

Développement de l'imagerie RMN par agents CEST : application à un modèle rongeur de tumeur cérébrale

Julien Flament

▶ **To cite this version:**

Julien Flament. Développement de l'imagerie RMN par agents CEST : application à un modèle rongeur de tumeur cérébrale. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112094 . tel-00720031

HAL Id: tel-00720031

https://theses.hal.science/tel-00720031

Submitted on 23 Jul 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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences et Technologies de l'Information des Télécommunications et des Systèmes (STITS)

LABORATOIRE : Laboratoire d'Imagerie et de Spectroscopie RMN (CEA/DSV/I²BM/NeuroSpin/LRMN)

DISCIPLINE : Sciences Physiques - Imagerie Médicale

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 20 juin 2012 par

Julien FLAMENT

DÉVELOPPEMENT DE L'IMAGERIE RMN PAR AGENTS CEST : APPLICATION À UN MODÈLE RONGEUR DE TUMEUR CÉRÉBRALE

COMPOSITION DU JURY :

RAPPORTEURS :	Emmanuelle CANET-SOULAS	*Professeur, UCBL, Lyon*
	Robert MULLER	*Professeur, UMH, Mons*
EXAMINATEURS :	Brigitte GILLET	*PhD, UPSUD, Orsay*
	Marc PORT	*PhD, Guerbet, Aulnay-sous-Bois*
DIRECTEUR DE THÈSE :	Gilles BLOCH	*PhD, CEA, Fontenay-aux-Roses*
ENCADRANT DE THÈSE :	Fawzi BOUMEZBEUR	*PhD, CEA, Saclay*

Remerciements

Ces quatre années passées à NeuroSpin ont été pour moi une source immense d'enrichissements scientifiques et techniques. Elles m'ont aussi et surtout permis de faire des rencontres humaines formidables. Je tiens donc par l'intermédiaire de ces quelques lignes à remercier l'ensemble des personnes que j'ai pu côtoyer durant cette période et qui ont largement contribué à la réussite, je l'espère, de cette thèse.

MERCI …

... à Fawzi Boumezbeur pour son encadrement, son aide quotidienne et son soutien dans les instants difficiles de l'imagerie CEST. Ces moments de recherche et de manipes mais aussi de détente passés avec lui m'ont été très plaisants et particulièrement instructifs.

... à Gilles Bloch pour avoir accepté de porter la casquette de Directeur de thèse en dépit de ses très nombreuses responsabilités.

... à Franck Lethimonnier pour son investissement dans le cadre du projet Iseult et pour ses conseils toujours très éclairés.

... à Emmanuelle Canet-Soulas et à Robert Muller pour avoir rapporté mon travail de thèse ainsi qu'à Brigitte Gillet et Marc Port pour leur participation à mon jury.

... à Denis Le Bihan pour son accueil au sein de NeuroSpin.

... à l'ensemble des membres du projet Iseult, et particulièrement à Julien Valette, Sébastien Mériaux et Aurélie Verpilleux pour les nombreux échanges scientifiques que nous avons pu avoir, mais aussi pour les discussions plus légères qui ont certainement contribué à la très bonne ambiance au sein du projet.

... à toute l'équipe de Guerbet, Claire Corot, Philippe Robert, Marc Port, Caroline Robic, Christelle Médina, Jean-Sébastien Raynaud, Gaëlle Louin, Jean-François Mayer, Xavier Violas et Robin Santus pour leur collaboration fructueuse dans le domaine des lipoCEST.

... à mes acolytes de l'espace ouvert 1025A, Benjamin Marty, Céline Giraudeau, Olivier Reynaud, Ileana Jelescu, Alfredo Lopez et Ludovic Broche pour les moments de franche rigolade passés ensemble. Je suis sûr que nous serons amenés à travailler ensemble à l'avenir et j'espère que l'esprit du Bureau des Horreurs perdurera.

... à Françoise Geffroy pour ses talents d'histologiste et de cuisinière et surtout pour sa bonne humeur quotidienne.

... à Boucif Djemaï pour son aide parfois tôt le matin et parfois tard le soir lors de mes manipes.

... à l'ensemble des *Mus musculus* et *Rattus norvegicus* (ou *souris* et *rats* pour les noms vernaculaires) qui ont contribué à la réussite de mes manipes.

... aux inventeurs de l'indispensable Tarlatane ® et des seringues « multifonction » Terumo ®.

... à toute ma famille pour son soutien indéfectible et pour la relecture attentive de ce manuscrit.

... et enfin à Élise pour sa présence à mes côtés et pour la suite de l'aventure !

Table des Matières

Liste des Abréviations **13**

Liste des Figures **17**

Liste des Tableaux **21**

CHAPITRE I - Contexte de la thèse **23**

I.1. Introduction générale 23

I.2. Présentation de NeuroSpin 24

I.3. Le Projet Iseult 26

I.4. Organisation du mémoire de thèse et contributions 28

Bibliographie du chapitre I 29

CHAPITRE II - Imagerie moléculaire **31**

II.1. Introduction 31

II.2. Les modalités d'imagerie moléculaire 32

II.2.a. Tomographie d'émission de positons 32

II.2.b. Tomographie d'émission monophotonique 33

II.2.c. Imagerie Optique 33

II.2.d. Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire 34

II.3. Comparaison des modalités d'imagerie moléculaire 35

II.4. Vers la quantification en imagerie moléculaire 37

Bibliographie du Chapitre II 38

CHAPITRE III - Imagerie de transfert de saturation par échange chimique 41

III.1. Introduction 41

III.2. Théorie 42

III.2.a. Equations de Bloch-McConnell 42

III.2.b. Condition d'observation des populations de spins A et B 44

III.2.c. Transfert de saturation 47

III.2.d. Caractérisation du transfert d'aimantation 52

III.3. Applications 54

III.3.a. Imagerie MT 54

III.3.b. Imagerie diaCEST et APT 56

II.3.c. Imagerie paraCEST 58

Bibliographie du Chapitre III 60

CHAPITRE IV - Les lipoCEST 65

IV.1. Généralités 65

IV.1.a. Description 66

IV.1.b. Influence du complexe de Lanthanide paramagnétique 68

IV.1.c. Influence de la membrane 70

IV.2. Optimisation des lipoCEST 73

IV.2.a. Choix du Ln(III) 73

IV.2.b. Choix du ligand 74

IV.2.c. Choix de la membrane 76

IV.2.d. Furtivité et Fonctionnalisation 77

IV.3. Formulation retenue et caractéristiques CEST 78

Bibliographie du chapitre IV 81

CHAPITRE V - Protocole d'imagerie CEST *in vivo* à 7T 87

V.1. Montage expérimental 87

V.1.a. Scanner IRM 7T 87

V.1.b. Sondes radiofréquences 88

V.1.c. Anesthésie et positionnement des animaux 89

V.2. La Séquence CEST-MSME 89

V.2.a. Présentation 89

V.2.b. Reconstruction 91

V.2.c. Module de saturation 92

V.2.d. Choix de la puissance et de la fréquence de saturation 94

V.4. Acquisition des cartes de champs B_1 et B_0 96

V.4.a. Contrôle de l'homogénéité du champ B_1 96

V.4.b. Contrôle de l'homogénéité du champ B_0 97

V.5. Protocole d'imagerie CEST *in vivo* 99

Bibliographie du chapitre V 101

CHAPITRE VI - Imagerie CEST de l'angiogenèse tumorale dans un modèle de tumeur cérébrale U87 à l'aide de lipoCEST fonctionnalisés 105

VI.1. Introduction 105

VI.1.a. Enjeux de l'imagerie moléculaire de la tumeur cérébrale 105

VI.1.b. Mécanisme de l'angiogenèse tumorale 106

VI.1.c. Détection de l'angiogenèse tumorale 107

VI.2. Matériels et Méthodes 109

VI.2.a. Modèle animal 109

VI.2.b. Protocole d'imagerie 111

VI.2.c. Analyse par région d'intérêt du contraste CEST 111

VI.2.d. Histologie et microscopie de fluorescence 112

VI.3. Résultats 113

VI.3.a. Caractérisation des lipoCEST et du contraste MT 113

VI.3.b. Détection *in vivo* des lipoCEST 114

VI.3.c. Sensibilité et persistance du contraste CEST 115

VI.3.d. Validation histologique 119

VI.4. Discussion 121

VI.4.a. Taille des tumeurs U87 121

VI.4.b. Significativité statistique des contrastes CEST observés 121

VI.4.c. Justification du contraste CEST 123

VI.4.d. Avantages et limitations des lipoCEST 124

VI.5. Conclusion 125

Bibliographie du chapitre VI 126

CHAPITRE VII - Semi-quantification des lipoCEST *in vivo* **131**

VII.1. Modélisation des échanges de protons *in vivo* en présence d'agents CEST 132

VII.1.a. Modèle à 4 compartiments 132

VII.1.b. Détermination des paramètres du modèle pour les contrastes APT et MT 137

VII.1.c. Détermination des paramètres du modèle pour les lipoCEST 142

VII.2. Outil d'Analyse Quantitative (OAQ) 144

VII.2.a. Architecture de l'Outil d'Analyse Quantitative 144

VII.2.b. Validation *in vitro* de l'OAQ 146

VII.3. Application *in vivo* de l'OAQ chez la souris U87 148

VII.3.a. Quantification des lipoCEST *in vivo* 148

VII.4.b. Vers la modélisation compartimentale 151

VII.5. Conclusion 156

Bibliographie du chapitre VII 157

CHAPITRE VIII - Conclusion générale **161**

Bibliographie du chapitre VIII 164

Annexe **167**

Liste des Abréviations

^1H	Proton
α_{eff}	Angle de bascule effectif de l'aimantation
$\alpha_v\beta_3$	Intégrine surexprimée lors de l'angiogenèse tumorale
δ_{sat}	Fréquence de saturation
Δ	Déplacement chimique
λ	Longueur d'onde
γ	Rapport gyromagnétique du proton
σ	Ecart-type du bruit
APT	Amide Proton Transfer
B_0	Champ magnétique statique
B_1	Champ magnétique variable
BSM	Bulk Magnetic Susceptibility
C_0	Concentration maximale théorique
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energie Alternatives
CEST	Chemical Exchange Saturation Transfer
CNR	Rapport contraste-sur-bruit
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
d_H	Diamètre hydrodynamique
diaCEST	Agent de contraste CEST diamagnétique
DSV	Direction des Sciences du Vivant
FA	Facteur d'amplification
GFP	Green Fluorescent Protein

I²BM	Institut d'Imagerie BioMédicale
IC_{50}	Concentration Inhibitrice 50
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IV	Intraveineuse
lipoCEST	Agent de contraste CEST liposomal
Ln^{3+}	Lanthanide(III)
LRMN	Laboratoire d'imagerie et spectroscopie RMN
M_0	Aimantation initiale
MSME	Multi-Slices Multi-Echos
MT	Magnetization Transfer
MTR	Magnetization Transfer Ratio
MTRasym	asymmetric Magnetization Transfer Ratio
$M_{x,y}$	Composantes transverses de l'aimantation
M_z	Composante longitudinale de l'aimantation
n_{coupe}	Nombre de coupes
$n_{lipoCEST}$	Nombre de molécules d'eau déplacées par lipoCEST
OAQ	Outil d'Analyse Quantitative
paraCEST	Agent de contraste CEST paramagnétique
PEG	Poly Ethylène Glycol
PFA	Paraformaldehyde
pH	Potentiel hydrogène
ppm	Partie par million
PTR	Proton Transfer Ratio
q	Nombre de coordination
RF	Radiofréquence

RGD	Peptide arginine-glycine-acide aspartique
r_i	Rayon interne du liposome
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROI	Région d'intérêt
SAR	Specific Absorption Rate
SNR	Rapport signal-sur-bruit
S.R.E	Système réticulo-endothélial
t	Temps
T_1	Temps de relaxation longitudinale
T_2	Temps de relaxation transverse
T_2^*	Temps de relaxation transverse apparent
T_{acq}	Temps d'acquisition
TE	Temps d'écho
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TEMP	Tomographie d'émission monophotonique
T_{in}	Temps d'entrée du produit
Tm^{3+}	Thulium(III)
T_{out}	Temps de sortie du produit
TR	Temps de répétition
T_{sat}	Temps de saturation
U87MG	Cellules malignes de glioblastome humain
USPIO	Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxides
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WASSR	WAter Saturation Shift Referencing

Liste des Figures

Figure F.I.1 : Photo de NeuroSpin 25

Figure F.I.2 : Vue en coupe du futur imageur 11,75T 26

Figure F.I.3 : Principe du RF shimming statique 27

Figure F.II.1 : Chaîne de traitement de données pour la quantification en imagerie moléculaire 37

Figure F.III.1 : Schéma d'une séquence de transfert de saturation 42

Figure F.III.2 : Modèle à 2 compartiments pour le transfert de saturation 43

Figure F.III.3 : Spectres des populations de spins A et B en fonction de la vitesse du taux d'échange 47

Figure F.III.4 : Taux de saturation des spins A en fonction de M_0^b, de k_{ex}^{ba} et de T_1^a 51

Figure F.III.5 : Z-spectrum et Z-spectrum asymétrique simulés dans le cadre d'un modèle à 2 compartiments 53

Figure F.III.6 : Transfert d'aimantation entre les protons libres et les protons liés 55

Figure F.III.7 : Application clinique de l'imagerie de transfert de saturation 56

Figure F.III.8 : Application clinique de l'imagerie gluCEST 57

Figure F.III.9 : Application clinique de l'imagerie APT 58

Figure F.IV.1 : Représentation schématique d'un lipoCEST en milieu aqueux 67

Figure F.IV.2 : Structure des cinq ligands utilisés 70

Figure F.IV.3 : Structure des constituants des membranes des liposomes 71

Figure F.IV.4 : Schéma du lipoCEST retenu pour le protocole d'imagerie moléculaire 79

Figure F.IV.5 : Z-spectra et Z-spectra asymétriques acquis respectivement avec les lipoCEST contrôle et fonctionnalisé avec le peptide RGD 80

Figure F.V.1 : Scanner IRM 7T PharmaScan Bruker de NeuroSpin 87

Figure F.V.2 : Sondes radiofréquences 88

Figure F.V.3 : Schéma de la séquence CEST-MSME 90

Figure F.V.4 : Pondération T_2 des échos au cours d'un module CPMG 91

Figure F.V.5 : Reconstruction des images CEST 92

Figure F.V.6 : Profil spectral du module de saturation 93

Figure F.V.7 : Evolution de l'intensité de l'effet CEST en fonction de T_{sat} 94

Figure F.V.8 : Z-spectrum 2D du RGD-lipoCEST 95

Figure F.V.9 : Carte typique de champ B_1 97

Figure F.V.10 : Images de saturation directe utilisées pour la méthode WASSR et carte de champ B_0 98

Figure F.V.11 : Protocole d'imagerie CEST *in vivo* 99

Figure F.VI.1 : Image RMN pondérée T_1 d'un glioblastome humain après injection d'agent de contraste à base de Gadolinium 105

Figure F.VI.2 : Mécanisme de la néo-angiogenèse tumorale 107

Figure F.VI.3 : Schéma d'une intégrine $\alpha_v\beta_3$ 108

Figure F.VI.4 : Image anatomique de référence d'une souris avec un glioblastome U87 109

Figure F.VI.5 : Evolution de la taille de la tumeur en fonction du nombre de jours après implantation 110

Figure F.VI.6 : Délimitation manuelle des ROI 112

Figure F.VI.7 : Z-spectra *in vivo* acquis dans un cerveau de souris 113

Figure F.VI.8 : Visualisation *in vivo* des lipoCEST 115

Figure F.VI.9 : Décours temporels du contraste MTRasym 116

Figure F.VI.10 : Persistance du contraste CEST 118

Figure F.VI.11 : Colocalisation du RGD-lipoCEST avec la cible $\alpha_v\beta_3$ dans la tumeur 120

Figure F.VI.12 : Significativité statistique en fonction du CNR 122

Figure F.VI.13 : Vascularisation des tissus tumoraux et sains 123

Figure F.VII.1 : Schéma du modèle d'échange de protons à 4 compartiments 133

Figure F.VII.2 : Régions d'intérêt des Z-spectra 138

Figure F.VII.3 : Ajustement des Z-spectra *in vivo* 139

Figure F.VII.4 : Détermination des paramètres d'échange exogènes 143

Figure F.VII.5 : Schéma d'un lipoCEST avec les dimensions utilisées pour le calcul du nombre de molécules d'eau internes $n_{lipoCEST}$ 143

Figure F.VII.6 : Quantification des données CEST par l'Outil d'Analyse Quantitative 145

Figure F.VII.7 : Validation *in vitro* de l'OAQ 147

Figure F.VII.8 : Cartes de concentration en lipoCEST 149

Figure F.VII.9 : Décours temporels de la concentration en lipoCEST 150

Figure F.VII.10 : Modèle à 3 compartiments pour décrire la dynamique de prise de contraste CEST 152

Figure F.VII.11 : Ajustement des décours temporels de la concentration en lipoCEST par une fonction biexponentielle 153

Figure F.VII.12 : Cartes paramétriques T_{in}, T_{out} et C_0 155

Liste des Tableaux

Tableau T.II.1 : Comparaison des différentes modalités d'imagerie moléculaire 36

Tableau T.IV.1 : Influence du Ln^{3+} 69

Tableau T.IV.2 : Choix du Lanthanide 74

Tableau T.IV.3 : Choix du ligand 75

Tableau T.IV.4 : Choix de la membrane 76

Tableau T.VI.1 : P-values calculées à l'aide d'un test de Student 117

Tableau T.VII.1 : Paramètres d'échange endogènes 140

Tableau T.VII.2 : Validation *in vitro* de l'OAQ 146

Tableau T.VII.3 : P-values calculées à l'aide d'un test de Student 150

Tableau T.VII.4 : Paramètres T_{in}, T_{out} et C_0 du modèle pour les 4 conditions 154

CHAPITRE I
Contexte de la thèse

I.1 Introduction générale

L'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM) est une discipline relativement récente. Son histoire débute avec la découverte par Isidor Isaac Rabi (prix Nobel de Physique en 1944) du phénomène de résonance magnétique nucléaire en 1938 *(Rabi et al., 1938)*. Portée par les travaux notamment de Félix Bloch et Edward Mills Purcell (prix Nobel de Physique en 1952), la RMN est d'abord utilisée pour élucider les structures chimiques des composés *(Bloch et al., 1946; Purcell et al., 1946)*. Ce n'est qu'en 1969 que Raymond Vahan Damadian propose d'utiliser la RMN pour distinguer des tissus, notamment les tissus sains et les tumeurs *(Damadian, 1971)*. Mais il faut attendre l'utilisation par Paul Lauterbur en 1973 de gradients de champ magnétique permettant l'encodage spatial du signal RMN pour passer de la RMN à l'IRM *(Lauterbur, 1973)*. Parallèlement, les travaux de Peter Mansfield sur le traitement mathématique des signaux RMN permettent de faciliter la reconstruction d'images interprétables à partir des signaux RMN *(Mansfield and Grannell, 1973)*. Ils ont tous deux été récompensés du prix Nobel de Médecine en 2003. Dès lors, l'IRM a connu des développements importants et s'est imposée dans le domaine médical comme l'outil de diagnostic de référence pour l'imagerie des tissus mous.

L'IRM « conventionnelle » fournit principalement des informations structurelles à l'échelle du millimètre. Or certains phénomènes pathologiques ne se manifestent à cette échelle qu'à partir d'un stade relativement avancé. A cette limite de détectabilité, se rajoute la difficulté à interpréter de façon non-équivoque les contrastes et marqueurs liés à l'évolution de la maladie. C'est pourquoi, au début des années 2000, est née la volonté d'imager directement les processus biologiques impliqués dans les pathologies. Outre un diagnostic précoce, la visualisation *in vivo* de biomarqueurs spécifiques promet une meilleure compréhension des phénomènes physiopathologiques et une évaluation « en temps réel » des traitements *(Massoud and Gambhir, 2003; Rudin and Weissleder, 2003; Weissleder, 2002)*. Si certaines modalités d'imagerie moléculaire, notamment la tomographie par émission de positons, permettent d'ores

et déjà d'accéder à la visualisation de processus biologiques de façon non-invasive, leur utilisation en routine clinique reste marginale en raison de coûts importants et de contraintes d'utilisation. La perspective d'utiliser l'IRM comme modalité d'imagerie moléculaire paraît donc très séduisante *(Rudin et al., 1999)*. La plupart des hôpitaux sont équipés de scanners IRM, c'est une modalité d'imagerie peu coûteuse et elle est facile à mettre en œuvre. Ainsi, le développement de l'imagerie moléculaire par IRM permettrait de repousser les limites actuelles de la technique en permettant l'exploration de phénomènes biologiques spécifiques ayant lieu à l'échelle moléculaire ou cellulaire tout en tirant profit de ces atouts, à savoir une haute résolution spatiale et un bon contraste entre les tissus.

Pour cela, deux challenges majeurs doivent être relevés. Le premier consiste à accroître directement ou indirectement la sensibilité de l'IRM en l'état incompatible avec la détection de quelques nano voir picomoles de molécules. La piste principale pour augmenter la sensibilité de détection de l'IRM est d'augmenter l'aimantation des spins. C'est dans cette optique que NeuroSpin a été créé, afin de repousser un peu plus loin les limites actuelles de l'IRM grâce à l'utilisation de très hauts champs magnétiques. Le second problème à résoudre est celui de la spécificité du contraste IRM. Pour cela, NeuroSpin s'est allié avec l'industriel Guerbet afin de mettre au point une nouvelle génération d'agents de contraste fonctionnalisés. Cette alliance s'est cristallisée autour du projet Iseult que nous détaillons dans la suite de ce chapitre.

I.2 Présentation de NeuroSpin

NeuroSpin est un service de l'Institut d'Imagerie BioMédicale (I²BM), rattaché à la Direction des Sciences du Vivant (DSV) du Commissariat à l'Energie Atomique (CEA). Il a été inauguré en 2007 et est dirigé par le Professeur Denis Le Bihan. L'objectif principal de NeuroSpin est de lever les verrous technologiques et méthodologiques de l'IRM cérébrale à très haut champ magnétique. Pour cela, NeuroSpin regroupe une équipe pluridisciplinaire de physiciens, informaticiens, biologistes, neuropsychologues, médecins, techniciens et infirmières autour d'un parc d'imageurs précliniques (7T et 17,2T) et cliniques (3T et 7T) unique en France. Cette proximité entre des outils d'investigation précliniques et cliniques a été voulue afin de faciliter le transfert technologique de la souris à l'homme. Par ailleurs, la volonté était de rassembler en un même lieu des experts en méthodologie RMN, en traitement du signal, en

neurosciences et médecins pour repousser les limites de l'IRM et mieux comprendre le cerveau à l'état normal et pathologique.



