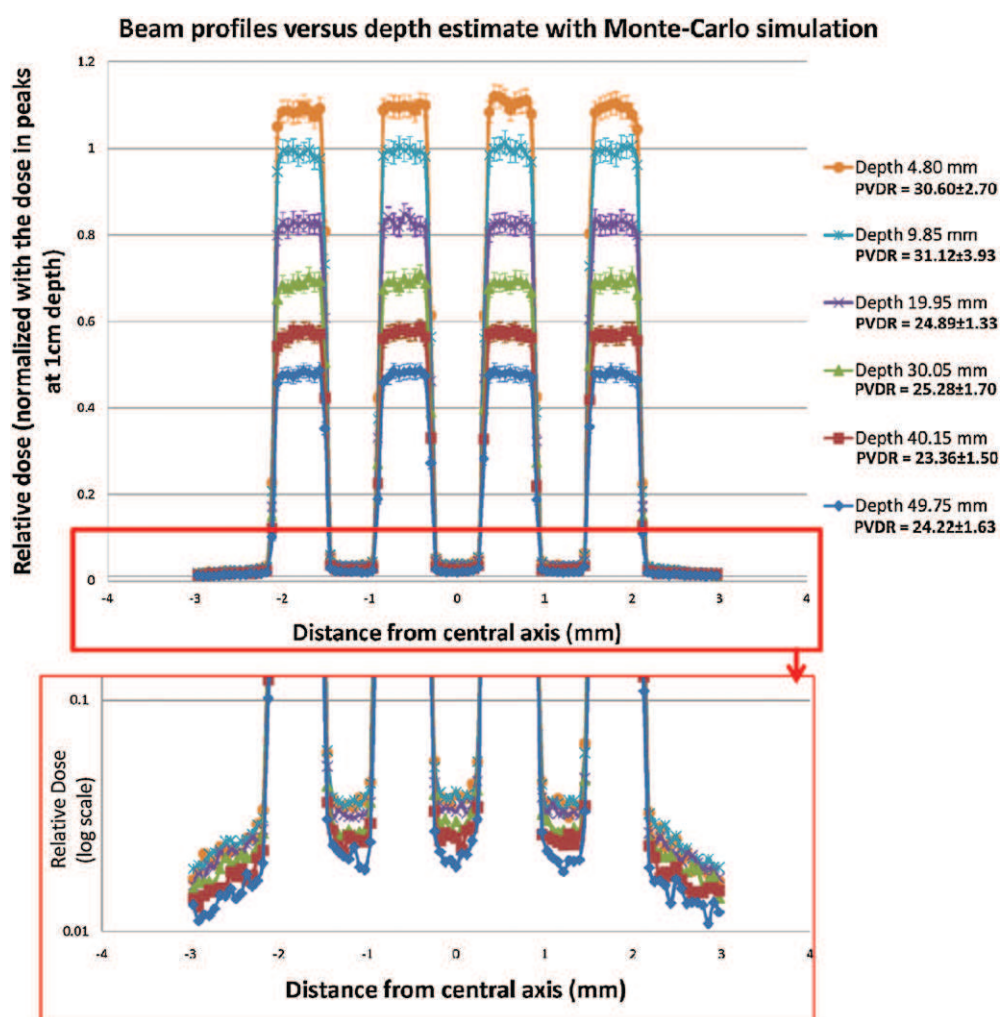


Figure 5. Beam profiles versus depth estimated with Monte Carlo simulation. The peak dose decreases with depth following a mono-exponential law (peak dose = $1.20 e^{-0.0183z}$, $R^2 = 0.9985$). Uncertainties are defined equal to 3σ .

The group of rats treated by minibeam patterns had a significant increased lifespan with a mean survival of 59.6 ± 2.8 days in comparison with 28.25 ± 0.75 days for the untreated group (111% increased life span; $p < 0.001$, logrank Mantel–Cox test on the survival curves is represented in figure 9). The median survival times were 57 and 29 days for the treated and untreated group, respectively.

Discussion

This study shows the feasibility of producing monochromatic minibeam patterns for radiation therapy purposes, with high accuracy and precision. This work is the validation of the dose distribution by Monte Carlo simulations and 3D experimental polymer gel dosimetry

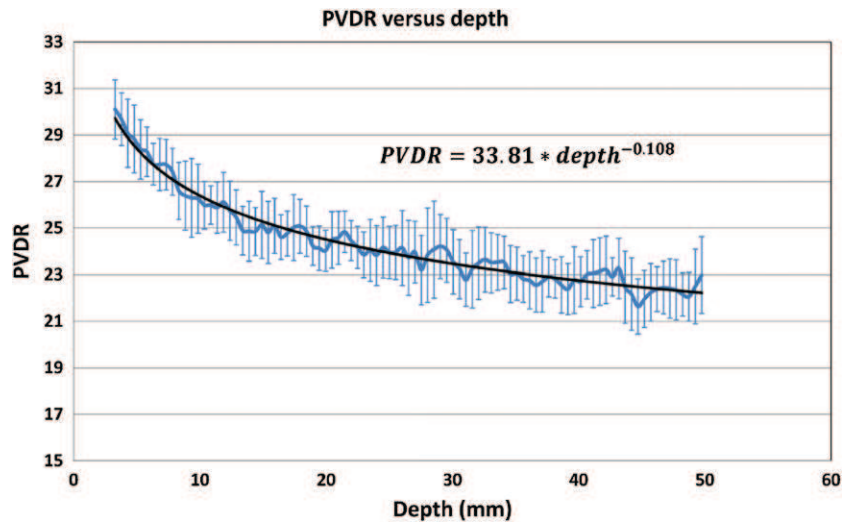


Figure 6. Peak to valley dose ratio versus depth curve for four minibeam (Monte Carlo simulations). The peak to valley dose ratio (PVDR) decreases as a power law with the depth ($PVDR = 33.75 \text{ depth}^{-0.107}$, $R^2 = 0.965$). Uncertainties are defined equal to 1σ .

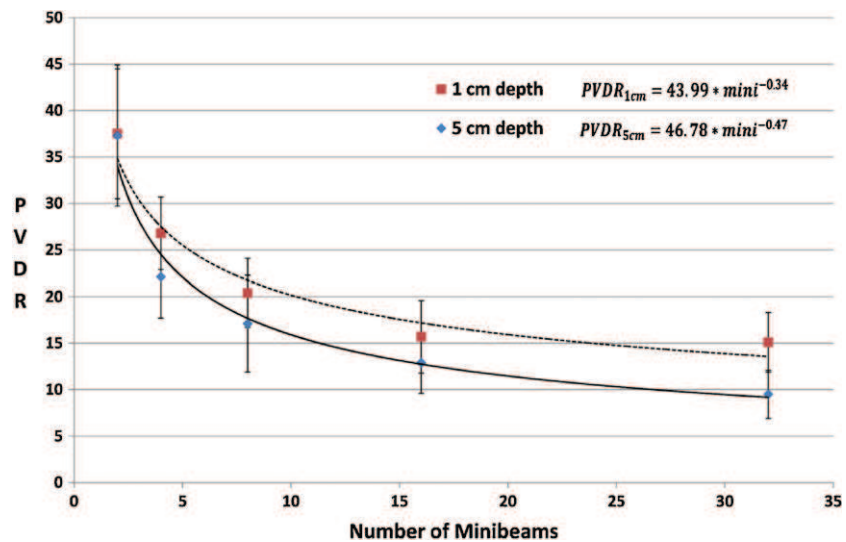


Figure 7. PVDR versus the number of minibeam (Monte Carlo simulations). The PVDR decreases as the number of minibeam increases according to a power law, which depends on the depth considered. Uncertainties are defined equal to 1σ .

of preclinical minibeam irradiation protocols. A preclinical trial has also been performed on glioma-bearing rats as a proof of principle of the technique.

Various techniques aim at the improvement of dose distributions as described by Baumert *et al* (2004) and Khuntia *et al* (2009). Minibeam radiotherapy proposes high spatial dose fractionation with sub-millimetric beams in comparison with the millimetric beams used in

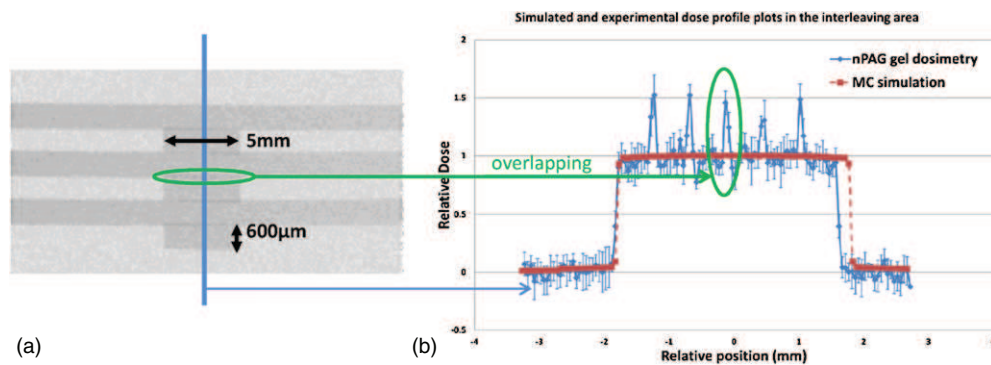


Figure 8. (a) $R2 = 1/T2$ map of an nPAG gel irradiated with two interleaved incidences (15 Gy entrance dose for each incidence). T2 acquisitions were obtained on a 4.7 T small animal MRI device with a resolution of $0.05 \times 0.11 \times 2.0 \text{ mm}^3$. (b) Dose profiles normalized by the dose at the isocenter (as measured on a 10×10 pixels ROI). The profiles are drawn according to the line in figure 7(a), from top to bottom. The dashed profile is obtained from a Monte Carlo simulation and serves as a reference. The solid curve with error bars (1σ) is the experimental profile obtained from the $R2$ measurements. The profiles are plotted from the same starting point on the left, so that the left penumbra can be compared. One can see on this profile a small overlapping ($<50 \mu\text{m}$) of the minibeam when the interleaving is realized. This overlapping explains the difference that is seen on the right penumbra region ($200 \mu\text{m}$, with 6 minibeam, as measured with $50 \mu\text{m}$ pixels).

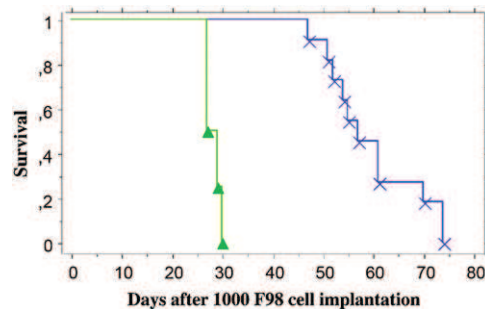


Figure 9. Kaplan–Meier survival plots for F98 glioma-bearing rats after minibeam irradiation. (\blacktriangle) 4 untreated animals, (\times) 11 irradiated animals (24 Gy, one fraction, interleaved minibeam, 14 days after tumor implantation). The two survival curves are significantly different (Mantel–Cox logrank test: $p < 0.001$).

conventional photon radiosurgery (Kondziolka *et al* 1992a, 1992b, Flickinger *et al* 1992b, 1992a) and with the micrometric beams of MRT (Dilmanian *et al* 2006a, 2006b, Serduc *et al* 2009, 2010, Brauer-Krisch *et al* 2010b). The idea is to reach a higher tissue tolerance when compared to conventional radiosurgery, with reduced technical and dosimetric difficulties inherent to MRT, when clinical trials is the goal to be reached.

There are two major dosimetric advantages in using minibeam in radiotherapy: the higher tissue tolerance of healthy tissues regarding submillimetric spatially fractionated beams (Dilmanian *et al* 2006a, 2006b) and simplification in dose calculation (absence of scatter contribution in the beams). The study of peak to valley dose is a good indicator of the treatment quality.

The dosimetry of the technique has been fully characterized and a good correlation has been found between the Monte Carlo and 3D experimental dosimetries (unpaired Student's *t*-tests: $p = 0.87$ and $p = 0.36$ for the PDDs and the profiles, respectively). The large experimental uncertainties are inherent to the reading method of the gels with MRI at high resolution and cannot be easily reduced as the acquisition times are already longer than 10 h. This is the reason why a chi-2 test would be inappropriate. A *t*-test does not consider the uncertainties, but does a comparison of the average values. However, we have numerous experimental data points (>20), which is a prerequisite for the *t*-test reliability and appropriateness. This result validates the use of nPAG gels for dose profile measurements in minibeam irradiation, provided that enough data points are recorded. The precision in evaluating the dose distribution is a crucial point in this technique to plan the sparing effect of the fractionated pattern in the healthy tissue. In minibeam radiotherapy, one can use Monte Carlo simulations to study accurately the fine dose distributions, whereas polymer gel dosimetry can be used to carefully check the irradiation geometry as well as having an estimation of the dose distributions.

In interleaved irradiations there is a small overlap at the beam junction ($<50 \mu\text{m}$) as the minibeam divergence enlarges the irradiated zone to $620 \mu\text{m}$ instead of $600 \mu\text{m}$. However, this small overlap is only located in the target and resembles microbeam irradiation geometries (Serduc *et al* 2009). This small overlap prevents low dose regions which could appear at the beam junctions due to motor movements' uncertainties and lead to tumor recurrences. Previous studies on microbeam irradiations have shown that the doses reached in the overlapping parts (some tens of microns) should have no damageable effects (Serduc *et al* 2008, 2010).

Previous dosimetric studies are reported in the literature for minibeam radiotherapy. But all of these studies refer to clinical dosimetry. Dilmanian *et al* have performed BANG[®] gel dosimetry on a human head phantom with a coarser spatial resolution of 0.44 mm (Dilmanian *et al* 2006b) or 0.59 mm (Dilmanian *et al* 2008). The spatial resolution is too low to be used to carefully study minibeam dose distributions. Gokeri *et al* (2010) have studied theoretically the PVDR variation with depth and number of minibeam using Monte Carlo simulations but in a human phantom and with $680 \mu\text{m}$ width beams.

To be accurate in preclinical trial dosimetry, one should use appropriate simulation parameters in the Monte Carlo studies, which has been performed by decreasing the absorption energies to 1 keV and by using the PENELOPE code which is known for its accurate electron (and photon) transport formalism (Salvat and Fernandez-Varea 2009). In order to validate the simulations, an appropriate experimental dosimetry technique should be used. Radiochromic films would be appropriate (Brauer-Krisch *et al* 2010a) but offer only a 2D view of the problem (Lee *et al* 2006). Polymer gel dosimetry is a real 3D tissue-equivalent dosimetry solution (Baldock *et al* 2010), but the spatial resolution problem is transposed to the reading device. Wong *et al* (2007) have reported high-resolution MRI reading procedures for IMRT dosimetry. In this study, we have proposed a high-resolution MRI polymer gel reading methodology for minibeam radiotherapy preclinical trials.

Depth-dose curves, beam profiles and interleaving quality were thus evaluated with Monte Carlo dosimetry and associated polymer gel dosimetry. Gels were read by MRI at high resolution ($50 \times 110 \mu\text{m}^2$ in plane). The evolution of the profiles versus depth was also studied by Monte Carlo as well as the PVDR versus depth and versus the number of minibeam by incidence. This parameter is essential for the sparing effect. We have shown in this study that in minibeam therapy, the dose along the beam axis can be computed by taking into account

only the primary dose. This is due to the small field sizes. Indeed, the primary dose is defined as follows:

$$D_{\text{prim}}(z) = \varnothing(z) E \left(\frac{\mu_{\text{en}}}{\rho} \right) = \varnothing_0 e^{-\mu * z} E \left(\frac{\mu_{\text{en}}}{\rho} \right), \quad (1)$$

with z the depth in cm, $\varnothing(z)$ and \varnothing_0 the photon fluence at depth z and at the entrance, respectively, and μ the water linear attenuation coefficient at 80 keV. $\left(\frac{\mu_{\text{en}}}{\rho} \right)$ is the mass energy absorption coefficient of water at 80 keV. The theoretical primary PDD normalized at 1 cm depth is then

$$\text{PDD}_{\text{prim}}(z) = \frac{e^{-\mu * z}}{e^{-\mu * 1}} = 1.2 * e^{-\mu * z}. \quad (2)$$

The simulated PDDs found in this study are $\text{PDD}(z) = A \exp(-B * z)$; with $A = 1.199 \pm 0.006$ and $B = 0.183 \text{ cm}^{-1} \pm 0.003 \text{ cm}^{-1}$. We retrieve the values of the theoretical primary PDD within the uncertainties.

The dose in the valleys is due to in beam-scattered photons which are roughly proportional to the number of primary interactions from which they originate. The valley dose should thus be nearly proportional to the primary dose. The PVDR should therefore remain constant over depth. We have shown in this paper that the PVDR decreases as a power law of the depth in tissue. However, after 3 cm of tissue, the PVDR remains almost constant within the error bars (figure 5). Siegbahn *et al* (2006) have already shown this fact after 1 cm of tissue, with polychromatic x-rays for MRT and explained the higher PVDR before 1 cm by a larger build-up effect in the scatter area. The PVDR decreases as the number of minibeam increases. This has already been shown by Gokeri *et al* (2010) with larger minibeam (20 × 0.680 mm²). In their study the PVDR were found slightly smaller. This might be due to the size and geometries they used. This is coherent with the lower PVDR found in the studies by Prezado *et al* in 2009 in a human phantom with larger minibeam sizes and number and at higher monochromatic energies, or using the ESRF medical beamline white beam spectrum (Prezado *et al* 2009b). With an extrapolation of the PVDR versus depth and PVDR versus number of minibeam curves, we can hypothesize that at 8 cm (center of a human head), the PVDR would be higher than 7. We can thus assume that if 20 Gy are delivered in one fraction at 8 cm depth, the dose between two minibeam will remain below 3 Gy, which is lower than the healthy tissue tolerance (Emami *et al* 1991, Flickinger *et al* 1992a, Niranjana and Flickinger 2008).

MBT treatment was applied to F98 glioma-bearing rats (24 Gy prescribed dose). Two minibeam arrays were interleaved in the target volume. The mean survival time of irradiated glioma-bearing rats increased significantly, when compared to untreated animals (59.6 ± 2.8 days versus 28.25 ± 0.75 days, $p < 0.001$). These preclinical results are only preliminary results and warrant further investigations to demonstrate the potential of the technique in dose escalation protocols for the management of primary brain tumors. Similar survival enhancements were obtained on the F98 glioma at equivalent doses in iodine-enhanced SSRT (Adam *et al* 2006) and in boron neutron capture therapy (Barth *et al* 2000); whereas the highest survival time at 25 Gy single fractions was obtained by Adam *et al* in 2006 with a dynamic synchrotron artherapy technique (181.0 ± 130.0 days versus 25.6 ± 2.4 days for the untreated, $p < 0.001$). The results obtained in the current study have to be considered only as a proof of principle of the minibeam irradiation technique on primary brain tumor models in rodent, with high accuracy on the associated dosimetry. A dedicated morphological and functional MRI follow-up, dedicated histological studies are mandatory to further evaluate if curative doses can be reached with such irradiation protocols. Thus, the tissue sparing effect and accurate imaging follow-up coupled with histological studies should be the aim of forthcoming extensive MBT preclinical studies on healthy and glioma-bearing rats.

Conclusion

The theoretical and experimental dosimetry for 80 keV monochromatic minibeam radiotherapy preclinical trials has been carefully studied. Monte Carlo simulation results were correlated to polymer gel dosimetry at high resolution even if the uncertainties remained important. Moreover, the associated preclinical study shows that the technique can realistically be applied to glioma-bearing rats in preclinical trials.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dominique Dallery and the technicians in the Grenoble Neuroscience Institute animal facility for help with animal care; Thierry Brochard and Christian Nemoz for the technical support. The authors would also like to acknowledge the MRI facility of Grenoble for its technical support.

References

- Adam J F, Joubert A, Biston M C, Charvet A M, Peoc'h M, Le Bas J F, Balosso J, Esteve F and Elleaume H 2006 Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **64** 603–11
- Baldock C, De Deene Y, Doran S, Ibbott G, Jirasek A, Lepage M, McAuley K B, Oldham M and Schreiner L J 2010 Polymer gel dosimetry *Phys. Med. Biol.* **55** R1–63
- Barth R F, Yang W L, Rotaru J H, Moeschberger M L, Boesel C P, Soloway A H, Joel D D, Nawrocky M M, Ono K and Goodman J H 2000 Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival and cure following blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of sodium borocaptate and boronophenylalanine *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **47** 209–18
- Baumert B G, Norton I A, Lomax A J and Davis J B 2004 Dose conformation of intensity-modulated stereotactic photon beams, proton beams, and intensity-modulated proton beams for intracranial lesions *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **60** 1314–24
- Boudou C, Tropres I, Rousseau J, Lamalle L, Adam J F, Esteve F and Elleaume H 2007 Polymer gel dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy and iodine dose-enhancement measurements *Phys. Med. Biol.* **52** 4881–92
- Brauer-Krisch E *et al* 2010a Potential high resolution dosimeters for MRT *6th Int. Conf. on Medical Applications of Synchrotron Radiation* ed K K W Siu vol 1266 pp 89–97
- Brauer-Krisch E, Serduc R, Siegbahn E A, Le Duc G, Prezado Y, Bravin A, Blattmann H and Laissue J A 2010b Effects of pulsed, spatially fractionated, microscopic synchrotron x-ray beams on normal and tumoral brain tissue *Mutat. Res.* **704** 160–6
- Clavier J B, Voirin J, Kehrl P and Noël G 2010 Systematic review of stereotactic radiotherapy for high-grade gliomas *Cancer Radiother.* **14** 739–54
- Dilmanian F A, Romanelli P, Zhong Z, Wang R L, Wagshul M E, Kalef-Ezra J, Maryanski M J, Rosen E M and Ansel D J 2008 Microbeam radiation therapy: tissue dose penetration and BANG-gel dosimetry of thick-beams' array interlacing *Eur. J. Radiol.* **68** S129–36
- Dilmanian F A *et al* 2006a Microbeam radiation therapy in an interlaced geometry: potential applicability to neuro-oncology and radiosurgery *Neuro-Oncol.* **8** 484–5
- Dilmanian F A, Zhong Z, Bacarian T, Benveniste H, Romanelli P, Wang R L, Welwart J, Yuasa T, Rosen E M and Ansel D J 2006b Interlaced x-ray microplanar beams: a radiosurgery approach with clinical potential *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103** 9709–14
- Edouard M, Broggio D, Prezado Y, Esteve F, Elleaume H and Adam J F 2010 Treatment plans optimization for contrast-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy *Med. Phys.* **37** 12
- Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider J E, Shank B, Solin L J and Wesson M 1991 Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **21** 109–22
- Flickinger J C, Lunsford L D and Kondziolka D 1992a Dose prescription and dose-volume effects in radiosurgery *Neurosurg. Clin. N Am.* **3** 51–9
- Flickinger J C, Lunsford L D, Kondziolka D, Maitz A H, Epstein A H, Simons S R and Wu A 1992b Radiosurgery and brain tolerance—an analysis of neurodiagnostic imaging changes after gamma-knife radiosurgery for arteriovenous malformations *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **23** 19–26

- Gokeri G, Kocar C and Tombakoglu M 2010 Monte Carlo simulation of microbeam radiation therapy with an interlaced irradiation geometry and an Au contrast agent in a realistic head phantom *Phys. Med. Biol.* **55** 7469–87
- Khuntia D, Tome W A and Mehta M P 2009 Radiation techniques in neuro-oncology *Neurotherapeutics* **6** 487–99
- Kim J H, Brown S L, Jenrow K A and Ryu S 2008 Mechanisms of radiation-induced brain toxicity and implications for future clinical trials *J. Neuro-Oncol.* **87** 279–86
- Kondziolka D, Lunsford L D, Claassen D, Maitz A H and Flickinger J C 1992a Radiobiology of radiosurgery: I. The normal rat-brain model *Neurosurgery* **31** 271–9
- Kondziolka D, Lunsford L D, Claassen D, Pandalai S, Maitz A H and Flickinger J C 1992b Radiobiology of radiosurgery: II. The rat-C6 glioma model *Neurosurgery* **31** 280–8
- Laissue J A *et al* 1998 Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated x rays *Int. J. Cancer* **78** 654–60
- Lee K Y, Fung K K L and Kwok C S 2006 Application of high-resolution radiochromic film dosimetry in verifying a small-field stereotactic radiosurgery plan *Appl. Radiat. Isot.* **64** 934–9
- Martinez-Rovira I, Sempau J, Fernandez-Varea J M, Bravin A and Prezado Y 2010 Monte Carlo dosimetry for forthcoming clinical trials in x-ray microbeam radiation therapy *Phys. Med. Biol.* **55** 4375–88
- Nieder C, Adam M, Molls M and Grosu A L 2006 Therapeutic options for recurrent high-grade glioma in adult patients: recent advances *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **60** 181–93
- Niranjan A and Flickinger J C 2008 Radiobiology, principle and technique of radiosurgery *Prog. Neurol. Surg.* **21** 32–42
- Prezado Y, Fois G, Edouard M, Nemoz C, Renier M, Requardt H, Esteve F, Adam J F, Elleaume H and Bravin A 2009a Biological equivalent dose studies for dose escalation in the stereotactic synchrotron radiation therapy clinical trials *Med. Phys.* **36** 725–33
- Prezado Y, Thengumpallil S, Renier M and Bravin A 2009b X-ray energy optimization in minibeam radiation therapy *Med. Phys.* **36** 4897–902
- Rousseau J, Barth R F, Moeschberger M L and Elleaume H 2009 Efficacy of intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation for treatment of F98 glioma-bearing rats *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **73** 530–6
- Salvat F, Fernández-Varea J and Sempau J 2006 PENELOPE—a code system for Monte Carlo simulation of electron and photon transport (Issey-les-Moulineaux: OECD/NEA Data Bank) Available in PDF format from OECD Nuclear Energy website <http://www.nea.fr/lists/penelope.html>
- Salvat F and Fernandez-Varea J M 2009 Overview of physical interaction models for photon and electron transport used in Monte Carlo codes *Metrologia* **46** S112–38
- Serduc R *et al* 2009 Synchrotron microbeam radiation therapy for rat brain tumor palliation—influence of the microbeam width at constant valley dose *Phys. Med. Biol.* **54** 6711–24
- Serduc R *et al* 2010 High-precision radiosurgical dose delivery by interlaced microbeam arrays of high-flux low-energy synchrotron x-rays *Plos One* **5** E9028
- Serduc R *et al* 2008 Characterization and quantification of cerebral edema induced by synchrotron x-ray microbeam radiation therapy *Phys. Med. Biol.* **53** 1153–66
- Shepherd S F, Laing R W, Cosgrove V P, Warrington A P, Hines F, Ashley S E and Brada M 1997 Hypofractionated stereotactic radiotherapy in the management of recurrent glioma *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **37** 393–8
- Siegbahn E A, Stepanek J, Brauer-Krisch E and Bravin A 2006 Determination of dosimetrical quantities used in microbeam radiation therapy (MRT) with Monte Carlo simulations *Med. Phys.* **33** 3248–59
- Suortti P and Thomlinson W 2003 Medical applications of synchrotron radiation *Phys. Med. Biol.* **48** R1–35
- Wen P Y and Kesari S 2008 Malignant gliomas in adults *N. Engl. J. Med.* **359** 492–507
- Wong C J, Ackerly T, He C, Patterson W, Powell C E, Ho A, Qiao G, Solomon D H, Meder R and Geso M 2007 High-resolution measurements of small field beams using polymer gels *Appl. Radiat. Isot.* **65** 1160–4

Biology Contribution

Monochromatic Minibeams Radiotherapy: From Healthy Tissue-sparing Effect Studies Toward First Experimental Glioma Bearing Rats Therapy

Pierre Deman, M.Sc.,^{*,†,‡} Mathias Vautrin, M.Sc.,^{*,†,‡,¶} Magali Edouard, Ph.D.,^{*,†,‡}
 Vasile Stupar, Ph.D.,^{*,†} Laure Bobyk, Ph.D.,^{*,†,‡} Régine Farion, B.Sc.,^{*,†,‡}
 Hélène Elleaume, Ph.D.,^{*,†,‡,§} Chantal Remy, Ph.D.,^{*,†} Emmanuel L. Barbier,^{*,†}
 François Esteve, M.D., Ph.D.,^{*,†,‡,§} and Jean-François Adam, Ph.D.,^{*,†,‡,§}

From ^{*}INSERM, Grenoble, France; [†]Université Joseph Fourier, Institut des Neurosciences, Grenoble, France; [‡]European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France; [§]Grenoble University Hospital, Grenoble, France; and [¶]DOSisoft, Cachan, France

Received Dec 20, 2010, and in revised form Aug 24, 2011. Accepted for publication Sep 12, 2011

Purpose: The purpose of this study was to evaluate high-dose single fraction delivered with monochromatic X-rays minibeams for the radiotherapy of primary brain tumors in rats.