Figure F.I.1 : Photo de NeuroSpin. *Le bâtiment extérieur rappelle la forme sinusoïdale des impulsions radiofréquences utilisées en IRM.*

Les équipes de recherche et de support de NeuroSpin sont organisées autour de cinq laboratoires :

- le laboratoire d'imagerie et spectroscopie RMN (LRMN) dirigé par Cyril Poupon et où cette thèse a été réalisée,
- le laboratoire de Neuro-Imagerie Assistée par Ordinateur (LNAO) dirigé par Jean-François Mangin,
- le laboratoire de Sciences Cognitives (LCogn) dirigé par Stanislas Dehaene,
- le laboratoire de Biologie Intégrée (LBI) dirigé par Michel Bottlaender,
- le laboratoire d'Investigation Biomédicale (LBiom) dirigé par Lucie Hertz-Pannier.

I.3 Le projet Iseult

Le projet Iseult/INUMAC (pour Imaging of Neuro disease Using high field MR and Contrastophores) est un projet franco-allemand regroupant des partenaires industriels (Guerbet, Alstom, Siemens et Bruker) et académiques (le CEA et l'Université de Freiburg) financé par Oséo (anciennement Agence de l'Innovation Industriel) en France et le BMBF (Ministère fédéral de l'Éducation et de la Recherche) en Allemagne. L'objectif d'Iseult est de mettre au point une nouvelle génération d'agents de contraste pour l'imagerie moléculaire par IRM à très haut champ magnétique. Pour cela, le projet Iseult est organisé en trois axes menés conjointement par les différents partenaires.

Le premier axe concerne la conception et la réalisation d'un scanner IRM clinique corps entier avec un champ magnétique statique de 11,75T. La bobine supraconductrice est actuellement en cours de fabrication et les premières images devraient être réalisées en 2014.

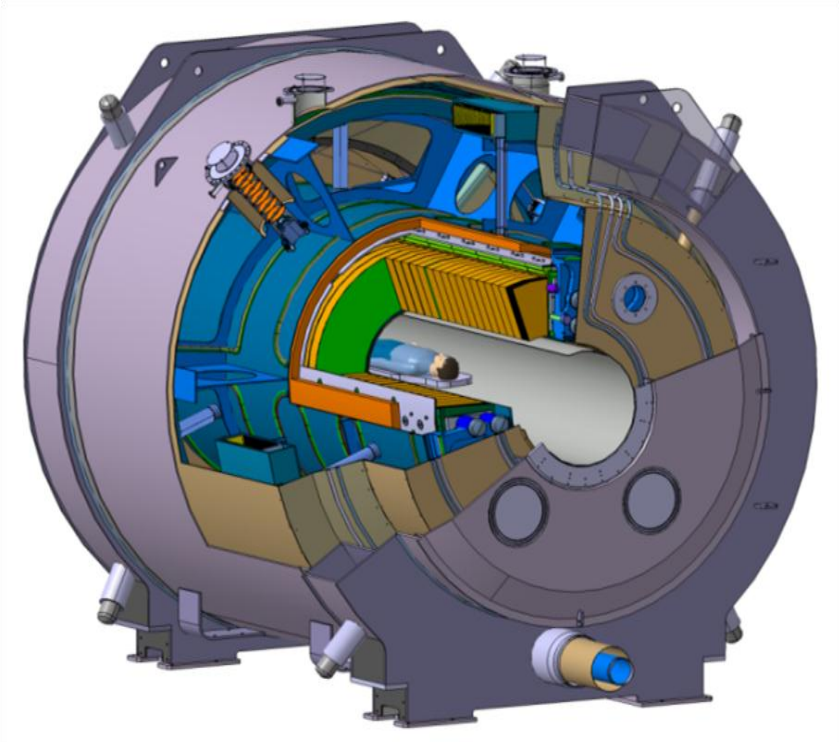


Figure F.I.2 : Vue en coupe du futur imageur 11,75T. *Les bobines supraconductrices sont représentées en orange, le cryostat en bleu et la structure mécanique en gris. L'ouverture sera de 90 cm, permettant le passage du corps entier du volontaire.*

Le deuxième axe du projet Iseult est consacré aux développements hardware et software permettant un meilleur contrôle de l'excitation radiofréquence (RF) des spins. En effet, la fréquence de Larmor du signal RMN étant proportionnelle au champ magnétique statique, la longueur d'onde de l'onde RF est raccourcie à très haut champ magnétique et devient comparable aux dimensions de l'organe imagé. La propagation de l'onde RF donne lieu à des phénomènes d'interférence et d'ondes stationnaires. Ceci se manifeste par une forte inhomogénéité du champ B_1^+ et des pertes de signal. Le « RF shimming » *(Hoult and Phil, 2000)* est une technique consistant à adapter les formes d'impulsions RF émises simultanément par les éléments d'un réseau d'antennes RF afin de minimiser l'inhomogénéité du champ B_1^+ dans une région d'intérêt. L'approche la plus simple consiste à appliquer une même impulsion RF sur chaque canal mais en ajustant les amplitudes et les phases pour minimiser la dispersion de l'angle de bascule des spins dans une région d'intérêt (voir figure F.I.3.a).

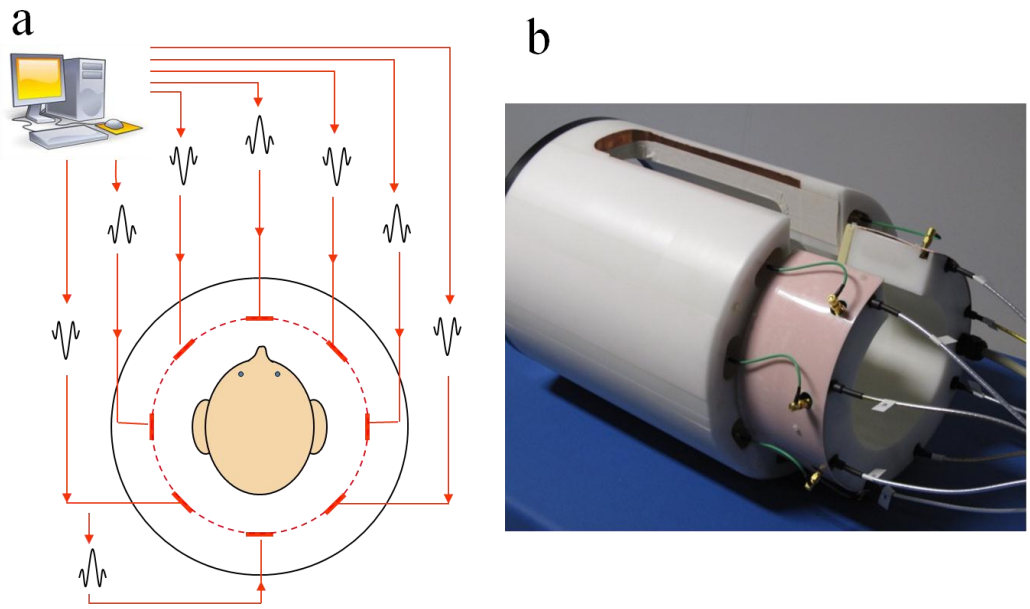


Figure F.I.3 : Principe du RF shimming statique. ***(a)*** *Une impulsion RF est appliquée sur chaque canal avec une amplitude et une phase propre grâce à une électronique dédiée multi-canaux.* ***(b)*** *Prototype d'antenne réseau à 8 canaux dédiée à la transmission parallèle.*

Par ailleurs, le « RF shimming » permet de sélectionner parmi les scenarii simulés celui qui minimise la quantité d'énergie déposée dans l'objet afin de respecter les limites de Taux d'Absorption Spécifique ou SAR pour *Specific Absorption Rate*. La figure F.I.3.b représente un prototype d'antenne réseau 8 canaux développé par l'équipe de Michel Luong (CEA/DSM/IRFU) dans le cadre du projet Iseult pour l'imagerie cérébrale chez l'homme à 7T.

Enfin, le troisième volet vise au développement et à l'évaluation d'une nouvelle génération d'agents de contraste pour l'imagerie moléculaire par IRM. Ce troisième axe est mené en étroite collaboration avec Guerbet, un industriel spécialisé dans les agents de contraste pour l'imagerie médicale. L'objectif est de développer et d'optimiser en collaboration avec les chimistes de Guerbet des agents de contraste nanoparticulaires fonctionnalisés afin de cibler des marqueurs de pathologies cérébrales telles que la maladie d'Alzheimer, les accidents vasculaires et les tumeurs cérébrales. Dans ce troisième axe, quatre types d'agents de contraste sont évalués pour l'imagerie moléculaire par IRM : les agents super-paramagnétiques (*Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxides*, USPIO), les émulsions de complexes de Gadolinium, les émulsions d'huile perfluorée et les agents déplaçant la fréquence de résonance des protons échangeables. Les travaux présentés dans ce manuscrit portent sur cette dernière catégorie d'agent de contraste, dits agents CEST pour *Chemical Exchange Saturation Transfer*.

I.4 Organisation du mémoire de thèse et contributions

Ce mémoire de thèse est subdivisé en huit chapitres. Dans le second chapitre, la problématique de l'imagerie moléculaire par IRM est posée. Dans le chapitre suivant, les principes de l'imagerie de transfert d'aimantation par échange chimique (CEST) sont détaillés. Le chapitre IV est consacré aux agents de contraste utilisés durant cette thèse, à savoir les « lipoCEST » puis le protocole expérimental mis au point pour l'imagerie CEST est présenté au chapitre V. Le chapitre VI constitue le chapitre central de ce manuscrit. La preuve de concept des agents lipoCEST fonctionnalisés y est établie pour l'imagerie de l'angiogenèse tumorale chez la souris. Ces travaux ont donné lieu à une publication dans *Magnetic Resonance in Medicine (Flament et al., 2012)*. Dans le chapitre VII, une stratégie de quantification des agents lipoCEST est proposée et appliquée aux données d'imagerie présentées au chapitre précédent. Celle-ci repose sur l'application d'un modèle à quatre compartiments des échanges de protons entre eau libre, macromolécules, protons des fonctions amides et agents lipoCEST dans le cerveau de rongeur. Un article sur la modélisation et la validation de cet outil de quantification est en cours de rédaction et devrait être soumis à la revue *NMR in Biomedicine*. Enfin, dans le dernier chapitre, nous dresserons un bilan des travaux réalisés et les résultats obtenus afin de fournir des pistes sur le futur de l'imagerie moléculaire par IRM-CEST.

Bibliographie du chapitre I

Bloch, F., W. Hansen, and M. Packard, 1946, Nuclear Induction: Phys. Rev., v. 69, p. 127.

Damadian, R., 1971, Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance: Science, v. 171, p. 1151-1153.

Flament, J., F. Geffroy, C. Medina, C. Robic, J. F. Mayer, S. Mériaux, J. Valette, P. Robert, M. Port, D. Le Bihan, F. Lethimonnier, and F. Boumezbeur, 2012, In vivo CEST MR imaging of U87 mice brain tumor angiogenesis using targeted LipoCEST contrast agent at 7 T.: Magn Reson Med.

Hoult, D. I., and D. Phil, 2000, Sensitivity and power deposition in a high-field imaging experiment.: J Magn Reson Imaging, v. 12, p. 46-67.

Lauterbur, P., 1973, Image Formation by Induced Local Interactions: Examples employing Nuclear Magnetic Resonance: Nature, v. 242, p. 190-191.

Mansfield, P., and P. Grannell, 1973, NMR 'Diffraction' in solids ?: J Phys, v. 6, p. 422.

Massoud, T. F., and S. S. Gambhir, 2003, Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light.: Genes Dev, v. 17, p. 545-80.

Purcell, E., H. Torrey, and R. Pound, 1946, Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid: Phys. Rev., v. 69, p. 37-38.

Rabi, I., J. Zacharias, S. Millman, and P. Kusch, 1938, A new method of measuring nuclear magnetic moment: Phys. Rev., v. 53, p. 318.

Rudin, M., N. Beckmann, R. Porszasz, T. Reese, D. Bochelen, and A. Sauter, 1999, In vivo magnetic resonance methods in pharmaceutical research: current status and perspectives.: NMR Biomed, v. 12, p. 69-97.

Rudin, M., and R. Weissleder, 2003, Molecular imaging in drug discovery and development.: Nat Rev Drug Discov, v. 2, p. 123-31.

Weissleder, R., 2002, Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice.: Nat Rev Cancer, v. 2, p. 11-8.

CHAPITRE II
Imagerie moléculaire

II.1 Introduction

L'imagerie moléculaire est une discipline émergente de l'imagerie *in vivo* répondant au besoin croissant de la biologie moléculaire, de la pharmacologie et de la médecine d'explorer des processus ou des biomarqueurs à l'échelle cellulaire ou moléculaire de la façon la moins invasive possible. Dans la foulée des progrès réalisés en génomique, la perspective d'imager des altérations moléculaires fines dans des modèles pathologiques ou directement chez le patient ouvre un vaste champ d'opportunités pour la recherche biomédicale, par exemple l'élucidation des mécanismes physiopathologiques, le diagnostic précoce, l'évaluation des thérapeutiques ou la médecine personnalisée. Par ailleurs, en promettant la visualisation et la quantification de marqueurs spécifiques d'un processus biologique, l'imagerie moléculaire devrait permettre aux études cliniques et précliniques d'atteindre un meilleur degré d'objectivité scientifique. Même si cela reste encore marginal, certaines études ont déjà montré le potentiel de l'imagerie moléculaire pour des applications cliniques *(Graham, 2011; Lusser, 2008; Miller and Thrall, 2004)*. Les années à venir seront donc particulièrement cruciales pour le développement de l'imagerie moléculaire et son application en recherche clinique.

Etant une discipline jeune et en pleine effervescence, les frontières de l'imagerie moléculaire restent floues notamment vis-à-vis de certaines modalités récentes de microscopie telle que la microscopie de fluorescence. Dans ce manuscrit, nous entendrons par imagerie moléculaire toute modalité d'imagerie permettant de visualiser et quantifier, de façon non-invasive et *in vivo* des processus biologiques à l'échelle d'un organe entier ou d'un individu. Cette définition s'applique notamment à l'imagerie nucléaire, l'imagerie optique et l'IRM. Chacune d'elles utilise un agent d'imagerie (ex : radio-marqueur, fluorophore ou complexe paramagnétique) le plus souvent administré en faible quantité pour ne pas perturber la physiologie du sujet. Elles possèdent aussi leurs caractéristiques propres, avantages et limitations qui sont brièvement exposés dans ce chapitre.

II.2 Les modalités d'imagerie moléculaire

II.2.a Tomographie par émission de positons

La tomographie par émission de positons (TEP ou en anglais PET pour *Positron Emission Tomography (Phelps, 2004)*) est aujourd'hui la modalité d'imagerie moléculaire de référence en recherche clinique. En TEP, des noyaux émetteurs de positons (radiation β+) tels que le ^{11}C ou ^{18}F sont incorporés à une molécule d'intérêt. Une fois émis, le positon se déplace dans les tissus sur une courte distance de l'ordre du mm avant de rencontrer son antiparticule : l'électron. Il s'en suit une réaction d'annihilation conduisant à l'émission de deux photons de 511 keV avec un angle de 180° approximativement. La détection de la paire de photons γ a lieu en coïncidence grâce à une couronne de γ-caméras placée autour du sujet. Grâce à la « collimation électronique » qui permet de n'enregistrer que les évènements ayant eu lieu dans une fenêtre de 0.5 à 10 nanosecondes et au grand nombre de désintégrations ayant lieu, il est possible de reconstruire la distribution spatiale de radioactivité au cours du temps.

Du fait de la haute énergie des photons γ et du bon rendement des photodétecteurs, l'imagerie TEP possède une excellente sensibilité, de l'ordre de 10^{-11} à 10^{-12} M. Elle souffre toutefois de deux inconvénients majeurs. D'une part, sa résolution spatiale est limitée intrinsèquement par le libre parcours moyen du positon. Celui-ci dépend du radio-isotope mais est compris entre 0,5 et 3 mm. A cela s'ajoute l'impact de la géométrie de la caméra TEP et notamment de ses photodétecteurs. La fonction d'étalement du point caractérise la réponse de la caméra (pour un algorithme de reconstruction donné) à une source ponctuelle de radioactivité. En définitive, la résolution spatiale est de l'ordre de 3 à 5 mm pour les caméras TEP cliniques et de l'ordre de 1 à 1,5 mm pour les caméras TEP précliniques. L'autre inconvénient majeur de la TEP est la demi-vie courte des isotopes utilisés. Ainsi, ^{l5}O possède une demi-vie de seulement 122 secondes ; pour le ^{18}F sa demi-vie est de 110 minutes. Par conséquence, il est souvent nécessaire d'acquérir un cyclotron et de disposer d'une équipe de radiochimistes à demeure pour la synthèse des radio-marqueurs. Par ailleurs, ces derniers doivent définir des voies d'incorporation du radio-isotope rapide et efficace pour maximiser l'activité spécifique du radio-marqueur. Malheureusement, ceci n'est pas toujours possible et limite donc l'applicabilité de l'imagerie TEP *(Pimlott and Sutherland, 2011)*.

De nombreux développements se poursuivent autour de l'imagerie TEP. On peut noter en particulier le développement de photodétecteurs de plus petites dimensions ou possédant une

meilleure résolution temporelle *(Lewellen, 2008)* ainsi que l'arrivée de systèmes hybrides TEP/IRM *(Judenhofer et al., 2008)*.

II.2.b Tomographie d'émission monophotonique

La tomographie d'émission monophotonique (TEMP ou en anglais SPECT pour *Single Photon Emission Computed Tomography*) est une technique d'imagerie médicale nucléaire tomographique reposant comme l'imagerie TEP sur la scintigraphie. Elle permet de détecter au moyen d'un ensemble de γ-caméras collimatées en rotation autour du patient la distribution tridimensionnelle d'un radio-isotope, émetteur de rayon gamma, tel que l'iode-123 (^{123}I) ou le technetium-99 métastable (^{99m}Tc). L'utilisation d'une collimation "physique" conduit à exclure un certain nombre de désintégrations et donc à une sensibilité inférieure à la TEP. La sensibilité de l'imagerie TEMP demeure toutefois excellente de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-10} M. Bien que la résolution spatiale des γ-caméras cliniques soit le plus souvent d'approximativement 10 mm, des résolutions submillimétriques ont été atteintes pour certaines γ-caméras précliniques utilisant des collimateurs et des photodétecteurs optimisés *(van der Have et al., 2009)*.

En attendant que ces développements technologiques s'appliquent dans le domaine clinique, le principal avantage de l'imagerie TEMP réside dans la longue demi-vie des radio-isotopes utilisés. Ces demi-vies de plusieurs heures (de 6h pour le ^{99m}Tc à 78h pour ^{67}Ga) ont deux conséquences positives par rapport à la TEP. D'une part, les coûts sont réduits. D'autre part, la demi-vie physiologique des radio-marqueurs TEMP est souvent plus courte que sa demi-vie radioactive. Cela permet de minimiser la contribution de la fraction non-spécifique du signal, conduisant à une modélisation plus aisée des données dynamiques. Cela permet aussi d'explorer des voies métaboliques plus lentes *(Pimlott and Sutherland, 2011)*.

II.2.c Imagerie Optique

L'imagerie optique est une modalité d'imagerie moléculaire qui se décline selon de multiples techniques tirant parti de l'absorption, de la réflexion, de la fluorescence, ou de la bioluminescence dans le domaine visible (du proche infrarouge à l'ultraviolet) d'un tissu ou d'un agent d'imagerie *(Luker and Luker, 2008)*. Ces techniques sont particulièrement attractives pour la recherche préclinique en raison de leur sensibilité, du caractère non-ionisant des

rayonnements, de leur faible coût et de leur facilité de mise en œuvre. Toutefois, leur applicabilité en clinique reste très réduite, à l'exception d'applications cliniques de surface notamment pour la détection de cancers du sein *(Ntziachristos et al., 2000)* ou du côlon *(Funovics et al., 2003)*. Ceci est dû à la faible profondeur d'exploration (de l'ordre du mm) des photons dans le domaine visible. En effet, leur longueur d'onde (200 à 900 nm) étant proche de la taille des différentes organelles, la lumière émise est largement diffusée et absorbée lors de sa propagation dans le milieu. Par conséquent, la sensibilité (10^{-9} à 10^{-11} M) et la résolution spatiale (de 1 à 2 mm) de l'imagerie optique se dégradent rapidement avec la profondeur de la source et les tissus paraissent relativement opaques. En raison d'un coefficient d'absorption moindre des tissus, la profondeur d'exploration pour l'imagerie spectroscopique proche infrarouge peut néanmoins atteindre quelques centimètres *(Ferrari and Quaresima, 2012)*.

Au-delà des molécules endogènes possédant des raies d'absorption dans le visible (ex : hémoglobine) ou une fluorescence naturelle (ex : collagène), il existe une grande variété d'agents d'imagerie optique synthétiques. On peut citer les protéines de fusion fluorescentes telle que la GFP (pour *Green Fluorescent Protein*). Son gène peut être fusionné *in vitro* au gène d'une protéine d'intérêt et introduit dans le génome d'une cellule ou d'un embryon. Ceci permet alors d'étudier *in situ* l'expression et la distribution de cette protéine par fluorescence. Sa découverte a été récompensée par le prix Nobel de Chimie en 2008 attribué à M. Chalfie, O. Shimomura et R. Tsien. Il existe aussi des nanoparticules fluorescentes fonctionnalisables : les boites quantiques (ou *quantum dots*). Il s'agit de nanocristaux de matériau semi-conducteur dont les dimensions sont inférieures à 10 nm. Ces nanoparticules possèdent une excellente stabilité, efficience lumineuse et leur fréquence d'émission est commodément liée à leur géométrie, permettant ainsi de suivre plusieurs cibles moléculaires simultanément. Il existe toutefois de sérieux doutes quant à leur toxicité *(Hardman, 2006)*.

II.2.d Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire

L'imagerie moléculaire par résonance magnétique nucléaire est probablement la modalité d'imagerie moléculaire la moins développée à ce jour. L'IRM souffre en tout premier lieu de sa faible sensibilité relativement aux autres modalités d'imagerie moléculaire. Si on considère l'IRM du ^{1}H, la sensibilité est de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} M. Ceci est lié à la faible polarisation des spins (de 10^{-5} à 10^{-6}) à température ambiante. Afin d'accroître cette polarisation, il est possible mais très coûteux d'augmenter l'intensité du champ magnétique statique ou

encore de recourir à l'hyperpolarisation *(Viale and Aime, 2010)*. En dépit de cette limitation, l'imagerie moléculaire par RMN offre l'opportunité d'acquérir au cours de la même session des images anatomiques bénéficiant d'une résolution spatiale submillimétrique et d'un excellent contraste entre tissus mous. Par ailleurs, l'IRM est une méthode extrêmement versatile et permet de mesurer des paramètres physiologiques ou structurels tels que le flux sanguin local ou le tenseur de diffusion de l'eau *(Haacke et al., 1999)*.