Methods and Materials: Two groups of healthy rats were irradiated with one anteroposterior minibeam incidence (four minibeams, 123 Gy prescribed dose at 1 cm depth in the brain) or two interleaved incidences (54 Gy prescribed dose in a $5 \times 5 \times 4.8$ mm³ volume centered in the right hemisphere), respectively. Magnetic resonance imaging (MRI) follow-up was performed over 1 year. T2-weighted (T2w) images, apparent diffusion coefficient (ADC), and blood vessel permeability maps were acquired. F98 tumor bearing rats were also irradiated with interleaved minibeams to achieve a homogeneous dose of 54 Gy delivered to an $8 \times 8 \times 7.8$ mm³ volume centered on the tumor. Anatomic and functional MRI follow-up was performed every 10 days after irradiation. T2w images, ADC, and perfusion maps were acquired.

Results: All healthy rats were euthanized 1 year after irradiation without any clinical alteration visible by simple examination. T2w and ADC measurements remain stable for the single incidence irradiation group. Localized Gd-DOTA permeability, however, was observed 9 months after irradiation for the interleaved incidences group.

The survival time of irradiated glioma bearing rats was significantly longer than that of untreated animals (49 ± 12.5 days *versus* 23.3 ± 2 days, $p < 0.001$). The tumoral cerebral blood flow and blood volume tend to decrease after irradiation.

Conclusions: This study demonstrates the sparing effect of minibeams on healthy tissue. The increased life span achieved for irradiated glioma bearing rats was similar to the one obtained with other radiotherapy techniques. This experimental tumor therapy study shows the feasibility of using X-ray minibeams with high doses in brain tumor radiotherapy. © 2011 Elsevier Inc.

Reprint requests to: Jean-François Adam, Ph.D., ESRF-ID17, 6, rue Jules Horowitz, 38043 Grenoble, France. Tel: +33 4 76 88 29 89; Fax: +33 4 76 88 28 85; E-mail: adam@esrf.fr

Conflict of interest: none.

Acknowledgment—Special thanks to Dominique Dallery and the technicians in the Grenoble Neuroscience Institute animal facility for the help with animal care; Thierry Brochard and Christian Nemoz and the magnetic resonance imaging facility of Grenoble for the technical support; and Nicolas Pannetier for the help with the perfusion analysis software.

Int J Radiation Oncol Biol Phys, Vol. ■, No. ■, pp. 1–8, 2011
 0360-3016/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
 doi:10.1016/j.ijrobp.2011.09.013

Keywords: Minibeams, Radiotherapy, MRI follow-up, Monte Carlo dosimetry, Dose—volume effects

Introduction

There is still no curative treatment for high-grade gliomas despite the use of aggressive combined strategies (surgery, chemotherapy, and radiotherapy) (1). Radiotherapy is partially effective but limited by normal tissue tolerance (2). The high radiation dose required for sterilizing such a tumor would lead to damages to the surrounding healthy tissues if being delivered by megavoltage X-rays from a linear accelerator. Two techniques were developed using synchrotron sources to reach the required differential effect. Microbeam radiotherapy (MRT) is based on high single doses (>100 Gy) delivered under a micrometric spatial fractionation pattern leading to increased healthy tissue-sparing effect (3, 4). Contrast-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy (SSRT) is based on localized dose-enhancement effects obtained by reinforced photoelectric absorption with medium energy X-rays irradiations on high-Z elements previously incorporated in the tumor (5). These two techniques are currently being transferred to clinical trials (6, 7). A new synchrotron-based irradiation modality called minibeam therapy (MBT) (8, 9) aims at combining the advantages of these two techniques. The irradiation is also performed using spatial fractionation to increase the sparing effect on healthy tissue. Submillimetric parallel medium energy X-ray beams (~600 μm in height) are collimated in their lateral dimension to match the target width. At least two incidences are interleaved at the isocenter so that the target receives a homogeneous dose distribution as shown in Fig. 1. The conformal use of medium energy monochromatic X-ray beams when irradiating the tumor could be associated with the presence of heavy elements in the tumor to further increase the differential effect. The MBT technique is at its core, and only studies performed on healthy rats with polychromatic X-rays (8–10) have been reported so far.

This work is a first step in the development and evaluation of MBT for the treatment of gliomas. The sparing effect and potential toxicity was first evaluated by irradiating healthy rats with high X-ray doses (Fig. 1). MBT treatment was then applied to F98 glioma-bearing rats. For both studies, a morphologic and functional magnetic resonance imaging (MRI) follow-up was performed to evaluate potential adverse effects and to characterize the tumor evolution.

Methods and Materials

All *in vivo* experiments were conducted on male Fischer 344 rats, 7–8 weeks old. The guidelines of the French government (A3851610008 and B3818510002) were followed for all animal care procedures. During follow-up, rats were regularly weighed and inspected for clinical signs.

Dosimetry

All irradiations were performed at the European Synchrotron Radiation Facility biomedical beamline with 80 keV monochromatic X-

rays (80 eV bandwidth). The exposure time required for a given prescribed dose were obtained from dedicated percentage depth dose curves (PDDs), combined with absolute dose measurements in air with an ionization chamber calibrated in dose to water (PTW 23331, 1 cm³; 2.5 × 2.5 cm² field). The PDDs were obtained from experimental dosimetry using normoxic polyacrylamide gelatin gels according to the method described by Boudou *et al.* (11) and correlated with Monte Carlo simulations, using the PENELOPE 2006 code system (12) (data not shown). The prescribed dose (at 1 cm depth in the rat) was obtained by multiplying the entrance dose in the rat head (which is obtained from the dose in water measured in air with the ion chamber) by the PDD value at 1 cm (0.835) and by the heterogeneity correction factor to take into account the presence of 1 mm of skull bone before the prescription point (0.99).

Healthy rats (normal tissue-sparing effect study)

Irradiation protocol

Two irradiation protocols targeting the striatum were conducted on healthy Fischer rats (Fig. 1).

- Five rats were irradiated with four minibeam (620 μm width, 600 μm nonirradiated gaps between each minibeam). The prescribed dose (123 Gy at 1 cm depth, Fig. 1a) was delivered at one time. With this exposure, we should deliver about 30 Gy in a tumor situated in the center of a human head (8 cm deep).
- Six rats were irradiated with two interleaved incidences (Fig. 1b, four minibeam per incidence, 54 Gy at 1 cm depth). The incidences were interleaved in the center of the right striatum to deliver a homogeneous dose in a 5 × 5 × 4.8 mm³ parallel pipe at 1 cm depth. The 10 μm overlapping zones in the interleaved area have been carefully checked with experimental three-dimensional polymer gel dosimetry (data not shown). This ensures a small adjacent-beam overlap and a guaranteed solid irradiation field in the target to avoid system misalignment or animal movement's effects.

The interactions of primary photons in the beam path led to energy deposition in the valley from secondary particles (mainly scattered photons). At 1 cm depth in tissue, the valley dose is roughly 30 times lower than in the peak with four minibeam. This ratio decreases to 17 when using 13 minibeam as for the tumor-bearing rats protocol.

MRI follow-up

An anatomical MRI follow-up was performed 1, 5, 26, 59, 200, 298, and 347 days after irradiation on a 4.7 T or a 7 T preclinical magnet (both Bruker Avance III systems) using a volume/surface cross coil configuration. The rats were anaesthetized using isoflurane (2%) and their tail vein was catheterized. Each rat underwent the following protocols (1-mm thick slices, seven slices):

- Morphological T₂-weighted images (repetition time [TR]: 4000 ms; echo time [TE]: 33 ms field of view [FOV]: 4 × 4 cm², matrix size: 256 × 256)

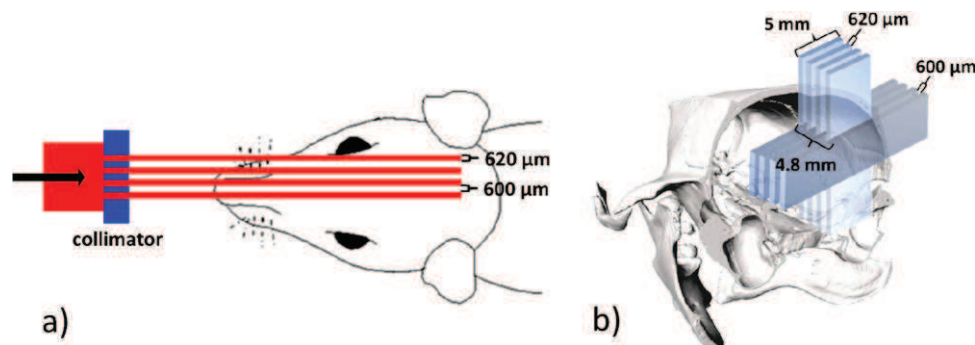


Fig. 1. Minibeam radiation therapy irradiation geometries for rodents experimental tumor therapy studies: (a) one incidence protocol: four beams of 620 μm width, 5 mm height, separated by 600 μm width nonirradiated zones. (b) Two interleaved incidences protocol: four beams in each incidence, 620 μm high, 5 mm width; interleaved in the rat right striatum.

- Apparent diffusion coefficient (ADC) for water maps (echo planar imaging [EPI]: three orthogonal directions ($b = 1000 \text{ s/mm}^2$) plus reference ($b \sim 0 \text{ s/mm}^2$); FOV: $3 \times 3 \text{ cm}^2$, matrix size: 128×128)
- For two rats per group, T_1 -weighted images (FOV: $3 \times 3 \text{ cm}^2$, matrix size: 128×128) were acquired before and 5 min after injection of a bolus of Gd-DOTA (Guerbet SA, France; 200 $\mu\text{mol/kg}$).

Regions of interest (ROIs $\sim 2 \text{ mm}^2$) were drawn manually in the center of the targeted and contralateral striatum, on the slice where tumor implantation is done in the following study. In case of Gd-DOTA extravasation, two additional ROI were drawn: the first containing exclusively the pixels in the right striatum with enhanced MRI signal and the second being its contralateral counterpart. For each sequence, the average ROIs values obtained in the irradiated part were divided by the corresponding contralateral values.

Tumor-bearing rats (experimental tumor therapy)

Tumor implantations

10^3 F98 cells in a 4 μL suspension were injected (0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$) into the right striatum of 23 Fischer rats as described by Rousseau *et al.* (13); according to the following stereotactic coordinates: 3.5 mm right from the bregma and 6 mm depth from the skull surface.

Irradiation and follow-up protocols

The irradiation was performed 14 days after tumor implantation and was similar as the one for healthy rats irradiated with two incidences, except that the irradiated target corresponds to an $8 \times 8 \times 7.8 \text{ mm}^3$ parallelepiped (13 interlaced minibeam). After irradiation, rats were examined and weighted every 2 days until their deaths.

A functional MRI follow-up was performed at 4, 12, 21, and 31 days after tumor irradiation. Experiments were performed on the 7T preclinical magnet with the same configuration as for the healthy rat follow-up (as previously described). Each rat underwent the following protocols:

- T_2 -weighted images and ADC maps were acquired as previously described
- Dynamic susceptibility contrast (DSC) MRI: T_2^* -weighted images were acquired (EPI sequence, TR: 250 ms; TE: 11.20 ms, FOV: $3 \times 3 \text{ cm}^2$; matrix: 128×128) every 0.5 s for 3 min.

After acquisition of 30 images, a second bolus of Gd-DOTA was injected (200 $\mu\text{mol/kg}$, manually injected within 2–3 s).

Tumor ROIs were drawn on the ADC map where the tumor (higher ADC than normal brain tissue) had the largest dimensions. One ROI was drawn as the contour of the entire tumor. If the central area could be distinguished from the tumor periphery in terms of ADC values (high ADC values, similar to liquid region), two complementary regions were also delimited (*i.e.*, two subparts of the tumor ROI) and labeled as hyperdiffusion area and periphery, respectively. Two additional ROIs were also drawn on the contralateral counterpart in the cortex and in the striatum.

A tumor size index was calculated for each rat at each follow-up time and was defined as the whole tumoral ROI area.

The DSC-MRI data were processed as follows. The first 30 images were averaged to obtain a baseline signal (S_{baseline}). The variations of $R2^*$ ($\Delta R2^*$) as a function of time t were computed in each ROIs as following: $\Delta R2^*(t) = 1/TE \ln(S(t)/S_{\text{baseline}})$.

In each ROI, the average $\Delta R2^*(t)$ curve was fitted with a gamma-variate function. A cerebral blood volume index (CBV index) was computed as the area under the gamma variate (14). The mean transit time (MTT) was computed as the first moment of the gamma-variate. A cerebral blood flow index (CBFindex) was also computed according to the central volume principle: $\text{CBFindex} = \text{CBVindex}/\text{MTT}$. The contrast arrival time (T_0) as well as the time to peak (TTP) were also retrieved from the $\Delta R2^*$ curves.

Histology protocol

After the rat's death or euthanasia (1 mL Dolethal or KCL, intracardiac injection), the brain was quickly removed, frozen in precooled Isopentane, and stored at -80°C . Ten-micron brain sections were cut using a cryomicrotome and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The orientation cut is chosen to be perpendicular to the irradiation direction.

Results

Healthy rats (sparing effect study)

The rats were not clinically altered over the 1 year follow-up as assessed by regular examination and weighing.

For the single incidence protocol (123 Gy), no significant differences were observed for the $T_2\text{w}$ and ADC values

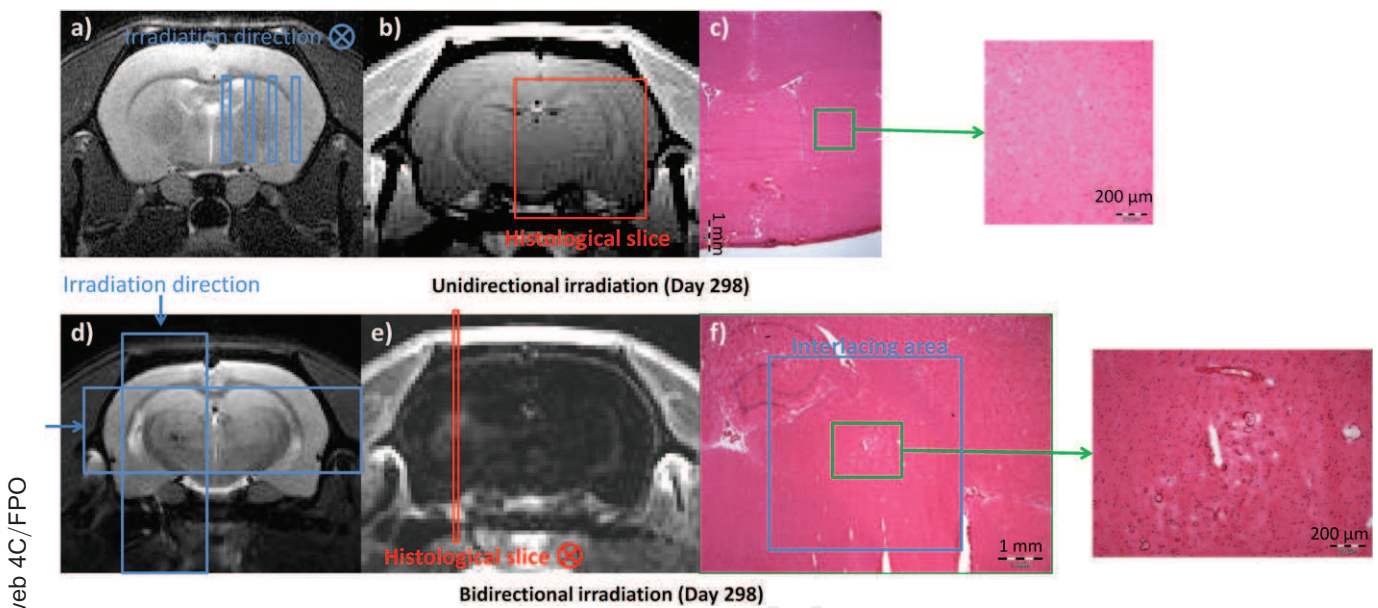


Fig. 2. Magnetic resonance imaging (MRI) follow-up on one rat 298 days after irradiation with unidirectional irradiation: (a) T2-weighted (T2w) image; (b) T1-weighted (T1w) image after injection of Gd-DOTA; (c) hematoxylin and eosin (H&E) slice. There is no specific modification in the beam path. One rat with the two interleaved incidences: (d) T2w image; (e) T1w signal increase after injection of Gd-DOTA; (f) H&E slice (zoom $\times 10$) showing the blood microvessels alteration area. In blue is the pattern of irradiation; in red is the histological slice orientation. The localization on MRI slices is approximate.

normalized to the contralateral over the six time points. A linear fit (degree one polynomial) gave the following results:

- T_2w : offset = 0.972 ± 0.029 , slope = $-7.23 \cdot 10^{-5} \pm 11 \cdot 10^{-5}$ days $^{-1}$ (reduced $\chi^2 = 1.4$, χ^2 probability = 0.220)
- ADC: offset = 1.013 ± 0.0114 , slope = $-3.9 \cdot 10^{-5} \pm 6.3 \cdot 10^{-5}$ days $^{-1}$ (reduced $\chi^2 = 0.9816$, χ^2 probability = 0.427).

For the 54 Gy interleaved irradiation, a localized modification of the tissue in the interleaving area can be observed with MRI on T2w and T1 images. Gadolinium uptake appeared in the irradiated hemisphere at 200 and 298 days after irradiation in the same area for

the two rats with contrast enhanced follow-up (Fig. 2), probably because of modification of the blood–brain barrier permeability.

Histology

For healthy rats, the histological slices look perfectly normal (Fig. 2c) for unidirectional irradiations. For cross-fired irradiations, a small area with larger and coagulated vessels is observed at the same place than the abnormal gadolinium uptake region (Fig. 2f).

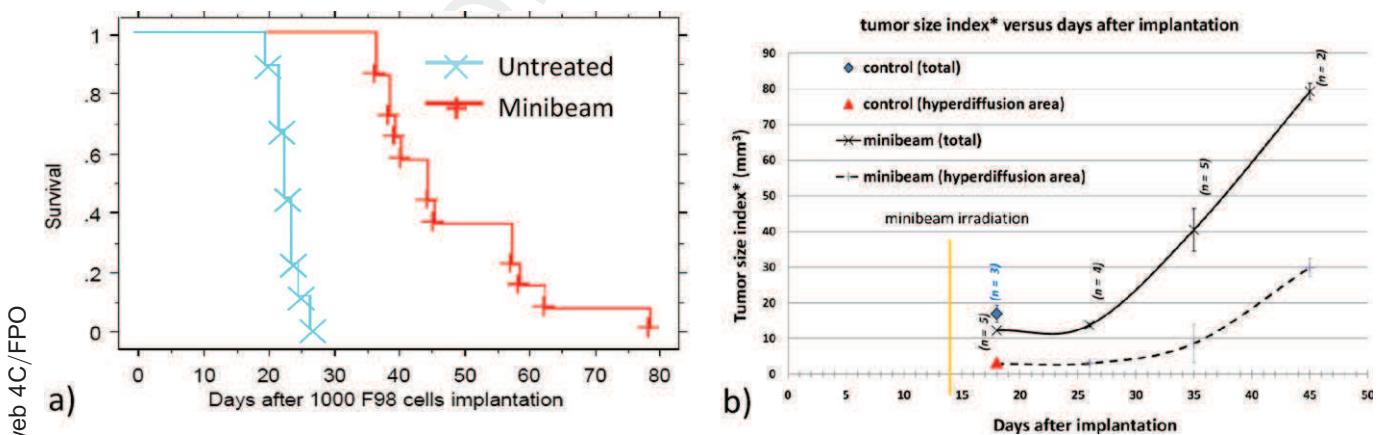


Fig. 3. (a) Kaplan-Meier survival plots for F98 glioma bearing rats after minibeam irradiation. (\times) 9 untreated animals, (+) 14 irradiated animals (54 Gy, one fraction, interleaved minibeam, 14 days after tumor implantation). The two survival curves are significantly different (Mantel-Cox log–rank test: $p < 0.001$). (b) Tumor size index (area of the tumor measured on the slice where the tumor is the largest, mean \pm SD across all animals) vs. days after implantation. The solid and dashed curves represent the tumor size index for the whole tumor area, and for the hyperdiffusion area, respectively. For untreated animals, there is only one tumor size index for the whole tumor (blue diamond) and the hyperdiffusion area (red triangle) because their deaths occurred before the second magnetic resonance imaging session.

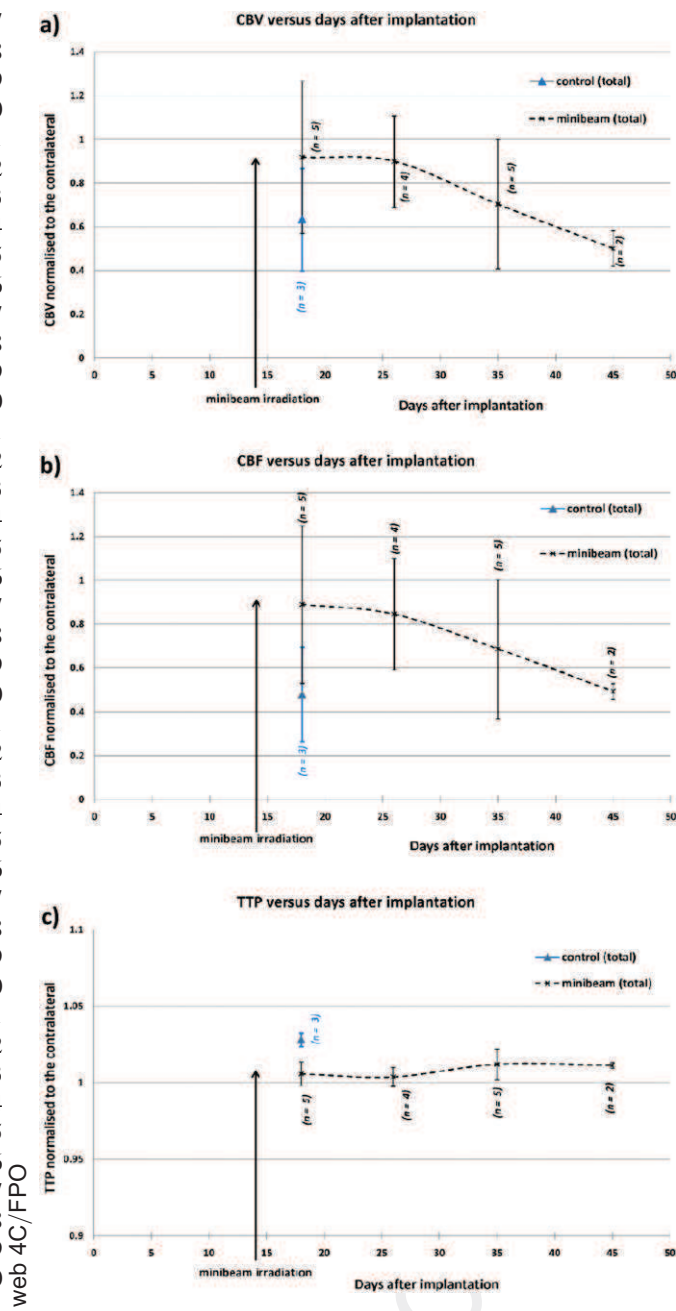


Fig. 4. Perfusion parameters (slice where the tumor appears the largest, mean \pm SD across all animals) vs. days after implantation: (a) cerebral blood volume index (CBV index), (b) cerebral blood flow index (CBF index), (c) time to peak (TTP).

Tumor-bearing rats (experimental tumor therapy study)

The group of rats treated by minibeam radiotherapy had a significantly increased lifespan with a mean survival of 49 ± 12.5 days in comparison with 23.33 ± 2 days for the untreated group (210% increased life span; $p < 0.001$ log-rank Mantel-Cox test; survival curves represented in Fig. 3a).

The tumor size index vs. time (measured on T2w images) is represented on the Fig. 3b as well as the size of the distinct central part corresponding to the hyperdiffusion area. The F98 tumor growth is exponential without treatment (15), whereas the tumor volume remains constant for 12 days after minibeam radiotherapy and then increases again.

Figure 4 shows the evolution of CBV, CBF and TTP vs. the days after tumor implantation. The small number of rats in each group has a minor contribution on the large error bars, which are mainly from the heterogeneity of perfusion parameters in F98 tumors. Although no statistical evidence can be derived ($p > 0.1$), the perfusion parameters tend to stabilize after tumor irradiation and evolve again (decrease in CBV and CBF indexes and increase in TTP) when the tumor regrowth occur (12 days after irradiation, Fig. 3). This correlates with the increase in tumor size and the necrotic core observed in the tumor. Similar values than for untreated tumors are retrieved at the time of death.

Histology

For both untreated and irradiated rats, the tumor appears highly heterogeneous at the death time. A peripheral edema, a central necrotic core surrounded by glioma cells with pseudo-palisadic aspects and viable tumor tissue in the periphery of necrosis were seen on all rats (Fig. 5b). The necrosis coverage was evaluated to be around 40–50% of the tumors in the control group against 70% in the minibeam group, the latter being more pseudo-kystic.

Discussion

This study shows the feasibility of using monochromatic minibeam patterns for glioma radiation therapy purposes. The main advantage in using minibeam radiotherapy is the higher tissue tolerance of healthy tissues to submillimetric spatially fractionated beams (8, 10). In interleaved irradiations, the homogeneous target coverage is the crucial point of the treatment quality and special attention should be paid on this particular issue. In our case, there is a small overlap at the beams junctions ($< 60 \mu\text{m}$, as measured on gafchromic® HD-810 films). This micrometric margin avoids unirradiated areas between interleaved beams, which could lead to tumor regrowth. Previous studies on microbeam irradiations have shown that the doses reached in the overlapping parts (measured in tens of microns) should have no damageable effects (4, 16).

Various techniques aim at improving the dose distributions, as described by Baumert *et al.* (17) and Khuntia *et al.* (18). Minibeam radiotherapy proposes high spatial dose fractionation with submillimetric beams in comparison with the millimetric beams used in conventional photon radiosurgery (19–21) and with the micrometric beams of synchrotron MRT (4, 8, 10, 22). Minibeam radiotherapy is a realistic treatment alternative for clinical trials with a higher tissue tolerance when compared with conventional radiosurgery, and reduced technical and dosimetric difficulties when compared with MRT. Gokeri *et al.* (23) have found peak-to-valley dose ratio values around 10 in a human phantom with $680 \mu\text{m}$ polychromatic beams (30–600 keV, 107 keV mean energy). We expect a higher differential effect and a better dosimetric control with monochromatic beams. Radiosurgery can also be performed with ion beams with improved differential effects (24); however, these techniques use broad beams with the associated tissue tolerance limitation. Moreover, they require complex modalities for beam shaping and for real-time energy tuning protocols (Bragg peak spreading over the whole target volume).

The complications of overirradiation can be acute, early delayed, and late effects (25). Late effects are mainly from damages on the vascular endothelial cells (26, 27) and motivate a 1-year clinical and MRI follow-up on healthy rats (anatomical,

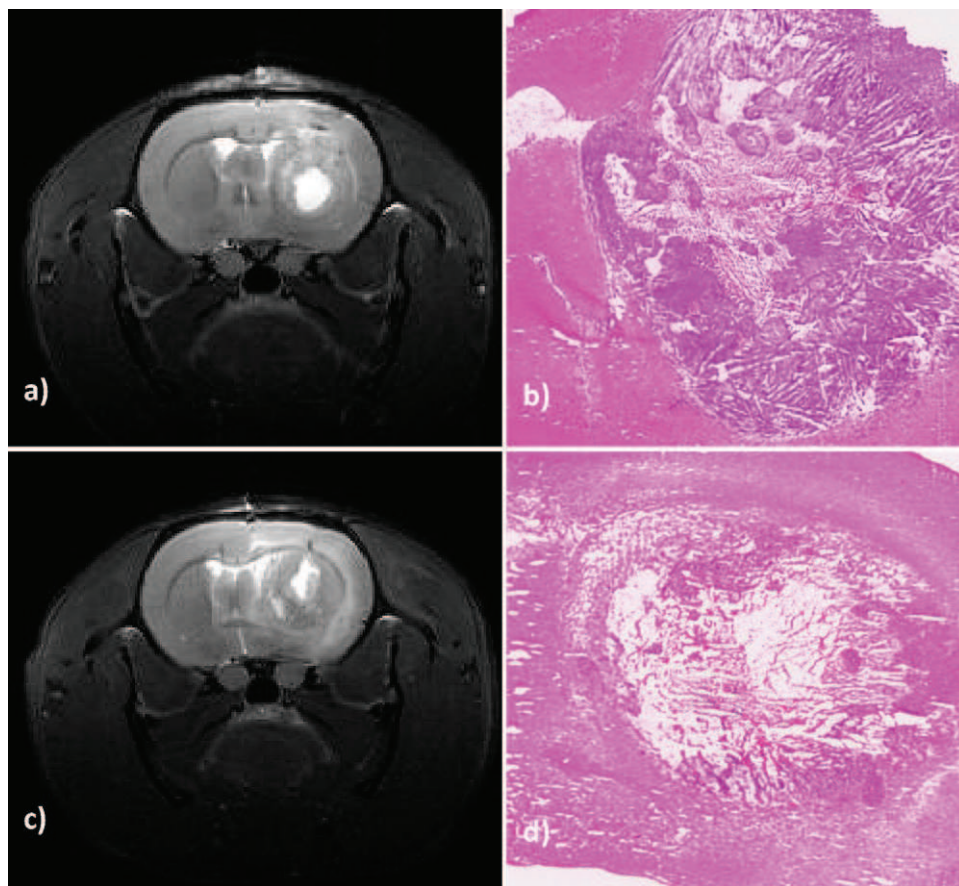


Fig. 5. T2-weighted (T2w) images and hematoxylin and eosin (H&E) section of the tumor on an untreated rat and a rat treated by minibeam (54 Gy at 1 cm). Untreated rat: (a) T2w image, 18 days after implantation; (b) H&E section, same rat, 27 days after implantation. Irradiated rat: (c) T2w image, 35 days after implantation; (d) H&E section, same rat, 41 days after implantation. The necrotic area is larger for treated rats, but tumor cells remain in both treated and untreated animals.

diffusion coefficient, and vessel permeability maps) to conclude on the reality of the sparing effect. No clinical alteration or MRI images abnormalities have been observed on the rats irradiated by one minibeam incidence (four minibeam, 123 Gy prescribed at 1 cm depth). A modification of the T2 (hyposignal) and an increased permeability to gadolinium was observed for the rats irradiated with two interleaved incidences, 200 and 298 days after irradiation (54 Gy prescribed at 1 cm depth). However, the rats had no clinical alteration observable by simple examination and their feeding ability and movements remained normal. These damages have not been observed in the study performed by Dilmanian *et al.* (8, 10) with similar doses, but with a shorter follow-up time. We can thus assume that if high doses (single fraction) between 30 and 50 Gy can be delivered in a human patient, the healthy tissue tolerance (21, 28, 29) is no longer a limitation for the minibeam technique.

The lifespan of the tumor-bearing rats irradiated with 54 Gy was significantly improved when compared with the control group. Here again, the anatomical and functional MRI follow-up is of particular importance because the perfusion parameters variation show two tumoral phases after irradiation (stagnation and regrowth). The significant benefits of perfusion imaging in brain tumor radiotherapy treatment follow-up and survival prognosis have also been reported in the past decade by various authors (30–32).

The increased life span was not improved when compared to other study using synchrotron source (MRT or SSRT) even with lower prescribed doses (22, 33) or with other treatment such as boron neutron capture therapy (34). Tumoral cells may remain out of the lethal dose area and lead to delayed regrowth. Fifty-four Gy in one fraction may also simply not be a curative dose if delivered to the planning target volume (including margins) in case of the F98 rat glioma model, which is particularly aggressive. The solution can be in the combination of minibeam therapy on the macroscopic volume with classic whole-brain fractionated radiation therapy to target infiltrating cells (2–3 Gy/day, 5 days/week, total dose ~30 Gy). Conventional radiosurgery results were not conclusive in most of the reported cases (35, 36), but the boost is limited by the tissue tolerance, which would be larger for minibeam. Moreover, the monochromatic minibeam can be performed on tumor loaded with heavy elements for the same purpose as with contrast-enhanced SSRT (5–7). The localized dose enhancement from increased photoelectric absorption could improve the dose distribution (additional differential effect). These improvements and the combination with chemotherapy could lead to better life span and then the sparing effect of the healthy tissue of minibeam would be required. The dose valley, which is directly linked to the minibeam width, the depth in tissue, and the number of minibeam, has to stay lower than the normal brain tissue dose tolerance. Considering that point, if a 10

745 Gy (single fraction) dose limit is set for the normal brain, the
746 tumor dose will be derived from the PVDR. The consequence in
747 case of human irradiations, this limits the volume of the target that
748 could be treated to 30 cm³ (8). When using heavy elements, such
749 as in contrast-agent SSRT (7), one can gain 10% of dose
750 enhancement per mg/ml of contrast agent and overcome partially
751 the PVDR limitation, and thus treat larger volumes.

752 Conclusion

753 The aim of this article was to show the feasibility and potential
754 interest of monochromatic minibeam irradiations using
755 synchrotron sources, with a first experimental tumor therapy,
756 including morphological and functional MRI follow-up.

757 An irradiation on healthy rats with a 123 Gy at 1-cm dose with
758 submillimetric X-ray beams with a spatially fractionated pattern
759 show no clinical alteration, neither damages on MRI images (T2w
760 and ADC). This high dose corresponds to the entrance dose
761 required to deliver about 30 Gy in a glioma at the center of human
762 brain. A long-term disruption of the blood–brain barrier has been
763 observed in the targeted volume 10 months after irradiation for
764 interleaved incidences (54 Gy), but with no deleterious clinical
765 effects.

766 To our knowledge, this is the first report of minibeam radiation
767 therapy on glioma-bearing rats, leading to a significant increase of
768 the lifespan (200%). Even if the survival results obtained in the
769 present study are modest (less than expected), this technique is
770 promising for future studies in combination with radiosensitizers
771 to further improve the differential effect (high-Z elements such as
772 contrast agents, nanoparticles, or with chemotherapy). Better
773 candidates to radiosurgery (less infiltrative tumors) might also be
774 considered.

775 References

- 776 1. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *New Engl J Med* 2008;
777 359:492–507.
- 778 2. Kim JH, Brown SL, Jenrow KA, *et al.* Mechanisms of radiation-
779 induced brain toxicity and implications for future clinical trials. *J*
780 *Neuro-Oncol* 2008;87:279–286.
- 781 3. Laissue JA, Geiser G, Spanne PO, *et al.* Neuropathology of ablation of
782 rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar
783 beam of synchrotron-wiggler-generated X rays. *Int J Cancer* 1998;78:
784 654–660.
- 785 4. Serduc R, Brauer-Krisch E, Siegbahn EA, *et al.* High-precision radio-
786 surgical dose delivery by interlaced minibeam arrays of high-flux
787 low-energy synchrotron x-rays. *Plos One* 2010;5.
- 788 5. Adam JF, Joubert A, Biston MC, *et al.* Prolonged survival of Fischer
789 rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic
790 radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:603–611.
- 791 6. Prezado Y, Fois G, Edouard M, *et al.* Biological equivalent dose
792 studies for dose escalation in the stereotactic synchrotron radiation
793 therapy clinical trials. *Med Phys* 2009;36:725–733.
- 794 7. Edouard M, Broggio D, Prezado Y, *et al.* Treatment plans optimization
795 for contrast-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy. *Med Phys*
796 2010;37:2445–2456.
- 797 8. Dilmanian FA, Zhong Z, Bacarian T, *et al.* Interlaced x-ray micro-
798 planar beams: A radiosurgery approach with clinical potential. *Proc*
799 *Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9709–9714.
- 800 9. Dilmanian FA, Romanelli P, Zhong Z, *et al.* Microbeam radiation
801 therapy: Tissue dose penetration and BANG-gel dosimetry of thick-
802 beams' array interlacing. *Eur J Radiol* 2008;68:S129–S136.

- 803 10. Dilmanian FA, Zhong Z, Bacarian T, *et al.* Microbeam radiation
804 therapy in an interlaced geometry: Potential applicability to neuro-
805 oncology and radiosurgery. *Neuro-Oncology* 2006;8:484–485.
- 806 11. Boudou C, Tropres I, Rousseau J, *et al.* Polymer gel dosimetry for
807 synchrotron stereotactic radiotherapy and iodine dose-enhancement
808 measurements. *Phys Med Biol* 2007;52:4881–4892.
- 809 12. Salvat F F-VJ, Sempau J, *et al.* A Code system for Monte Carlo
810 Simulation of Electron and Photon Transport. Issy-les-Moulineaux:
811 Nuclear Energy Agency (OECD); 2006. Q6
- 812 13. Rousseau J, Barth RF, Moeschberger ML, *et al.* Efficacy of intracere-
813 bral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation
814 for treatment of F98 glioma-bearing rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*
815 2009;73:530–536.
- 816 14. Axel L. Cerebral blood-flow determination by rapid-sequence
817 computed-tomography—a theoretical-analysis. *Radiology* 1980;137:
818 679–686.
- 819 15. Fournier E, Passirani C, Montero-Menei C, *et al.* Therapeutic effective-
820 ness of novel 5-fluorouracil-loaded poly(methylidene malonate
821 2.1.2)-based microspheres on F98 glioma-bearing rats. *Cancer* 2003;
822 97:2822–2829.
- 823 16. Serduc R, de Looij YV, Francony G, *et al.* Characterization and
824 quantification of cerebral edema induced by synchrotron x-ray
825 microbeam radiation therapy. *Phys Med Biol* 2008;53:1153–1166.
- 826 17. Baumert BG, Norton IA, Lomax AJ, *et al.* Dose conformation of
827 intensity-modulated stereotactic photon beams, proton beams, and
828 intensity-modulated proton beams for intracranial lesions. *Int J Radiat*
829 *Oncol Biol Phys* 2004;60:1314–1324.
- 830 18. Khuntia D, Tome WA, Mehta MP. Radiation techniques in neuro-
831 oncology. *Neurotherapeutics* 2009;6:487–499.
- 832 19. Kondziolka D, Lunsford LD, Claassen D, *et al.* Radiobiology of
833 radiosurgery. 1. The normal rat-brain model. *Neurosurgery* 1992;31:
834 271–279.
- 835 20. Kondziolka D, Lunsford LD, Claassen D, *et al.* Radiobiology of
836 radiosurgery. 2. The rat-C6 glioma model. *Neurosurgery* 1992;31:
837 280–288.
- 838 21. Flickinger JC, Lunsford LD, Kondziolka D. Dose prescription and
839 dose-volume effects in radiosurgery. *Neurosurg Clin N Am* 1992;3:
840 51–59.
- 841 22. Serduc R, Bouchet A, Brauer-Krisch E, *et al.* Synchrotron microbeam
842 radiation therapy for rat brain tumor palliation-influence of the
843 microbeam width at constant valley dose. *Phys Med Biol* 2009;54:
844 6711–6724.
- 845 23. Gokeri G, Kocar C, Tombakoglu M. Monte Carlo simulation of
846 microbeam radiation therapy with an interlaced irradiation geometry
847 and an Au contrast agent in a realistic head phantom. *Phys Med Biol*
848 2010;55:7469–7487.
- 849 24. Schulz-Ertner D, Tsujii H. Particle radiation therapy using proton and
850 heavier ion beams. *J Clin Oncol* 2007;25:953–964.
- 851 25. Ruben JD, Dally M, Bailey M, *et al.* Cerebral radiation necrosis:
852 Incidence, outcomes, and risk factors with emphasis on radiation
853 parameters and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65:
854 499–508.
- 855 26. Munter MW, Karger CP, Schneider HM, *et al.* Delayed vascular injury
856 after single high-dose irradiation in the rat brain: Histologic, immu-
857 nohistochemical, and angiographic studies. *Radiology* 1999;212:
858 475–482.
- 859 27. Coderre JA, Morris GM, Micca PL, *et al.* Late effects of radiation on
860 the central nervous system: Role of vascular endothelial damage and
861 glial stem cell survival. *Radiat Res* 2006;166:495–503.
- 862 28. Emami B, Lyman J, Brown A, *et al.* Tolerance of normal tissue to
863 therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;21:
864 109–122.
- 865 29. Niranjan A, Flickinger JC. Radiobiology, principle and technique of
866 radiosurgery. *Prog Neurol Surg* 2008;21:32–42.
- 867 30. Cao Y, Tsien CI, Nagesh V, *et al.* Clinical investigation survival
868 prediction in high-grade gliomas by MRI perfusion before and
869 during early stage of RT. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:
870 876–885.

- 869 31. Fuss M, Wenz F, Essig M, *et al.* Tumor angiogenesis of low-grade
870 astrocytomas measured by dynamic susceptibility contrast-enhanced
871 MRI (DSC-MRI) is predictive of local tumor control after radiation
872 therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:478–482.
- 873 32. Marcus CD, Ladam-Marcus V, Cucu C, *et al.* Imaging techniques to
874 evaluate the response to treatment in oncology: Current standards and
875 perspectives. *Cri Rev Oncol Hematol* 2009;72:217–238.
- 876 33. Rousseau J, Adam JF, Deman P, *et al.* Intracerebral delivery of 5-iodo-2'-
877 deoxyuridine in combination with synchrotron stereotactic radiation for
878 the therapy of the F98 glioma. *J Synchrotron Radiat* 2009;16:573–581.
- 879 34. Barth RF, Grecula JC, Yang WL, *et al.* Combination of boron neutron
880 capture therapy and external beam radiotherapy for brain tumors. *Int J*
881 *Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:267–277.
- 882 35. Kondziolka D, Somaza S, Comey C, *et al.* Radiosurgery and frac-
883 tionated radiation therapy: Comparison of different techniques in an
884 *in vivo* rat glioma model. *J Neurosurg* 1996;84:1033–1038.
- 885 36. Sneed PK, Suh JH, Goetsch SJ, *et al.* A multi-institutional review of
886 radiosurgery alone vs. radiosurgery with whole brain radiotherapy as
887 the initial management of brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol*
888 *Phys* 2002;53:519–526.

UNCORRECTED PROOF

Dosimetry protocol for the preclinical trials in white-beam minibeam radiation therapy

Y. Prezado^{a)}

ID17 Biomedical Beamline, European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), 6, Rue Jules Horowitz B.P.220, 38043 Grenoble, France

I. Martínez-Rovira

ID17 Biomedical Beamline, European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), 6, Rue Jules Horowitz B.P. 220, 38043 Grenoble Cedex, France and Institut de Tècniques Energètiques, Universitat Politècnica de Catalunya, Diagonal 647, E-08028 Barcelona, Spain

S. Thengumpallil

ID17 Biomedical Beamline, European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), 6, Rue Jules Horowitz B.P.220, 38043 Grenoble, France and Dipartimento di Fisica "E. Amaldi", Università degli Studi Roma Tre, 84, Via della Vasca Navale, 00146 Rome, Italy

P. Deman

ID17 Biomedical Beamline, European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), 6, Rue Jules Horowitz B.P.220, 38043 Grenoble, France; INSERM, U836, Equipe 6, F-38042 Grenoble 9, France; and University Grenoble 1, F-38041 Grenoble, France

(Received 15 April 2011; revised 8 June 2011; accepted for publication 17 June 2011; published 11 August 2011)

Purpose: In the quest of a curative radiotherapy treatment for gliomas, new delivery modes are being explored. At the Biomedical Beamline of the European Synchrotron Radiation Facility, a new spatially fractionated technique, called minibeam radiation therapy (MBRT), is under development. The aims of this work were to assess different dosimetric aspects and to establish a dosimetry protocol to be applied in the forthcoming animal (rat) studies in order to evaluate the therapeutic index of this new radiotherapy approach.

Methods: Absolute dosimetry was performed with a thimble ionization chamber (PTW semiflex 31010) whose center was positioned at 2 g cm^{-2} depth. To translate the dose measured in broad beam configuration to the dose deposited with a minibeam, the scatter factors were used. Those were assessed by using the Monte Carlo simulations and verified experimentally with Gafchromic films and a Bragg Peak chamber. The comparison of the theoretical and experimental data were used to benchmark the calculations. Finally, the dose distributions in a rat phantom were evaluated by using the validated Monte Carlo calculations.

Results: The absolute dosimetry in broad beam configuration was measured in reference conditions. The dose rate was in the range between 168 and 224 Gy/min, depending on the storage ring current. A scatter factor of 0.80 ± 0.04 was obtained. Percentage depth dose and lateral profiles were evaluated both in homogenous and heterogeneous slab phantoms. The general good agreement between Monte Carlo simulations and experimental data permitted the benchmark of the calculations. Finally, the peak doses in the rat head phantom were assessed from the measurements in reference conditions. In addition, the peak-to-valley dose ratio values as a function of depth in the rat head were evaluated.

Conclusions: A new promising radiotherapy approach is being explored at the ESRF: Minibeam Radiation Therapy. To assess the therapeutic index of this new modality, in vivo experiments are being planned, for which an accurate knowledge of the dosimetry is essential. For that purpose, a complete set of measurements and Monte Carlo simulations was performed. The first dosimetry protocol for preclinical trials in minibeam radiation therapy was established. This protocol allows to have reproducibility in terms of dose for the different biological studies. © 2011 American Association of Physicists in Medicine. [DOI: 10.1118/1.3608908]

Key words: synchrotron radiation, minibeam radiation therapy, dosimetry, Monte Carlo simulations

I. INTRODUCTION

Conventional radiation therapy, a major treatment modality for cancers, can prove ineffective at times. Its failure appears to be primarily related to constraints on delivering a curative

radiation dose due to the critical morbidity of normal tissues. Despite intensive research and development work in conformal radiotherapy, there are still some radioresistant tumors, like gliomas, for which a radical treatment is usually not

feasible at hospitals. This limitation is especially severe in children, due to the high risk of complications in the development of the central nervous system. The management of tumors close to an organ of risk, like the spinal cord, is also restrained.

This is the motivation for the development of two new radiotherapy techniques at the Biomedical Beamline of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF): microbeam radiation therapy (MRT) and, more recently, minibeam radiation therapy (MBRT). These techniques present two distinct features with respect to the conventional radiotherapy methods that allow to shift the normal tissue tolerances to higher doses:

- (1) Submillimetric field sizes are used, exploring the limits of what is called dose-volume effect: the smaller the field size is, the higher the tolerances of the healthy tissues are.^{1,2} The beam width range from 25 to 100 μm in the case of MRT and from 500 to 700 μm in MBRT. The use of those extremely thin beam widths, at least one order of magnitude thinner than the ones used in radiosurgery, may permit a rapid increase in healthy tissue tolerances.
- (2) The dose is spatially fractionated: very high doses (≥ 100 Gy) are delivered in one fraction by using intense x-rays parallel beams. The interbeam separation is 200 or 400 μm in the case of MRT and 600 μm in MBRT. The dose profiles consist of a pattern of peaks and valleys, *i.e.*, with high doses in the beam paths and low doses in the spaces between them.³ The minimum dose in the central region between two beams is named valley dose and the dose in the center of the beam is the peak dose. The different widths and spacings in MRT and MBRT might lead to dissimilar biological effects, which need to be evaluated.