Afin de pallier à la moindre sensibilité de l'IRM, il est possible d'utiliser des agents de contraste. Ces agents de contraste IRM sont le plus souvent des complexes de Gadolinium paramagnétiques ou des nanocristaux d'oxyde de fer superparamagnétiques. L'interaction de ces molécules avec les protons de l'eau libre conduit localement à une accélération des phénomènes de relaxation longitudinaux et transversaux gouvernés par les temps de relaxation T_1, T_2 et T_2*. Ces « contrastophores » présentent une toxicité réduite et ont rapidement été utilisés en recherche clinique. Parmi ses applications, on peut notamment citer l'angiographie RMN, l'IRM de perfusion ou encore de l'infiltration macrophagique *(Corot et al., 2006)*. Ainsi, des sensibilités de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-9} M sont atteintes. Cependant, ce sont des agents de contraste non-spécifiques. Leur distribution dans l'organisme ou dans l'organe est gouvernée par leurs propriétés physico-chimiques. C'est pourquoi, des agents de contraste IRM fonctionnalisés sont actuellement en phase de développement. Ils consistent en l'association d'un ou plusieurs contrastophores à un peptide ou un pharmaceutique (on parle alors de pharmacophore) ayant une affinité pour un biomarqueur d'intérêt. En fonction de l'affinité du pharmacophore pour sa cible et de la biodistribution de l'agent de contraste fonctionnalisé, il est alors possible de détecter spécifiquement le couple pharmacophore-biomarqueur via les protons de l'eau interagissant avec le contrastophore.

II.3 Comparaison des modalités d'imagerie moléculaire

Cette brève introduction à l'imagerie moléculaire permet de constater la variété des modalités d'imagerie moléculaire. Le tableau T.II.1 résume certaines de leurs caractéristiques, notamment leurs avantages et inconvénients.

Les modalités les plus sensibles sont les modalités d'imagerie nucléaire. Elles permettent de détecter des radiotraceurs à des concentrations de l'ordre du picomolaire. De plus, ces deux modalités d'imagerie nucléaire présentent l'avantage d'être quantitatives. En effet, la

quantité de rayonnements γ reçue au niveau des détecteurs est directement proportionnelle à la quantité de radiotraceurs. En revanche, leur résolution spatiale reste limitée comparativement aux autres modalités, au mieux de l'ordre du mm.

Modalité	Résolution spatiale	Sensibilité	Avantages	Inconvénients
TEP	1-5 mm	10^{-11}-10^{-12} M	très haute sensibilité, quantitatif	résolution spatiale, coûteux
TEMP	< 10 mm	10^{-9}-10^{-10} M	sensibilité, quantitatif, temps de ½ vie	résolution spatiale
Imagerie Optique	1-2 mm	10^{-9}-10^{-11} M	sensibilité, simple, peu coûteux	résolution spatiale, applications clinique limitée
IRM	100 µm	10^{-3}-10^{-6} M	résolution spatiale, contraste, application clinique	sensibilité

Tableau T.II.1 : Comparaison des différentes modalités d'imagerie moléculaire. *Le tableau résume les caractéristiques principales de chaque modalité notamment leurs principaux avantages et inconvénients.*

L'imagerie optique permet également d'atteindre une excellente sensibilité de détection et reste très peu coûteuse par rapport aux autres. Cependant, son potentiel pour des applications cliniques est limité en raison de la faible profondeur d'exploration. Elle reste donc cantonnée à des visualisations en surface.

Quant à l'IRM, il s'agit d'une modalité relativement facile d'accès (la plupart des hôpitaux en sont équipés), moins coûteuse que l'imagerie nucléaire, et surtout offrant une excellente résolution spatiale. Cependant, c'est une modalité peu sensible. Le développement d'agents de contraste sensibles et spécifiques constitue donc la clef pour l'avènement de l'imagerie moléculaire par IRM. Le développement de séquences d'IRM et d'outils d'analyse dédiés à l'imagerie de tels agents de contraste fonctionnalisés représente donc un projet de recherche passionnant.

II.4 Vers la quantification en imagerie moléculaire

La finalité de l'imagerie moléculaire est la quantification d'une cible ou d'un processus biologique *in vivo*. Quelque soit la modalité d'imagerie moléculaire, la quantification n'est possible qu'après une chaîne de traitement de données que l'on peut représenter schématiquement par la figure F.II.1.

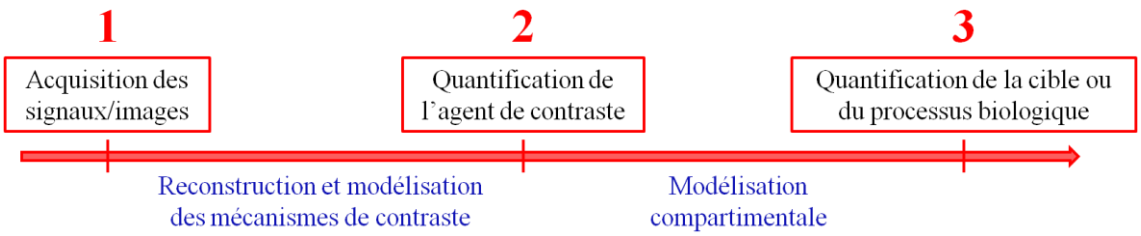


Figure F.II.1 : Chaîne de traitement de données pour la quantification en imagerie moléculaire.

La première étape consiste en l'acquisition du signal brut et/ou des images. Puisque des agents d'imagerie sont le plus souvent utilisés, il est nécessaire de modéliser le mécanisme de contraste. Il est ainsi possible de remonter à la densité d'agent d'imagerie à l'origine du signal ou du contraste dans l'image. Enfin, la dernière étape est la quantification des cibles biologiques. Cela nécessite de modéliser la prise de contraste en fonction de la nature des tissus et des propriétés physico-chimiques de l'agent de contraste. Le taux d'expression de la cible, la biodistribution de l'agent de contraste, son temps de demi-vie, son affinité pour la cible sont autant de paramètres qui entrent en ligne de compte. Souvent, certains de ces paramètres ne sont pas accessibles et l'opérateur est contraint de formuler des hypothèses. Par conséquent, la quantification en imagerie moléculaire reste une tâche très compliquée, et il est souvent plus juste de parler de semi-quantification. Cependant, cette information est plus pertinente qu'une simple intensité pour apprécier le processus biologique d'intérêt. Dans le cadre de cette thèse, nous avons adopté cette approche de semi-quantification et nous avons tenté de l'appliquer à l'imagerie CEST de la néo-angiogenèse tumorale chez la souris U87. Les résultats sont présentés dans les chapitres VI et VII de ce manuscrit.

Bibliographie du Chapitre II

Corot, C., P. Robert, J. M. Idée, and M. Port, 2006, Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging.: Adv Drug Deliv Rev, v. 58, p. 1471-504.

Ferrari, M., and V. Quaresima, 2012, A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application.: Neuroimage.

Funovics, M. A., H. Alencar, H. S. Su, K. Khazaie, R. Weissleder, and U. Mahmood, 2003, Miniaturized multichannel near infrared endoscope for mouse imaging.: Mol Imaging, v. 2, p. 350-7.

Graham, M. M., 2011, Clinical Molecular Imaging with Radiotracers: Current Status.: Med Princ Pract.

Haacke, E., R. Brown, M. Thompson, and R. Venkateson, 1999, Magnetic resonance imaging: physical principles and sequence design: New York, p 349.

Hardman, R., 2006, A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors.: Environ Health Perspect, v. 114, p. 165-72.

Judenhofer, M. S., H. F. Wehrl, D. F. Newport, C. Catana, S. B. Siegel, M. Becker, A. Thielscher, M. Kneilling, M. P. Lichy, M. Eichner, K. Klingel, G. Reischl, S. Widmaier, M. Röcken, R. E. Nutt, H. J. Machulla, K. Uludag, S. R. Cherry, C. D. Claussen, and B. J. Pichler, 2008, Simultaneous PET-MRI: a new approach for functional and morphological imaging.: Nat Med, v. 14, p. 459-65.

Lewellen, T. K., 2008, Recent developments in PET detector technology.: Phys Med Biol, v. 53, p. R287-317.

Luker, G. D., and K. E. Luker, 2008, Optical imaging: current applications and future directions.: J Nucl Med, v. 49, p. 1-4.

Lusser, M., 2008, Challenges in realizing the potential of clinical molecular imaging.: J Nucl Med, v. 49, p. 72N-73N.

Miller, J., and J. Thrall, 2004, Clinical Molecular Imaging: J Am Coll Radiol., p. 4-23.

Ntziachristos, V., A. G. Yodh, M. Schnall, and B. Chance, 2000, Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement.: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 97, p. 2767-72.

Phelps, M., 2004, PET: Molecular Imaging and its Biological Applications: Springer, New York.

Pimlott, S. L., and A. Sutherland, 2011, Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease.: Chem Soc Rev, v. 40, p. 149-62.

van der Have, F., B. Vastenhouw, R. M. Ramakers, W. Branderhorst, J. O. Krah, C. Ji, S. G. Staelens, and F. J. Beekman, 2009, U-SPECT-II: An Ultra-High-Resolution Device for Molecular Small-Animal Imaging.: J Nucl Med, v. 50, p. 599-605.

Viale, A., and S. Aime, 2010, Current concepts on hyperpolarized molecules in MRI.: Curr Opin Chem Biol, v. 14, p. 90-6.

CHAPITRE III
Imagerie de transfert de saturation par échange chimique

III.1 Introduction

L'étude des échanges chimiques a été et demeure un champ d'application dynamique de la RMN. Les effets de l'échange chimique entre deux populations de spins sur leur spectre RMN a été rapporté dès 1951 *(Arnold and Packard, 1951; Liddel and Ramsey, 1951)*. Quelques années plus tard, Forsén et Hoffman *(Forsén and Hoffman, 1963)* établirent la spectroscopie de transfert d'aimantation comme une méthode de référence pour l'étude des échanges de protons entre deux sites non-équivalents. Cependant, ce n'est qu'en 1989 que cette approche a été adaptée à l'imagerie RMN *in vivo*. Wolff et Balaban furent les premiers à démontrer que l'échange chimique entre l'eau libre et des protons labiles de solutés en faible concentration permet de générer un contraste sur le signal de l'eau libre *(Guivel-Scharen et al., 1998; Ward et al., 2000; Wolff and Balaban, 1990)*. Ce nouveau mécanisme de contraste fut désigné par l'acronyme CEST (pour *Chemical Exchange dependent Saturation Transfer*). Cette même approche fut appliquée pour générer un contraste lié à l'échange de protons entre l'eau libre et les macromolécules semi-mobiles des tissus *(Wolff and Balaban, 1989)*, définissant l'imagerie de transfert d'aimantation (désigné par l'acronyme MT pour *Magnetization Transfer*) comme une nouvelle modalité de caractérisation des tissus mous pour la recherche clinique (pour revue voir *(Wolff and Balaban, 1994)*).

Plus tard, van Zijl et collaborateurs *(Goffeney et al., 2001; Snoussi et al., 2003)* appliquèrent l'imagerie CEST pour faciliter la détection indirecte de macromolécules possédant un très grand nombre de fonctions amides ou imines (~500000) tel que la poly-L-lysine. Des facteurs d'amplification record de 10^7 furent atteints ouvrant le champ à une nouvelle génération d'agents de contraste exogènes tirant parti de ce phénomène d'amplification *(Aime et al., 2002; Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2001)*.

Dans ce chapitre III, nous nous proposons de préciser le cadre théorique qui régit les imageries CEST et MT. Nous nous sommes notamment inspirés des excellentes revues de Zhou et Woessner *(Woessner et al., 2005; Zhou and van Zijl, 2006)*.

III.2 Théorie

III.2.a Equations de Bloch-McConnell

Considérons une séquence standard de transfert de saturation (voir figure F.III.1). Cette séquence se compose de deux parties : une première partie consiste à perturber le système de spins en échange chimique. La seconde partie consiste à mesurer la réponse du système à cette perturbation. Dans le cas de l'imagerie de transfert de saturation, la perturbation consiste à détruire sélectivement une partie de l'aimantation longitudinale. D'autres méthodes, la plupart spécifiques de la spectroscopie RMN, modifient la phase de l'aimantation ou la polarisation d'une des populations de spins.

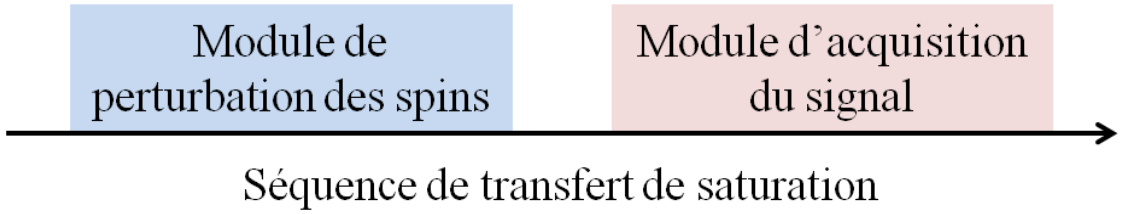


Figure F.III.1 : Schéma d'une séquence de transfert de saturation.

Afin de décrire l'évolution des aimantations M_A et M_B de deux populations de spins A et B en échange chimique au cours d'une séquence de transfert de saturation, nous avons choisi d'adopter la description semi-classique donnée par les équations de Bloch-McConnell *(McConnell, 1958; Woessner, 1961)*. Soient deux populations de protons A et B en échange chimique (voir figure F.III.2), et les paramètres du modèle :

$M^a_{x,y,z}$ et $M^b_{x,y,z}$: les aimantations dans le référentiel tournant,

M^a_0 et M^b_0 : leur aimantation à l'équilibre,

T_1^a et T_1^b : les temps de relaxation longitudinaux en s,

T_2^a et T_2^b : les temps de relaxation transversaux en s,

Δ_a et Δ_b : les déplacement fréquentiels par rapport à la fréquence du référentiel tournant en Hz,

k_{ex}^{ab} et k_{ex}^{ba} : les taux d'échange en s^{-1},

et $\omega_1 = \gamma.B_1 / 2\pi$: l'intensité du champ d'excitation en rad.s^{-1} (dans ce cas appliqué selon l'axe Ox).

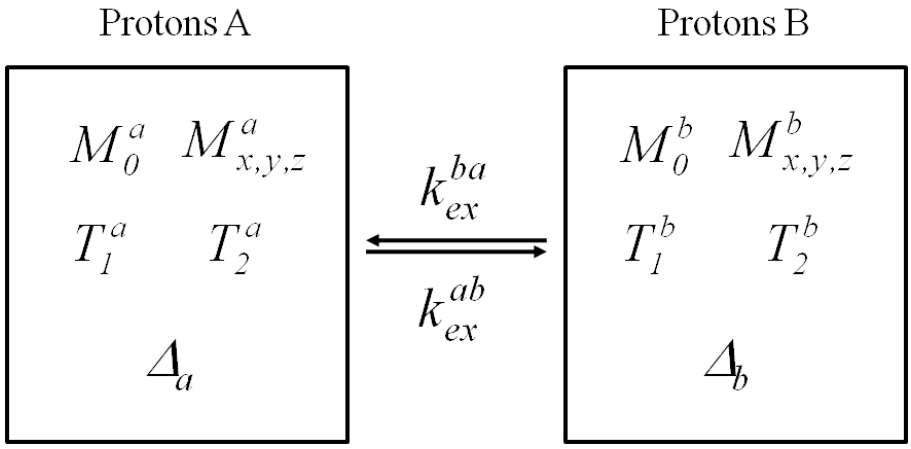


Figure F.III.2 : Modèle à 2 compartiments pour le transfert de saturation.

Les équations de Bloch-McConnell s'écrivent :

E1 $$\frac{dM_x^a}{dt} = -\frac{M_x^a}{T_2^a} - k_{ex}^{ab} M_x^a + k_{ex}^{ba} M_x^b - 2\pi\Delta_a M_y^a ,$$

E2 $$\frac{dM_x^b}{dt} = -\frac{M_x^b}{T_2^b} - k_{ex}^{ba} M_x^b + k_{ex}^{ab} M_x^a - 2\pi\Delta_b M_y^b ,$$

E3 $$\frac{dM_y^a}{dt} = -\frac{M_y^a}{T_2^a} - k_{ex}^{ab} M_y^a + k_{ex}^{ba} M_y^b + 2\pi\Delta_a M_x^a - \omega_1 M_z^a ,$$

E4 $$\frac{dM_y^b}{dt} = -\frac{M_y^b}{T_2^b} - k_{ex}^{ba} M_y^b + k_{ex}^{ab} M_y^a + 2\pi\Delta_b M_x^b - \omega_1 M_z^b ,$$

E5 $$\frac{dM_z^a}{dt} = \frac{M_0^a - M_z^a}{T_1^a} - k_{ex}^{ab} M_z^a + k_{ex}^{ba} M_z^b + \omega_1 M_y^a ,$$

E6 $$\frac{dM_z^b}{dt} = \frac{M_0^b - M_z^b}{T_1^b} - k_{ex}^{ba} M_z^b + k_{ex}^{ab} M_z^a + \omega_1 M_y^b .$$

III.2.b Condition d'observation des populations de spins A et B

Dans un premier temps, considérons l'application d'une excitation non-sélective des deux systèmes de spins, l'angle de bascule étant de 90°. Les aimantations à t = 0 sont : $M^a(0)=\begin{pmatrix}0 & M_0^a & 0\end{pmatrix}$ et $M^b(0)=\begin{pmatrix}0 & M_0^b & 0\end{pmatrix}$. Leur évolution dans le plan transverse est décrite par les équations suivantes :

E7 $$\frac{dM_x^a}{dt}=-\frac{M_x^a}{T_2^a}-k_{ex}^{ab}M_x^a+k_{ex}^{ba}M_x^b-2\pi\Delta_a M_y^a,$$

E8 $$\frac{dM_x^b}{dt}=-\frac{M_x^b}{T_2^b}-k_{ex}^{ba}M_x^b+k_{ex}^{ab}M_x^a-2\pi\Delta_b M_y^b,$$

E9 $$\frac{dM_y^a}{dt}=-\frac{M_y^a}{T_2^a}-k_{ex}^{ab}M_y^a+k_{ex}^{ba}M_y^b+2\pi\Delta_a M_x^a,$$

E10 $$\frac{dM_y^b}{dt}=-\frac{M_y^b}{T_2^b}-k_{ex}^{ba}M_y^b+k_{ex}^{ab}M_y^a+2\pi\Delta_b M_x^b.$$

Considérons les aimantations transversales complexes $M_T^a=M_y^a-iM_x^a$ et $M_T^b=M_y^b-iM_x^b$, on peut réécrire le système d'équations {***E7-E10***} sous forme matricielle :

E11 $$\frac{d}{dt}\begin{bmatrix}M_T^a\\M_T^b\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}i2\pi\Delta_a-k_{ex}^{ab}-1/T_2^a & k_{ex}^{ba}\\ k_{ex}^{ab} & 2\pi\Delta_b-k_{ex}^{ba}-1/T_2^b\end{bmatrix}\begin{bmatrix}M_T^a\\M_T^b\end{bmatrix}.$$

Ce système d'équations peut être résolu analytiquement pour déterminer l'évolution temporelle des aimantations transversales en présence d'échange chimique. Les solutions sont :

E12 $M_T^a(t)=c_1^a\,exp(\lambda_1 t)+c_2^a\,exp(\lambda_2 t)$ et

E13 $M_T^b(t)=c_1^b\,exp(\lambda_1 t)+c_2^b\,exp(\lambda_2 t)$, avec $\lambda_{1,2}$ les valeurs propres de la matrice.

Afin de simplifier l'expression de cette solution analytique, considérons le cas particulier où M_0^a et M_0^b sont égaux. Ceci implique que $k_{ex}^{ab}=k_{ex}^{ba}$ puisqu'à l'équilibre, les flux

de protons entre les deux groupes sont égaux, i.e. $k_{ex}^{ab} M_0^a = k_{ex}^{ba} M_0^b$. Aussi les relaxations transverses sont négligées. On a alors :

$$\lambda_{1,2} = i\pi(\Delta_a + \Delta_b) - k_{ex}^{ab} \pm W ,$$

$$c_1^a = \frac{M_0^a}{2W}\left[i\pi(\Delta_a - \Delta_b) + k_{ex}^{ab} + W\right],\ c_2^a = \frac{M_0^a}{2W}\left[-i\pi(\Delta_a - \Delta_b) - k_{ex}^{ab} + W\right],$$

$$c_1^b = \frac{M_0^b}{2W}\left[-i\pi(\Delta_a - \Delta_b) + k_{ex}^{ab} + W\right],\ c_2^b = \frac{M_0^b}{2W}\left[i\pi(\Delta_a - \Delta_b) - k_{ex}^{ab} + W\right] \text{ et}$$

$$W = \sqrt{(k_{ex}^{ab})^2 - \pi^2(\Delta_a - \Delta_b)^2} .$$

En définitive, le signal mesuré est :

E14 $S(t) \propto M_T^a(t) + M_T^b(t).$

Afin de mieux appréhender ces relations et les conséquences de l'échange chimique sur l'observation des populations de spins A et B, considérons deux cas de figure :

- Echange lent : $k_{ex}^{ab} << |\Delta_a - \Delta_b|$

On a alors :

$$W \approx i\pi(\Delta_a - \Delta_b),$$

$$\lambda_1 \approx i2\pi\Delta_a - k_{ex}^{ab}\ ,\ \lambda_2 \approx i2\pi\Delta_b - k_{ex}^{ab}\ ,$$

$$c_1^a \approx M_0^a\ ,\ c_2^b \approx M_0^b \text{ et } c_2^a \approx c_1^b \approx 0 .$$

Il en découle la mesure d'un signal temporel :

E15 $S(t) \propto M_0^a\, exp\left[\left(i2\pi\Delta_a - k_{ex}^{ab}\right)t\right] + M_0^b\, exp\left[\left(i2\pi\Delta_b - k_{ex}^{ab}\right)t\right]$

dont le spectre (partie réelle de la transformée de Fourier) correspond à l'observation de deux pics d'intensités respectives M_0^a et M_0^b, centrés en Δ_a et Δ_b, et de largeur à mi-hauteur $2k_{ex}^{ab}$ (voir figure F.III.3).