In MRT the combination of submillimetric field sizes and a spatial fractionation of the dose leads to an exceptional normal tissue resistance to very high doses (≥ 100 Gy) in one fraction.⁴⁻¹⁴ In addition, MRT rendered significant tumor growth delay and, in some cases, complete tumor ablation.¹⁵⁻²¹ This was despite the small fraction of the tumor mass irradiated with the high dose microbeams, fact that appear to challenge many of the current paradigms in conventional radiation therapy. The preferential effect on malignant tissues has been mainly attributed to selective effects of microbeams on immature tumor vessels versus lack of microbeam effects on the differentiated normal vasculature,¹⁸ although other factors might be operative. Aimed at the tumor volume, the microbeams interact in tissue, delivering a lethal radiation dose to endothelial cells lying directly in their path, *i.e.*, peak regions. In normal tissue, the well-preserved vasculature in the valley regions seemed to ensure the rapid regeneration of directly irradiated blood vessels. It is therefore essential that the valley dose is kept to the minimum to ensure the preservation of normal tissue architecture¹⁸ and the survival of sufficient cells needed for healthy tissue repair. Based on these assumptions, the effectiveness of MRT is determined by the peak-to-valley dose ratio (PVDR). Therefore, PVDR is a relevant dosimetric parameter in spatially fractionated techniques.^{3,18}

The main drawback of MRT is that its widespread clinical implementation is limited nowadays due to the requirement of high dose rates, only available at synchrotrons. This is due to the fact that since microbeams are closely packed, it is important that the tissue/target does not move during the irradiation due to the cardiosynchronous pulsations.²² The thicker beams used in MBRT, a new radiotherapy approach, overcome those difficulties. The dose profiles of minibeam are not as vulnerable as the ones of microbeams to beam smearing from cardiac pulsations, and therefore high dose rates are not needed. Hence, it is conceptually possible to extend this technique by using modified x-ray equipment, creating an opportunity for its implementation at hospitals. In addition, the use of higher beam energies in MBRT (≥ 200 keV (Ref. 23)) than in MRT is feasible,²⁴ resulting in a lower entrance dose to deposit the same integral dose in the tumor. Those advantages triggered the exploration of this new radiotherapeutic approach.

Since the thicker beams and spacings employed in MBRT in comparison with the thin microbeams may lead to different biological effects than the ones observed in MRT,²⁵ experimental studies are warranted to evaluate the possible different tumor and normal tissue responses to MBRT with respect to MRT and the other radiotherapy methods. Functional tissue deterioration rather than direct cellular damage in the beam path may be involved in MBRT.²⁵ The results of the first animal experiments performed at Brookhaven National Laboratory indicate that the thicker beams used in MBRT still provide a remarkable healthy tissue tolerances.¹⁴ This outcome paved the way to the implementation of this novel technique at the ESRF ID17 Biomedical Beamline.²⁶ MBRT might offer a good compromise between providing a good healthy tissue sparing and having the possibility of being extended outside synchrotron sources with a cost-effective equipment. Preclinical studies with small animals are being planned at the ESRF in order to assess the tumor control and normal tissue complication probability curves for this new therapeutic modality.

The precise knowledge of the doses in the preclinical studies is crucial in order to extract valid conclusions for the future possible clinical trials, like the assessment of dose-response of healthy tissues or tumor control probability curves. For that reason an extensive set of measurements and Monte Carlo (MC) simulations were performed in different phantoms. The agreement between the calculations and the experimental data allowed the benchmarking of the MC dosimetry. Finally, the first dosimetry protocol to be used in the preclinical trials was established and it will be described, hereafter.

II. MATERIALS AND METHODS

II.A. Radiation source and minibeam patterns generation

At ID17 Biomedical Beamline, the x-rays source consists in two wigglers with 15 and 12.5 cm period, respectively, and a maximum magnetic field of 1.6 T. In MBRT studies only the first wiggler is used. It is located 40.5 m from the patient positioning system and delivers high intensity

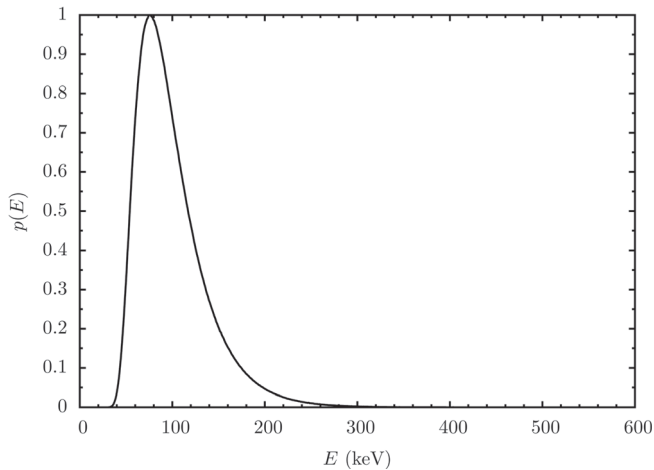


FIG. 1. Energy spectrum at the goniometer (patient) position at ID17 Biomedical Beamline, extracted from Ref. 27.

kilovoltage energy x-ray beams. The x-ray energy spectrum after filtering ranges from about 50 to 600 keV, with a mean energy around 99 keV.²⁷ The energy spectrum (Fig. 1) and beam divergence at the sample position was assessed from a complete modeling of the beamline and benchmarked with experimental data.²⁷

The animals or samples are placed in a three-axis Kappa-type high-precision goniometer (Huber, Germany).²⁸ See Fig. 2. At that position, the maximum field dimensions achievable are 2.5 mm in height and 41 mm in width, approximately. Since the beam height is very thin, the animals or phantoms are scanned vertically through the beam.²⁹

An original method was developed and tested at the ESRF ID17 Biomedical Beamline to produce the minibeam patterns. It utilizes a specially developed high-energy white-beam chopper whose action is synchronized with the vertical motion of the target moving at constant speed. Each opening of the chopper generates a horizontal beam print. The method offers an excellent reliability and allows for an easy control of all the parameters which are essential for the general safety of the treatment.²⁶

A more detailed technical description of the beamline layout can be found elsewhere.²⁸

II.B. Monte Carlo simulations

The MC code PENELOPE 2008 (Refs. 30–32) and penEasy,³³ a structured general-purpose main program for

PENELOPE, were adopted to perform the calculations. In this code, the coupled transport of photons and electrons and its interactions in a wide energy range are considered. The main advantage of this code is a careful implementation of accurate low energy electron cross sections, which are of particular importance in this work. The simulation algorithm is based on a scattering model that combines numerical databases with analytical cross section models for the different interaction mechanisms and it is applicable to energies (kinetic energies in the case of electrons and positrons) from a few hundred electron volts to 1 GeV. PENELOPE uses a mixed simulation scheme in which hard interactions are simulated collision by collision and small angular deflections and energy losses are treated in a grouped manner (the thresholds depend on the simulation parameters).

Since the working energy range is a few hundreds of kilo electron volts the most relevant interactions are photoelectric effect and Compton scattering. The photoelectric cross sections used in PENELOPE are obtained by interpolation in a numerical table that was extracted from the Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL) evaluated photon data library (EPDL).³⁴ Regarding Compton scattering, PENELOPE considers bounding effects and Doppler broadening when simulating Compton interactions. This code has been widely used in the medical physics field, see for example Refs. 35, 36 and in particular for the dose distribution assessment in MRT and MBRT.^{3,23,24,37,38}

II.B.1. Simulation geometry and irradiation configuration

Three geometries were considered in the simulations:

- (1) A homogeneous RW3 (Goettingen White Water) solid-water phantom ($30 \times 30 \times 12$ cm³).³⁹
- (2) A heterogeneous slab phantom ($20 \times 20 \times 5$ cm³) consisting of one slab of bone equivalent material (1 cm thick), two muscle equivalent slabs and two others of RW3 (1 cm-thick each one).⁴⁰
- (3) A rat head phantom consisting in layers of skin (700 μ m), bone (500 μ m), and brain (2.6, 5.2, and 2 cm thickness in lateral, anterior–posterior, and crano-caudal axis, respectively). See Fig. 3. Those thicknesses were extracted from MRI images.²³

Two irradiation geometries were investigated: a unidirectional array (600 μ m wide minibeam with a center-to-center

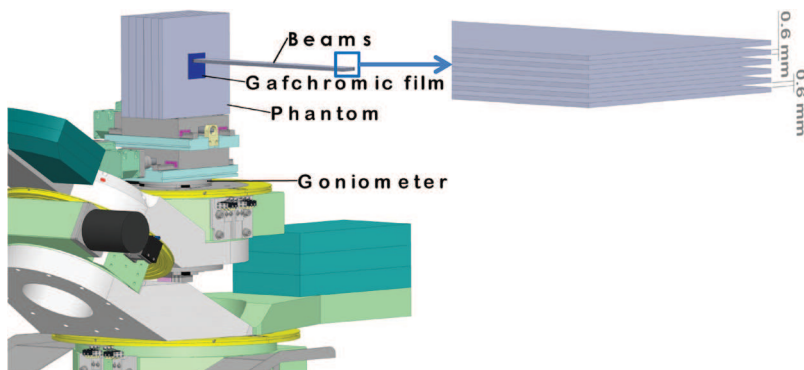


FIG. 2. Scheme of the irradiation setup. The samples are positioned on top of a high-precision goniometer whose vertical translation allows to cover the desired field size.

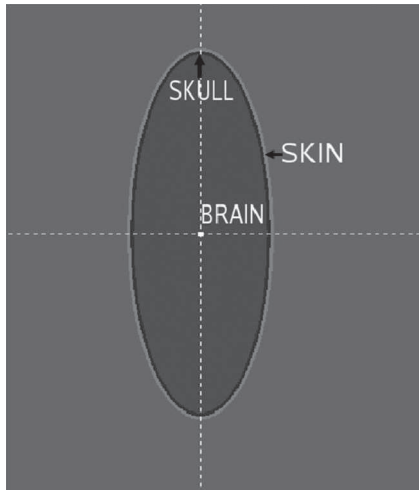


FIG. 3. Coronal view of the rat head phantom. The thickness of the skin ($700\ \mu\text{m}$), the skull ($500\ \mu\text{m}$) and the brain (2.6 and 5.2 cm in the lateral and anterior–posterior directions, respectively) were extracted from MRI images Ref. 23.

(c-t-c) distance of $1200\ \mu\text{m}$), and two orthogonal arrays, one of them in the lateral direction (right to left), the other in the crano-caudal axis. The two arrays intersected in the target position such that the peaks of one of them fill the valleys of the other. This permitted to achieve a quasi-homogeneous dose distribution in the target. A beam width of $640\ \mu\text{m}$ and a c-t-c distance of $1120\ \mu\text{m}$ were found to provide a homogenous dose distribution in a rat head phantom. Further details will be given in Sec. III B. In the rat, the target was the central plane of the tumor position. At the Biomedical Beamline (ESRF) the tumor is usually inoculated at caudate nucleus (9 mm anterior to the ear-bars, *i.e.*, at bregma site, 3.5 mm lateral to the midline, 5.5 mm depth from the skull).^{41,42}

The dose computation was divided into two parts. The absorbed dose distribution for a single minibeam in the phantom was simulated first. Then, at each depth, the single dose distribution was shifted and added to the total dose distribution in order to cover the irradiation field sizes: 1×1 , 2×2 , and $3 \times 3\ \text{cm}^2$. Only the $1 \times 1\ \text{cm}^2$ field size was evaluated in the rat head phantom.

The absorption energy was set to 50 keV for electrons and 5 keV for photons. The cutoff energies for the production of hard inelastic events, WCC, and for the production of hard bremsstrahlung, WCR were set equal to the absorption energy for electrons and photons, respectively. The average angular deflections between two consecutive hard elastic events, C1, and the maximum average fractional energy loss in a single multiple-scattering step, C2, were selected to be 0.1.

Doses were scored in voxels of $50\ \mu\text{m}$ along the lateral direction of the microbeams, 2 mm in the vertical direction of the microbeam and 1 mm in depth. These dimensions were reduced to $25\ \mu\text{m} \times 1\ \text{mm} \times 0.07\ \text{mm}$ for the rat head phantom as a higher spatial resolution was required.

The average statistical uncertainty in the simulations was 0.5% (two standard deviations).

II.C. Dosimetry protocol

This protocol describes a methodology for dosimetry in MBRT preclinical studies. It is based on absorbed dose to water and inspired by the recommendations compiled in the IAEA TRS 398 Code of Practice.⁴³ The main advantage of this methodology is that biological studies can be made on the basis of uniform dosimetry procedures. The different points of this protocol are described hereafter.

II.C.1. Dosimetry equipment

Following the recommendations of the TRS 398 for medium x-ray energies, the dose measurement in reference conditions (see Sec. II C 2) was performed with a semiflex PTW 30010 thimble ionization chamber ($0.125\ \text{cm}^3$).³⁹ As reported in Sec. II A, the maximum field dimensions achievable are 2.5 mm in height and 41 mm in width. Since the beam height is very thin, the animals or phantoms are scanned vertically through the beam. It has been demonstrated that the integration of the dose rate, while scanning the ionization chamber with a constant and well known speed is equivalent to measure the dose deposited with a uniform irradiation.²⁹

The experimental evaluation of the peak dose was performed by using two alternative type of detectors:

- Gafchromic films HD 810,⁴⁴ which provide a very high spatial resolution and a wide dose range (from 10 to 400 Gy). This permits to measure peak and valley doses. A widely used flat bed scanner (EPSON Perfection V750 PRO) was used to analyze the dose deposition in the films following the methodology described in the work by Devic *et al.*⁴⁵
- A large Bragg Peak chamber (PTW 34070), also called as large area chamber (LAC), with a diameter of 4 cm. The collected charge corresponds to both primary and scatter radiations.

Dose measurements were performed both in the homogeneous RW3 (Goettingen White Water) solid-water and the heterogeneous phantoms³⁹ described in Sec. II B. The use of the RW3 instead of water to perform the dosimetry was due to several practical aspects. First, very small misalignments of any element of the beamline or beam emittance changes can lead to differences in dose of up to 10%. Therefore the dose must be measured before each experiment and/or refill of the storage ring. An accurate setting of a water tank in the experimental area at the Biomedical Beamline is very time-consuming. Another reason to use a solid-water phantom is that the handling and accurate positioning of the Gafchromic films to be used in relative dosimetry is very delicate in water. Since the MC simulations were performed in solid-water phantoms and the correlation between the dose deposited in the RW3 and the rat head phantom was established, developing a protocol based on solid-water phantom measurements does not lead to a lack of consistency. In addition, the code of practice TRS 398 (Ref. 43) states that solid-water phantoms could be used for routine measurements provided that the relationship between dosimetry readings in water

and in the solid-water phantom has been established. A $5.7\% \pm 0.1\%$ higher dose deposition in water with respect to RW3 was encountered both by comparing experimental measurements and MC simulations. Consequently, to develop a protocol for preclinical work based on measurements in a solid-water phantom is justified.

II.C.2. Determination of absorbed dose under reference conditions

The first step in this dosimetry methodology is to measure the dose in reference conditions. Following the recommendations of the TRS 398 (Ref. 43) for medium x-ray energies, the center of the cavity volume of the ionization chamber (reference point of the chamber) was placed at 2 g cm^{-2} (reference depth). The reference field size was chosen to be $2 \times 2 \text{ cm}^2$. Since at the working range of energies the average range of the electrons is less than $100 \mu\text{m}$, the lateral electronic equilibrium is guaranteed for that field size. The phantom material was chosen to be RW3 for the reasons explained in Sec. II C 1.

The absorbed dose in the solid-water phantom is then obtained by using the following expression:

$$D_{\text{sw},Q} = M_Q N_{D,\text{sw},Q_0} K_{Q,Q_0} \quad (1)$$

where N_{D,sw,Q_0} is the calibration factor for the beam quality Q_0 in water provided by the calibration laboratory,⁴⁶ corrected by the $5.7\% \pm 0.1\%$ difference in dose deposition in water with respect to RW3. M_Q is the reading of the dosimeter with the reference point of the chamber positioned at the reference depth and corrected for the influence quantities like temperature and pressure (K_{TP}), ionic recombination (K_s), polarity effect (K_{pol}), and electrometer calibration (K_{elec}). K_{Q,Q_0} is a chamber-specific factor which corrects for differences between the reference beam quality Q_0 and the actual beam quality being used Q . Since the Bragg–Gray theory cannot be applied in our case (the secondary electron range is around $10 \mu\text{m}$, much smaller than the detector volume⁴⁷), it is recommended to obtain K_{Q,Q_0} from measurements. The calibration laboratory has provided us with the calibration factor in ^{60}Co and some correction factors K_{Q,Q_0} , around 4%, for different x-ray beam qualities close to our spectrum. The K_{Q,Q_0} value for the closest spectrum (140 kV, 0.5 mm Cu) is 0.953 ± 0.031 .

II.C.3. Determination of absorbed dose under nonreference conditions

II.C.3.a. Peak dose: assessment of the scatter factors. To translate the absolute dose measured in the broad beam configuration to the dose deposited with a minibeam (peak dose), the scatter factors were used. They take into account the different contribution from the scattered radiation as a function of the field size. Due to the low energies used and the fact that the closest collimators are around 2 m away from the patient, the collimator scatter factor is negligible²⁹ and only the scatter radiation originated in the phantom will have a contribution. Therefore, the phantom scatter factor S_p can be assumed to be equal to the total scatter fac-

tor. S_p was determined as the ratio of the dose deposited in the central point of the irradiated field at 2 cm-depth in water by the minibeam and the reference field. Hence, the peak dose at 2 cm-depth in the solid-water phantom can be determined as:

$$D_{\text{peak},2 \text{ cm}} = D_{\text{reference}} \times S_p \times f_{\text{array}} \quad (2)$$

where $D_{\text{peak},2 \text{ cm}}$ refers to the dose deposited by one minibeam (peak dose) at 2 cm depth in water, $D_{\text{reference}}$ is the absolute dose deposited by a $2 \times 2 \text{ cm}^2$ field size at the same depth, S_p is the phantom scatter factor for one minibeam and f_{array} is a factor that takes into account the contribution of the tails of the minibeam to the central peak when an array is used. S_p and f_{array} were assessed by using MC simulations and verified experimentally by using two different methods:

- The ratio of the dose deposited at 2 cm-depth in the RW3 phantom with a $2 \times 2 \text{ cm}^2$ and a $600 \mu\text{m} \times 2 \text{ cm}$ field was assessed by using Gafchromic films.⁴⁴
- The method described in the work of Sánchez-Doblado *et al.*⁴⁸ were followed by employing the LAC described in Sec. II C 1.

II.C.3.b. Relative dosimetry: dose distributions. The depth dose curves were assessed by placing Gafchromic films in the central axis of the phantom which was previously aligned with the beam axis. The lateral profiles were evaluated by irradiating films with different field sizes at different depths. As it has already been stated in the introduction, different biological studies suggest that PVDR is a very relevant dosimetric parameter in spatially fractionated techniques.^{3,18} Therefore, PVDR values were studied.

II.C.3.c. Absorbed dose in the rat head phantom. Absolute peak dose at 1 cm-depth (middle line of the brain) in the rat head phantom ($D_{\text{peak},1 \text{ cm},\text{rat}}$) is obtained from the peak dose at 2 cm-depth in the solid-water phantom ($D_{\text{peak},2 \text{ cm}}$), see Eq. (2), by means of a precalculated (MC) calibration factor ($f_{\text{swater},\text{rat}}$), as expressed by the following equation:

$$D_{\text{peak},1 \text{ cm},\text{rat}} = D_{\text{peak},2 \text{ cm}} \times f_{\text{swater},\text{rat}} \quad (3)$$

The dose at any other point within the rat head phantom can be evaluated by means of the percentage depth dose curves (PDD) and PVDR values.

III. RESULTS

In this section, absolute dosimetry (reference conditions) performed with the protocol described in Sec. II C and the relative dose distributions will be reported. The comparison of the experimental data with MC simulations was used to benchmark the calculations. Dose distributions in the rat head phantom will also be presented.

III.A. Absolute dosimetry

A value of $\dot{D}_{\text{reference}} = 67.2 \text{ Gy/s/mA}$ was obtained for an electron beam current in the storage ring of 189.41 mA. The range of dose rate went from 168 Gy/min for a beam current

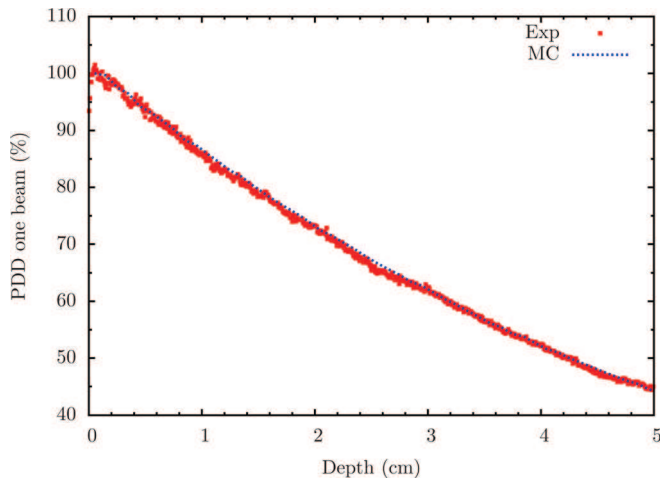


FIG. 4. Experimental (points) and MC PDD (dashed lines) curves for the central minibeam of an array covering an area of $2 \times 2 \text{ cm}^2$.

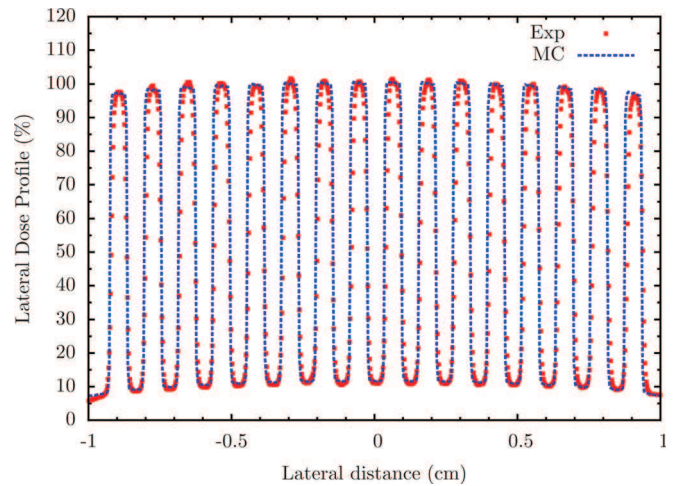


FIG. 5. Experimental (points) and MC (dashed lines) lateral dose profiles at 2 cm-depth for a field size of $2 \times 2 \text{ cm}^2$.

of 150 mA to 224 Gy/min for a beam current of 200 mA, that is to say, one order of magnitude higher than the 6 Gy/min achievable in Rapid Arc (Ref. 49) or VMAT machines.⁵⁰

The peak dose at 2 cm-depth in water was then obtained from $D_{\text{reference}}$ by using Eq. (2). S_p was assessed by using MC simulations (0.80 ± 0.04) and verified with experimental data as described in Sec. II C. A value of 0.77 ± 0.06 was obtained by using Gafchromic films, whereas the LAC chamber method provided a value of 0.82 ± 0.08 . Therefore a good agreement was achieved. The correction factor f_{array} amounted to 1.09 ± 0.02 .

III.B. Relative dosimetry: dose distributions

In this section, the experimental dose distributions obtained when the slabs phantoms (both homogenous and heterogeneous) were irradiated with a unilateral array of minibeam were compared with MC simulations. In addition, the quality of the interlaced configuration was assessed by using Gafchromic films.

III.B.1. Dose distributions in solid-water phantoms

The PDD and lateral dose profiles were evaluated both experimentally and theoretically (MC) for different field sizes (1×1 , 2×2 , and $3 \times 3 \text{ cm}^2$).

Figure 4 depicts the PDD curves for the central minibeam of an array covering an area of $2 \times 2 \text{ cm}^2$. A good agreement between calculations and experimental data was obtained, the global difference being lower than 2%. A satisfactory match was also achieved for the 1×1 and $3 \times 3 \text{ cm}^2$ field sizes. A small buildup (around $800 \mu\text{m}$) in the PDD was observed and consistent with the results of Prezado *et al.*²⁹

Figure 5 shows how the MC simulations reproduce the experimental lateral dose profile at 2 cm-depth assessed by Gafchromic films. Systematic comparisons of theoretical and experimental PVDR values at different depths and several field sizes for the homogenous phantom were performed (see Table I).

Calculations and experimental data agreed within the error bars (corresponding to extended uncertainty, $k=2$). PVDR values diminished as a function of depth, rapidly in the first centimeter and very smoothly after 2 cm-depth. A descend of PVDR values was also observed when the field size (number of beams) augmented, in agreement with other works.^{24,51} The smaller the field sizes were, the more important the decrease in PVDR was, since the tails of the extreme minibeam in the array contribute more to the central valley than in larger field sizes.

Table II shows the satisfactory match of the theoretical and experimental data in a heterogeneous phantom for

TABLE I. Experimental (Exp) and theoretical (MC) PVDR values for different field sizes as a function of depth in a homogenous solid-water phantom.

| Depth (cm) | PVDR $1 \times 1 \text{ cm}^2$ | | PVDR $2 \times 2 \text{ cm}^2$ | | PVDR $3 \times 3 \text{ cm}^2$ | |
|------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|
| | MC | Exp | MC | Exp | MC | Exp |
| 0.3 | 23.4 ± 0.2 | 21.7 ± 2.2 | 14.04 ± 0.07 | 15.2 ± 1.6 | 10.6 ± 0.1 | 11.3 ± 1.2 |
| 0.5 | 20.6 ± 0.2 | 17.4 ± 1.8 | 12.24 ± 0.06 | 12.8 ± 1.2 | 9.33 ± 0.08 | 9.8 ± 1.0 |
| 1.0 | 17.4 ± 0.2 | 17.5 ± 1.8 | 10.05 ± 0.05 | 9.6 ± 1.0 | 7.65 ± 0.07 | 8.1 ± 0.8 |
| 2.0 | 15.4 ± 0.1 | 16.1 ± 1.6 | 8.44 ± 0.04 | 9.3 ± 1.0 | 6.29 ± 0.05 | 6.9 ± 0.6 |
| 4.0 | 14.0 ± 0.1 | 15.1 ± 1.6 | 7.38 ± 0.04 | 8.6 ± 0.8 | 5.23 ± 0.05 | 5.9 ± 0.6 |
| 6.0 | 13.4 ± 0.1 | 12.8 ± 1.2 | 6.94 ± 0.04 | 7.5 ± 0.8 | 4.85 ± 0.05 | 5.4 ± 0.6 |
| 8.0 | 12.9 ± 0.2 | 12.7 ± 1.2 | 6.67 ± 0.04 | 6.7 ± 0.6 | 4.56 ± 0.05 | 5.1 ± 0.6 |

TABLE II. Experimental (Exp) and simulated (MC) PVDR values in a heterogeneous phantom, consisting in 1 cm of bone equivalent material, 2 cm of muscle equivalent slabs, and 2 cm of RW3.

| Depth (cm) | PVDR 1 × 1 cm ² | | PVDR 2 × 2 cm ² | | PVDR 3 × 3 cm ² | |
|------------|----------------------------|------------|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| | MC | Exp | MC | Exp | MC | Exp |
| 1.0 | 12.02 ± 0.09 | 11.0 ± 1.1 | 7.45 ± 0.07 | 7.4 ± 0.7 | 5.94 ± 0.06 | 5.9 ± 0.6 |
| 2.0 | 13.6 ± 0.1 | 13.9 ± 1.4 | 7.50 ± 0.08 | 8.1 ± 0.8 | 5.54 ± 0.06 | 6.4 ± 0.6 |
| 3.0 | 14.1 ± 0.2 | 13.8 ± 1.4 | 7.59 ± 0.09 | 7.8 ± 0.8 | 5.59 ± 0.06 | 6.2 ± 0.6 |
| 4.0 | 14.5 ± 0.2 | 14.0 ± 1.4 | 7.8 ± 0.1 | 8.1 ± 0.8 | 5.66 ± 0.07 | 6.2 ± 0.6 |

several depths. Just after the bone (at 1 cm-depth), PVDR values fell with respect to the homogenous case. Their decrease was more important the smaller the field size was. This PVDR reduction in bone is due to the increase of the fluence of photons that are Compton scattered into the valley region. These photons have a larger probability per unit mass of undergoing a photoelectric absorption in bone since its average atomic number is higher. This results in a higher local dose deposition.³ The PVDR in depth (4 cm) were similar to the ones obtained in the homogenous one (the absolute peak doses being different in the two cases).

The general good agreement between calculations and experimental data achieved permitted to validate the simulations, which showed their performance even in the presence of heterogeneities.

In order to study, the quality of the interlacing at the approximately the tumor position in a rat head phantom, the dose distributions at 1 cm-depth in the solid-water phantom were measured with Gafchromic films. Figure 6 shows that the dose distribution fulfills the requirements to be considered as homogeneous: the dose in the target fitted within 95%–107% of the prescribed dose.⁵²

III.C. Dose distributions in a rat head phantom

Absolute peak dose at 1 cm-depth in the rat head phantom irradiated with an array of eight minibeam covering a 1 × 1 cm² field size was determined by using Eq. (3). The dose at

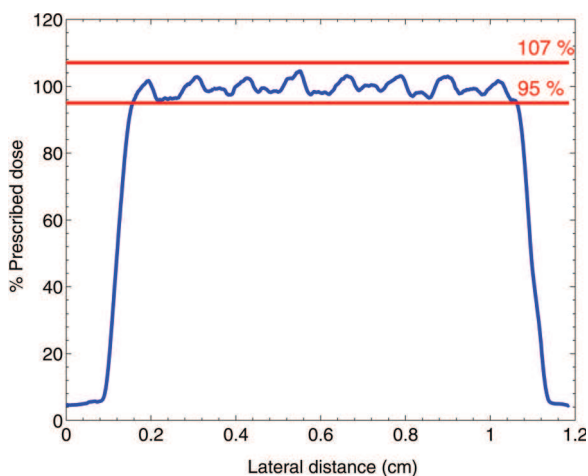


FIG. 6. Dose distribution at 1 cm-depth for an interlaced configuration measured by using the Gafchromic films. The dose distribution fits within the recommended limits (Ref. 52).

any other point within the rat head phantom can be evaluated by means of the PDD and PVDR values. Figures 7 and 8 depict the PDD curves and PVDR, respectively, as a function of depth. An enhanced dose deposition in the bone can be clearly observed in the PDD due to its higher effective atomic number. In parallel, the PVDR falls off rapidly in the bone as it was explained in Sec. III B 1. In the central part of the brain the PVDR remain almost constant. The same trend was observed in other MRT studies.³

Regarding the interlaced configuration, it was determined that a factor 1.12 higher dose in the target was obtained with respect to peak dose in a unidirectional array at the same position. This value was obtained by dividing the calculated dose deposited in the central part of the dose profiles in the interlaced and unidirectional configurations. This factor (1.12) should be taken into account in the dose prescriptions.

IV. CONCLUSIONS

Minibeam radiation therapy is an innovative synchrotron radiation therapy technique with potential of application outside synchrotron sources. Biological studies are planned to evaluate the therapeutic effectiveness of this new approach. For that purpose, a reliable and reproducible dosimetry protocol is essential. In this context, a complete set of measurements and MC calculations were performed on solid-water phantoms and in a rat head phantom for the first time. The spatial dose distributions, depth dose curves and lateral

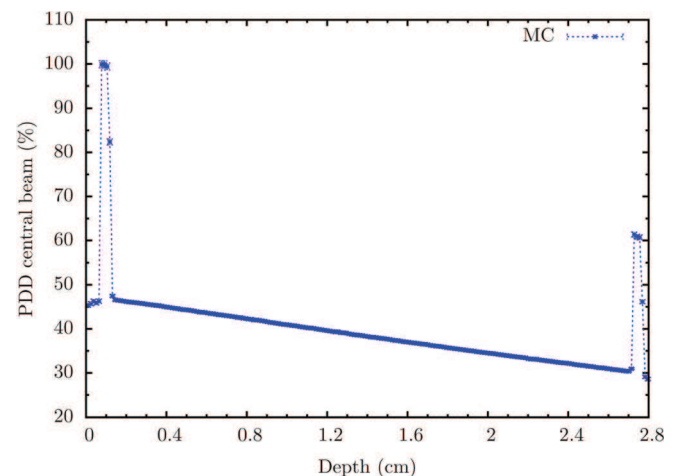


FIG. 7. PDD for the central minibeam in the rat head phantom. An enhancement of dose deposition is observed in the bone due to its high effective atomic number.

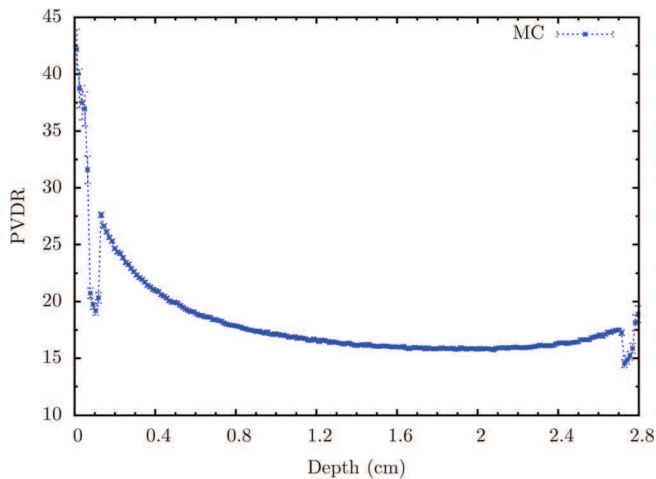


FIG. 8. PVDR values as a function of depth in the rat head phantom.

profiles, were evaluated. The satisfactory agreement between theoretical and experimental values allowed to validate the MC simulations, that had proven their performance not only for homogenous medium but also in presence of heterogeneities. This permitted to establish the first dosimetry protocol to guide the foreseen preclinical studies with small animals. The reproducibility and reliability of this protocol is a relevant feature to perform those biological studies aiming to assess dose-response curves for normal tissue complication probability (NTCP) and tumor control probability (TCP), with the goal of determining the possible therapeutic window for this new radiotherapy modality.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors warmly thank ID17 Biomedical Beamline (ESRF) for the granted beamtime and specially M. Renier and C. Nemoz for support in the realization of the experiments.

^{a)}Electronic mail: prezado@gmail.com

¹H. J. Curtis, "The use of a deuteron microbeam for simulating the biological effects of heavy cosmic-ray particles," *Radiat. Res. Suppl.* **7**, 250–257 (1967).

²Y. R. Lawrence, X. Q. Li, I. El Naqa, C. A. Hahn, L. B. Marks, T. E. Merchant, and A. P. Dicker, "Radiation dose-volume effects in the brain," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **76**, S20–S27 (2010).

³I. Martínez-Rovira, J. Sempau, J. M. Fernández-Varea, A. Bravin, and Y. Prezado, "MC dosimetry for forthcoming clinical trials in x-ray microbeam radiation therapy," *Phys. Med. Biol.* **55**, 4375–4388 (2010).

⁴R. Serduc *et al.*, "In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **64**, 1519–1527 (2006).

⁵D. Slatkin, P. Spanne, F. A. Dilmanian, J. O. Gebbers, and J. A. Laissue, "Subacute neuropathological effects of microplanar beams of x-rays from a synchrotron wiggler," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 8783–8787 (1995).

⁶J. A. Laissue *et al.*, "Microbeam radiation therapy," *Proc. SPIE* **3770**, 38–45 (1999).

⁷F. A. Dilmanian *et al.*, "Response of avian embryonic brain to spatially segmented x-ray microbeams," *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **47**, 485–493 (2001).

⁸J. A. Laissue *et al.*, "The weanling piglet cerebellum: a surrogate for tolerance to MRT (Microbeam Radiation Therapy) in pediatric neurooncology," *Proc. SPIE* **4508**, 65–73 (2001).

⁹N. Zhong, G. M. Morris, T. Bacarian, E. M. Rosen, and F. A. Dilmanian, "Response of rat skin to high-dose unidirectional x-ray microbeams: a histological study," *Radiat. Res.* **160**, 133–142 (2003).

¹⁰R. Serduc *et al.*, "Brain tumor vessel response to synchrotron microbeam radiation therapy: a short-term in vivo study," *Phys. Med. Biol.* **53**, 3609–3622 (2008).

¹¹R. Serduc *et al.*, "Characterization and quantification of cerebral edema induced by synchrotron x-ray microbeam radiation therapy," *Phys. Med. Biol.* **53**, 1153–1166 (2008).

¹²A. Bouchet *et al.*, "Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy on intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **78**, 1503–1512 (2010).

¹³B. Van der Sanden, E. Brauer-Krisch, E. A. Siegbahn, C. Ricard, J. C. Vial, and J. Laissue, "Tolerance of arteries of arteries to microplanar x-ray beam beams," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **77**, 1545–1552 (2010).

¹⁴F. A. Dilmanian *et al.*, "Interlaced x-ray microplanar beams: a radiosurgery approach with clinical potential," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 9709–9714 (2006).

¹⁵J. A. Laissue *et al.*, "Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated x rays," *Int. J. Cancer* **78**, 654–660 (1998).

¹⁶H. M. Smilowitz *et al.*, "Synergy of gene-mediated immunoprophylaxis and microbeam radiation therapy for advanced intracerebral rat 9L gliosarcomas," *J. Neurooncol.* **78**, 135–43 (2006).

¹⁷P. Régnard *et al.*, "Irradiation of intracerebral 9L gliosarcoma by a single array of microplanar x-ray beams from a synchrotron: balance between curing and sparing," *Phys. Med. Biol.* **53**, 861–878 (2008).

¹⁸F. A. Dilmanian *et al.*, "Response of rat intracranial 9L gliosarcoma to microbeam radiation therapy," *Neuro Oncol.* **4**, 26–38 (2002).

¹⁹R. Serduc, E. Brauer-Krisch, A. Bouchet, L. Renaud, T. Brochard, A. Bravin, J. A. Laissue, and G. Le Duc, "First trial of spatial and temporal fractionations of the delivered dose using synchrotron microbeam radiation therapy," *J. Synchrotron Radiat.* **16**, 587–590 (2009).

²⁰F. A. Dilmanian *et al.*, "Murine EMT-6 carcinoma: high therapeutic efficacy of microbeam radiation therapy," *Radiat. Res.* **159**, 632–641 (2003).

²¹M. Miura *et al.*, "Radiosurgical palliation of aggressive murine SCCVII squamous cell carcinomas using synchrotron-generated x-ray microbeams," *Br. J. Radiol.* **79**, 71–75 (2006).

²²B. P. Poncelet, V. J. Wedeen, R. M. Weisskopf, and M. S. Cohen, "Brain parenchyma motion: measurement with cine echo-planar MR imaging," *Radiology* **85**, 645–651 (1992).

²³Y. Prezado, G. Fois, G. Le Duc, and A. Bravin, "Gadolinium dose enhancement studies in microbeam radiation therapy," *Med. Phys.* **36**, 3568–74 (2009).

²⁴Y. Prezado, S. Thengumpallil, M. Renier, and A. Bravin, "X-ray energy optimization in minibeam radiation therapy," *Med. Phys.* **36**, 4897–4902 (2009).

²⁵A. Uyama, T. Kondoh, K. Nariyama, K. Umetani, M. Fukumoto, K. Shinoharad, and E. Kohmura, "A narrow microbeam is more effective for tumor growth suppression than a wide microbeam: an in vivo study using implanted human glioma cells," *J. Synchrotron Radiat.* **18**, 671–678 (2011).

²⁶Y. Prezado, M. Renier, and A. Bravin, "A new method of creating minibeam patterns for synchrotron radiation therapy: a feasibility study," *J. Synchrotron Radiat.* **16**, 582–586 (2009).

²⁷I. Martínez-Rovira, J. Sempau, and Y. Prezado, "Development and commissioning of a MC photon beam model for the forthcoming clinical trials in Microbeam radiation therapy" (submitted).

²⁸M. Renier *et al.*, "The radiotherapy clinical trials projects at the ESRF: technical aspects," *Eur. J. Radiol.* **68S**, S147–S150 (2008).

²⁹Y. Prezado, M. Vautrin, I. Martínez-Rovira, A. Bravin, F. Estève, H. Elleaume, P. Berkvens, and J. F. Adam, "Dosimetry protocol for the forthcoming clinical trials in synchrotron stereotactic radiation therapy (SSRT)," *Med. Phys.* **38**, 1709–1717 (2011).

³⁰F. Salvat, J. M. Fernández-Varea, and J. Sempau, *PENELOPE, a code system for MC Simulation of electron and photon transport*, OECD Nuclear Energy Agency, Issy-les-Moulineaux-France, 2003 Available in PDF-format from the web at www.nea.fr.

³¹J. Sempau, E. Acosta, J. Baró, J. M. Fernández-Varea, and F. Salvat, "An algorithm for MC simulation of coupled electronphoton transport," *Nucl. Instrum. Methods B* **132**, 377–390 (1997).

³²F. Salvat, J. M. Fernández-Varea, and J. Sempau, *PENELOPE, a code system for MC Simulation of electron and photon transport* (OECD Nuclear Energy Agency, Issy-les-Moulineaux-France, 2003), Available in PDF-format from the web at www.nea.fr.

³³J. Sempau and A. Badal, "PenEasy, a modular main program and voxelised geometry package for PENELOPE," (2008), <http://www.upc.edu/inte/downloads/penEasy.htm>

- ³⁴D. E. Cullen, J. H. Hubbell, and L. Kissel, "EPDL97 the evaluated data library, 097 version," Report No. UCRL-50400, 6 (Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore (USA), 1997).
- ³⁵J. Sempau, A. Sánchez-Reyes, F. Salvat, H. Oulad ben Tahar, S. B. Jiang, and J. M. Fernández-Varea, "Monte Carlo simulation of electron beams from an accelerator head using PENELOPE," *Phys. Med. Biol.* **46**, 1163–86 (2001).
- ³⁶J. Torres, M. J. Buades, J. F. Almansa, R. Guerrero, and A. M. Lallena, "Dosimetry characterization of 32P intravascular brachytherapy source wires using MC codes PENELOPE and GEANT4," *Med. Phys.* **31**, 296–304 (2004).
- ³⁷E. A. Siegbahn, J. Stepanek, E. Brauer-Krisch, and A. Bravin, "Determination of dosimetric quantities used in microbeam radiation therapy (MRT) with Monte-Carlo simulations," *Med. Phys.* **33**, 3248–3259 (2006).
- ³⁸J. Spiga, E. A. Siegbahn, E. Brauer-Krisch, P. Randaccio, and A. Bravin, "The GEANT4 toolkit for microdosimetry calculations: application to microbeam radiation therapy (MRT)," *Med. Phys.* **34**, 4322–4330 (2007).
- ³⁹www.ptw.de.
- ⁴⁰www.gammex.com.
- ⁴¹N. Kobayashi, N. Allen, N. R. Clendenon, and L. W. Ko, "An improved rat brain-tumor model," *J. Neurosurg.* **53**, 808–815 (1980).
- ⁴²G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed. (Academic, New York, 1986).
- ⁴³International Atomic Energy Agency "Absorbed dose determination in external beam radiotherapy: an international code of practice for dosimetry based on standards of absorbed dose to water," IAEA Technical Reports Series 398 (IAEA, Vienna, 2005).
- ⁴⁴ISP advanced materials, <http://online1.ispcorp.com/>.
- ⁴⁵S. Devic, J. Seuntjens, E. Sham, E. B. Podgorsak, C. Ross Schmidlein, A. S. Kirov, and G. Soares, "Precise radiochromic film dosimetry using a flat-bed document scanner," *Med. Phys.* **32**, 2245–2253 (2005).
- ⁴⁶www.ptw.de/ssdcalibration.html.
- ⁴⁷C. M. Ma and A. E. Nahum, "Bragg-Gray theory and ion chamber dosimetry for photon beams," *Phys. Med. Biol.* **36**, 413–428 (1991).
- ⁴⁸F. Sánchez-Doblado, G. H. Hartmann, J. Pena, J. V. Rosello, G. Russiello, and D. M. Gonzalez-Castaño, "A new method for output factor determination in MLC shaped narrow beams," *Phys. Med.* **23**, 58–66 (2007).
- ⁴⁹C. Clifton, P. Zhang, Y. Archambault, J. Bocanek, G. Tang, and T. LoSasso, "Commissioning and quality assurance of rapidarc radiotherapy delivery system," *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* **72**, 575–581 (2008).
- ⁵⁰V. Fleygelman, G. Zhang, and C. Stevens, "Initial dosimetric evaluation of SmartArc—A novel VMAT treatment planning module implemented in a multi-vendor delivery chain," *J. Appl. Clin. Med. Phys.* **11**, 1–14 (2010).
- ⁵¹G. Gokeri, C. Kocar, and M. Tombakoglu, "MC simulation of microbeam radiation therapy with an interlaced irradiation geometry and an Au contrast agent in a realistic head phantom," *Phys. Med. Biol.* **55**, 7469–7487 (2010).
- ⁵²International Commission on Radiation Units and Measurements, "Prescribing, Recording, and Reporting Photon Beam Therapy," ICRU Report 50 (International Commission on Radiation Units and Measurements, Bethesda, 1993).

Increase of lifespan for glioma bearing rats by using Minibeam Radiation Therapy

YOLANDA PREZADO,^{a*} AND SUKHENA SARUN,^a SILVIA GIL,^{a,b}

PIERRE DEMAN,^{a,c,d} AUDREY BOUCHET^{a,e} AND GERALDINE LE DUC^a

^a*ID17 Biomedical Beamline, European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), 6 Rue*

Jules Horowitz B.P. 220, 38043 Grenoble Cedex, France, ^b*Centre d'Études en*

Biofísica (CEB), Unitat de Biofísica, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de

Barcelona, Spain, ^c*Inserm, U836, equipe 6, BP170, 38042 Grenoble Cedex, France,*

^d*Université Joseph-Fourier, BP51, 38041 Grenoble Cedex, France,* and ^e*Grenoble*

Institute of Neurosciences, Team 7, Grenoble, France. E-mail: prezado@esrf.fr

(Received 0 XXXXXXXX 0000; accepted 0 XXXXXXXX 0000)

Brain tumours, Minibeam Radiation Therapy, preclinical trials

Abstract

This feasibility work assesses the therapeutic effectiveness of Minibeam Radiation Therapy, a new synchrotron radiotherapy technique. In this new approach the irradiation is performed on 9L gliosarcoma bearing rats with arrays of parallel beams of 500-700 μm width. Two irradiation configurations were compared: a lateral unidirectional irradiation and two orthogonal arrays interlacing at the target. A dose escalation study was performed. The factor three gain in the mean survival time obtained for some animals paves the way to keep exploring the different possibilities of this technique and its further optimization.

1. Introduction

The goal of radiotherapy is to deposit a therapeutic radiation dose in the tumor without exceeding the nearby healthy tissues tolerances. There are some particularly radioresistant tumours, like gliomas, for which the dose-response curves for tumor control and normal tissue complications lay in close proximity with the dose distributions achievable in clinics nowadays. This results in only palliative treatments. This limitation is especially severe in children, due to the high risk of complications in the development of the central nervous system. The management of tumours close to an organ of risk, like the spinal cord, is also very limited. In order to widen the therapeutic window for gliomas, two new radiotherapy techniques are under development at the Biomedical Beamline of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF): Microbeam Radiation Therapy (MRT) and, more recently, Minibeam Radiation Therapy (MBRT).

These techniques combine the use of submillimetric field sizes and a spatial fractionation of the dose. The beam widths range from 25 to 100 μm in the case of MRT and from 500 to 700 μm in MBRT, exploring the limits of what it is called dose-volume effect: the smaller the field size is, the higher the tolerances of the healthy tissues are (Curtis *et al* 1967, Lawrence *et al* 2010). Very high doses (≥ 50 Gy) are delivered in one fraction by using arrays of intense parallel x-ray beams mean energy at around 100 keV (Siegbahn *et al* 2006)). The interbeam separation is 200 μm or 400 μm in the case of MRT and 600 μm in MBRT.

During the last two decades, several experiments have shown the sparing effect of the healthy tissues provided by MRT on the central nervous system of several animal models (Slatkin *et al* 1995, Laissue *et al* 1999, Dilmanian *et al* 2001, Laissue *et al* 2001, Regnard *et al* 2008, Serduc *et al* 2008). In addition, a remarkable preferential tumoricidal effect at high doses has been observed (Laissue *et al* 1998, Laissue *et al*

1999, Dilmanian *et al* 2002, Dilmanian *et al* 2003, Smilowitz *et al* 2006, Miura *et al* 2006, Regnard *et al* 2008, Serduc *et al* 2009).

The thin microbeams (and their associated small beam spacing) need high dose rates, only available at synchrotrons nowadays. This is due to the fact that since microbeams are closely packed, it is important that the tissue/target does not move during the irradiation due to the cardiosynchronous pulsations (Poncelet *et al* 1992). Such motions would smear out the dose in between the microbeams and therefore would jeopardize the tissue sparing effect of the microbeams. This limits their widespread clinical implementation. In addition, the high lateral scattering produced by beam energies higher than 200 keV would lead to the loss of the healthy tissue sparing (Prezado *et al* 2009a). The requirement of low-energy beams limit the dose penetration to the tissue. To overcome those difficulties, A. Dilmanian *et al.* (Dilmanian *et al* 2006) proposed the so called Minibeam Radiation Therapy (MBRT). They have hypothesized that beams as thick as 0.68 mm keep (part of) the sparing effect (Dilmanian *et al* 2006) observed in MRT, supporting a potential application of minibeam to treat tumors with minimal damage to the surrounding healthy tissues. In addition, from MRT preclinical studies there are indications that a wider beam results in a higher tumoricidal effect (Serduc *et al* 2009). Moreover, in MBRT the use of higher beam energies is feasible (Prezado *et al* 2009b), resulting in a lower entrance dose to deposit the same integral dose in the tumor. It requires lesser precision of targeting and synchronization than microscopic beams. The clinical implementation of interlaced MBRT (Dilmanian *et al* 2006) producing a broad beam at the target is technically much less challenging than with thinner beams. The dose profiles of minibeam are not as vulnerable as the ones of microbeams to beam smearing from cardiac pulsations, therefore high dose rates are not needed and it is conceptually possible to extend this technique by using modified x-ray equipment.

For the aforementioned reasons, a new method has been developed and tested at the ESRF ID17 Biomedical Beamline to produce the minibeam patterns (Prezado *et al* 2009c). It utilizes a specially developed white-beam chopper. The method offers an excellent reliability and allows for an easy control of all the parameters which are essential for the general safety of the treatment. Following the results of Dilmanian *et al* 2006, at the ESRF the minibeam patterns are produced with a beam thickness of 640 μm and a center-to-center (c-t-c) distance of 560 μm . This method was applied to treat the rat 9L glioma model, commonly used in MRT. Two different MBRT geometry configurations were studied:

- (i) a single array of minibeam patterns (unidirectional);
- (ii) two orthogonal arrays interlacing at the target, such that, a quasi-homogeneous dose distribution in the tumor is achieved while the healthy tissue still benefits from the spatial fractionation of those submillimetric beams.

Survival lifespan of 9L glioma rat model after each of those irradiation configurations will be compared.