- Echange rapide : $k_{ex}^{ab} >> |\Delta_a - \Delta_b|$

On a alors :

$$W \approx k_{ex}^{ab}\left[1 - \frac{\pi^2(\Delta_a - \Delta_b)^2}{2(k_{ex}^{ab})^2}\right],$$

$$\lambda_{1,2} = i\pi(\Delta_a + \Delta_b) - k_{ex}^{ab} \pm k_{ex}^{ab}\left[1 - \frac{\pi^2(\Delta_a - \Delta_b)^2}{2(k_{ex}^{ab})^2}\right],$$

$c_1^a \approx M_0^a$, $c_1^b \approx M_0^b$ et $c_2^a \approx c_2^b \approx 0$.

Il en découle la mesure d'un signal temporel :

E16 $$S(t) \propto M_0^a \exp\left[\left(i\pi(\Delta_a + \Delta_b) - \frac{\pi^2(\Delta_a - \Delta_b)^2}{2k_{ex}^{ab}}\right).t\right] + M_0^b \exp\left[\left(i\pi(\Delta_a + \Delta_b) + \frac{\pi^2(\Delta_a - \Delta_b)^2}{2k_{ex}^{ab}}\right).t\right]$$

dont le spectre correspond à l'observation d'un pic unique d'intensité $M_0^a + M_0^b$, centré en $(\Delta_a + \Delta_b)/2$, et de largeur à mi-hauteur $\pi^2(\Delta_a - \Delta_b)^2 / k_{ex}^{ab}$ (voir figure F.III.3).

Etant donné que le transfert d'aimantation n'est possible qu'entre deux groupes de protons fréquentiellement distincts, il est nécessaire que le taux d'échange soit inférieur au déplacement chimique entre les deux populations de protons. Ceci constitue donc une condition d'observation d'un contraste CEST :

E17 $$k_{ex}^{ba} << |\Delta_a - \Delta_b|.$$

Il est important de noter que cette condition ***E17*** est plus aisément remplie à haut champ magnétique puisque $|\Delta_a - \Delta_b|$ augmente proportionnellement avec l'intensité de celui-ci.

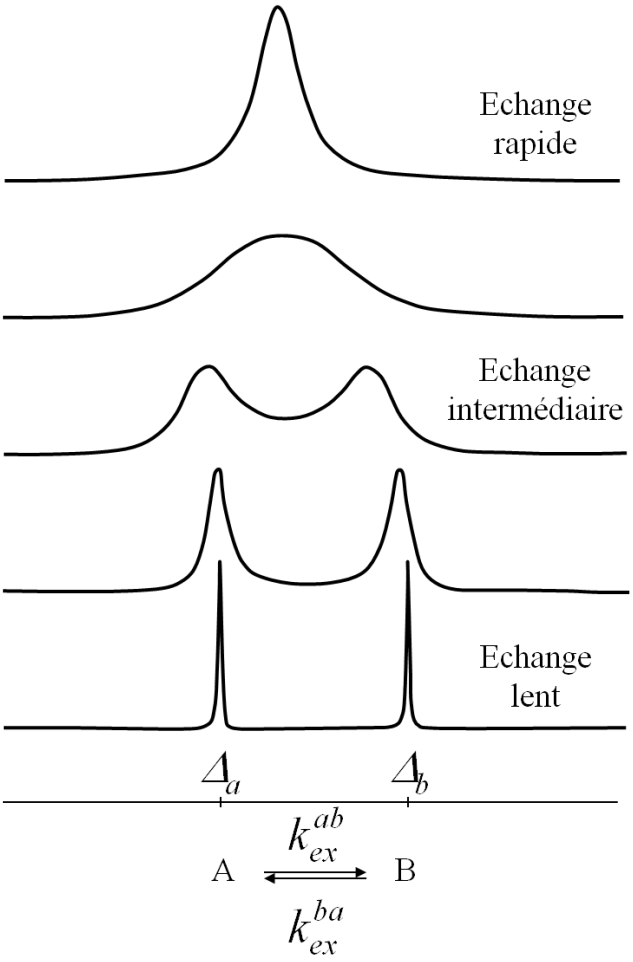


Figure F.III.3 : Spectres des populations de spins A et B en fonction de la vitesse du taux d'échange.

III.2.c Transfert de saturation

- Saturation complète du soluté B

Considérons l'expérience de transfert de saturation durant laquelle le soluté B est sélectivement et complètement saturé de sorte que : $M_z^b(t)=0$. De la résolution des équations de Bloch-McConnell {***E1-E6***}, on dérive :

E18 $$\frac{M_z^a(t)}{M_0^a}=\frac{1}{R_a T_1^a}+\left[1-\frac{1}{R_a T_1^a}\right].exp\left(-R_a.t\right),$$

avec $R_a = \frac{1}{T_1^a} + k_{ex}^{ab}$ et t le temps de saturation. On remarque que le taux de saturation maximum atteint pour les spins A à t = ∞ n'est pas égal à l'unité :

E19 $$1 - \frac{M_z^a(t)}{M_0^a} = 1 - \frac{1}{R_a T_1^a} = \frac{k_{ex}^{ab}}{1/T_1^a + k_{ex}^{ab}}.$$

L'équation ***E19*** illustre l'existence d'un équilibre entre l'aimantation détruite par échange chimique avec les spins B et celle restaurée par la relaxation longitudinale.

- Saturation partielle du soluté B

Cette fois-ci, considérons la saturation sélective mais incomplète des spins B. On a alors le système d'équation de Bloch-McConnell suivant (les termes d'évolution fréquentielle étant négligés) :

E20 $$\frac{dM_y^a}{dt} = -\frac{M_y^a}{T_2^a} - k_{ex}^{ab} M_y^a + k_{ex}^{ba} M_y^b,$$

E21 $$\frac{dM_y^b}{dt} = -\frac{M_y^b}{T_2^b} - k_{ex}^{ba} M_y^b + k_{ex}^{ab} M_y^a - \omega_1 M_z^b,$$

E22 $$\frac{dM_z^a}{dt} = \frac{M_0^a - M_z^a}{T_1^a} - k_{ex}^{ab} M_z^a + k_{ex}^{ba} M_z^b,$$

E23 $$\frac{dM_z^b}{dt} = \frac{M_0^b - M_z^b}{T_1^b} - k_{ex}^{ba} M_z^b + k_{ex}^{ab} M_z^a + \omega_1 M_y^b.$$

Le système peut être résolu analytiquement pour $\frac{dM_{x,y,z}^{a,b}}{dt} = 0$. Les aimantations à l'équilibre sont alors :

E24 $$M_z^b - M_0^b = -\frac{\omega_1^2 M_0^b}{\omega_1^2 + p.q},$$

E25 $$M_y^b = -\frac{\omega_1 .q.M_0^b}{\omega_1^2 + p.q},$$

E26 $$M_z^a - M_0^a = -k_{ex}^{ab}.T_1^a.\frac{\omega_1^2 M_0^a}{\omega_1^2 + p.q},$$

E27 $$M_y^a = -k_{ex}^{ab}.T_2^a\,\frac{\omega_1.q.M_0^a}{\omega_1^2 + p.q},$$

E28 $$p = \frac{1 + T_2^a k_{ex}^{ab} + T_2^b k_{ex}^{ba}}{T_2^b + T_2^b T_2^a k_{ex}^{ab}}$$ et

E29 $$q = \frac{1 + T_1^a k_{ex}^{ab} + T_1^b k_{ex}^{ba}}{T_1^b + T_1^b T_1^a k_{ex}^{ab}}.$$

On peut définir le ratio de saturation des spins B :

E30 $$\alpha = \frac{M_0^b - M_z^b}{M_0^b} = \frac{\omega_1^2}{\omega_1^2 + p.q}.$$

On remarque que la saturation complète du groupe B n'est jamais atteinte en pratique puisque cela nécessiterai une intensité ω_1 infinie.

- Approximation de saturation faible

Enfin, considérons la dépendance du transfert de saturation en fonction du temps de saturation T_{sat}. Afin de disposer d'une solution analytique, deux approximations sont nécessaires : l'aimantation des spins B atteint son état d'équilibre quasi-instantanément, i.e. les relations ***E24*** et ***E25*** sont vérifiées ; l'aimantation des spins A reste inchangée pendant ce court laps de temps ($M_z^a(0) = M_0^a$). Ces approximations sont valides si l'on considère que le taux de saturation du groupe B est supérieur au taux de transfert de saturation vers le groupe A, i.e. si : $\left(\frac{1}{T_1^b} + \frac{1}{T_2^b}\right) > \left(\frac{1}{T_1^a} + k_{ex}^{ab}\right)$. Cette condition est assez souvent vérifiée si le soluté B est significativement moins mobile que l'eau libre A. On a alors :

E31 $$M_z^a(t) - M_0^a = -\frac{k_{ex}^{ab}}{1/T_1^a + k_{ex}^{ab}}.\frac{\omega_1^2 M_0^a}{\omega_1^2 + p.q}.\left[1 - exp\left(-(\frac{1}{T_1^a} + k_{ex}^{ab}).t\right)\right].$$

Le taux de saturation des spins A est régulièrement désigné dans la littérature par l'acronyme PTR (pour *Proton Transfer Ratio*) et est défini ainsi :

E32 $$\frac{M_0^a - M_z^a(t)}{M_0^a} = \frac{\alpha . k_{ex}^{ab}}{1/T_1^a + k_{ex}^{ab}} . \left[1 - exp\left(-(\frac{1}{T_1^a} + k_{ex}^{ab}) t \right) \right].$$

On remarque que l'efficacité de saturation des spins A dépend du ratio de saturation des spins B et du taux de saturation des protons A : $\left(\frac{1}{T_1^a} + k_{ex}^{ab} \right)$. Comme l'illustrent respectivement les figures F.III.4.a, .b et .c, ce dernier est impacté par la concentration de soluté ($k_{ex}^{ab} = k_{ex}^{ba} . M_0^b / M_0^a$), par le taux d'échange intrinsèque du soluté avec l'eau libre k_{ex}^{ba} et par la valeur du T_1^a. Ainsi, un taux d'échange rapide entre les spins A et B, une concentration importante en soluté B ou une augmentation du T_1^a permettent d'améliorer l'efficacité de la saturation des spins A. Or on sait que le temps de relaxation longitudinal augmente avec le champ magnétique. Par conséquent, le passage aux hauts champs magnétiques est favorable à l'imagerie de transfert de saturation par échange chimique.

L'intérêt majeur de l'imagerie de transfert de saturation par échange chimique est de pouvoir détecter indirectement un soluté peu concentré (ici les protons B) via son échange chimique avec les protons du solvant évidemment plus concentré (ici les protons A). La détection des protons B est donc amplifiée grâce au transfert de saturation et on peut définir un facteur d'amplification FA par la relation suivante :

E33 $$FA = \frac{M_0^a - M_z^a(t)}{M_0^b} = \frac{PTR . M_0^a}{M_0^b} = \frac{\alpha . k_{ex}^{ba}}{1/T_1^a + k_{ex}^{ab}} . \left[1 - exp\left(-(\frac{1}{T_1^a} + k_{ex}^{ab}) t \right) \right].$$

Ainsi, dans le cas de la courbe bleue présentée sur la figure F.III.4 (α = 0,5 ; k_{ex}^{ba} = 10000 Hz ; T_1^a = 5000 ms ; M_0^a = 100 M ; M_0^b = 1 mM ; T_{sat} = 10s), la saturation de 50% des protons B se manifeste par une variation de 16% du signal mesuré à la fréquence des protons A ce qui correspond à un facteur d'amplification de 16000. C'est en raison de facteurs d'amplification importants que l'imagerie de transfert de saturation constitue une approche intéressante pour accroître la sensibilité de détection de l'imagerie moléculaire par IRM.

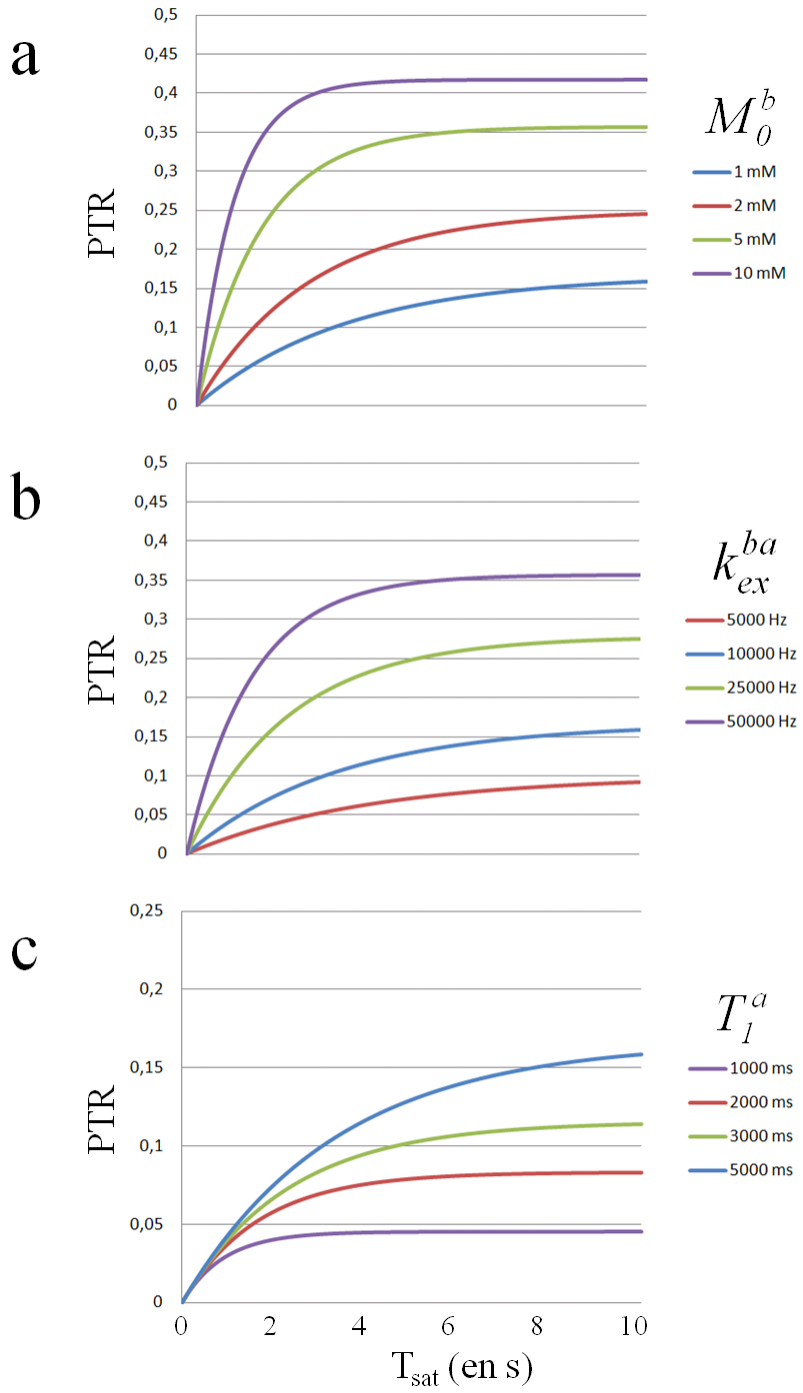


Figure F.III.4 : Taux de saturation des spins A en fonction de M_0^b, de k_{ex}^{ba} et de T_1^a. *Paramètres de la simulation : **(a)** : $\alpha = 0,5$; $k_{ex}^{ba} = 10000$ Hz ; $T_1^a = 5000$ ms ; $M_0^a = 100$ M ; $M_0^b = 1/2/5/10$ mM ; **(b)** : $\alpha = 0,5$; $k_{ex}^{ba} = 5000/10000/25000/50000$ Hz ; $T_1^a = 5000$ ms ; $M_0^a = 100$ M ; $M_0^b = 1$ mM ; **(c)** : $\alpha = 0,5$; $k_{ex}^{ba} = 10000$ Hz ; $T_1^a = 1000/2000/3000/5000$ ms ; $M_0^a = 100$ M ; $M_0^b = 1$ mM. La courbe bleue est commune aux trois graphes.*

Si l'efficacité de la saturation augmente avec l'intensité de la saturation B_1, l'application d'une saturation intense engendre aussi une augmentation de la saturation directe des spins A (ou *spill-over effect*). Par conséquent, il existe une intensité optimale pour laquelle le compromis entre le transfert de saturation et la saturation directe des protons libre entraine un PTR maximum. Cette intensité peut être obtenue en annulant la dérivée première selon ω_1 de l'équation ***E32*** *(Sun et al., 2005)*. Une résolution numérique rapportée par Woessner et collaborateurs indique que la valeur optimale de l'intensité de saturation ω_{1opt} dépend au premier ordre du taux d'échange entre les spins A et B *(Woessner et al., 2005)*. On peut alors estimer que l'intensité optimale de saturation ω_{1opt} vérifie la relation suivante :

E34 $$k_{ex}^{ba} = \omega_{1opt} = 2\pi.\gamma.B_{1opt},$$

avec γ le rapport gyromagnétique du proton (exprimé en $Hz.T^{-1}$) et B_1 l'intensité de la saturation (exprimée en T).

III.2.d Caractérisation du transfert d'aimantation

De façon générale, les équations d'évolution des aimantations au cours d'une expérience de transfert d'aimantation sont très rarement dérivées d'une résolution analytique des équations de Bloch-McConnell en raison de la complexité des systèmes réels notamment *in vivo*. En revanche, il est fréquent de considérer le calcul numérique ou la mesure expérimentale du Z-spectrum *(Grad et al., 1991)*. Le Z-spectrum correspond à la fraction d'aimantation longitudinale pour les spins observés (ici M_z^a / M_0^a exprimé en %) en fonction de la fréquence de saturation (δ_{sat}). La figure F.III.5 représente un Z-spectrum simulé pour un modèle à 2 compartiments correspondant à l'eau libre (protons A) et aux protons déplacés par un agent CEST (protons B).

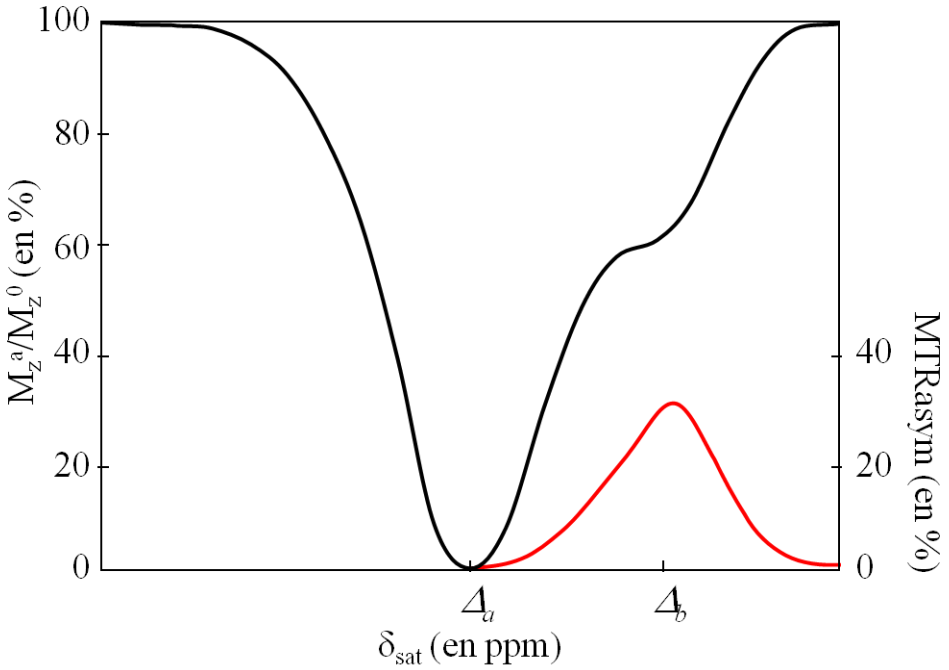


Figure F.III.5 : Z-spectrum (courbe noire) et Z-spectrum asymétrique (courbe rouge) simulés dans le cadre d'un modèle à 2 compartiments. *Les paramètres de la simulation sont (M_0^a = 110 M, T_1^a = 3500 ms, T_2^a = 100 ms, Δ_a = 0 ppm, T_1^b = 50 ms, T_2^b = 2 ms, Δ_b = 11 ppm, M_0^b = 1,5 M, k_{ex}^{ba} = 300 Hz, B_1 = 7 µT).*

Tel qu'illustré par la figure F.III.5, l'effet de la saturation est maximal lorsque celle-ci est appliquée à la fréquence de résonance des spins A ou B (Δ_a ou Δ_b). On remarque toutefois que la saturation n'est pas nulle hors-résonance. Ceci est dû à la saturation directe encore désignée par l'expression anglaise de *spill-over effect*. Ce *spill-over effect* se manifeste lorsqu'une saturation intense est appliquée à proximité de l'une des résonances. Une étude théorique du *spill-over effect* a été réalisée par Baguet et Roby *(Baguet and Roby, 1997)*. Ce *spill-over effect* est approximativement symétrique. Par conséquent, il est possible de s'en affranchir en réalisant deux expériences de saturation avec la même saturation appliquée de part et d'autre de la fréquence de résonance de l'eau libre. Par conséquent, un ratio de transfert d'aimantation asymétrique désigné par l'acronyme MTRasym pour *asymmetrical Magnetization Transfer Ratio* est défini par l'équation suivante :

E35 $$MTRasym = \frac{M_z^a(-\delta_{sat}) - M_z^a(\delta_{sat})}{M_0^a}.$$

Cette grandeur étant spécifique de l'échange chimique avec le soluté B, il est pratique de tracer la fonction $MTRasym(\delta_{sat})$ pour mieux apprécier le transfert de saturation entre A et B. On parle alors de Z-spectrum asymétrique (voir figure F.III.5, courbe rouge). Dans la suite de ce manuscrit, les deux types de Z-spectra seront exploités.

III.3 Applications

III.3.a Imagerie MT

L'imagerie de transfert d'aimantation a été proposée pour la première fois en 1989 par Wolff et Balaban pour générer un nouveau type de contraste *(Wolff and Balaban, 1989)*. Ce contraste MT (pour *Magnetization Transfer*) trouve son origine dans l'échange chimique et le couplage dipolaire entre protons de l'eau libre et protons semi-mobiles des macromolécules cellulaires (protéines, membranes cellulaires, myéline). Etant donné la relative immobilité de ces protons macromoléculaires, leur T_2 est extrêmement court (< 100 µs) et par conséquent leurs résonances se caractérisent par une largeur spectrale importante de plusieurs kHz. Par ailleurs, ce spectre est approximativement symétrique par rapport à celui de l'eau libre (voir figure F.III.6).