2. Materials and Methods

2.1. Radiation source

The ESRF is one of three synchrotrons with the highest energy and brilliance in the world. At ID17 Biomedical Beamline, the x-rays source consists in two wigglers with 15 cm and 12.5 cm period, respectively, and a maximum magnetic field of 1.6 T. It is located 40 meters from the patient positioning system and delivers high intensity kilovoltage energy x-ray beams. The x-ray energy spectrum after filtering ranges from about 50 to 500 keV, with a mean energy around 100 keV (Siegbahn *et al* 2006). The maximum field dimension achievable are 3 mm height and 36 mm width. Since the beam height is very thin, the animals are scanned vertically through the beam.

The synchrotron beams at the target position have negligible divergence (allowing the production of sharply-defined beam edges in tissue) and high flux (exceeding the flux of a tungsten-anode x-ray tube by 5 orders of magnitude). A more detailed technical description of the beamline layout can be found in the work of Renier *et al* 2008.

2.2. Dosimetry

The dose deposited on the rat brain was assessed both theoretically (Monte Carlo simulations) and experimentally. The Monte Carlo code used is PENELOPE 2006 (Salvat *et al* 2003). In this code all relevant physical processes for photons (photoelectric effect, Rayleigh and Compton scattering) as well as for electrons (elastic scattering and ionization) are considered. Dose distributions (peak and valley doses) have been assessed both in a water and a rat phantoms. Experimental validation of the calculations was performed by using radiochromic films HD-810 placed at different depths in a water-equivalent phantom (Prezado *et al* 2009c). Absolute dose for a seamless field of $2 \times 2 \text{ cm}^2$ at 1.0 cm depth was measured with an ionization chamber (PTW 31002) in the same water-equivalent phantom. The dose measured in this broad field configuration was converted to peak doses at 1.0 cm depth by using the phantom scatter factors calculated by Monte Carlo simulations and verified experimentally by using gafchromic films. The peak dose at 1 cm depth in water was then converted to dose deposited at 1 cm depth in the rat phantom by means of a precalculated (Monte Carlo) calibration factor.

2.3. Intracerebral gliosarcoma model in rat

The 9L gliosarcoma cell line (Coderre *et al* 1994, Régnard *et al* 2008) was established by Benda *et al* 1971. Cells were grown with complete medium at 37°C. The anesthetized male Fisher 344 rats (180–250 g, Charles River, L'Arbresle, France) were

placed on a stereotactic head holder (model 900, David Kopf Instruments, Tujunga, USA). 10^4 cells were suspended into 1 μ l DMEM with antibiotics (1%) and then injected using a Hamilton syringe through a burr hole in the right caudate nucleus (9 mm anterior to the ear-bars, i.e. at bregma site, 3.5 mm lateral to the midline, 5.5 mm depth from the skull) (Kobayashi *et al* 1980, Paxinos *et al* 1986).

At all the stages of the experiment (innoculation and irradiation), the rats were anesthetized with 4% isoflurane inhalation followed by an intraperitoneal injection of xylazine/ketamine (64.5/5.4 mg/kg). All operative procedures related to animal care strictly conformed to the Guidelines of the French Government with licenses 380825 and B3818510002 and they were reviewed by the Internal Evaluation Committee for Animal Welfare and Rights of the ESRF.

2.4. Radiation exposure

36 tumor bearing rats were treated 10 days after tumor implantation as follows:

-6 rats were not irradiated and were used as control.

-10 rats were irradiated unidirectionally by the lateral direction (right to left) with an escalation in doses. The irradiation was performed with an array of 6 horizontal minibeam, 640 μ m wide and 1120 μ m center-to-center (ctc) distance, covering an area of 8×8 mm².

-20 rats were irradiated by using two orthogonal arrays of interlaced minibeam: one of them in the lateral direction (right to left), the other in the craneo-caudal direction, covering an area of 8×8 mm² as well.

The size of the tumor, assessed by MRI the day before irradiation, was 2×3 mm².

A dose escalation study was performed. The dose prescriptions (at 1 cm depth) were:

-Unidirectional (lateral) irradiation: 100 Gy peak dose (9 Gy valley dose) (n=3), 150 Gy peak dose (13 Gy valley dose) (n=3) and 180 Gy peak dose (16 Gy valley dose) (n=4). The doses were chosen such that they were within safe limits observed in the work of Dilmanian *et al* 2006.

-Interlaced irradiation: 40 Gy (n=6), 53 Gy (n=5), 70 Gy (n=6) and 100 Gy (n=3).

The figure 2.4 shows the dose distributions at 1 cm depth in a solid water phantom, measured with gafchromic films, for the unidirectional (up) and interlaced irradiations (down), respectively. In the latter one, the dose distribution fulfills the requirements to be considered as homogeneous: the dose in the target fits within 95-107 % of the prescribed dose (ICRU 50, 1993).

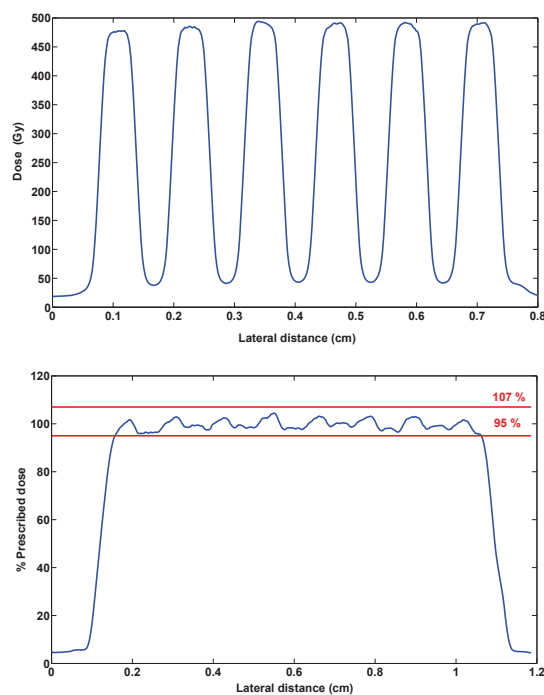


Fig. 1. Dose distributions at 1 cm depth in a solid water phantom for an unidirectional irradiation (up) and for an interlaced configuration (down). The distributions were measured by using gafchromic films.

For irradiation the rats were positioned on a home-made holder and fixed by the

teeth and ears on top of a 3-axis Kappa-type goniometer (Huber, Germany) (Renier *et al* 2008). For each rat a radiochromic film HD 810 was positioned in front of the rat head. The inspection of the films ensured the quality of the irradiation.

2.5. Survival analysis

The clinical status of the rats was checked twice per week. At a later tumor stage, some rats were euthanized by intra-cardiac injection of sodium pentobarbital at less than 1 day before their anticipated death as judged by clinical signs (Laissue *et al* 1998). Some of them were found dead. The time between implantation and death was recorded as survival time. The median survival time post-implantation was calculated and Kaplan Meier survival data were plotted versus time after tumor implantation. The increase in lifespan in percent (%ILS) characterizes the difference between median survival time for treated and untreated rats divided by the median survival time for untreated rats. The survival curves were compared using the log-rank test between the irradiated groups and the controls.

2.6. Histologic analysis

The irradiated brains were sampled and frozen in formalin after the death/euthanasia of the rats. Ten microns transversal brain sections were cut at -20°C using a cryotome (Microm HM560, France) and stained according the standard Haematoxylin-Eosin (HE) procedure (Regnard *et al* 2008).

2.7. Magnetic resonance imaging (MRI)

The rats receiving interlaced irradiation (100 Gy) underwent an MRI examination on day 21 after implantation.

Images were acquired using a 7 T Bruker imaging system coupled with a bird cage radiofrequency coil by applying:

1. T₂ weighted Turbo RARE SE sequence (TE = 11 ms, TR = 4000 ms).
2. T₁ weighted Turbo RARE SE sequence (TE = 4.85 ms, TR = 800 ms) after gadolinium chelate injection through the tail vein.

3. Results

3.1. Survival curves

The survival curves and the detailed values of mean survival time (MeST) and increase in life span (ILS) are reported in Figure 2 and Table 1, respectively. The control (CTRL) rats exhibited a mean survival of 19 days. The difference between survival curves for irradiated series versus control series was significant for most of the curves except for unidirectional irradiation at 150 Gy and 180 Gy, with no increase in life span. The best MeST were obtained when performing interlaced irradiation at 70 Gy and 100 Gy with an increase of life span of 100 % and 215 %, respectively.

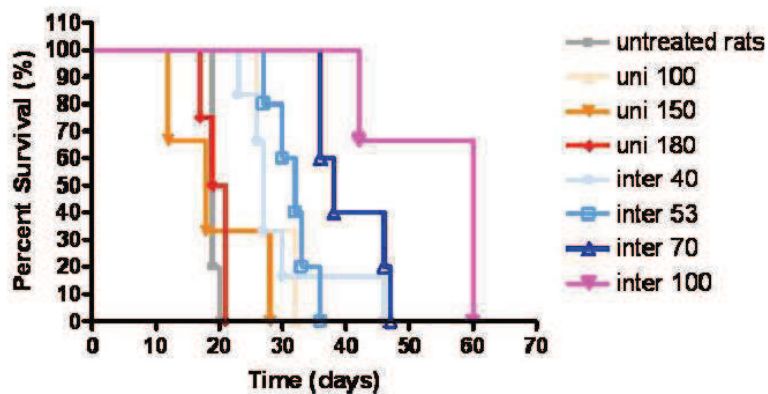


Fig. 2. Survival curves (as a function of time) of 9L gliosarcoma bearing rats for different doses. The response of both the control rats (CTRL) and the rats receiving one fraction minibeam radiation therapy in unidirectional and interlaced configurations are shown.

Table 1. *Mean survival time (MeST) and the corresponding standard error of the mean (SEM), increase of life span (ILS), significance versus control (Sign. vs CTRL) and p values for the two irradiation geometries and dose groups. "Uni" refers to unidirectional irradiation, "Inter" to interlaced configuration.*

| Series | N. of rats | Dose (Gy) | MeST (SEM) (days) | ILS (%) | Sign. vs CTRL | p value |
|-----------|------------|-----------|-------------------|------------|---------------|---------|
| CRTL | 6 | n/a | n/a | 19.0 (0.3) | n/a | n/a |
| Uni 100 | 3 | 100 | 27 (2) | 42 | S | 0.0082 |
| Uni 150 | 3 | 150 | 18 (4) | -5 % | NS | |
| Uni 180 | 3 | 180 | 20 (3) | 5 % | NS | |
| Inter 40 | 6 | 40 | 27 (1) | 42 % | S | 0.0008 |
| Inter 53 | 4 | 53 | 32 (2) | 68 % | S | 0.0016 |
| Inter 70 | 6 | 70 | 38 (2) | 100 % | S | 0.0016 |
| Inter 100 | 3 | 100 | 60 (6) | 215 % | S | 0.0082 |

3.2. Follow-up of the animals

Few days before death the rats showed typical signs of tumor presence, like chromodacryorrhea, tarnished hairs, prostration, weakness and difficulty to feed.

3.3. H/E coloration and MRI images

The recurrence of tumor growth was observed in all the rats and it appears as an evidence on the HE staining. For example, the figure 3 shows how the tumor invaded the hemisphere in one of the rats that received 100 Gy interlaced irradiation. All the rats a very large tumor either invading the right hemisphere or spreading at the margin of the left hemisphere at the rat death. The MRI images were taken 21 days after implantation. Aedema is observed in the T₂ weighted sequence while disruption of blood brain barrier appears in the T₁ weighted sequence with gadolinium contrast, indicating the presence of a tumor.

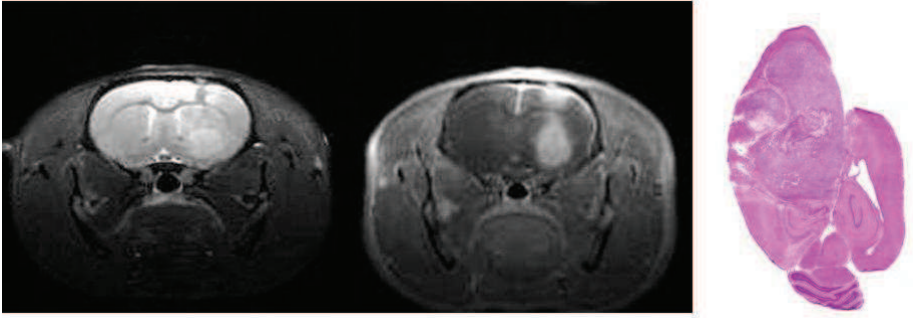


Fig. 3. Left: T2 weighed image. Center: T1 weighted sequence with gadolinium contrast. The MRI were performed on the 21st day after tumor implantation. The presence of the tumor on the right hemisphere is observed. Right: An example of H/E stained brain cut of series Inter 100. The tumor occupies the right hemisphere completely.

4. Discussion

The beam type (photons, electrons, protons, etc.), the beam quality, dose delivery methods (fractionation scheme, dose rate, spatial distribution, etc.) have a direct impact on the biological effect of the radiation (Steel *et al* 2002). The modification of any of the afore mentioned parameters implies a different biological response and it might lead to the shift of the healthy tissue complication probability curve to higher doses, opening in this way the therapeutic window for gliomas. This idea is the basis of two new radiotherapy techniques: Microbeam Radiation Therapy (MRT) and, more recently, Minibeam Radiation Therapy (MBRT). These techniques present distinct features with respect to conventional radiotherapy methods:

1. Submillimetric field sizes are used, exploring the limits of what it is called dose-volume effect.
2. The dose is spatially fractionated: very high doses (≥ 50 Gy) are delivered in one fraction by using arrays of intense parallel beams. The interbeam separation is 200 μm or 400 μm in the case of MRT and 600 μm in MBRT.

3. The x-ray energy spectrum employed ranges from 50 to 500 keV, with a mean energy at around 100 keV (Siegbahn *et al* 2006).
4. Extremely high dose rates (≥ 5000 Gy/s) have been used up to date in order to provide a fast irradiation.

The preclinical studies performed until in MRT now indicate that the change of those four parameters lead to an opening of the therapeutic window for gliomas. Although the biological mechanisms playing a role in MRT irradiation are not fully known yet, the healthy tissue sparing effect in the beam paths has been attributed to rapid biological repair of the microscopic lesions by the minimally irradiated cells contiguous to the irradiated tissue slices (Serduc *et al* 2006). This reparation effect has also been observed in experiments with high energy photons (Hopewell *et al* 2000). To explain this phenomenon it has been formulated what it is called stem cell depletion hypothesis: for each organ it exists a limiting critical volume, which can be repopulated by a single surviving stem cell and for which damage can be repaired by repopulation (Yaes *et al* 1988).

However the widespread implementation of MRT is restrained due to its technical difficulty and the need of very high dose rates, only available in synchrotrons nowadays. MBRT has potential to overcome those limitations.

In this study the effectiveness of MBRT for 9L glioma treatment was investigated. Tumor bearing rats were irradiated with two different geometries, unidirectional and interlaced configurations, with an escalation of doses. The MeST of CTRL rats of 19 days is in agreement with similar protocols (Regnard *et al.* 2008). The unidirectional series do not provide a significant improvement with respect to untreated controls. This might indicate that the valley doses in the target (maximum 12 Gy for 180 Gy peak dose) are not high enough. This is coherent with the minimum lethal dose for cells found while performing in vitro studies (20 Gy valley dose) (Sarun *et al.* 2010).

Moreover, the fact that rats in the groups at 150 and 180 Gy died within few days after irradiation might point at healthy tissue toxicity.

In contrast, interlaced irradiation provides a significant increase in both MeST and ILS with respect to the controls. This gain augments as a function of the dose delivered. The highest increment ($\times 3$) in MeST was obtained with an interlaced irradiation for the highest dose (100 Gy), reaching an ILS of 215 %. That MeST (60 days) is comparable to the one obtained with the standard ESRF interlaced MRT configuration (65 days) (Bouchet *et al.* 2010). Additionally, the mean survival time observed by depositing 20 Gy with broad beam irradiation (unidirectional) in the same experimental conditions was equal to 24 days (n=12) (detailed results not shown).

While the remarkable healthy tissue sparing in MRT have already been clearly demonstrated by numerous experiments, in MBRT the first experiments performed by A. Dilmanian *et al.* 2006 indicate that minibeam keep part of the healthy tissue sparing shown by the thinner beams. However further histological analysis is needed for confirmation. Despite probably loosing in normal tissue sparing, MBRT is technically easier to implement than MRT and it offers the possibility of being extended towards hospitals with cost-effective x-ray equipment.

The results obtained in this study could be improved by:

1. The use of image guidance. Due to the fact that the irradiations were performed using anatomical landmarks for target positioning, the field sizes used were large in comparison with the target size. This led to an increase in healthy tissue damage around the target, specially in the interlaced irradiation geometry. Moreover, since image-guidance was not used, part of the tumor might have scaped from the irradiated area.
2. Employing new combinations of chemo-radiotherapy.
3. Exploiting the dose enhancement effect in the tumor by using high atomic number

elements (Prezado *et al.* 2009a).

Theoretical advantages of MBRT over the existing clinical radiotherapy and radiosurgery methods might include the following:

1. Due to its lower impact on the non-targeted tissue, it might allow the use of high potentially curative doses in those clinical cases in which cure is not possible today.
2. Second, it might allow re-treatment of the Central Nervous System (CNS) months or years after the initial treatment(s).
3. The reduced penumbras ($\leq 100 \mu\text{m}$) make MBRT the best candidate for what is starting to be called microradiosurgery for the treatment of illnesses like epilepsy (Anschel *et al* 2007), without significant secondary effects. In addition, it could be used for the treatment of tumours close to an organ at risk, like the spinal cord.

5. Conclusions

Minibeam radiation therapy is an innovative synchrotron radiation therapy technique with potential of application outside synchrotron sources. In this work the effectiveness of a single fraction MBRT to treat glioma bearing rats has been assessed. Two different irradiation configurations (unidirectional and interlaced) and different doses have been studied. While unidirectional irradiation showed no benefit with respect to untreated controls, the interlaced geometry provided a significant enhancement of MeST (a factor 3 with respect to controls) and in life span (215 %). Those results evidence the feasibility of this new technique to treat gliomas. Improvement of the outcome is expected by using image-guidance, chemo-radiotherapy, etc. in future studies.

Acknowledgements

The authors warmly acknowledge the granted beamtime at the ID17 Biomedical Beamline at the ESRF. The authors would like to thank the support of the ID17 and

the Animal Facility staff at the ESRF. The authors specially thank A. Bravin for the reading of this manuscript, C. Le Clec'h and R. Serduc for help with the histology analysis.

References

- Anschel D J, Romanelli P, Benveniste H *et al.* 2007 Evolution of a focal Brain Lesion Produced by Interlaced Microplanar x-rays *Minim Invas Neurosurg* **50** 43-46
- Benda P, Someda K, Messer J and Sweet W 1971 Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture *J Neurosurg* **84** 310–323
- Bouchet A, Lemasson B, Le Duc G *et al.* 2010 Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy of intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks *Int J Rad Oncol Biol Phys* **78** 1503–12.
- Coderre J A, Button T M, Micca P L, Fisher C D, Nawrocky M M and Liu H B 1994 Neutron capture therapy of the 9L rat gliosarcoma using the p-boronophenylalanine-fructose complex *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **30** 643-52
- Curtis H J 1967 The use of a deuteron microbeam for simulating the biological effects of heavy cosmic-ray particles *Rad. Res. Suppl.* **7** 250–7
- Dilmanian F A, Morris G, Le Duc G *et al.* 2001 Response of avian embryonic brain to spatially segmented x-ray microbeams *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **47** 485–93
- Dilmanian F A, Button T, Le Duc G *et al.* 2002 Response of rat intracranial 9L gliosarcoma to microbeam radiation therapy *Neuro Oncol.* **4** 26–38
- Dilmanian F A, Morris G M, Zhong N, Bacarian T, Hainfeld J F, Kalef-Ezra J, Brewington L J, Tammam J and Rosen E M 2003 Murine EMT-6 carcinoma: high therapeutic efficacy of microbeam radiation therapy *Radiat. Res.* **159** 632–41
- Dilmanian F A, Zhong Z, Bacarian T, Benveniste H, Romanelli P, Wang R, Welwart J, Yuasa T, Rosen E M and Anschel D J 2006 Interlaced x-ray microplanar beams: A radiosurgery approach with clinical potential *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** 9709-14
- ICRU, International Commission on Radiation Units and Measurements, report 50, Prescribing, Recording, and Reporting Photon Beam Therapy (1993).
- Joel D D, Fairchild R G, Laissue J A, Saraf S K, Kalef-Ezra J A, and Slatkin D N 1990 Boron neutron capture therapy of intracerebral rat gliosarcomas *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **87** 9808–9812.
- Kobayashi N, Allen N, Clendenon N R and Ko L-W 1980 An improved rat brain-tumor model *J Neurosurg* **53** 808-15
- Laissue J A *et al.* 1998 Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays *Int. J. Cancer* **78** 654–60
- Laissue J A *et al.* 1999 Microbeam radiation therapy *SPIE* **3770** 38–45

- Laissue J A *et al.* 2001 The weanling piglet cerebellum: a surrogate for tolerance to MRT (microbeam radiation therapy) in pediatric neuro-oncology *SPIE* **4508** 65–73
- Laissue J A, Blattmann H, Wagner H P, Grotzer M A and Slatkin D N 2007 Prospects for microbeam radiation therapy of brain tumours in children to reduce neurological sequelae *Dev. Med. Child. Neurol.* **49** 577-81
- Lawrence Y R, Li X Q, El Naqa I, Hahn C A, Marks L B, Merchant T E and Dicker A P 2010 Radiation dose-volume effects in the brain *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **76** S20–27
- Miura M, Blattmann H, Bräuer-Krisch E, Bravin A, Hanson A L, Nawrocky M M, Micca P L, Slatkin D N and Laissue J A 2006 Radiosurgical palliation of aggressive murine SCCVII squamous cell carcinomas using synchrotron-generated x-ray microbeams *Br. J. Radiol.* **79** 71–75
- Paxinos G and Watson C (ed) 1986 *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates* (New York: Academic)
- Poncelet B P, Wedeen V J, Weisskopf R M and Cohen M S 1992 Brain parenchyma motion: measurement with cine echo-planar MR imaging *Radiol* **85** 645–651
- Prezado Y, Fois G, Le Duc G and Bravin A 2009a Gadolinium dose enhancement studies in microbeam radiation therapy *Med. Phys.* **36** 3568–74
- Prezado Y, Thengumpallil S, Renier M and Bravin A 2009b X-ray energy optimization in Minibeam Radiation Therapy *Med Phys* **36** 4897–4902
- Prezado Y, Renier M and Bravin A 2009c A new method to create minibeam patterns for Synchrotron Radiation Therapy: a feasibility study *J Synchr Rad* **16**, 582–586.
- Regnard P, Le Duc G, Brauer E, Tropes I, Siegbahn EA, et al. 2008 Irradiation of intracerebral 9L gliosarcoma by a single array of microplanar x-ray beams from a synchrotron: balance between curing and sparing *Phys. Med. Biol.* **53** 861–78
- Renier M, Brochard Th, Nemoz C, Requardt H *et al.* 2008 The radiotherapy clinical trials projects at the ESRF: Technical aspects *Eur J Radiol* **68S** 147-150
- Salvat F, Fernández-Varea J M and Sempau J 2006 *PENELOPE-2006, A Code System for Monte Carlo Simulation of Electron and Photon Transport* (Issy-les-Moulineaux, France: OECD Nuclear Energy Agency)
- Sarun S, Gil-Duran S, Fauquette W *et al.* 2010 A kinetic in vitro survival response of glioma cell lines using Synchrotron Minibeam Radiation Therapy, *Radiotherapy and Oncology* **96** S255.
- Serduc R, Vérant P, Vial J C *et al.* 2006 In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **64** 1519–1527
- Serduc R, van de Looij Y, Francony G *et al.* 2008 Characterization and quantification of cerebral edema induced by synchrotron x-ray microbeam radiation therapy *Phys Med Biol* **53** 1153-66
- Serduc R, Bouchet A, Bräuer-Krisch E *et al.* 2009 Synchrotron microbeam radiation therapy for rat brain tumor palliation influence of the microbeam width at constant valley dose *Phys Med Biol* **54** 6711-6724

- Siegbahn E A, Stepanek J, Bräuer-Krisch E and Bravin A 2006 Determination of dosimetical quantities used in microbeam radiation therapy (MRT) with Monte Carlo simulations *Med. Phys.* **33** 3248–59
- Slatkin D N, Spanne P, Dilmanian F A, Gebbers J O and Laissue J A 1995 Subacute neuropathological effects of microplanar beams of x-rays from a synchrotron wiggler *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** 8783–7
- Smilowitz H M *et al.* 2006 Synergy of gene-mediated immunoprophylaxis and microbeam radiation therapy for advanced intracerebral rat 9L gliosarcomas *Neuro Oncol.* **78** 135–43
- Steel G G, Adams G E and Horwich A 2002 *Basic Clinical Radiobiology* London: Edward Arnold
- Yaes R J and Kalend A 1988 Local stem cell depletion model for radiation myelitis *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **14** 1247–59.

Synopsis

A new radiotherapy technique, combining submillimetric field sizes and a spatial fractionation of the dose, is under development at the Biomedical Beamline of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF). In this new approach, called Minibeam radiation therapy, the irradiation is performed with an array of parallel beams of 500-700 μm width. Those field sizes might offer a good compromise between keeping (part) of the healthy tissue sparing observed in thinner beams and having the possibility of extending this technique towards hospitals, if proven successful. A new method has been developed at the ESRF to produce minibeam patterns based on a white-beam chopper. In this work the therapeutic effectiveness of single fraction Minibeam Radiation Therapy (MBRT) on 9L gliosarcoma bearing rats is assessed.

Intracerebral delivery of 5-iodo-2'-deoxyuridine in combination with synchrotron stereotactic radiation for the therapy of the F98 glioma

Julia Rousseau,^{a,b,c} Jean-François Adam,^{a,b,c,d} Pierre Deman,^{a,b,c} Ting-Di Wu,^{e,f} Jean-Luc Guerquin-Kern,^{e,f} Barbara Gouget,^g Rolf F. Barth,^h François Estève^{a,b,c,d} and Hélène Elleaume^{a,b,c,d*}

^aINSERM U836, Equipe 6, Grenoble 38043, France, ^bUniversité Joseph Fourier, Grenoble 38043, France, ^cEuropean Synchrotron Radiation Facility, Medical Beamline ID17, Grenoble 38043, France, ^dCentre Hospitalier Universitaire, Grenoble 38043, France, ^eInstitut Curie, Laboratoire de Microscopie Ionique, Orsay 91405, France, ^fINSERM U759, Orsay 91405, France, ^gLaboratoire Pierre Süe, Groupe Toxicologie Humaine et Environnementale, CEA-CNRS UMR 9956, Gif-sur-Yvette 91191, France, and ^hDepartment of Pathology and Division of Biostatistics, The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210, USA. E-mail: h.elleaume@esrf.fr

Iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy takes advantage of the radiation dose-enhancement produced by high-*Z* elements when irradiated with mono-energetic beams of synchrotron X-rays. In this study it has been investigated whether therapeutic efficacy could be improved using a thymidine analogue, 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUdR), as a radiosensitizing agent. IUdR was administered intracerebrally over six days to F98 glioma-bearing rats using Alzet osmotic pumps, beginning seven days after tumor implantation. On the 14th day, a single 15 Gy dose of 50 keV synchrotron X-rays was delivered to the brain. Animals were followed until the time of death and the primary endpoints of this study were the mean and median survival times. The median survival times for irradiation alone, chemotherapy alone or their combination were 44, 32 and 46 days, respectively, compared with 24 days for untreated controls. Each treatment alone significantly increased the rats' survival in comparison with the untreated group. Their combination did not, however, significantly improve survival compared with that of X-irradiation alone or chemotherapy alone. Further studies are required to understand why the combination of chemoradiotherapy was no more effective than X-irradiation alone.

Keywords: glioma; IUdR; intracerebral delivery; osmotic pump; radiation therapy.

1. Introduction

High-grade gliomas are almost uniformly fatal despite aggressive multimodality treatments (Behin *et al.*, 2003; Croteau & Mikkelsen, 2001). Efforts to improve their prognosis using innovative radiation therapy techniques have included stereotactic radiosurgery (Phillips *et al.*, 1994), intensity-modulated radiation therapy (Cardinale *et al.*, 1998), boron neutron capture therapy (Barth *et al.*, 2005), Auger electron emitter therapy (Kassis, 2003) and synchrotron stereotactic radiotherapy (SSR) (Adam *et al.*, 2003, 2006; Biston *et al.*, 2004; Rousseau, Boudou, Barth *et al.*, 2007). In iodine-enhanced SSR, the tumor is selectively loaded with an iodinated compound and then stereotactically irradiated with a monochromatic beam of 50 keV X-rays, restricted to the tumor volume, as determined by imaging. The resulting radiation geometry produces a sharp dose distribution around

the tumor. In addition, the fluorescent X-rays, photoelectrons and Auger electrons generated by the photoelectric effect on the high-*Z* element atoms produce a localized dose enhancement (Rousseau, Boudou, Estève *et al.*, 2007; Boudou *et al.*, 2004, 2005). The use of X-rays with energies in the 10–100 keV range is essential for the success of this approach, owing to the prevalence of the photoelectric effect at these energies. In contrast, X-rays produced by medical accelerators (5–25 MV) would provide less than 10% dose enhancement from the photoelectric effect (Robar *et al.*, 2002). The tunable and intense monochromatic X-ray beams, generated with synchrotron sources, are therefore essential for optimizing the therapeutic efficacy of this treatment. For the irradiation of rats and mice, iodine dose-enhancement is maximum for X-ray energies of ~50 keV and can reach 250% in the presence of an iodine contrast agent at a concentration of 10 mg ml⁻¹ (Adam *et al.*, 2003; Corde *et al.*, 2004; Estève *et al.*, 2002).

We have recently shown that suitable iodine bio-distributions could be obtained in F98 rat glioma, by intracarotid or intravenous (i.v.) infusion of the iodinated contrast agent (Iomeron) in combination with the intracarotid infusion of mannitol to transiently disrupt the blood brain barrier (Adam *et al.*, 2005, 2006). A significant improvement in the survival of F98 glioma-bearing rats was obtained when the animals were irradiated in the presence of iodine (doses ≤ 15 Gy) compared with irradiation alone (Adam *et al.*, 2006), although no long-term survivors were observed in that study. The failure of iodine-enhanced SSR to cure these rats may have been due to its inability to uniformly produce lethal DNA damage. Since iodinated contrast agents remain in the extra-cellular space (Lorusso *et al.*, 1994), the 17 keV photoelectrons emitted by iodine atoms have a limited range (~ 10 μm), and produce a small amount of DNA damage. To improve the effectiveness of SSR, we have investigated the possible use of stable iodine, incorporated into the DNA of tumor cells *via* 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUdR), in combination with 50 keV X-rays to generate a cascade of Auger electrons (Fairchild *et al.*, 1982). This can be produced by using either radioactive IUdR, labelled with an Auger emitter such as ^{123}I or ^{125}I (Bodei *et al.*, 2003), or stable ^{127}I -IUdR and external X-rays with energies above the *K*-edge of iodine (Berry & Kinsella, 2001). It has been shown that 95% of Auger electrons have energies below 3 keV with high linear energy transfer (LET). These particles would have a greater relative biological effectiveness comparable with that of α particles (Karnas *et al.*, 1999). Monte Carlo simulations have shown that these high-LET particles could produce more than one DNA double-strand break per decay, and therefore they should be lethal to cells that have incorporated IUdR (Terrissol *et al.*, 2004).

Karnas *et al.* (1999) have shown, both theoretically and experimentally, that the optimum energy for obtaining the maximum dose-enhancement in the presence of IUdR is not just above the iodine *K*-edge (33.17 keV) but at a higher energy of 50 keV. We have come to a similar conclusion using the SQ20B squamous cells pre-treated with non-radioactive IUdR. The optimal energy for producing maximum radiosensitization was 50 keV, and not 33.5 keV (Corde *et al.*, 2004). Owing to the very short range of Auger electrons, iodine atoms must be incorporated into the DNA of tumor cells in order to produce DNA damage. Since IUdR is transported through the cell membrane and incorporated into DNA in competition with thymidine (Thd) during the S phase of the cell cycle, it is a very good radiosensitizer. Efficient radiosensitization has been obtained with Thd analogs and the effect is dependent on both a sufficient uptake of the analog into DNA on a per cell basis and on maximizing the proportion of cells with Thd replacement (Doiron *et al.*, 1999; Kassis *et al.*, 1998; Kinsella *et al.*, 1987). Prolonged and loco-regional administration of radioactive ^{125}I -IUdR was effective in treating the rat 9 L gliosarcoma with a 10–20% cure rate (Kassis *et al.*, 1998). Several clinical trials are underway to evaluate the therapeutic efficiency of this treatment (Bodei *et al.*, 2003). Mairs *et al.* (2000) have shown that a single injection of 0.37 MBq of ^{125}I -IUdR in 10 μL labelled only 6% of tumor

cells in C6 glioma-bearing rats whereas similar amounts of ^{125}I -IUdR released from polymer or infused continuously *via* an osmotic pump labelled 22% and 34% of tumor cells, respectively. Using a xenograft model for a head and neck cancer, Harrington *et al.* (2004) obtained their best results with pegylated liposome-encapsulated IUdR administered over seven days.

In the present study, we have evaluated the feasibility and therapeutic potential of SSR combined with loco-regional administration of ^{127}I -IUdR. Total iodine tissular content in rat brain was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry and the intracellular localization of iodine was determined by an analytical imaging technique using a secondary ion mass spectrometry nanoprobe (NanoSIMS-50) (Guerquin-Kern *et al.*, 2005; Usami *et al.*, 2008).

2. Materials and methods

2.1. Animals and tumor implantation

Male Fischer rats (240–280 g) were purchased from Charles River Laboratory (L'Abresles, Rhône, France). All operative procedures and animal care were in conformity with the Guidelines of the French Government (Décret 87-848, 19 October 1987, licences #7593 and #A38185-10002) and were approved by the European Synchrotron Radiation Facility Ethical Committee. The F98 rat glioma has been propagated both *in vitro* and *in vivo* and has proven to be a useful model for evaluating a variety of therapeutic modalities (Barth & Kaur, 2009). Cells were routinely cultured as monolayers in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin and streptomycin. For tumor cell implantation, the rats were anaesthetized by inhalation of isoflurane followed by an intraperitoneal injection of ketamine, 64.5 mg kg⁻¹ of body weight, mixed with xylazine, 5.4 mg kg⁻¹ of body weight. Supplemental intraperitoneal injections of ketamine and xylazine were administered, as needed, to maintain sedation. The animals' eyes were lubricated with an ocular lubricant. For these experiments, 1000 F98 cells in 10 μL of serum-free DMEM (containing 1% agarose with a gelling temperature < 303 K) were stereotactically implanted into the right caudate nucleus (3.5 mm right to the bregma and 5.0 mm in depth) of the rats. A syringe pump (model KDS 310, GENEQ Inc., Montréal, Québec, Canada) was mounted directly on the stereotactic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, California, USA) and the syringe (model 702N, Hamilton) was attached to the pump. A 22 s-gauge needle was first inserted, 3.5 mm to the right of the bregma to a depth of 5.5 mm from the skull, and then withdrawn to its target depth in the brain (5.0 mm from the skull surface), following which F98 cells were injected over 16 s. The needle was left in place for an additional 2 min and then withdrawn slowly. The burr hole was then filled with bone wax and the operative field was cleaned with betadine before closure of the scalp incision.

2.2. Chemotherapeutic agents and intracerebral infusion

Stable dry ^{127}I -IUdR was obtained from Sigma-Aldrich (Fluka BioChemika). The IUdR powder was first solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich). Sterile water then was added to obtain a final concentration of 20 mg ml^{-1} of IUdR in 50% DMSO. In our previous studies, it was established that rats tolerated an intracerebral (i.c.) infusion of drugs solubilized in 50% DMSO and administered by Alzet osmotic pumps over 72 h (Barth *et al.*, 2004). Alzet osmotic pumps (model #2001) and Alzet brain infusion kits (model #2, rigid stainless-steel cannula, 5 mm, 28 gauge) were purchased from Charles River Laboratories (L'Abresles, Rhône, France). The osmotic pumps were filled with the IUdR solution and stored in the dark in a sterile saline (9%) solution at 310 K for 24 h prior to implantation. Seven days later, the rats were anaesthetized as previously described, and the pump was inserted subcutaneously into a pocket created with a hemostat into a mid-scapular incision on the rat's dorsum with a sufficient amount of catheter tubing to permit free motion of the animal's head and neck. The distal end of the catheter was connected to a 28 gauge brain infusion cannula, which was inserted stereotactically to a depth of 5 mm from skull surface and the cannula was fixed with surgical glue. The Alzet pump was left in place from day 7 to day 13 after tumor implantation, during which time the animals received an infusion of ^{127}I -IUdR (20 mg ml^{-1}), delivered at a rate of $1\text{ }\mu\text{L h}^{-1}$.

2.3. *In vivo* uptake of IUdR in F98 glioma-bearing rats

For inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and secondary ion mass spectrometry (SIMS) analysis, F98 glioma-bearing rats received an i.c. infusion of IUdR delivered by osmotic pumps, as described above.

2.3.1. ICP-MS: tissue preparation for iodine quantification.

Following infusion, the animals were euthanized and the brains were removed immediately and stored at 193 K until sample preparation. Five samples of brain were taken: three contiguous 2 mm coronal sections were taken from the tumor area, the second one being located at the injection site. The fourth section was taken from the ipsilateral tumor-bearing right hemisphere at the site of tumor implantation, and the last was taken from the contralateral non-tumor-bearing left cerebral hemisphere.

Brain samples were dried for 2 days at 333 K and weighed. Iodine contents ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) were quantified as previously described (Milgram *et al.*, 2008). Briefly, samples were acidified with ultrapure 65% nitric acid (Normatom quality grade, VWR ProLabo, Fontenay sous Bois, France) and dissolved in ultrapure water. Iodine concentrations were measured using an X7 series quadrupole Thermo Elemental apparatus (Thermo Electron Corporation, Cergy-Pontoise, France) calibrated with a SPEX CertiPrep standard (Jobin Yvon, Longjumeau, France). Rhodium, rhenium and beryllium were used as internal standards ($1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) and the SRM 1640 certified solution (NIST, USA) was analysed at the beginning of each experiment to control the quality of trace elements analysis.

2.3.2. NanoSIMS: tissue preparation and analysis.

Imaging by NanoSIMS was used to assess the subcellular localization of iodine in tumor. Once anaesthetized, the rat received an intracardiac perfusion of formaldehyde (4%) by means of a peristaltic pump (Roth Cyclo II, Roth) in order to fix the tissue. The brain then was removed and stored in formaldehyde (Roti, Histofix 10%; Roth Sochiel, France), until 1 mm^3 samples were cut, corresponding to the injection site. These samples were embedded in an epoxy resin and then cut into $0.300\text{ }\mu\text{m}$ serial sections; some were stained with toluidine blue and placed on glass slides for histological examination using light microscopy, and the others were placed on silicon holders for SIMS analysis. Imaging of iodine atoms distribution was carried out using a NanoSIMS-50 ion nanoprobe (CAMECA, Gennevilliers, France) operated in scanning mode. This technique, based on SIMS, allows direct identification of chemical elements with a high degree of sensitivity and specificity and can be used for chemical mapping to visualize the elemental distribution of different atomic species. The instrument was equipped with a magnetic spectrometer using a parallel detection system that could acquire simultaneously data up to five atomic species with different masses. The magnetic field was set to detect the heaviest mass (in the present study $m_1 = 127$) on one of the largest radius detectors. The other movable detectors were positioned to detect CN^- , P^- and S^- at masses of 26, 31 and 34, respectively. We have selected the isotope 34 of sulfur rather than the more abundant 32 isotope owing to the magnetic field used to detect iodine and the limitation with spacing between adjacent detectors that does not allow simultaneous detection of ^{31}P and ^{32}S . The primary ion beam was generated from a caesium source with an energy of 16 keV and its intensity was around 5 pA for typical experiments, with a probe size of $\sim 150\text{ nm}$ in diameter (defined as 16–84% rise distance of the signal intensity). The probe was stepped over the sample in a 256×256 pixel raster of $40\text{ }\mu\text{m}$ to generate secondary ion images. The typical dwell time was 15 ms pixel^{-1} . The image processing was performed using *ImageJ*, a public-domain Java image-processing program (Abramoff *et al.*, 2004), to obtain a proper co-localization of the observed structures on the processed maps for all of the ion species. These processed elemental maps could then be correlated with the light microscope images.

2.4. Irradiation protocol

Animals were irradiated with a single 15 Gy dose of monochromatic X-rays from the European Synchrotron Radiation Facility ID17 beamline, according to the procedure described elsewhere (Adam *et al.*, 2006; Biston *et al.*, 2004). Briefly, the right cerebral hemisphere was centred on the rotational axis and the beam dimensions were adjusted to $10\text{ mm} \times 1\text{ mm}$. The complete irradiation was performed with continuous rotation of the rat in 15 adjacent 360° arcs, so that the planning target volume encompassed a cylinder of diameter 10 mm and height 15 mm. The prescribed dose of 15 Gy at the site of the tumor was determined by means of Monte Carlo simulations (Boudou *et al.*, 2004, 2005). Rats that

received IUdR were irradiated with 50 keV monochromatic X-rays, corresponding to the maximum dose-enhancement observed *in vitro* (Corde *et al.*, 2004; Karnas *et al.*, 1999). Three-dimensional synchrotron radiation quantitative computed tomography (SRCT) of the rat head was performed before radiation therapy (skin entrance X-ray dose: 0.15–0.20 Gy) without the injection of a contrast agent. The images were used for tumor centring and dosimetry. The rats were randomly divided into four groups as follows: (i) untreated controls ($n = 17$); (ii) ^{127}I -IUdR injection alone ($n = 12$); (iii) irradiation alone (15 Gy) on day 14 after implantation ($n = 8$); (iv) ^{127}I -IUdR plus irradiation (15 Gy), on day 14 after implantation and 24 h after completion of the infusion ($n = 10$).

2.5. Evaluation of tumor growth by means of computed tomography (CT)

Tumor growth was assessed by SRCT (Rousseau, Boudou, Estève *et al.*, 2007) in a subset of animals, 15 to 18 days after tumor implantation. CT images were acquired with 35 keV monochromatic X-rays after tail vein injection of 1 ml of pre-warmed (310 K) iodinated contrast agent (Iomeron; iodine concentration: 350 mg ml⁻¹), followed by 1 ml of NaCl. Three-dimensional axial SRCT images (1 mm slice thickness, 1 mm spacing) were acquired, starting 5–10 min after completion of the i.v. iodine infusion. The detector used in this study was made of high-purity germanium, segmented into 432 elements with 0.35 mm pixel size (Eurisy Mesures, Lingolsheim, France). Image reconstruction was performed using the *SNARK89* filtered back projection algorithm (Herman *et al.*, 1989). The images were analyzed using IDL processing software (Interactive Data Language, Research Systems Inc., Boulder, Colorado, USA).

The iodine concentrations in all voxels of the rat's brain were estimated using

$$c = (\mu - \mu_0)/(\mu/\rho)_{E,I}, \quad (1)$$

where c [g ml⁻¹] is the iodine concentration, μ [cm⁻¹] is the linear attenuation coefficient measured in the SRCT images after iodine infusion, and μ_0 [cm⁻¹] is the linear attenuation coefficient of rat brain tissue without iodine. μ_0 was measured in several regions of interest: $\mu_0 = 0.3149 \pm 0.0001$ cm⁻¹ at 35 keV. $(\mu/\rho)_{E,I}$ is the iodine mass attenuation coefficient at energy E ; in this study $(\mu/\rho)_{35\text{keV,I}} = 31.23$ cm² g⁻¹.

The images were acquired ~5 min after the bolus injection. The tumor volume index was computed by a semi-automatic technique. A region of interest (ROI) was grown starting from a seed of voxels that had a value exceeding a given threshold. This was defined as the contralateral brain attenuation coefficient plus three times the noise amplitude. The skull bone ($\mu = 0.68$ cm⁻¹) was automatically subtracted from the ROI by applying an upper threshold of 0.46 cm⁻¹, a value that empirically never reached the tumor, and corresponded to an iodine concentration of >11.5 mg ml⁻¹. The ROIs were visually inspected before being included in the calculation of tumor volume.

2.6. Health monitoring of the animals and statistical analysis

Rats were followed after treatment by weighing them daily and monitoring their food intake, external appearance and locomotion. The combination of sustained weight loss, ataxia and peri-orbital haemorrhage (Redgate *et al.*, 1991) indicated that death was imminent, and such animals were euthanized by intracardiac injection of Dolethal (1 ml kg⁻¹) (Vetoquinol, Lure, France). The survival time was calculated by adding one day to the date of euthanization. Kaplan–Meier survival curves were plotted and pairwise comparisons were made using the Mantel–Cox log rank test (JMP, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). In addition, the percent increase life spans (ILS) relative to the mean survival times (MST) and median survival times (MeST) of the untreated control group were computed.

2.7. Histopathology

Following death or euthanization, the brains of all rats were removed and then fixed in 10% buffered formalin. Following fixation, they were cut coronally at the level of the optic chiasm and 2 mm anterior and posterior to it. Slices were embedded in paraffin, sectioned at 4 μm, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and then examined microscopically to assess histopathologic changes. The tumor size index (TSI) was determined from H&E stained coronal sections, using a semi-quantitative grading scale ranging from 0 to 4. Each section was scored as follows: 0, no tumor; 1, very small (*i.e.* microscopic, <1 mm); 2, small (~1–3 mm); 3, large (~4–7 mm); and 4, massive (>8 mm).

3. Results

3.1. *In vivo* uptake of IUdR in F98 tumor-bearing rats

3.1.1. ICP-MS. Tissue accumulation of iodine in an F98 tumor-bearing rat brain infused with 20 mg ml⁻¹ of IUdR for six days at 1 μL h⁻¹ is shown in Fig. 1. Three samples (2 mm thick) of the ipsilateral brain were cut ~2 mm rostral and caudal to the site of infusion. The maximum amount of iodine was found in sections corresponding to the tumor site. The concentrations for iodine were 6.04, 15.53 and 35.71 μg g⁻¹ (dry weight) in the tumor volumes 1, 2 and 3, respectively. The corresponding values for ipsilateral (non-tumor area) and contralateral brain were 2.45 and 0.04 μg g⁻¹, respectively.

3.1.2. NanoSIMS. Sections stained with toluidine blue (Fig. 2*a*) were used to control the quality of the blocks and to locate targeted tumor cells for further analysis. Ultrastructural details such as the nuclei, nucleoli, nuclear envelopes and intracellular structures were visible on the CN⁻ image (Fig. 2*b*). The P⁻ image was representative of phosphorylated macromolecules, corresponding mainly to nucleic acids, and permitted identification of the nuclei (Fig. 2*c*). The location of S atoms (Fig. 2*d*) corresponded mostly to the location of proteins in the cell (cytoplasm, nucleus and mostly membranes). Detection of iodine is presented in Fig. 2(*e*). The simultaneous detection of CN⁻, P⁻ and S⁻ ions permitted identification of the location of iodine in the cells. It appears

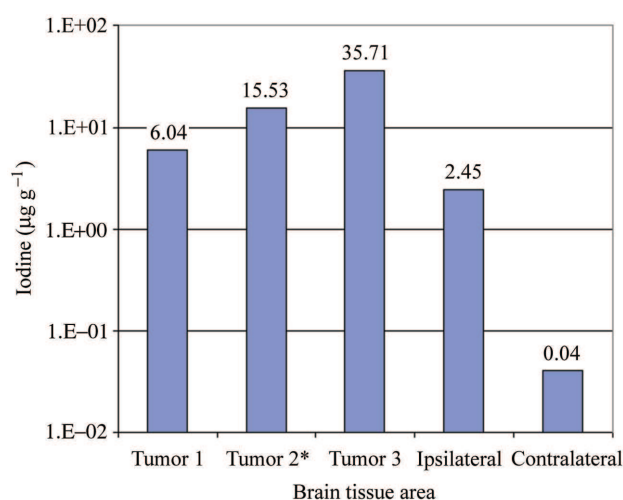


Figure 1

Tissue accumulation of iodine measured by ICP-MS. Iodine concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) were measured in a F98 tumor-bearing rat brain infused with 20 mg ml^{-1} of IUdR for six days at $1 \mu\text{L h}^{-1}$. Three contiguous 2 mm coronal sections of the ipsilateral brain were taken from the tumor area, the second one being located at the injection site (Tumor 2*). The fourth section was taken from the ipsilateral tumor-bearing right hemisphere, and the last was taken from the contralateral non-tumor-bearing left cerebral hemisphere.

that iodine was aggregated only in the nuclei. Furthermore, iodine was accumulated in condensed chromatin located on the internal nuclear membrane. No iodine was detected either in the cytoplasm or in the extracellular medium.

3.2. Therapeutic response

The survival data are summarized in Table 1. Implantation of 10^3 F98 glioma cells resulted in the death of all untreated animals. The corresponding Kaplan–Meier plots are shown in

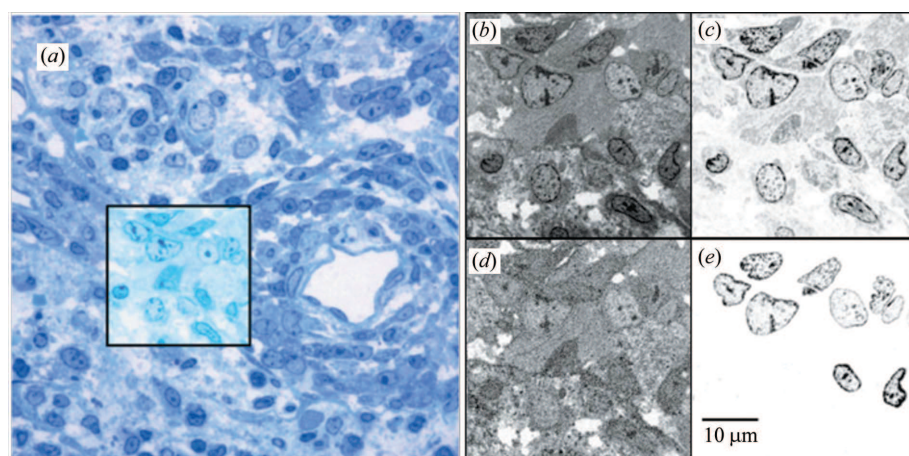


Figure 2

Iodine location at the subcellular level determined by SIMS analysis. The F98 glioma-bearing rat received an intratumoral injection of IUdR during six days by means of osmotic pump. Panel (a) corresponds to a light microscopy view of a brain section stained with toluidine blue. The boxed part in panel (a) is the tumor brain area chosen for SIMS analysis. The panels (b), (c), (d) and (e) represent the corresponding SIMS analysis of CN^- , P^- , S^- and I^- ions, respectively, in this tumor brain area. Grey scale: white corresponds to low concentrations or the absence of the ion detected; black corresponds to high concentrations of the ion detected.