Lorsqu'une impulsion de saturation est appliquée hors-résonance à moins de 5kHz de la résonance de l'eau libre, une fraction de l'aimantation de ces protons semi-mobiles est saturée. Ainsi que nous l'avons détaillé dans le paragraphe III.2, cette saturation est transférée à l'eau libre. En pratique, un protocole d'imagerie MT comprend l'acquisition de deux images, une image de référence sans saturation ($Image_{Ref}$) et une image avec saturation ($Image_{ON}$). Comme pour ***E35***, on définit alors un ratio de transfert d'aimantation désigné par l'acronyme MTR pour *Magnetization Transfer Ratio* :

E36 $$MTR = \frac{Image_{Ref} - Image_{ON}}{Image_{Ref}}.$$

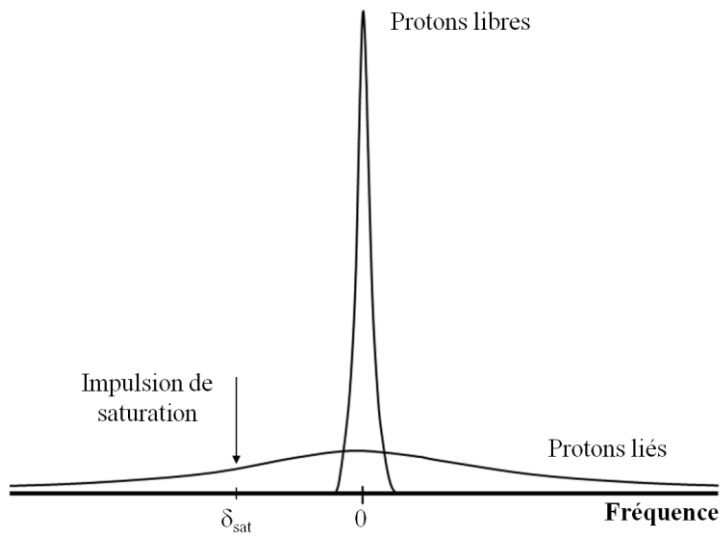


Figure F.III.6 : Transfert d'aimantation entre les protons libres et les protons liés.

Comme nous l'avons vu précédemment, la fraction de protons en échange avec les protons de l'eau libre est un facteur influençant fortement le contraste MT. Par conséquent, il a été proposé d'utiliser le contraste MT afin de mettre en évidence des changements de composition des tissus. Le champ d'application principal dans le domaine clinique est l'imagerie de pathologies de la matière blanche, comme par exemple la sclérose en plaque, qui se manifeste par une démyélinisation des fibres nerveuses. L'évolution de la pathologie est lente et certaines lésions ne sont pas toujours visibles en imagerie standard pondérée T_1 ou T_2. Aussi, le recourt à l'imagerie MT permet de détecter certaines pathologies plus précocement et de mieux les caractériser *(Filippi and Rocca, 2004; Grossman et al., 1994)*.

La figure F.III.7 présente une application clinique de l'imagerie de transfert de saturation pour la détection de la sclérose en plaque. La lésion est visible sur l'image anatomique conventionnelle mais le contraste avec les tissus sains est faible (voir figure F.III.7.a). Sur l'image de transfert de saturation (voir figure F.III.7.b), le contraste entre la lésion et les tissus sains est nettement augmenté. La différence entre ces deux images (voir figure F.III.7.c) permet de mettre en évidence les zones où le transfert de saturation est moindre, comme c'est le cas dans la lésion en raison de la démyélinisation de la matière blanche.

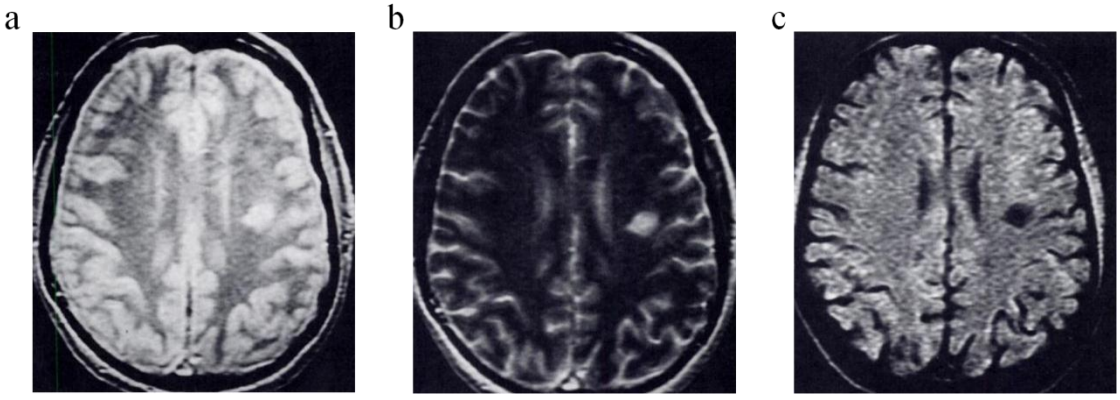


Figure F.III.7 : Application clinique de l'imagerie de transfert de saturation. *La démyélinisation affectant la matière blanche dans le cadre de la sclérose en plaque est visible sur l'image conventionnelle mais le contraste est faible (**a**). La lésion apparait en hypersignal sur l'image de transfert de saturation en raison d'un transfert de saturation moindre que dans le parenchyme sain (**b**). La différence des deux images permet d'augmenter le contraste entre la lésion et les tissus sains (**c**). Illustration tirée de (Grossman et al., 1994).*

III.3.b Imagerie diaCEST et APT

En 2000, Ward et Balaban proposèrent l'utilisation de petits composés possédant des protons labiles (alcool, amide, imine) en tant qu'agent de contraste CEST pour l'IRM *(Ward et al., 2000)*. L'originalité de ces molécules tient d'une part à la possibilité « d'allumer ou d'éteindre » le contraste grâce à l'application d'une impulsion sélective. D'autre part, les propriétés d'échange de ces composés étant intrinsèquement dépendantes de paramètres physiologiques tels que la température ou le pH, on peut envisager l'application de cette technique pour la thermométrie et la cartographie de pH *(van Zijl and Yadav, 2011)*. Ces agents de contraste diamagnétiques sont désignés par l'acronyme diaCEST.

On peut ainsi répertorier les approches glycoCEST pour l'imagerie du glycogène *(van Zijl et al., 2007)*, gagCEST pour l'imagerie des glycosaminoglycanes *(Ling et al., 2008)* ou très récemment le gluCEST pour l'imagerie du glutamate *(Cai et al., 2012)*. Cette approche diaCEST constitue une alternative crédible à l'imagerie spectroscopique de ces métabolites. La figure F.III.8 montre une application clinique de l'imagerie du gluCEST. Une carte gluCEST (voir figure F.III.8.b) acquise à 7T chez un volontaire sain montre une répartition du glutamate

dans le cerveau comparable aux volumes de distribution des récepteurs métabotropes au glutamate de sous-type 5 (mGluR5) déterminés grâce à l'imagerie TEP (voir figure F.III.8.c).

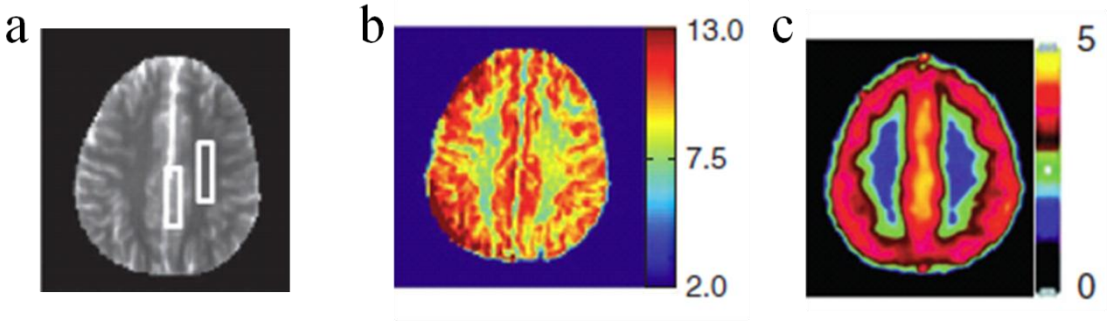


Figure F.III.8 : Application clinique de l'imagerie gluCEST. ***(a)*** *: Image anatomique de référence acquise à 7T chez un volontaire sain ;* ***(b)*** *: Carte gluCEST acquise sur la même coupe du cerveau. Les conditions de saturation sont B_1 = 3,6 µT et δ_{sat} = -5 à 5 ppm avec un pas de 0,1 ppm. L'échelle de couleur représente le pourcentage de contraste gluCEST ;* ***(c)*** *: Image TEP des volumes de distribution des récepteurs métabotropes au glutamate de sous-type 5. Illustration tirée de (Cai et al., 2012).*

Ces dernières années, un type d'imagerie diaCEST en particulier a connu un essor important. Il s'agit de l'imagerie de transfert d'aimantation des protons amides *(Zhou et al., 2003a)*. Ce contraste est désigné par l'acronyme APT (pour *Amide Proton Transfer*) et est lié à l'échange des protons amides avec les protons de l'eau libre. Les protons amides présentent des caractéristiques d'échange favorables, avec des taux d'échange de l'ordre de 10 à 30 Hz et sont relativement concentrés (environ 72 µM). De plus, les taux d'échanges sont dépendants des propriétés physiologiques du milieu comme la température ou le pH. Ces propriétés font de l'imagerie APT une méthode prometteuse pour la cartographie *in vivo* de ces paramètres mais aussi pour détecter des zones où ces paramètres varient comme dans le cas des tumeurs ou des ischémies cérébrales.

Des études *in vivo* menées chez le rat ont montré que l'imagerie APT permet de mieux visualiser les contours des tumeurs cérébrales que l'imagerie de pondération T_1 et T_2 traditionnelle et est aussi performante que l'imagerie de diffusion *(Zhou et al., 2003a)*. De plus, des études ont également démontré le potentiel de l'imagerie APT pour la détection de tumeurs cérébrales chez l'homme *(Jones et al., 2006; Zhao et al., 2008)*, comme l'illustre la figure F.III.9. Afin d'augmenter la sensibilité de détection des agents diaCEST, l'équipe de Peter van Zijl a proposé d'utiliser des macromolécules possédant un grand nombre de fonctions amides ou imides (~500000) telles que la poly-L-lysine. Des facteurs d'amplification records ont été

atteints (FA ~ 10^7) ouvrant le champ à une nouvelle génération d'agents de contraste exogènes tirant parti de ce phénomène d'amplification *(Aime et al., 2002; Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2001)*. De telles macromolécules peuvent aussi être exprimées de façon endogène en relation avec une protéine d'intérêt. Dans ce cas de figure, l'imagerie APT constitue une approche d'imagerie du gène-rapporteur particulièrement prometteuse pour la biologie moléculaire et la génétique *(Liu and Gilad, 2011)*. Enfin, ces molécules diamagnétiques peuvent être encapsulées dans des liposomes pour multiplier le nombre de site d'échange de protons par nanoparticule, permettant d'atteindre des seuils de détection de l'ordre de 2 nM *(Liu et al., 2011)*.

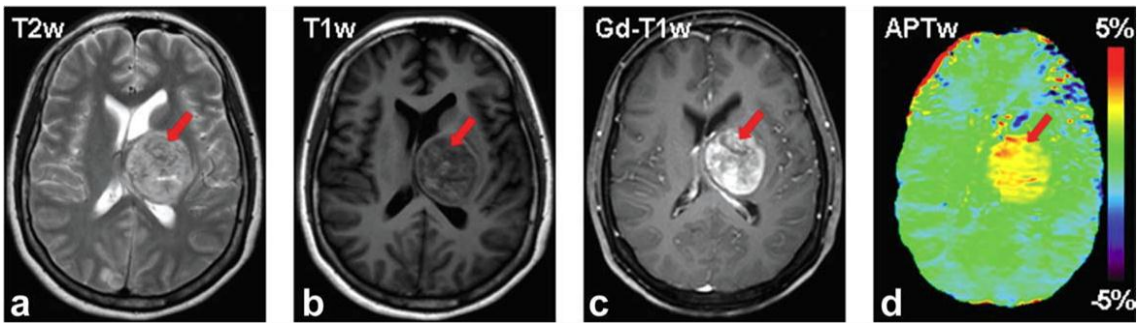


Figure F.III.9 : Application clinique de l'imagerie APT. *Les images conventionnelles pondérées T_2 et T_1 acquises à 3T chez un patient atteint d'une tumeur cérébrale permettent de visualiser la tumeur (**a** et **b** respectivement). Une injection d'agent de contraste à base de Gadolinium permet de rehausser le contraste entre la tumeur et les tissus sains (c). L'image APT (**d**) a été acquise avec les paramètres de saturation suivants : B_1 = 2 μT et δ_{sat} = -3,5 ppm. L'image APT permet de visualiser clairement la tumeur. Illustration tirée de (Zhao et al., 2008).*

III.3.c Imagerie paraCEST

Les agents décrits précédemment sont intéressants car ils permettent d'atteindre des seuils de sensibilité très bas, et d'être sensibles aux variations physiologiques comme la température ou le pH. Néanmoins, en raison du déplacement chimique faible des protons labiles (< 6 ppm), il peut être très compliqué de distinguer leur effet CEST des effets MT et APT endogènes. La détection de ces agents nécessite donc l'acquisition d'un Z-spectrum partiel. Ceci est coûteux en temps et de ce fait limite les applications *in vivo*. Afin de s'affranchir des contrastes endogènes inhérents aux tissus, l'équipe de Dean Sherry a proposé l'utilisation

d'agents paramagnétiques déplaçant fortement la fréquence des protons de l'eau en interaction avec ceux-ci *(Sherry et al.; Zhang et al., 2001)*. Il s'agit de complexes de Lanthanides (Ln^{3+}) paramagnétiques désignés par l'acronyme paraCEST *(Zhang et al., 2003)*. Tous les Lanthanides (à l'exception du Gadolinium(III), du Lutétium(III) et du Lanthane(III)) ont la capacité de déplacer très fortement la fréquence de résonance des protons dans leur environnement proche *(Peters et al., 1996)*. De plus, la nature du ligand permet de moduler le taux d'échange des molécules d'eau qui entrent dans la sphère de coordination du Ln^{3+}. Ainsi, il est possible d'obtenir des déplacements chimiques de plusieurs centaines de ppm avec des taux d'échange compatibles avec la condition d'observation de l'effet CEST. Similairement aux agents diaCEST, ces agents paraCEST présentent des caractéristiques dépendant fortement de paramètres physico-chimiques tels que la température ou le pH. Ils peuvent donc être utilisés pour cartographier ces paramètres *(Li et al., 2008; Sheth et al., 2011; Terreno et al., 2004; Zhang et al., 2005; Zhou et al., 2003b)*. Cependant, les paraCEST souffrent de deux limitations majeures pour une application *in vivo*. D'une part, les paraCEST nécessitent l'utilisation d'une impulsion de saturation relativement intense en raison du temps de résidence court des molécules d'eau au niveau du site métallique (voir équation ***E34***). D'autre part, bien que le facteur d'amplification atteint soit prometteur (FA ~ 10^5 à 10^6), le seuil de détection record enregistré est de 60 µM *in vitro*, ce qui reste incompatible avec l'imagerie moléculaire de cibles nanomolaires. Une solution pour remédier à ce manque de sensibilité est d'augmenter le nombre de sites d'échange de protons par molécule CEST. C'est à partir de cette idée que l'équipe de Silvio Aime *(Aime et al., 2005)* a proposé de concentrer des agents paraCEST dans des liposomes. Ces nouveaux agents de contraste CEST sont désignés par l'acronyme lipoCEST. Des agents lipoCEST développés par notre partenaire Guerbet ont été évalués au cours de cette thèse et sont présentés dans le chapitre suivant.

Bibliographie du Chapitre III

Aime, S., A. Barge, D. Delli Castelli, F. Fedeli, A. Mortillaro, F. U. Nielsen, and E. Terreno, 2002, Paramagnetic lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications.: Magn Reson Med, v. 47, p. 639-48.

Aime, S., D. D. Castelli, and E. Terreno, 2005, Highly sensitive MRI chemical exchange saturation transfer agents using liposomes: Angewandte Chemie-International Edition, v. 44, p. 5513-5515.

Arnold, T., and M. E. Packard, 1951: J. Chem. Phys, v. 19, p. 1608-1609.

Baguet, E., and C. Roby, 1997, Off-resonance irradiation effect in steady-state NMR saturation transfer.: J Magn Reson, v. 128, p. 149-60.

Cai, K., M. Haris, A. Singh, F. Kogan, J. H. Greenberg, H. Hariharan, J. A. Detre, and R. Reddy, 2012, Magnetic resonance imaging of glutamate.: Nat Med, v. 18, p. 302-6.

Filippi, M., and M. A. Rocca, 2004, Magnetization transfer magnetic resonance imaging in the assessment of neurological diseases.: J Neuroimaging, v. 14, p. 303-13.

Forsén, S., and R. Hoffman, 1963, Study of Moderately Rapid Chemical Exchange Reactions by Means of Nuclear Magnetic Double Resonance, J Chem Phys 1963; 39: 2892-2901.

Goffeney, N., J. W. M. Bulte, J. Duyn, L. H. Bryant, and P. C. M. van Zijl, 2001, Sensitive NMR detection of cationic-polymer-based gene delivery systems using saturation transfer via proton exchange: Journal of the American Chemical Society, v. 123, p. 8628-8629.

Grad, J., D. Mendelson, F. Hyder, and R. G. Bryant, 1991, Applications of nuclear magnetic cross-relaxation spectroscopy to tissues.: Magn Reson Med, v. 17, p. 452-9.

Grossman, R. I., J. M. Gomori, K. N. Ramer, F. J. Lexa, and M. D. Schnall, 1994, Magnetization transfer: theory and clinical applications in neuroradiology.: Radiographics, v. 14, p. 279-90.

Guivel-Scharen, V., T. Sinnwell, S. D. Wolff, and R. S. Balaban, 1998, Detection of proton chemical exchange between metabolites and water in biological tissues: Journal of Magnetic Resonance, v. 133, p. 36-45.

Jones, C. K., M. J. Schlosser, P. C. van Zijl, M. G. Pomper, X. Golay, and J. Zhou, 2006, Amide proton transfer imaging of human brain tumors at 3T.: Magn Reson Med, v. 56, p. 585-92.

Li, A. X., R. H. E. Hudson, J. W. Barrett, C. K. Jones, S. H. Pasternak, and R. Bartha, 2008, Four-Pool Modeling of Proton Exchange Processes in Biological Systems in the Presence of MRI-Paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer (PARACEST) Agents: Magnetic Resonance in Medicine, v. 60, p. 1197-1206.

Liddel, U., and N. F. Ramsey, 1951, Temperature Dependent Magnetic Shielding in Ethyl Alcohol: J. Chem. Phys., v. 19, p. 1608.

Ling, W., R. R. Regatte, G. Navon, and A. Jerschow, 2008, Assessment of glycosaminoglycan concentration in vivo by chemical exchange-dependent saturation transfer (gagCEST). Proc Natl Acad Sci U S A, v. 105, p. 2266-70.

Liu, G., and A. A. Gilad, 2011, MRI of CEST-based reporter gene.: Methods Mol Biol, v. 771, p. 733-46.

Liu, G., M. M. Moake, Y.-E. Har-el, C. M. Long, K. W. Y. Chan, A. Cardona, M. Jamil, P. Walczak, A. A. Gilad, G. Sgouros, P. C. M. van Zijl, J. W. Bulte, and M. T. McMahon, 2011, In Vivo Multicolor Molecular MR Imaging Using Diamagnetic Chamical Exchange Saturation Transfer Liposomes. Magnetic Resonance in Medicine 2011, DOI 10.1002/mrm.23100.

McConnell, H., 1958, Reaction rates by nuclear magnetic resonance, J Chem Phys, 28:430-431.

Peters, J., J. Huskens, and D. Raber, 1996, Lanthanide induced shifts and relaxation rate enhancements: Prog. NMR Spectrocopy, v. 28, p. 283-350.

Sherry, A., P. Winter, and K. Wu, Paramagnetic metal ion-based macrocyclic magnetization transfer contrast agents and method of use. WO 0243775 patent 0243775; 2002.

Sheth, V. R., Y. Li, L. Q. Chen, C. M. Howison, C. A. Flask, and M. D. Pagel, 2011, Measuring in vivo tumor pHe with CEST-FISP MRI. Magnetic Resonance in Medicine 2011, DOI 10.1002/mrm.23038: Magn Reson Med.

Snoussi, K., J. W. M. Bulte, M. Gueron, and P. C. M. van Zijl, 2003, Sensitive CEST agents based on nucleic acid imino proton exchange: Detection of poly(rU) and of a dendrimer-poly(rU) model for nucleic acid delivery and pharmacology: Magnetic Resonance in Medicine, v. 49, p. 998-1005.

Sun, P., P. van Zijl, and J. Zhou, 2005, Optimization of the irradiation power in chemical exchange dependent saturation transfer experiments: Journal of Magnetic Resonance, v. 175, p. 193-200.

Terreno, E., D. Castelli, G. Cravotto, L. Milone, and S. Aime, 2004, Ln(III)-DOTAMGIY complexes: A versatile series to assess the determinants of the efficacy of paramagnetic

chemical exchange saturation transfer agents for magnetic resonance imaging applications: Investigative Radiology, v. 39, p. 235-243.

van Zijl, P. C., and N. N. Yadav, 2011, Chemical exchange saturation transfer (CEST): what is in a name and what isn't?: Magn Reson Med, v. 65, p. 927-48.

van Zijl, P. C. M., C. K. Jones, J. Ren, C. R. Malloy, and A. D. Sherry, 2007, MR1 detection of glycogen in vivo by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST): Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, p. 4359-4364.

Ward, K. M., A. H. Aletras, and R. S. Balaban, 2000, A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST): Journal of Magnetic Resonance, v. 143, p. 79-87.

Woessner, D., 1961, Nuclear transfer effects in nuclear magnetic resonance pulse experiments, J Chem Phys,35:41-48.

Woessner, D. E., S. R. Zhang, M. E. Merritt, and A. D. Sherry, 2005, Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI: Magnetic Resonance in Medicine, v. 53, p. 790-799.

Wolff, S., and R. Balaban, 1990, NMR imaging of labile proton exchange: Journal of Magnetic Resonance, v. 86, p. 164-169.

Wolff, S. D., and R. S. Balaban, 1989, Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo.: Magn Reson Med, v. 10, p. 135-44.

Wolff, S. D., and R. S. Balaban, 1994, Magnetization transfer imaging: practical aspects and clinical applications.: Radiology, v. 192, p. 593-9.