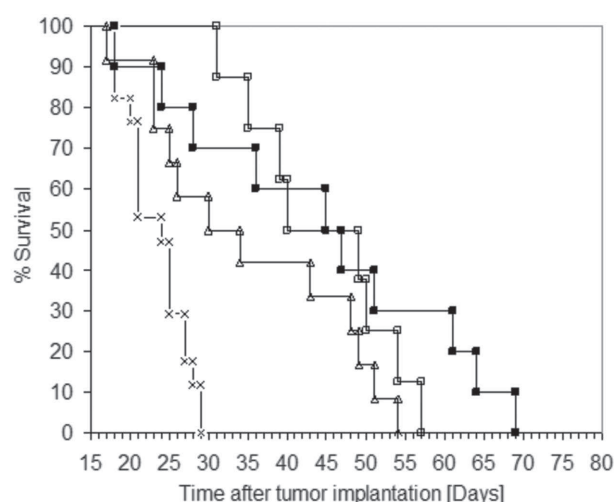


Figure 3

Kaplan–Meier survival curves for F98 glioma-bearing rats after chemoradiotherapy. Survival times in days after tumor implantation have been plotted for untreated animals (crosses), infusion of $^{127}\text{IUdR}$ with osmotic pump 20 mg ml^{-1} alone (triangles), irradiation alone (single fraction of 15 Gy) (open squares) or in combination with $^{127}\text{IUdR}$ delivered by osmotic pump 20 mg ml^{-1} (filled squares). IUdR was administered for six days starting seven days after tumor implantation. X-ray dose was delivered in a single fraction on day 14 after tumor implantation. Note: in the IUdR group, two rats died at the anaesthesia and were not included in the analysis.

Fig. 3. The proportional hazards assumption was checked by comparing the four groups overall (a single log-rank test for the four curves, $p < 0.001$). The statistical tests results are summarized in Table 2. The MeSTs of untreated rats (24 d) and those that received $^{127}\text{I-IUdR}$ alone (32 d) were significantly different ($p = 0.002$). The MeST of rats that received $^{127}\text{I-IUdR}$ in combination with X-irradiation (46 d), however, was not statistically different ($p = 0.104$) from that of rats treated with $^{127}\text{I-IUdR}$ alone (32 d). The log-rank test was not used to test the difference between $^{127}\text{I-IUdR}$ in combination with radiation and irradiation alone (MeST = 44 d), since the survival plots crossed each other. In such cases the log-rank test is unlikely to detect differences between groups (Klein & Moeschberger, 2003).

3.3. Computed tomographic imaging

CT images of two representative animals are shown in Fig. 4 (slice thickness: 1 mm, rats imaged 17 or 18 d after tumor implantation). The tumor was clearly visible on six CT scans of an untreated animal (Fig. 4a) with a tumor size of $\sim 180 \text{ mm}^3$. On the other hand, the tumor was not detectable when the rats received IUdR alone treatment over six days (Fig. 4b). The tumor volumes were calculated in a subset

Table 1

Survival times of F98 glioma-bearing rats after chemoradiotherapy.

$^{127}\text{IUdR}$ (20 mg ml^{-1}) was injected by means of osmotic pumps starting on day 7 after tumor implantation. The infusion lasted for six days, at a rate of $1 \mu\text{L h}^{-1}$. Radiotherapy (single fraction of 15 Gy) was delivered on day 14 after inoculation of 1000 F98 glioma cells.

| Group | Survival time (days) | | | ILS | |
|--|----------------------|-------------------------|--------|------|--------|
| | Survival range | Mean \pm SE \dagger | Median | Mean | Median |
| Untreated ($n = 17$) | 18–29 | 23 ± 1 | 24 | – | – |
| $^{127}\text{IUdR}$ ($n = 12$) | 17–54 | 35 ± 4 | 32 | 52% | 33% |
| Irradiation 15 Gy ($n = 8$) | 31–57 | 44 ± 3 | 44 | 91% | 83% |
| $^{127}\text{IUdR}$ + irradiation 15 Gy ($n = 10$) | 18–69 | 44 ± 6 | 46 | 91% | 92% |

\dagger SE is the standard error of the mean.

Table 2

Log-rank and Wilcoxon statistical tests results.

| Groups comparison | Statistical test | |
|--------------------|------------------|--------------|
| | Log-rank | Wilcoxon |
| IUdR/untreated | 0.002 | 0.013 |
| X/untreated | <0.001 | <0.001 |
| IUdR + X/untreated | <0.001 | 0.003 |
| IUdR + X/IUdR | 0.104 | 0.213 |
| IUdR + X/X | NA \dagger | NA \dagger |

\dagger NA: not applicable. The tests were not performed since the survival plots cross each other. In that case they are unlikely to detect differences between groups.

number of animals in each group. All the treatments, *i.e.* chemotherapy alone, irradiation alone or their combination, lead to a decrease of the tumor growth as shown in Fig. 5.

3.4. Neuropathologic evaluation

Untreated control rats had large (TSI = 3.4) highly invasive tumors that had the characteristic appearance of the F98

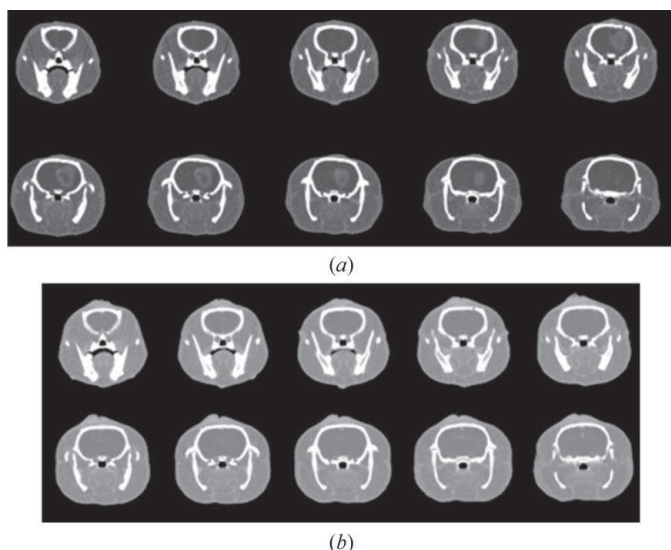


Figure 4

Synchrotron computed tomography. Ten consecutive CT images (slice thickness: 1 mm) of the rat head of two representative animals. (a) Untreated animal, imaged 18 days after tumor implantation, survival time 21 days; the tumor is clearly visible on six slices with a tumor volume index of $\sim 180 \text{ mm}^3$. (b) Group ‘IUdR alone’; imaged on day 17 after tumor implantation; survival time 51 days. The tumor was no longer detectable after IUdR infusion over six days (b), even with an optimized grey level windowing.

glioma (Clendenon *et al.*, 1990). Animals that received $^{127}\text{I-UdR}$ alone, administered by Alzet osmotic pumps, generally had smaller tumors (TSI = 2.33), and one out of eight rats was tumor free. The brain of this animal had a microscopic porencephalic cyst surrounded by atypical non-proliferating tumor cells in the white matter. Another animal had a tumor as well as an abscess, which was composed of polymorphonuclear leukocytes and macrophages. Rats that received $^{127}\text{I-UdR}$, administered by Alzet osmotic pumps, in combination with a single 15 Gy dose of X-irradiation, all had tumors (TSI = 3.0). Many of these were subcortical, and a few extended into the leptomeningeal space. A small brain abscess, not contiguous with the tumor, was seen in the brain of one rat. There were no changes suggestive of either a drug or radiation effect.

4. Discussion

In the present study, we have evaluated prolonged *i.c.* infusion of $^{127}\text{I-UdR}$ as a radiosensitizer for iodine-enhanced SSR. Auger cascades can be induced by photoactivation of stable iodine with an external X-ray beam tuned at the appropriate energy (Fairchild *et al.*, 1982; Karnas *et al.*, 1999, 2001), providing that a sufficient amount of iodine has been incorporated in the tumor cells. In addition, since Auger electrons have relatively short paths in tissue (Karnas *et al.*, 2001; Moiseenko *et al.*, 2002), the iodine atoms have to be located close to the nucleus.

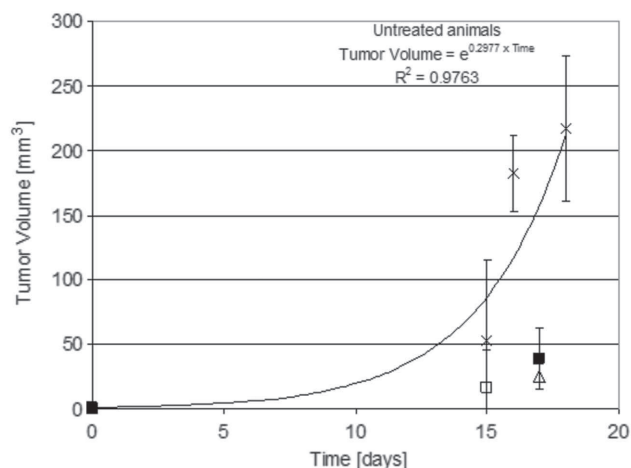


Figure 5

Tumor growth *versus* time for the different treatments. Tumor volumes measured using the CT images for a subset of rats in each group. Untreated animals (crosses), $n = 11$; infusion of $^{127}\text{IUdR}$ with osmotic pump 20 mg ml^{-1} alone (triangles), $n = 6$; irradiation alone (single fraction of 15 Gy) (open squares), $n = 5$; or in combination with $^{127}\text{IUdR}$ with osmotic pump 20 mg ml^{-1} (filled squares), $n = 5$. IUdR was administered for six days starting seven days after tumor implantation. The line corresponds to an exponential fit of the ‘untreated group’ survival data.

Karnas *et al.* (1999) have evaluated the macroscopic dose-enhancement ratio (defined as the ratio of mass energy absorption coefficients for IUdR-DNA to that of DNA) for monoenergetic X-rays and for varying levels of thymidine substitution. For 50 keV X-rays they found a dose-enhancement ratio of 2, with 20% thymidine replacement. The *in vitro* results that we obtained in a previous study (Corde *et al.*, 2004) were found to be in good agreement with those theoretical dose-enhancement estimations. Recently, Karnas and his collaborators have used Monte Carlo methods to model the initial DNA damages from Auger electron emission from stable iodine atoms incorporated in DNA (Karnas *et al.*, 2001). Using 50 keV X-rays and 20% thymidine substitution, they estimated the number of double strand breaks (DSBs) from Auger cascades to be 1.86 per Gy. In comparison with the usual yields of DSBs for X-ray irradiation of about 30 DSBs Gy⁻¹ (Prize *et al.*, 1998), the number of initial DSBs owing to Auger cascades is quite small, of the order of 10%, but it has been suggested that the complex nature of these DSBs makes them difficult to repair.

In the present study, the average iodine concentration in the tumor area was 19 µg g⁻¹ (dry weight) as measured by ICP-MS. This is about 500 and 8 times more than in the contralateral brain and ipsilateral brain, respectively. We verified by SIMS imaging that the iodine mainly accumulated in cell nuclei. Using prolonged infusion of IUdR, we expected to obtain about 20% of thymidine replacement by IUdR (Lawrence *et al.*, 1990; Rodriguez *et al.*, 1994). The main endpoint of this study was the prolongation in the survival time of F98 glioma-bearing rats following treatment. ¹²⁷I-IUdR alone significantly improved the MeST compared with untreated controls (32 d *versus* 24 d, $p = 0.002$). CT images taken on day 18 following tumor implantation showed almost complete disappearance of the tumor following ¹²⁷I-IUdR administration. Unexpectedly, however, the combination of ¹²⁷I-IUdR with X-irradiation did not significantly improve the MeST compared with X-irradiation alone or ¹²⁷I-IUdR alone (92% ILS, 83% ILS and 33% ILS, respectively). Twenty percent of the animals that received IUdR and X-irradiation survived longer than the irradiated group, but there was only an 8% difference in %ILS. A few rats in the group that received ¹²⁷I-IUdR + X-irradiation died before the first animals in the X-irradiation alone group, suggesting enhanced toxicity of the combination.

These results can be compared with those reported in the literature, using either radioactive ¹²⁵I-IUdR or the photoactivation of stable IUdR. The Auger effect produced by ¹²⁵I is, however, different from the Auger effect induced by K-shell ionization of stable iodine, as in the present work. The Auger effect in ¹²⁵I is indeed a double effect. The first results from the electron capture by the nucleus (in excess of protons) that induces a K-shell vacancy, and the second from the internal conversion of the resulting nuclei (tellurium), resulting in a γ -ray emission that again will trigger the Auger effect. Hence, the Auger effect in ¹²⁵I is much stronger in energy release and in the number of emitted electrons than the Auger effect resulting from the inner-shell excitation of stable iodine.

Kassis *et al.* (1998) evaluated the therapeutic potential of Auger electron therapy using radioactive ¹²⁵I-IUdR in rats bearing intracerebral 9 L gliosarcoma. In their study, ¹²⁵I-IUdR was infused i.c. (100 µl week⁻¹, 238 µCi in 86 µl) over 6 d, using Alzet osmotic pumps. The MeST of rats treated with ¹²⁵I-IUdR was 28.5 d, which was slightly, but not significantly, longer ($p = 0.07$) than that of control animals (24 d). However, even with a 22% ILS, 10% of the animals survived for >65 d. There are few studies dealing with i.c. tumor treated with stable IUdR in combination with irradiation (Deutsch *et al.*, 1989, 1990; Harrington *et al.*, 2004; Kinsella *et al.*, 1987, 1998; Williams *et al.*, 1997; Mairs *et al.*, 2000). Deutsch *et al.* (1990) reported on the efficacy of IUdR as a radiosensitizer when administered into the cerebral spinal fluid of the lateral ventricles of 9 L gliosarcoma-bearing rats. In their study, radiotherapy was delivered over the entire brain in three 8 Gy fractions, delivered on days 4, 6 and 7 following 9 L tumor implantation. IUdR (8.4 mg) was administered *via* osmotic pumps over seven days, beginning on the day of tumor implantation. There was a slight but not statistically significant increase in the MeST of treated animals (21.5 d for IUdR alone and 19.5 d for radiotherapy alone) compared with untreated controls (16.9 d). The combination of radiation and infusion of IUdR significantly enhanced the MeST (30.5 d) compared with all the other groups. Harrington *et al.* (2004) have reported on the effects of radiation therapy with ¹³⁷Cs in combination with various schedules of administration of free IUdR or pegylated liposomal IUdR (PLIUdR) for the treatment of KB xenografts in nude mice. They showed that when PLIUdR was delivered by a prolonged infusion schedule over 7 d (48 mg kg⁻¹) the therapeutic effect of a single 4.5 Gy fraction, but not for 9 Gy radiotherapy, significantly improved survival. Survival was further enhanced using fractionated PLIUdR-¹³⁷Cs radiotherapy compared with radiotherapy alone. Similarly, Doiron *et al.* (1999) used bromodeoxyuridine (BUdR), another Thd analog. They reported that there was no radiosensitization following a single 16.5 Gy dose in the murine RIF-1 tumor model after intratumoral administration of BUdR polymer. On the other hand, significant radiosensitization was observed following fractionated irradiation (⁶⁰Co γ -rays) when the BUdR polymer was implanted 3 d prior to the first dose.

Using the same tumor model and extracellular iodine as a radio-enhancer (Adam *et al.*, 2006), we obtained survival data similar to those reported in the present study. Rats that received i.v. iodine and intracarotid mannitol in combination with a single 50 keV 15 Gy dose of X-irradiation had a longer MeST than the rats irradiated without iodine (26 d, 46 d, 54 d and 71 d for untreated animals, irradiation alone, or in combination with i.v. and intracarotid injections, respectively). In comparison with the 15 Gy irradiation alone group, the MeSTs were significantly different only for intracarotid infusion ($p = 0.2$ and $p = 0.004$ for i.v. and intracarotid injections, respectively). The use of stable IUdR rather than radioactive IUdR could be advantageous for protecting surrounding normal brain. Although radioactive IUdR therapy can specifically target cancer cells, it also damages other tissues that

take up the radionucleotide. The use of stable IUdR with an external beam would lead to larger irradiation fields, but would be limited to the organs present in these fields. The photoactivation of IUdR theoretically generates additional DSBs in DNA (Terrissol *et al.*, 2004). However, it is difficult to differentiate *in vivo* between the chemotherapeutic effect of IUdR and the interaction of X-rays on the iodine atoms. The chemotherapeutic effect of IUdR observed in this study is important (Table 1) and might mask the Auger effect. The cause of the early deaths observed in the group of rats that received the combination of IUdR and radiotherapy also requires further investigation. In conclusion, although the chemotherapeutic effect of prolonged infusion of ^{127}I -IUdR produced significant prolongation in MeST, the addition of X-ray radiation did not further improve survival. These findings suggest that additional studies are needed to optimize this chemoradiotherapeutic approach for the treatment of brain tumors.

We thank the European Synchrotron Radiation Facility medical beamline for providing the necessary beam time and technical assistance in all the steps of the experimental studies. We also thank Mrs C. Massart, Mr T. Brochard, Dr C. Nemoz, Mrs G. Michel-Amadry, Dr M. Fernandez and Mrs E. Kerboul for their technical assistance, Mr D. Dallery for animal care and Mrs L. Martz for secretarial assistance.

References

- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J. & Ram, S. J. (2004). *Biophoton. Intl.* **11**, 36–42.
- Adam, J. F., Biston, M. C., Joubert, A., Charvet, A. M., Le Bas, J. F., Estève, F. & Elleaume, H. (2005). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **61**, 1173–1182.
- Adam, J. F., Elleaume, H., Joubert, A., Biston, M. C., Charvet, A. M., Balosso, J., Le Bas, J. F. & Estève, F. (2003). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **57**, 1413–1426.
- Adam, J. F., Joubert, A., Biston, M. C., Charvet, A. M., Peoc'h, M., Le Bas, J. F., Balosso, J., Estève, F. & Elleaume, H. (2006). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **64**, 603–611.
- Barth, R. F., Coderre, J. A., Vicente, M. G. & Blue, T. E. (2005). *Clin. Cancer Res.* **11**, 3987–4002.
- Barth, R. F. & Kaur, B. (2009). *J. Neurooncol.* doi:10.1007/s11060-009-9875-7.
- Barth, R. F., Yang, W., Al-Madhoun, A. S., Johnsamuel, J., Byun, Y., Chandra, S., Smith, D. R., Tjarks, W. & Eriksson, S. (2004). *Cancer Res.* **64**, 6287–6295.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F. & Delattre, J. Y. (2003). *Lancet*, **361**, 323–331.
- Berry, S. E. & Kinsella, T. J. (2001). *Semin. Radiat. Oncol.* **11**, 300–315.
- Biston, M. C., Joubert, A., Adam, J. F., Elleaume, H., Bohic, S., Charvet, A. M., Estève, F., Foray, N. & Balosso, J. (2004). *Cancer Res.* **64**, 2317–2323.
- Bodei, L., Kassis, A. I., Adelstein, S. J. & Mariani, G. (2003). *Cancer Biother. Radiopharm.* **18**, 861–877.
- Boudou, C., Balosso, J., Estève, F. & Elleaume, H. (2005). *Phys. Med. Biol.* **50**, 4841–4851.
- Boudou, C., Biston, M. C., Corde, S., Adam, J. F., Ferrero, C., Estève, F. & Elleaume, H. (2004). *Phys. Med. Biol.* **49**, 5135–5144.
- Cardinale, R. M., Benedict, S. H., Wu, Q., Zwicker, R. D., Gaballa, H. E. & Mohan, R. (1998). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **42**, 431–436.
- Clendenon, N. R., Barth, R. F., Gordon, W. A., Goodman, J. H., Alam, F., Staubus, A. E., Boesel, C. P., Yates, A. J., Moeschberger, M. L. & Fairchild, R. G. (1990). *Neurosurgery*, **26**, 47–55.
- Corde, S., Joubert, A., Adam, J. F., Charvet, A. M., Le Bas, J. F., Estève, F., Elleaume, H. & Balosso, J. (2004). *Br. J. Cancer*, **91**, 544–551.
- Croteau, D. & Mikkelsen, T. (2001). *Curr. Treat. Options Oncol.* **2**, 507–515.
- Deutsch, M., Rewers, A. B., Redgate, E. S., Fisher, E. R. & Boggs, S. S. (1989). *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 1322–1325.
- Deutsch, M., Rewers, A. B., Redgate, S., Fisher, E. R. & Boggs, S. S. (1990). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **19**, 85–87.
- Doiron, A., Yapp, D. T., Olivares, M., Zhu, J. X. & Lehnert, S. (1999). *Cancer Res.* **59**, 3677–3681.
- Estève, F., Corde, S., Elleaume, H., Adam, J. F., Joubert, A., Charvet, A. M., Biston, M. C., Balosso, J. & Le Bas, J. F. (2002). *Acad. Radiol.* **9**(Suppl. 2), S540–S543.
- Fairchild, R. G., Brill, A. B. & Ettinger, K. V. (1982). *Invest. Radiol.* **17**, 407–416.
- Guerquin-Kern, J. L., Wu, T. D., Quintana, C. & Croisy, A. (2005). *Biochim. Biophys. Acta*, **1724**, 228–238.
- Harrington, K. J., Syrigos, K. N., Uster, P. S., Zetter, A., Lewanski, C. R., Gullick, W. J., Vile, R. G. & Stewart, J. S. (2004). *Br. J. Cancer*, **91**, 366–373.
- Herman, G. T., Lewitt, R. M., Odhner, D. & Rowland, S. W. (1989). Report 160. Medical Imaging Processing Group, Department of Radiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.
- Karnas, S. J., Moiseenko, V. V., Yu, E., Truong, P. & Battista, J. J. (2001). *Radiat. Environ. Biophys.* **40**, 199–206.
- Karnas, S. J., Yu, E., McGarry, R. C. & Battista, J. J. (1999). *Phys. Med. Biol.* **44**, 2537–2549.
- Kassis, A. I. (2003). *J. Nucl. Med.* **44**, 1479–1481.
- Kassis, A. I., Wen, P. Y., Van den Abbeele, A. D., Baranowska-Kortylewicz, J., Makrigiorgos, G. M., Metz, K. R., Matalka, K. Z., Cook, C. U., Sahu, S. K., Black, P. M. & Adelstein, S. J. (1998). *J. Nucl. Med.* **39**, 1148–1154.
- Kinsella, T. J., Dobson, P. P., Mitchell, J. B. & Fornace, A. J. Jr (1987). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **13**, 733–739.
- Kinsella, T. J., Kunugi, K. A., Vielhuber, K. A., Potter, D. M., Fitzsimmons, M. E. & Collins, J. M. (1998). *Clin. Cancer Res.* **4**, 99–109.
- Klein, J. P. & Moeschberger, M. L. (2003). *Survival Analysis Techniques for Censored and Truncated Data*, 2nd ed. New York: Springer.
- Lawrence, T. S., Davis, M. A., Maybaum, J., Stetson, P. L. & Ensminger, W. D. (1990). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **18**, 1393–1398.
- Lorusso, V., Luzzani, F., Bertani, F., Tirone, P. & de Haen, C. (1994). *Eur. J. Radiol.* **18**(Suppl. 1), S13–S20.
- Mairs, R. J., Wideman, C. L., Angerson, W. J., Whateley, T. L., Reza, M. S., Reeves, J. R., Robertson, L. M., Neshasteh-Riz, A., Rampling, R., Owens, J., Allan, D. & Graham, D. I. (2000). *Br. J. Cancer*, **82**, 74–80.
- Milgram, S., Carriere, M., Thiebault, C., Malaval, L. & Gouget, B. (2008). *Toxicology*, **250**, 62–69.
- Moiseenko, V. V., Karnas, S. J., Yu, E. & Battista, J. J. (2002). *Radiat. Prot. Dosim.* **99**, 113–116.
- Phillips, M. H., Stelzer, K. J., Griffin, T. W., Mayberg, M. R. & Winn, H. R. (1994). *J. Clin. Oncol.* **12**, 1085–1099.
- Prize, K. M., Ahnstrom, G., Belli, M., Carlsson, J., Frankenberg, D., Kiefer, J., Lobrich, M., Michael, B. D., Nygren, J., Simone, G. & Stenerlow, B. (1998). *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 173–184.
- Redgate, E. S., Deutsch, M. & Boggs, S. S. (1991). *Lab. Anim. Sci.* **41**, 269–273.

- Robar, J. L., Riccio, S. A. & Martin, M. A. (2002). *Phys. Med. Biol.* **47**, 2433–2449.
- Rodriguez, R., Ritter, M. A., Fowler, J. F. & Kinsella, T. J. (1994). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **29**, 105–113.
- Rousseau, J., Boudou, C., Barth, R. F., Balosso, J., Estève, F. & Elleaume, H. (2007). *Clin. Cancer Res.* **13**, 5195–5201.
- Rousseau, J., Boudou, C., Estève, F. & Elleaume, H. (2007). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **68**, 943–951.
- Terrissol, M., Edel, S. & Pomplun, E. (2004). *Int. J. Radiat. Biol.* **80**, 905–908.
- Usami, N., Furusawa, Y., Kobayashi, K., Lacombe, S., Reynaud-Angelin, A., Sage, E., Wu, T. D., Croisy, A., Guerquin-Kern, J. L. & Le Sech, C. (2008). *Int. J. Radiat. Biol.* **84**, 603–611.
- Williams, J. A., Dillehay, L. E., Tabassi, K., Sipos, E., Fahlman, C. & Brem, H. (1997). *J. Neurooncol.* **32**, 181–192.