Zhang, S., C. Malloy, and A. Sherry, 2005, MRI thermometry based on PARACEST agents: Journal of the American Chemical Society, v. 127, p. 17572-17573.

Zhang, S., M. Merritt, D. Woessner, R. Lenkinski, and A. Sherry, 2003, PARACEST agents: modulating MRI contrast via water proton exchange.: Acc Chem Res, v. 36, p. 783-90.

Zhang, S. R., P. Winter, K. C. Wu, and A. D. Sherry, 2001, A novel europium(III)-based MRI contrast agent: Journal of the American Chemical Society, v. 123, p. 1517-1518.

Zhao, J. M., Y. E. Har-el, M. T. McMahon, J. Zhou, A. D. Sherry, G. Sgouros, J. W. Bulte, and P. C. van Zijl, 2008, Size-induced enhancement of chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast in liposomes.: J Am Chem Soc, v. 130, p. 5178-84.

Zhou, J., and P. C. M. van Zijl, 2006, Chemical exchange saturation transfer imaging and spectroscopy: Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, v. 48.

Zhou, J. Y., B. Lal, D. A. Wilson, J. Laterra, and P. C. M. van Zijl, 2003a, Amide proton transfer (APT) contrast for imaging of brain tumors: Magnetic Resonance in Medicine, v. 50, p. 1120-1126.

Zhou, J. Y., J. F. Payen, D. A. Wilson, R. J. Traystman, and P. C. M. van Zijl, 2003b, Using the amide proton signals of intracellular proteins and peptides to detect pH effects in MRI: Nature Medicine, v. 9, p. 1085-1090.

CHAPITRE IV
Les lipoCEST

IV.1 Généralités

L'imagerie moléculaire par RMN est potentiellement une modalité moins coûteuse que l'imagerie nucléaire, bénéficiant d'une meilleure résolution spatiale et compatible avec l'acquisition durant la même session d'images anatomiques ou fonctionnelles. Toutefois, elle souffre d'une moindre sensibilité intrinsèque (10^{-3} à 10^{-5} M contre 10^{-9} à 10^{-12} M pour l'imagerie nucléaire). Aussi, la majorité des travaux récents en imagerie moléculaire par IRM se sont concentrés sur le développement d'agents de contrastes permettant de combler ce fossé.

Dans ce contexte, de nouveaux agents macromoléculaires paramagnétiques (la plupart à base de complexe de Gd(III)) et superparamagnétiques (le plus souvent des nanoparticules d'oxyde de fer) ont été développés *(Caravan, 2009; Corot et al., 2006; Di Marco et al., 2007)*. Le principe de ces agents de contraste est de perturber localement les temps de relaxation T_1, T_2 et T_2^* des protons de l'eau. Toutefois ces agents de contraste présentent l'inconvénient de perturber le contraste des images anatomiques de repérage et cette perturbation est manifeste parfois plusieurs heures après leur administration.

Parallèlement, des agents de contraste CEST ont été développés comme alternative *(Aime et al., 2005; Sherry et al.; Zhang et al., 2003)*. L'imagerie d'agents de contraste CEST permet de générer un contraste « activable » lorsqu'une saturation sélective des solutés est réalisée. L'imagerie CEST permet d'atteindre des facteurs d'amplification de 10^5 à 10^7 *in vitro (Goffeney et al., 2001; Zhang et al., 2003)*. Aussi, du fait de sa dépendance fréquentielle, l'imagerie CEST autorise la détection de plusieurs agents de contraste CEST à la condition que leurs fréquences de résonance soient distinctes *(Liu et al., 2011; Sun, 2010)*.

Dans ce chapitre IV, nous présentons l'agent de contraste CEST développé en collaboration avec l'équipe de Recherche et Développement de Guerbet (composée de Marc Port, Caroline Robic, Christelle Médina et Jean-François Mayer) et que nous avons utilisé pour l'étude d'imagerie moléculaire par IRM-CEST présentée Chapitre VI. Il s'agit de liposomes nanoparticulaires encapsulant une forte concentration de complexes de Thulium. Proposés

initialement par l'équipe de Silvio Aime, ces agents CEST sont désignés par l'acronyme lipoCEST *(Aime et al., 2005)*. Nous essayerons d'expliquer leur fonctionnement, leur synthèse ainsi que les raisons qui ont amené à la formulation retenue.

IV.1.a Description

Un lipoCEST est un liposome encapsulant une forte concentration de complexes de Lanthanide paramagnétiques. Un liposome est une vésicule artificielle formée par une bicouche lipidique ellipsoïdale, définissant en son cœur un compartiment aqueux *(Bangham et al., 1965)*. Il est le plus souvent sphérique et son diamètre peut aller de la centaine de nanomètres à quelques micromètres. Dans la perspective de l'imagerie moléculaire, les liposomes offrent l'opportunité d'encapsuler un grand nombre d'agents d'imagerie augmentant de façon significative leur concentration locale. Cette stratégie a été appliquée avec succès pour différentes techniques d'imagerie *(Ghaghada et al., 2010)*. Ces dernières années, une grande variété d'architectures nano-particulaires ont été explorées et validées telles que les micelles, les émulsions, les nano-capsules, non-seulement en tant qu'agents d'imagerie à forte charge mais aussi en tant que vecteur pour l'administration ciblée de drogues *(Lammers et al., 2011; Reddy and Couvreur, 2011)*.

Dans le cadre de l'imagerie CEST, les liposomes constituent un choix naturel. En effet, la bicouche lipidique permet à la fois de piéger les complexes paraCEST sans empêcher l'échange de spins entre deux sites non-équivalents, les deux sites correspondant aux espaces intra- et extra-liposomaux. Telles que schématisées par la figure F.IV.1, deux populations de protons cohabitent dans une solution aqueuse de lipoCEST. Les protons des molécules d'eau à l'intérieur des liposomes ont une fréquence de précession déplacée en raison, d'une part de leur couplage dipolaire rapide avec les complexes de Lanthanides (voir chapitre III – échange rapide), et d'autre part en raison du super-paramagnétisme résultant de la forte concentration locale en ions paramagnétiques *(Kuchel et al., 2003)*.

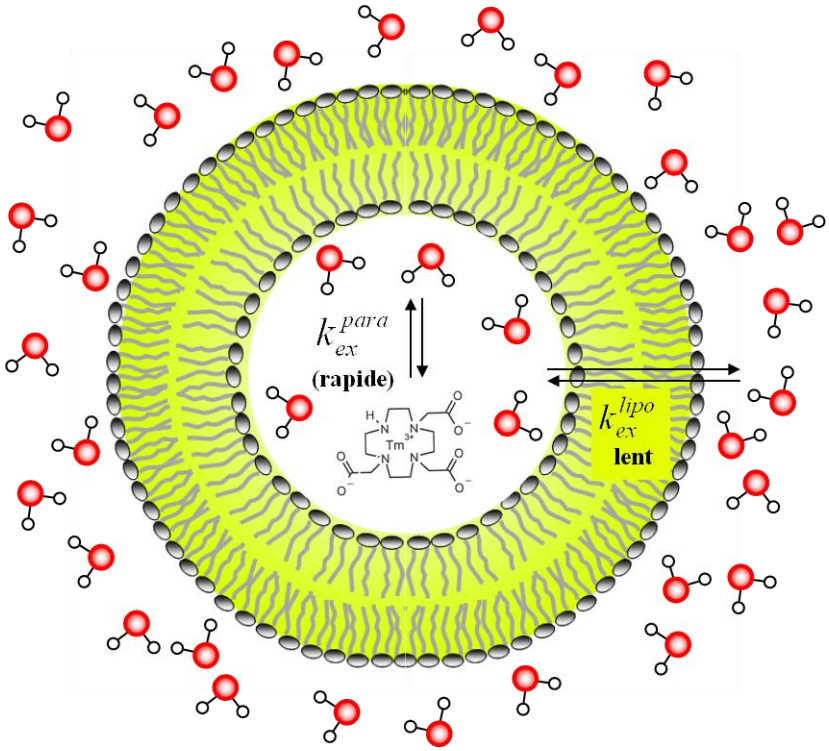


Figure F.IV.1 : Représentation schématique d'un lipoCEST en milieu aqueux. *Une importante concentration de paraCEST est piégée dans la cavité intra-liposomale d'une bicouche lipidique. Les molécules d'eau de la cavité sont en échange rapide avec les complexes de Ln^{3+} ce qui se manifeste par un déplacement chimique important de la fréquence de résonance des protons intra-liposomaux. Parallèlement, ces molécules d'eau déplacées sont en échange chimique avec les molécules d'eau extra-liposomales. Le taux d'échange transmembranaire relativement lent permet de remplir la condition d'observation de l'effet CEST.*

Dans une expérience CEST, l'impulsion de saturation est appliquée à la fréquence de précession moyenne de ces protons internes. Cette saturation est ensuite transférée aux molécules d'eau du solvant via la diffusion libre à travers la membrane. Cette diffusion transmembranaire des molécules d'eau est équivalente à un échange chimique avec un taux k_{ex}^{lipo} égal à l'inverse du temps de résidence moyen d'une molécule d'eau dans la cavité intra-liposomale. Contrairement aux agents paraCEST présentés au chapitre précédent, il est avantageux que le taux d'échange k_{ex}^{para} entre les molécules d'eau de la cavité intérieure et l'agent paraCEST soit le plus rapide possible. Ainsi, on maximise la quantité de molécules d'eau en interaction dipolaire avec les complexes et par conséquent le déplacement chimique moyen et l'effet CEST atteignable par nanoparticule. En fait, c'est le taux d'échange transmembranaire qui permet de satisfaire la condition d'observation de l'effet CEST (voir

relation ***E17***). On peut donc identifier deux éléments majeurs à optimiser pour maximiser l'efficacité du lipoCEST : le complexe de Lanthanide paramagnétique et la membrane du liposome.

IV.1.b Influence du complexe de Lanthanide paramagnétique

Comme expliqué précédemment, des complexes de Lanthanide paramagnétiques, les paraCEST, ont été développés pour l'imagerie CEST. Afin notamment de garantir la même stabilité thermodynamique que les complexes de Gd(III) utilisés pour l'imagerie pondéré T_1, des chélates similaires ont été considérés *(Hekmatyar et al., 2005)*. Les ligands couramment utilisés sont des chélates de Lanthanide dérivés du 1,4,7,10-tetraaza-1,4,7,10-tetrakis(carboxymethyl)cyclodecane (DOTA, figure F.IV.2, formule **[1]**) *(Aime et al., 2005)*. Ces ligands possèdent un site d'échange rapide pour lequel la théorie de Solomon-Bloembergen prévoit des taux d'échange de l'ordre de 10^8 s^{-1} *(Parker et al., 2002)*. De tels taux d'échange sont favorables à une forte relaxivité du complexe de Gd(III) mais incompatible avec l'observation d'un effet CEST. Pour l'imagerie paraCEST, la dynamique de solvatation des molécules d'eau a donc été ralentie grâce à l'ajout de chaînes latérales sur les ligands macrocycliques, comme des groupements tétra-amides par exemple *(Aime et al., 1998; Aime et al., 1999; Zhang et al., 2003)*.

Toutefois, cet effet stérique est modulé en fonction du Lanthanide considéré. Ainsi, le taux d'échange peux varier de deux ordres de grandeur pour le même chélate (voir le tableau T.IV.1 tiré de *(Zhang et al., 2003)*). On remarque notamment le taux d'échange relativement lent du complexe d'Europium(III) favorable à l'imagerie paraCEST. On constate également les taux d'échange rapides pour le Thulium et l'Ytterbium ($\geq$ 300 kHz) ainsi que les déplacements chimiques importants observés pour les complexes de Dysprosium (-720 ppm) et de Thulium (500 ppm). Toutefois, l'encapsulation de tels complexes dans des liposomes sphériques n'a permis de n'atteindre que des déplacements chimiques de l'ordre de 4 ppm *(Terreno et al., 2008)*.

Ln^{3+}	Pr^{3+}	Nd^{3+}	Sm^{3+}	Eu^{3+}	Tb^{3+}	Dy^{3+}	Ho^{3+}	Er^{3+}	Tm^{3+}	Yb^{3+}
Δ (en ppm)	-60	-32	-4	50	-600	-720	-360	200	500	200
k_{ex} (en kHz)	50	12,5	3,1	2,6	32	59	53	111	333	333

Tableau T.IV.1 : Influence du Ln^{3+}. *Comparaison des déplacements fréquentiels Δ et des taux d'échange k_{ex} des protons liés à un complexe de Ln(III)-DOTA-tétra-amide (avec Ln^{3+} = Pr^{3+} (Praséodyme) / Nd^{3+} (Néodyme) / Sm^{3+} (Samarium) / Eu^{3+} (Europium) / Tb^{3+} (Terbium) / Ho^{3+} (Holmium) / Er^{3+} (Erbium) /Tmr^{3+} (Thulium) / Yb^{3+} (Ytterbium). Données tirées de (Zhang et al., 2003).*

Afin d'augmenter davantage le déplacement chimique du lipoCEST (pour une concentration en complexes fixe et une géométrie de liposome donnée), deux options ont été proposées par l'équipe de Silvio Aime *(Terreno et al., 2008)*. La première solution consiste à augmenter le nombre de centres paramagnétiques par agent paraCEST. Ceci a été réalisé en utilisant des complexes multimériques, présentant jusqu'à 3 centres paramagnétiques. En évaluant des complexes de Tm^{3+} monomérique, dimérique et trimérique, des déplacements chimiques de 15, 21 et 28 ppm ont été atteints respectivement. Comme attendu, le déplacement chimique croît avec le nombre de centres paramagnétiques. Cependant, la dépendance n'est pas linéaire car l'accessibilité des molécules d'eau aux différents centres paramagnétiques n'est pas équivalente. La seconde possibilité consiste à utiliser des complexes paraCEST ayant un nombre de coordination **q** supérieur à un. Cette approche a été proposée par l'équipe de Recherche et Développement de Guerbet et a fait l'objet d'un dépôt de demande de brevet en 2004 publié en 2006 *(Port, 2006)*. Ainsi, pour une concentration donnée en complexe de Lanthanide, le nombre de molécules d'eau dans la sphère de coordination du complexe est multiplié par le nombre de coordination **q** augmentant théoriquement d'autant le déplacement du lipoCEST.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons testé avec notre partenaire industriel Guerbet, différentes formulations de complexes paramagnétiques afin d'optimiser le déplacement chimique des protons encapsulés. Nous avons ainsi testé différents Lanthanides, différentes formulations de chélates, notamment des complexes multimériques et des complexes avec un nombre de coordination **q** égal à 2.

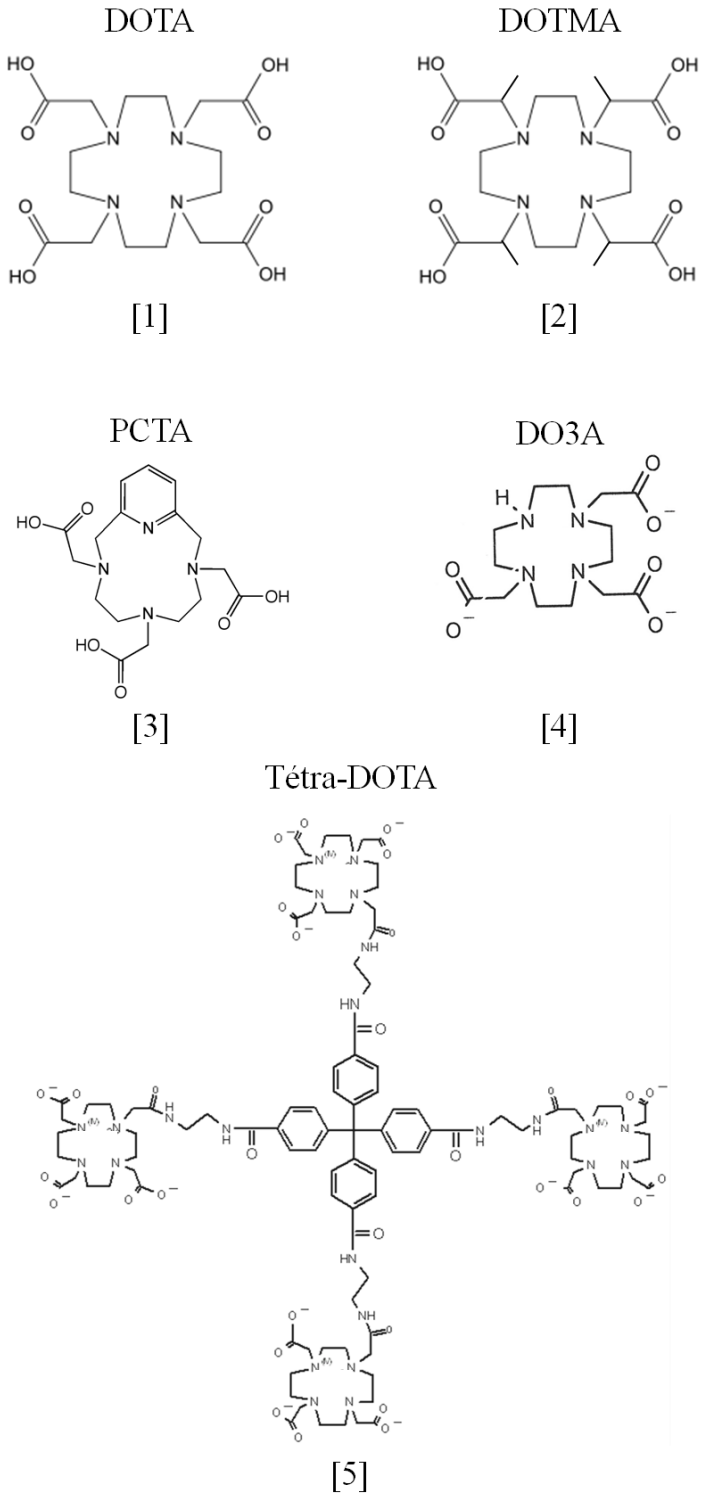


Figure F.IV.2 : Structure des cinq ligands utilisés. *[1] DOTA ; [2] DOTMA ; [3] PCTA ; [4] DO3A et [5] Tétra-DOTA.*

IV.1.c Influence de la membrane

La membrane du lipoCEST doit assurer une double fonction. D'une part, sa perméabilité aux molécules d'eau doit satisfaire la condition d'observation de l'effet CEST, à savoir un k_{ex}^{lipo} nettement inférieur au déplacement chimique moyen des protons de l'eau encapsulée. D'autre part, elle doit assurer une encapsulation efficace et stable d'une quantité maximale de complexes paramagnétiques. On comprend dès lors que la perméabilité de la membrane est le paramètre physico-chimique essentiel.

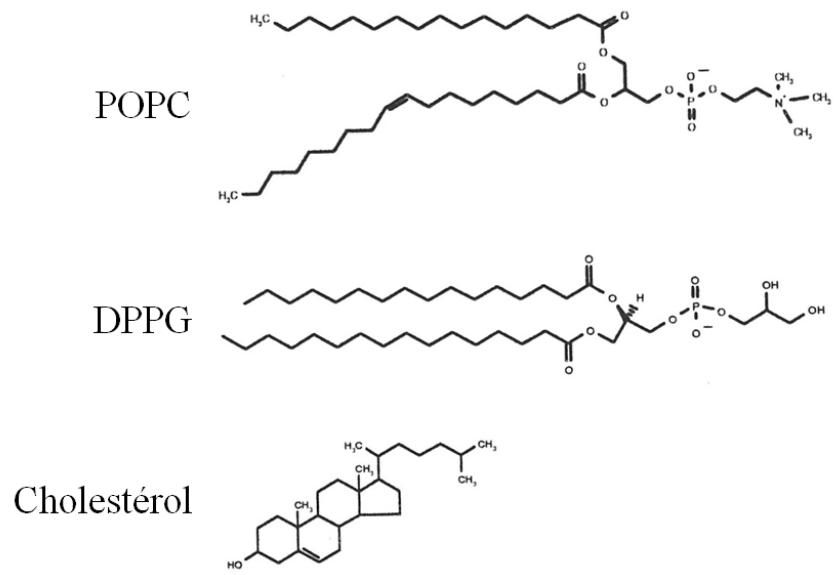


Figure F.IV.3 : Structure des constituants des membranes des liposomes. *Les membranes sont constituées d'un mélange de POPC, de DPPG et de Cholestérol.*

Une membrane constituée essentiellement de phospholipides avec des chaînes d'acides gras insaturés (tels que le POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)) est beaucoup plus perméable qu'une membrane avec des phospholipides saturés (tels que le DPPG (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)) *(Huster et al., 1997; Koenig et al., 1992)*. Les structures de ces composés sont présentées sur la figure F.IV.3. Cette différence s'explique par l'agencement plus compact des chaînes hydrophobiques avec le DPPG. Dans le cas du POPC, la présence d'insaturations réduit l'étanchéité de la membrane et augmente donc la diffusivité des molécules d'eau. La plupart des membranes sont donc composées d'un mélange de ces deux phospholipides. Cependant, une telle membrane est relativement instable. Il a été montré que l'ajout de Cholestérol permet de stabiliser la bicouche lipidique *(Gensure et*

al., 2006; Koenig et al., 1992). Etant donné que la membrane est plus compacte, la perméabilité est réduite. Par conséquent, le taux d'échange transmembranaire est ralenti, ce qui permet de remplir la condition d'observation de l'effet CEST. Les lipoCEST de première génération étaient ainsi composés de POPC/DPPG/Cholestérol dans des proportions en masse de 55/5/40, ce qui correspond à des proportions molaires de 40/4/56 *(Aime et al., 2005)*.

La synthèse d'un tel lipoCEST est réalisée dans un milieu isotonique, et par conséquent il présente une géométrie sphérique. Or, des travaux de la même équipe ont démontré que la forme des liposomes pouvait fortement influencer le déplacement des lipoCEST. En effet, le déplacement Δ du lipoCEST est en réalité une somme de deux composantes :

E37 $$\Delta = \Delta_{eau}^{dipolaire} + \Delta_{eau}^{BMS} .$$

La composante dipolaire $\Delta_{eau}^{dipolaire}$ correspond au déplacement chimique moyen des molécules d'eau en interaction avec les complexes de Tm(III) encapsulés et de l'eau libre intra-liposomale. Elle dépend de la concentration en complexes et de leur taux d'échange k_{ex}^{para}. La deuxième composante Δ_{eau}^{BMS} est liée à l'effet de susceptibilité magnétique dû à la forte concentration de centres paramagnétiques (BMS pour *Bulk Magnetic Susceptibility*) *(Chu et al., 1990)*. Pour observer un effet de susceptibilité magnétique, il faut que les moments magnétiques des complexes encapsulés s'orientent préférentiellement selon le champ magnétique statique. Dans le cas d'un lipoCEST sphérique, les moments individuels sont équidistribués, le moment magnétique global du lipoCEST est donc nul, Δ_{eau}^{BMS} l'est aussi par conséquent. Pour rendre ce terme non nul, il faut forcer l'anisotropie des complexes paramagnétiques. Une méthode consiste à déformer les liposomes grâce à l'application d'un choc osmotique dans une solution hypotonique (~ 40 mOsm/kg) *(Terreno et al., 2007)*. Cette technique permet d'atteindre des déplacements chimiques de plusieurs dizaines de ppm (jusqu'à -45 ppm). Néanmoins, il ne s'agit pas d'une solution envisageable pour l'imagerie *in vivo*. En effet, les valeurs typiques d'osmolalité du plasma sanguin varient entre 280 et 310 mOsm/kg chez les mammifères *(Iseri et al., 1965)*. Par conséquent, des liposomes avec une osmolalité interne de 40 mOsm/kg sont susceptibles d'imploser à la suite de leur injection dans le sang. C'est pourquoi nous n'avons pas considéré ces liposomes anisotropes pour notre étude en dépit de leurs performances remarquables.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons testé des liposomes sphériques synthétisés par notre partenaire industriel Guerbet dans le mannitol avec une osmolalité d'environ 300 mOsm/kg avec des membranes composées de POPC/DPPG/Cholestérol *(Aime et al., 2005)*. Nous avons en particulier évalué l'influence du taux de Cholestérol sur les performances de notre lipoCEST.

IV.2 Optimisation des lipoCEST

IV.2.a Choix du Ln(III)

Afin de confirmer les observations rapportées par l'équipe de Silvio Aimé concernant l'influence du Lanthanide sur le déplacement du lipoCEST, nous avons acquis les Z-spectra de cinq lipoCEST encapsulant des complexes de Praséodyme (Pr^{3+}), d'Ytterbium (Yb^{3+}), de Dysprosium (Dy^{3+}), de Néodyme (Nd^{3+}) et de Thulium (Tm^{3+}). Le ligand de complexation était le même, à savoir de l'acide 4,7-Bis-carboxymethyl-1,4,7,10-tetra aza-cyclododeca-1-yl)-acetique (DO3A, figure F.IV.2, formule **[4]**). Les paramètres de saturation utilisés pour l'acquisition des Z-spectra sont précisés dans le chapitre suivant.

Le tableau T.IV.2 résume les effets CEST et les déplacements chimiques observés pour chaque lipoCEST. Les résultats sont en accord avec les propriétés des complexes de Lanthanides présentées dans le tableau T.IV.1. Conformément à nos attentes, le complexe de Tm^{3+} permet d'obtenir les performances les plus intéressantes. En effet, les complexes de Tm^{3+} présentent en milieu aqueux des déplacements chimiques importants et des taux d'échange rapides (respectivement 500 ppm et 333 kHz). Les deux complexes d'Yb^{3+} et de Dy^{3+} présentent également des caractéristiques CEST intéressantes. Mais on peut expliquer leurs moindres performances par le plus faible déplacement chimique de l'Yb^{3+} par rapport au Tm^{3+} (200 ppm contre 500 ppm) et en raison du taux d'échange relativement modeste des complexes de Dy^{3+} (59 kHz contre 333 kHz). Enfin, les complexes de Pr^{3+} et Nd^{3+} ne constituent pas des solutions crédibles pour l'imagerie CEST. Nous avons donc retenu le Tm^{3+}.

Lanthanide	Δ (en ppm)	MTRasym (en %)
Pr^{3+}	-1,5	4
Yb^{3+}	4	40
Dy^{3+}	-4	17
Nd^{3+}	1,5	4
Tm^{3+}	10	35

Tableau T.IV.2 : Choix du Lanthanide. *Des lipoCEST contenant des complexes de DO3A-Ln(III) sont comparés avec Ln^{3+} = Praséodyme (Pr^{3+}), Ytterbium (Yb^{3+}), Dysprosium (Dy^{3+}), Néodyme (Nd^{3+}) et Thulium (Tm^{3+}).*

IV.2.b Choix du ligand

Nous avons évalué les performances de lipoCEST encapsulant cinq complexes différents (voir figure F.IV.2) :

- 2 lipoCEST de référence contenant des complexes monovalents de DOTA-Tm(III) formule **[1]**, et d'acide α,α',α'',α'''-tetramethyl-1,4,7,10-tetraacetique (DOTMA-Tm(III), formule **[2]**), déjà évalués par Aime et collaborateurs *(Aime et al., 2005)*,
- 2 lipoCEST contenant des complexes multivalents (**q** = 2) d'acide 3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9,-triacetique (PCTA-Tm(III), formule **[3]**), et d'acide 4,7-Bis-carboxymethyl-1,4,7,10-tetra aza-cyclododeca-1-yl)-acetique (DO3A-Tm(III), formule **[4]**),
- et un complexe tétramérique de DOTA (Tétra-DOTA, formule **[5]**).

Leurs caractéristiques CEST sont résumées dans le tableau T.IV.3.

Complexe paramagnétique	q	Δ (en ppm)	MTRasym (en %)
DOTMA-Tm(III)	1	4	27
DOTA-Tm(III)	1	4	21
PCTA-Tm(III)	2	8	13
DO3A-Tm(III)	2	10	35
Tétra-DOTA-Tm(III)	1	11	25

Tableau T.IV.3 : Choix du ligand. *Des lipoCEST contenant des complexes de DOTMA-Tm(III), DOTA-Tm(III), PCTA-Tm(III), DO3A-Tm(III) et Tétra-DOTA-Tm(III) sont comparés.*

On constate que le déplacement obtenu avec les ligands ayant un nombre de coordination **q** = 1 est au maximum de 4 ppm, ce qui est cohérent avec les résultats de la littérature *(Viswanathan et al., 2010)*. Comme espéré, l'utilisation de ligands avec un **q** = 2 permet d'augmenter significativement le déplacement du lipoCEST, d'au moins un facteur 2. Avec le DO3A, le déplacement est de 10 ppm. Enfin, le plus grand déplacement chimique (11 ppm) est observé avec le lipoCEST encapsulant le complexe tétramérique. Néanmoins, nous espérions un déplacement plus important. Théoriquement, le déplacement avec le complexe tétramérique aurait dû être 4 fois plus important que celui avec les complexes monomériques, soit d'environ 16 ppm. Une explication probable est liée à la difficulté d'encapsulation de la solution de complexes tétramériques lors de la synthèse du lipoCEST. En effet, la solution de tétramère est nettement plus visqueuse que les solutions de monomère, il est alors difficile d'encapsuler la même concentration de complexes monomériques. Par ailleurs, cette difficulté de synthèse se manifeste par une plus grande variabilité dans les caractéristiques CEST entre lots de lipoCEST. Par conséquent, nous avons écarté ce lipoCEST au bénéfice du lipoCEST encapsulant des complexes de DO3A-Tm(III) dont les performances sont satisfaisantes. Nous avons ainsi privilégié la reproductibilité des caractéristiques CEST pour notre étude d'imagerie moléculaire *in vivo*.

IV.2.c Choix de la membrane

En nous inspirant des mélanges de phospholipides (POPC et DPPG) et de lipides (Cholestérol) couramment utilisés pour la formulation de liposomes, nous avons optimisé les caractéristiques CEST en fonction de la proportion de Cholestérol dans la membrane (de 0 à 57% en moles). Les liposomes ont été synthétisés selon la méthode décrite dans la littérature *(Bangham et al., 1965)*. Bien que la distribution des tailles de lipoCEST ne soit pas vérifiée systématiquement, le procédé permet en général d'obtenir des liposomes dont le rayon hydrodynamique moyen est de l'ordre de 170 nm.

Cholestérol (% mol)	POPC (% mol)	DPPG (% mol)	Δ (en ppm)	MTRasym (en %)
0	95	5	5	8
17,9	68,2	13,9	4,5	7
17,9	77,4	4,6	7	9
32,9	62,8	4,3	9	12
40	55	5	10	14
56,7	39,6	3,7	10	35

Tableau T.IV.4 : Choix de la membrane. *Différentes proportions de POPC, DPPG et Cholestérol ont été testées. Les proportions de chaque constituant sont indiquées en pourcentage molaire.*

D'après le tableau T.IV.4, on constate que le déplacement chimique Δ du lipoCEST augmente avec le taux de Cholestérol dans la membrane. Etant donné que l'ajout de Cholestérol est connu pour rigidifier la membrane du liposome *(Tilcock et al., 1990)*, il est probable qu'un taux plus important de Cholestérol limite les fuites de complexes paramagnétiques à travers la membrane et stabilise leur concentration intra-liposomale. Ceci a pour conséquence d'augmenter le déplacement du lipoCEST. Par ailleurs, on constate un effet CEST croissant avec le taux de Cholestérol (jusqu'à 35% pour 57% de Cholestérol). Cette observation est

cohérente avec l'encapsulation d'une plus grande concentration de complexes. Elle nous indique également que jusqu'à 57% de Cholestérol, il n'y a pas d'entrave nette à la diffusion intra-membranaire des molécules d'eau. Enfin, des lipoCEST avec 57% de Cholestérol ont été conservés à 4°C et des Z-spectra ont été acquis avant et après 9 mois afin d'évaluer leur stabilité. Les caractéristiques CEST étaient légèrement dégradées (Δ = 7 ppm, MTRasym = 31%), attestant d'une stabilité suffisante pour notre protocole d'imagerie CEST. Par conséquent, nous avons retenu la composition de membrane POPC/DPPG/Cholestérol de 39,6/3,7/56,7 % en moles.

IV.2.d Furtivité et Fonctionnalisation

L'objectif de cette thèse était d'évaluer les agents lipoCEST pour l'imagerie moléculaire par IRM-CEST. Or, on sait que des liposomes injectés dans la circulation sanguine peuvent être captés rapidement par le système réticulo-endothélial (S.R.E), notamment au niveau du foie et de la rate *(Fidler et al., 1980; Hunt et al., 1979; Poste et al., 1982)*. Après injection dans la circulation sanguine, les opsonines (protéines se liant à des antigènes) se lient aux liposomes pour permettre une reconnaissance rapide par les macrophages *(Moghimi and Hunter, 2001)*. La méthode couramment utilisée pour rendre des nanoparticules « furtives » vis-à-vis du S.R.E et ainsi allonger leur temps de demi-vie est d'ajouter au liposome un polymère biocompatible et biodégradable : le polyéthylène glycol *(Klibanov et al., 1990)*. Grâce au PEG, la fixation des opsonines sur les liposomes est ralentie, ce qui permet de limiter leur captation par le système immunitaire. Par conséquent, nous avons intégré 5% de PEG à la composition précédemment décrite. En définitive, la composition retenue est donc POPC/DPPG/Cholestérol/ DSPE-PEG2000 dans des proportions molaires de 32/5/58/5.

Par ailleurs, la membrane étant formée d'une bicouche lipidique, il est relativement facile de fonctionnaliser le lipoCEST en y greffant des pharmacophores, le plus souvent des peptides ayant une affinité importante pour un biomarqueur pathologique. Afin de réaliser cette fonctionnalisation, un phospholipide DSPE-PEG2000 conjugué au peptide est ajouté à la préparation lipidique à 2%. Afin d'évaluer nos agents lipoCEST, nous avons choisi de nous intéresser à un modèle tumeur chez la souris (U87MG) et de cibler l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimée lors de l'angiogenèse tumorale (nous y reviendrons plus en détails dans le chapitre VI) *(Temming et al., 2005)*. Ainsi, nous avons fonctionnalisé notre lipoCEST en greffant à sa surface un peptide RGD (enchaînement d'acides aminés arginine, glycine et acide aspartique)

largement utilisé dans la communauté de l'imagerie moléculaire pour cibler l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Enfin, un phospholipide DSPE-PEG2000 conjugué à de la rhodamine a également été incorporé dans la membrane (à 0,1%) afin de pouvoir visualiser l'agent de contraste par imagerie de fluorescence.

IV.3 Formulation retenue et caractéristiques CEST

Grâce aux tests que nous avons menés sur différentes compositions de lipoCEST, nous avons pu sélectionner une formulation favorable à une application en imagerie moléculaire par IRM-CEST (voir figure F.IV.4). La membrane de ce lipoCEST est composée de POPC/DPPG/ Cholestérol/DSPE-PEG2000/rhodamine dans des proportions molaires de 32/5/58/5/0,1. La rhodamine est insérée dans la membrane afin de visualiser le lipoCEST en imagerie de fluorescence. Le lipoCEST fonctionnalisé ne comporte que 30% de POPC, les 2% restants étant remplacés par le DSPE-PEG2000 couplé au peptide RGD. Le complexe de Lanthanide choisi est un complexe de DO3A-Tm(III) encapsulé à une concentration intra-liposomale de 153 mM. Ceci implique que pour un volume moyen de la cavité liposomale de 10^{-18} L, approximativement 10^5 complexes sont encapsulés par lipoCEST. Un peptide RGD est greffé à la surface de la membrane afin de cibler spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimée lors de l'angiogenèse tumorale. Des tests *in vitro* ont permis de montrer que le RGD-lipoCEST a une affinité sub-nanomolaire pour le récepteur $\alpha_v\beta_3$ (courbes dose-réponse confidentielles, données acquises par notre partenaire industriel Guerbet).

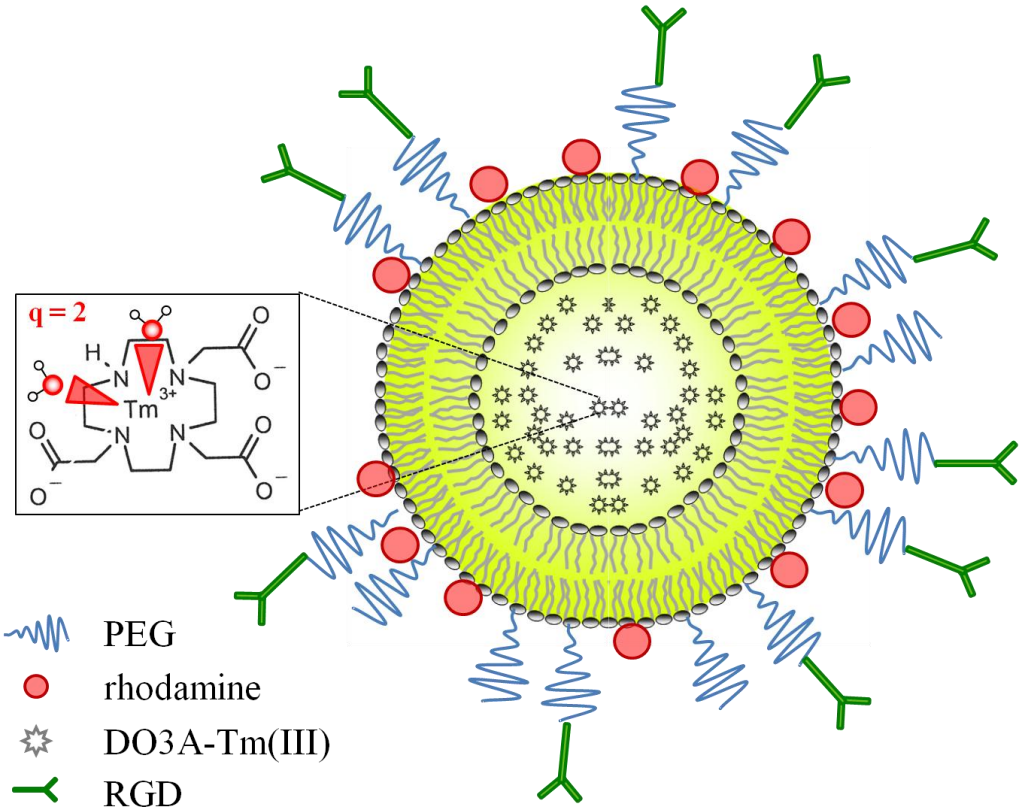


Figure F.IV.4 : Schéma du lipoCEST retenu pour le protocole d'imagerie moléculaire. *La membrane est composée de POPC/DPPG/Cholestérol/RGD/PEG/rhodamine (30/5/58/2/5/0,1), le complexe paramagnétique est un complexe de DO3A-Tm(III). La fonctionnalisation du lipoCEST est assurée par le peptide RGD greffé à sa surface et la rhodamine permet de visualiser le lipoCEST par imagerie de fluorescence.*

Enfin, les lipoCEST contrôle (sans RGD) et fonctionnalisé (avec RGD) ont été caractérisés grâce à l'acquisition de leur Z-spectrum (voir figures F.IV.5.a et .b respectivement). On constate que les 2 lipoCEST sont légèrement moins efficaces que ceux évalués pour l'optimisation de la formulation. La différence pourrait être imputable à l'ajout de PEG dans la membrane. Bien que les Ctrl- et RGD-lipoCEST soient quasiment identiques, ils présentent des effets MTRasym légèrement différents (voir figures F.IV.5.c et .d respectivement). Il est possible que l'ajout de RGD à la surface de la membrane perturbe l'échange d'eau transmembranaire. Cette différence peut aussi être attribuée au processus de synthèse. En effet, si la quantité de complexes encapsulée ou la concentration en nanoparticules varient légèrement entre deux lots, les déplacements chimiques et les effets CEST peuvent changer. Ces 2 lipoCEST ont été évalués pour l'imagerie moléculaire de l'angiogenèse tumorale après injection intraveineuse (IV). Les résultats de cette étude font l'objet du chapitre VI de ce manuscrit.

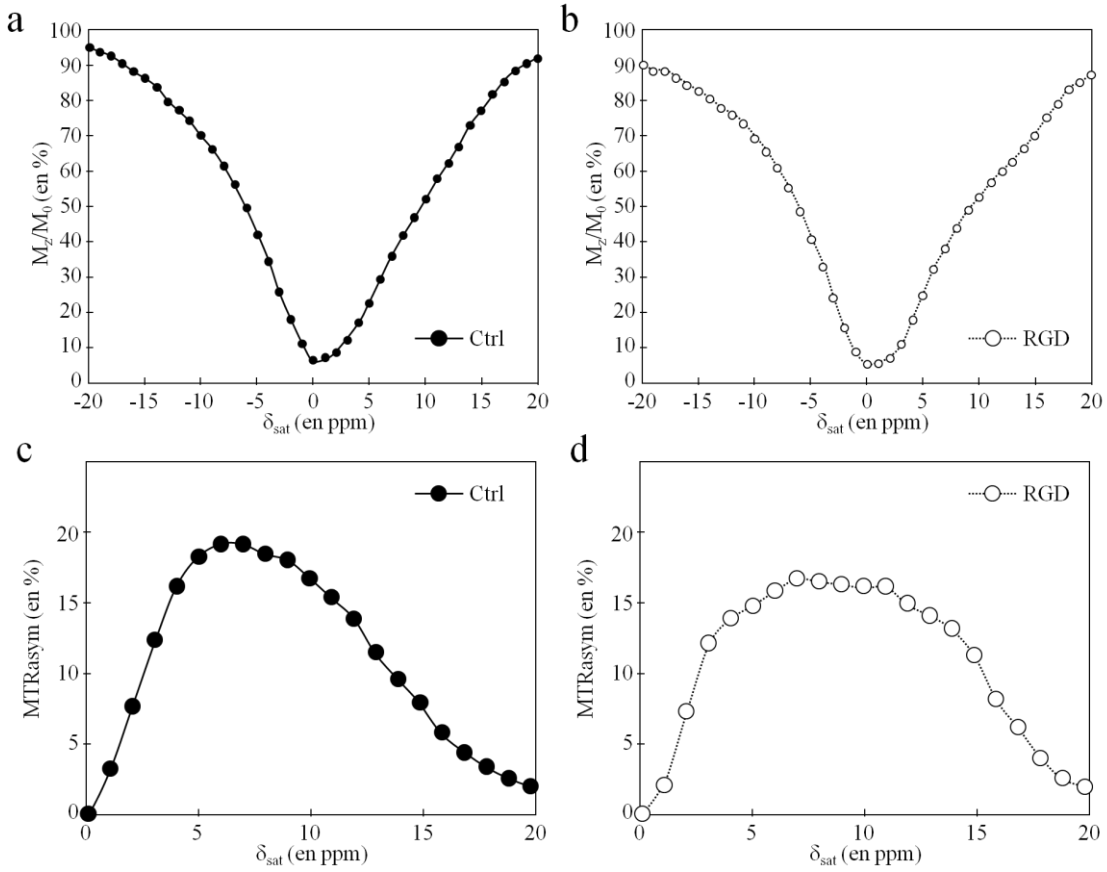


Figure F.IV.5 : Z-spectra (a et b) et Z-spectra asymétriques (c et d) acquis respectivement avec les lipoCEST contrôle et fonctionnalisé avec le peptide RGD. *La concentration en Ctrl- et RGD-lipoCEST est de 14 nM.*

Bibliographie du chapitre IV

Aime, S., A. Barge, M. Botta, A. S. De Sousa, and D. Parker, 1998, Direct NMR Spectroscopic Observation of a Lanthanide-Coordinated Water Molecule whose Exchange Rate Is Dependent on the Conformation of the Complexes: Angew. Chem. Int. Ed., v. 37, p. 2673-2674.

Aime, S., A. Barge, J. I. Bruce, M. Botta, J. A. K. Howard, J. M. Moloney, D. Parker, A. S. de Sousa, and M. Woods, 1999, NMR, Relaxometric, and Structural Studies of the Hydration and Exchange Dynamics of Cationic Lanthanide Complexes of Macrocyclic Tetraamide Ligands: *J. Am. Chem. Soc*, v. 121, p. 5762-5771.

Aime, S., D. D. Castelli, and E. Terreno, 2005, Highly sensitive MRI chemical exchange saturation transfer agents using liposomes: Angewandte Chemie-International Edition, v. 44, p. 5513-5515.

Bangham, A. D., M. M. Standish, and J. C. Watkins, 1965, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids.: J Mol Biol, v. 13, p. 238-52.

Caravan, P., 2009, Protein-targeted gadolinium-based magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents: design and mechanism of action.: Acc Chem Res, v. 42, p. 851-62.

Chu, S. C., Y. Xu, J. A. Balschi, and C. S. Springer, 1990, Bulk magnetic susceptibility shifts in NMR studies of compartmentalized samples: use of paramagnetic reagents.: Magn Reson Med, v. 13, p. 239-62.

Corot, C., P. Robert, J. M. Idée, and M. Port, 2006, Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging.: Adv Drug Deliv Rev, v. 58, p. 1471-504.

Di Marco, M., C. Sadun, M. Port, I. Guilbert, P. Couvreur, and C. Dubernet, 2007, Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) for biomedical application as MRI contrast agents.: Int J Nanomedicine, v. 2, p. 609-22.

Fidler, I. J., A. Raz, W. E. Fogler, R. Kirsh, P. Bugelski, and G. Poste, 1980, Design of liposomes to improve delivery of macrophage-augmenting agents to alveolar macrophages.: Cancer Res, v. 40, p. 4460-6.

Gensure, R. H., M. L. Zeidel, and W. G. Hill, 2006, Lipid raft components cholesterol and sphingomyelin increase H+/OH- permeability of phosphatidylcholine membranes.: Biochem J, v. 398, p. 485-95.

Ghaghada, K. B., R. R. Colen, C. R. Hawley, N. Patel, and S. Mukundan, 2010, Liposomal contrast agents in brain tumor imaging.: Neuroimaging Clin N Am, v. 20, p. 367-78.

Goffeney, N., J. W. M. Bulte, J. Duyn, L. H. Bryant, and P. C. M. van Zijl, 2001, Sensitive NMR detection of cationic-polymer-based gene delivery systems using saturation transfer via proton exchange: Journal of the American Chemical Society, v. 123, p. 8628-8629.

Hekmatyar, S. K., P. Hopewell, S. K. Pakin, A. Babsky, and N. Bansal, 2005, Noninvasive MR thermometry using paramagnetic lanthanide complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclodoecane-alpha,alpha',alpha",alpha"'-tetramethyl-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTMA4-). Magn Reson Med, v. 53, p. 294-303.

Hunt, C. A., Y. M. Rustum, E. Mayhew, and D. Papahadjopoulos, 1979, Retention of cytosine arabinoside in mouse lung following intravenous administration in liposomes of different size.: Drug Metab Dispos, v. 7, p. 124-8.

Huster, D., A. J. Jin, K. Arnold, and K. Gawrisch, 1997, Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by 17O NMR.: Biophys J, v. 73, p. 855-64.

Iseri, L. T., M. A. Kaplan, M. J. Evans, and E. D. Nickel, 1965, Effet of concentrated contrast media during angiography on plasma volume and plasma osmolality: Am Heart J, v. 69, p. 154-8.

Klibanov, A. L., K. Maruyama, V. P. Torchilin, and L. Huang, 1990, Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes.: FEBS Lett, v. 268, p. 235-7.

Koenig, S. H., Q. F. Ahkong, R. D. Brown, M. Lafleur, M. Spiller, E. Unger, and C. Tilcock, 1992, Permeability of liposomal membranes to water: results from the magnetic field dependence of T1 of solvent protons in suspensions of vesicles with entrapped paramagnetic ions.: Magn Reson Med, v. 23, p. 275-86.

Kuchel, P., B. E. Chapman, W. Bubb, P. Hansen, C. Durrant, and M. Hertzberg, 2003, Magnetic susceptibility: Solutions, emulsions, and cells: Concepts in Magnetic Resonance, v. 18A, p. 56-71.

Lammers, T., S. Aime, W. E. Hennink, G. Storm, and F. Kiessling, 2011, Theranostic nanomedicine.: Acc Chem Res, v. 44, p. 1029-38.

Liu, G., M. M. Moake, Y.-E. Har-el, C. M. Long, K. W. Y. Chan, A. Cardona, M. Jamil, P. Walczak, A. A. Gilad, G. Sgouros, P. C. M. van Zijl, J. W. Bulte, and M. T. McMahon, 2011, In Vivo Multicolor Molecular MR Imaging Using Diamagnetic Chamical

Exchange Saturation Transfer Liposomes. Magnetic Resonance in Medicine 2011, DOI 10.1002/mrm.23100.

Moghimi, S. M., and A. C. Hunter, 2001, Recognition by macrophages and liver cells of opsonized phospholipid vesicles and phospholipid headgroups.: Pharm Res, v. 18, p. 1-8.

Parker, D., R. S. Dickins, H. Puschmann, C. Crossland, and J. A. Howard, 2002, Being excited by lanthanide coordination complexes: aqua species, chirality, excited-state chemistry, and exchange dynamics.: Chem Rev, v. 102, p. 1977-2010.

Port, M., 2006, Contrast agents encapsulating systems for CEST imaging. WO 2006/032705; 2006.

Poste, G., C. Bucana, A. Raz, P. Bugelski, R. Kirsh, and I. J. Fidler, 1982, Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery.: Cancer Res, v. 42, p. 1412-22.

Reddy, L. H., and P. Couvreur, 2011, Nanotechnology for therapy and imaging of liver diseases.: J Hepatol, v. 55, p. 1461-6.

Sherry, A., P. Winter, and K. Wu, Paramagnetic metal ion-based macrocyclic magnetization transfer contrast agents and method of use. WO 0243775 patent 0243775; 2002.

Sun, P., 2010, Simplified and scalable numerical solution for describing multi-pool chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI contrast: Journal of Magnetic Resonance, v. 205, p. 235-241.

Temming, K., R. M. Schiffelers, G. Molema, and R. J. Kok, 2005, RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature.: Drug Resist Updat, v. 8, p. 381-402.

Terreno, E., A. Barge, L. Beltrami, G. Cravotto, D. D. Castelli, F. Fedeli, B. Jebasingh, and S. Aime, 2008, Highly shifted LIPOCEST agents based on the encapsulation of neutral polynuclear paramagnetic shift reagents.: Chem Commun (Camb), p. 600-2.

Terreno, E., C. Cabella, C. Carrera, D. Delli Castelli, R. Mazzon, S. Rollet, J. Stancanello, M. Visigalli, and S. Aime, 2007, From spherical to osmotically shrunken paramagnetic liposomes: an improved generation of LIPOCEST MRI agents with highly shifted water protons.: Angew Chem Int Ed Engl, v. 46, p. 966-8.

Tilcock, C., P. MacDougall, E. Unger, D. Cardenas, and L. Fajardo, 1990, The effect of lipid composition on the relaxivity of Gd-DTPA entrapped in lipid vesicles of defined size.: Biochim Biophys Acta, v. 1022, p. 181-6.

Viswanathan, S., Z. Kovacs, K. N. Green, S. J. Ratnakar, and A. D. Sherry, 2010, Alternatives to Gadolinium-Based Metal Chelates for Magnetic Resonance Imaging: Chemical Reviews, v. 110, p. 2960-3018.

Zhang, S., M. Merritt, D. Woessner, R. Lenkinski, and A. Sherry, 2003, PARACEST agents: modulating MRI contrast via water proton exchange.: Acc Chem Res, v. 36, p. 783-90.

CHAPITRE V
Protocole d'imagerie CEST *in vivo* à 7T

V.1 Montage expérimental

V.1.a Scanner IRM 7T

Tous les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse ont été acquis sur le scanner IRM 7T PharmaScan Bruker (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne, voir figure F.V.1). Le champ statique de ce scanner IRM est de 7,05T, correspondant à une fréquence de résonance du proton de 300,31 MHz. Ce système est équipé de gradients d'intensité maximale de 752 mT/m et le diamètre interne utile est de 8.5 cm. Le logiciel utilisé pour l'acquisition des données et la programmation de séquences est le logiciel ParaVision 5.1.



Figure F.V.1 : Scanner IRM 7T PharmaScan Bruker de NeuroSpin.

V.1.b Sondes radiofréquences

Deux antennes ^{1}H ont été utilisées au cours de cette thèse. La première est une antenne volumique ^{1}H commerciale de type « cage d'oiseau » (voir figure F.V.2.a) dont le diamètre interne de 34 mm permet l'imagerie cérébrale chez le rat. Cette antenne a été utilisée principalement pour tester *in vitro* les performances de nos lipoCEST. La deuxième antenne est une antenne quadrature volumique ^{1}H de 28 mm de diamètre intérieur. Cette antenne a été développée et réalisée dans le laboratoire d'électronique de NeuroSpin (voir figure F.V.2.b). En raison de sa plus faible dimension et de la disposition en quadrature de ses circuits résonants, cette antenne est particulièrement adaptée à l'imagerie cérébrale chez la souris. D'après des tests *in vitro* sur fantôme d'eau salée (0,9% de NaCl), cette antenne permet de gagner approximativement 100% en Rapport Signal-sur-Bruit (SNR pour *Signal-to-Noise Ratio*) par rapport à l'antenne volumique Bruker. Nous avons donc utilisé cette antenne pour notre étude *in vivo* chez la souris.

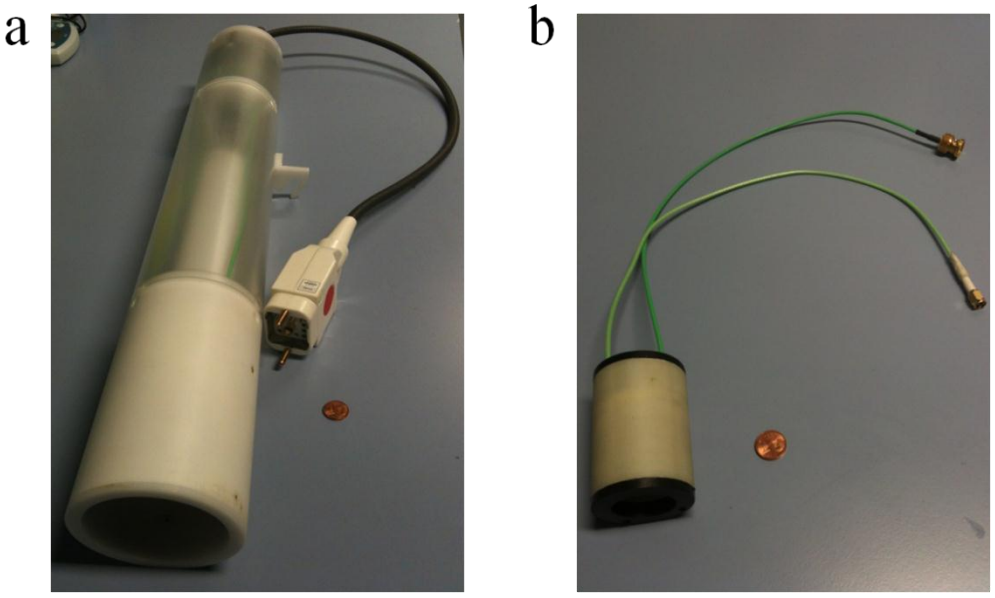


Figure F.V.2 : Antennes radiofréquences ^{1}H. *L'antenne volumique Bruker (**a**) a été utilisée pour les expériences in vitro. L'antenne quadrature volumique (**b**) a été développée dans le laboratoire d'électronique et a été utilisée pour les expériences chez la souris.*

V.1.c Anesthésie et positionnement des animaux

Conformément aux réglementations nationale (87/848) et européenne (86/609) en vigueur, les rongeurs ont été systématiquement anesthésiés avant et pendant les acquisitions IRM. L'anesthésie gazeuse a été réalisée avec 1 à 3% d'isoflurane diffusé dans un mélange air/O_2 (50/50 en volume). L'anesthésie gazeuse a permis d'ajuster le niveau d'anesthésie de l'animal (notamment sa fréquence respiratoire) durant le protocole d'acquisition. Les paramètres physiologiques des animaux ont été contrôlés et maintenus pendant la durée du protocole. La température a été gardée constante à 37°C grâce à un système de soufflerie d'air chaud et un système d'asservissement. Le rythme respiratoire des souris a été maintenu entre 50 et 80 respirations par minute.

Les souris ont été disposées dans un masque adapté aux dimensions de l'antenne quadrature. En raison de la géométrie de l'antenne incompatible avec l'installation de barres d'oreille, le maintien de la tête a été assuré par une fixation en deux points : le mors à dents et un point de compression à l'avant du museau.

V.2 La Séquence CEST-MSME

V.2.a Présentation

L'un des avantages de l'imagerie CEST est qu'il est aisé de transformer une séquence IRM conventionnelle en séquence d'imagerie CEST. Il suffit pour cela d'incorporer un module de saturation. Dans une large majorité de publications sur l'imagerie CEST (endogène ou exogène), des séquences de type Echo de Spin ont été utilisées *(Liu et al., 2011; Quesson et al., 1997; Terreno et al., 2009b; van Zijl et al., 2007)*. Elles présentent l'avantage d'être relativement peu sensibles aux inhomogénéités de champ B_0, ce qui est favorable pour l'imagerie *in vivo* à très haut champ magnétique. Par ailleurs, les temps de répétition sont usuellement plus longs qu'avec des séquences de type Echo de Gradient, ce qui permet notamment l'application de module de saturation long. Nous avons donc orienté notre choix vers une séquence MSME (pour *Multi-Slices Multi-Echos*). Un module de saturation composé d'un train de trois impulsions carrées a été incorporé. Le schéma de la séquence CEST-MSME est représenté sur la figure F.V.3.

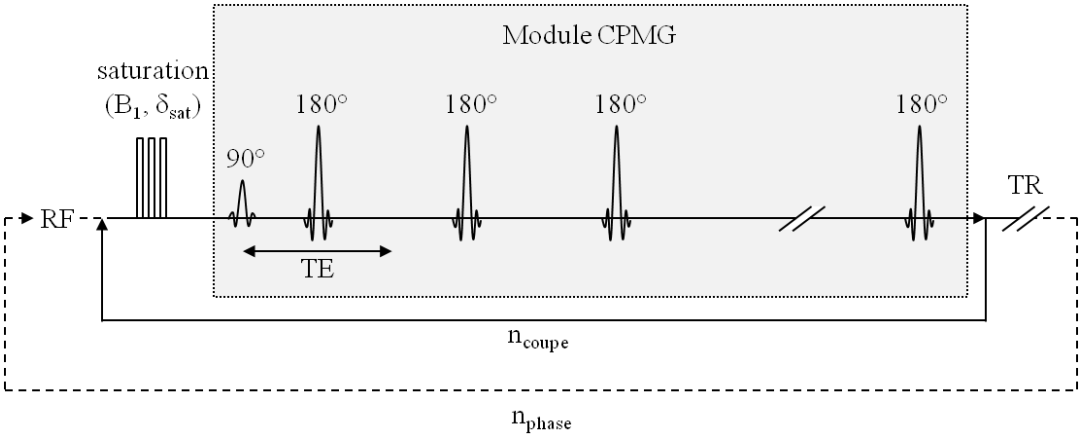


Figure F.V.3 : Schéma de la séquence CEST-MSME.

Les paramètres de la séquence CEST-MSME sont les suivants :

- Temps de répétition : TR = 5000 ms
- 12 échos enregistrés séparément avec TE_1 = 8 ms et un écart inter-écho de 8 ms
- Résolution : 150x150x660 μm^3
- Taille de la matrice : 128x128
- Nombre de coupes : n_{coupe} = 10
- Temps de saturation : T_{sat} = 384 ms
- Temps d'acquisition : T_{acq} = 6 min.

Dans une séquence MSME, l'acquisition du signal repose sur le principe d'écho de spin proposé par Hahn en 1950 *(Hahn, 1950)*. Après une impulsion RF de 90°, les spins sont basculés dans le plan transverse. Ils subissent alors un déphasage en raison des inhomogénéités de champ magnétique. Si une impulsion de 180° est appliquée selon l'autre axe du plan transverse après un temps τ, les spins se refocalisent et créent un écho. Cet écho a donc lieu au temps $TE = 2\tau$. En appliquant une série d'impulsions de 180° espacées de TE, il est alors possible de créer un train d'échos. Dans le cas de la séquence MSME, le train d'échos respecte les conditions CPMG (d'après le nom des inventeurs ; Carr, Purcell, Meiboom et Gill *(Meiboom and Gill, 1958)*). L'enveloppe du train d'échos suit une décroissance exponentielle dépendant uniquement du T_2 (voir figure F.V.4). Dans une séquence MSME, chacun des n échos correspond à une même ligne de l'espace k avec une pondération T_2 croissante. Il est notamment possible de sommer les différentes images afin d'accroître le SNR. Par ailleurs, la

séquence MSME permet une couverture spatiale efficace puisque plusieurs coupes peuvent être imagées successivement au cours du temps de répétition. Pour notre étude, 10 coupes de 660 µm d'épaisseur ont été acquises par TR, ce qui a permis d'imager tout le cerveau en un temps raisonnable (T_{acq} = 6 min).

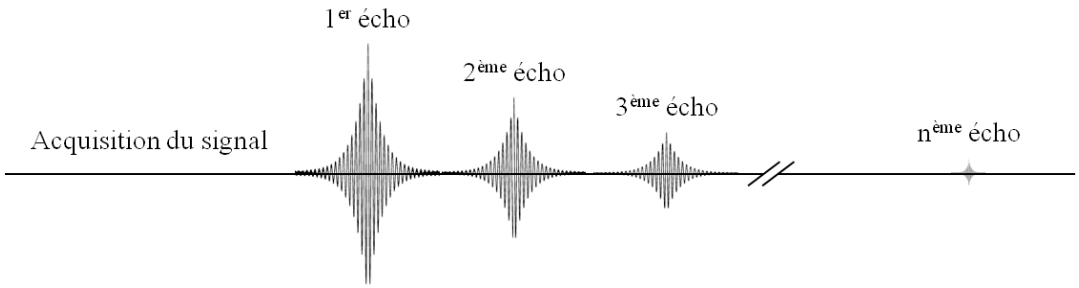


Figure F.V.4 : Pondération T_2 des échos au cours d'un module CPMG. *La pondération au n-ème écho est proportionnelle à* $exp(-n.TE/T_2)$.

V.2.b Reconstruction

Afin de maximiser le SNR, nous avons choisi d'une part de sommer les 12 images correspondant aux différents temps d'échos en fonction de leurs SNR respectifs *(Lee and Riederer, 1987)* et d'autre part d'appliquer un filtre de Tukey *(Gallichan et al., 2010)*.

La séquence MSME permet l'acquisition de 12 images dont la pondération T_2 est croissante. A l'évidence, il n'est pas favorable de réaliser une somme brute des images. Afin d'optimiser le SNR, ou le Rapport Contraste-sur-Bruit (CNR pour *Contrast-to-Noise Ratio*) d'une image, une somme pondérée doit être réalisée avec des poids égaux aux SNR (ou CNR) relatifs de chaque écho-image. Ici, le SNR est défini par le rapport des intensités mesurées dans 2 régions d'intérêt (ROI pour *Region of Interest*) de 10x10 pixels prises au centre et sur le bord de l'espace k. Cette somme pondérée permet de gagner 22% en SNR par rapport à la somme brute des écho-images. Afin d'augmenter le SNR en IRM, il est courant de filtrer les très hautes fréquences (correspondant notamment au bruit de l'image) sans modifier le centre de l'espace k. Nous avons choisi d'appliquer un filtre de Tukey avec un paramètre alpha = 0,7. L'application de ce filtre permet de gagner 16% en SNR au prix d'une dégradation de 12% de la résolution spatiale de l'image (voir figure F.V.5). Ainsi un gain total de 41% en SNR a été atteint par rapport à l'image obtenue par la somme brute des écho-images.

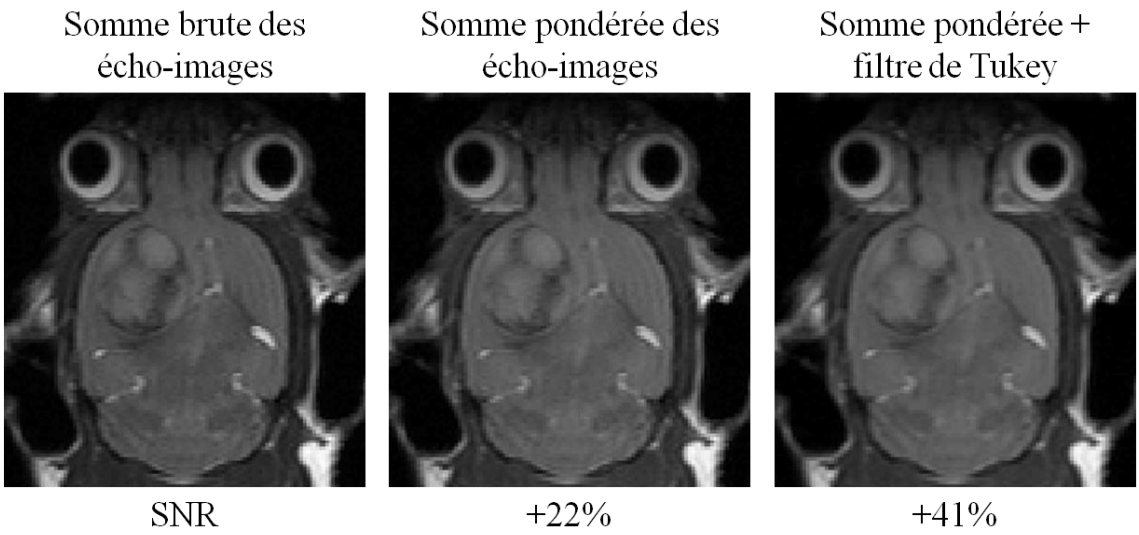


Figure F.V.5 : Reconstruction des images CEST. *En pondérant la somme des échos par le SNR mesuré sur chaque écho, le SNR est augmenté de 22%. Si en plus de la somme pondérée un filtre de Tukey est appliqué, le SNR est augmenté de 41% au prix d'une dégradation de 12% de la résolution spatiale.*

V.2.c Module de saturation

Usuellement en imagerie CEST, les modules de saturation sont constitués soit d'une irradiation en onde continue *(Delli Castelli et al., 2010; Stancanello et al., 2008; Terreno et al., 2009a)*, soit d'un train d'une centaine impulsions relativement courtes typiquement gaussiennes (de l'ordre d'une dizaine de ms) *(Mougin et al., 2010; Sheth et al., 2011; van Zijl et al., 2007; Zhou et al., 2003)*. Dans chacun des cas, la durée du module est relativement longue (T_{sat} > 1 s). Récemment, Dixon et collaborateurs *(Dixon et al., 2010)* ont démontré l'intérêt de modules de saturation courts répétés à un intervalle régulier en combinaison avec une séquence de type Multi-Slice Gradient-Echo. Le délai entre deux répétitions du module de saturation étant plus court que le T_1 de l'eau, on observe un effet cumulatif de la saturation sélective *(Dixon et al., 2010)*.

De façon similaire, nous avons opté pour un module de saturation relativement court de 384 ms composé de 3 impulsions carrées de 128 ms (figure F.V.6.a). Le module de saturation est répété tous les TR/n_{coupe} soit toutes les 500 ms. Le délai inter-module de 116 ms est

nettement inférieur au T_1 de l'eau à 7T (> 1600 ms), il y a par conséquent un effet cumulatif de la saturation. Etant donné que le délai entre chaque impulsion carrée (0,2 ms) est très court par rapport à la durée d'une impulsion, le train de trois impulsions peut être assimilé à une impulsion carrée de 384 ms ainsi que l'illustre sa transformée de Fourier (voir figure F.V.6.b).

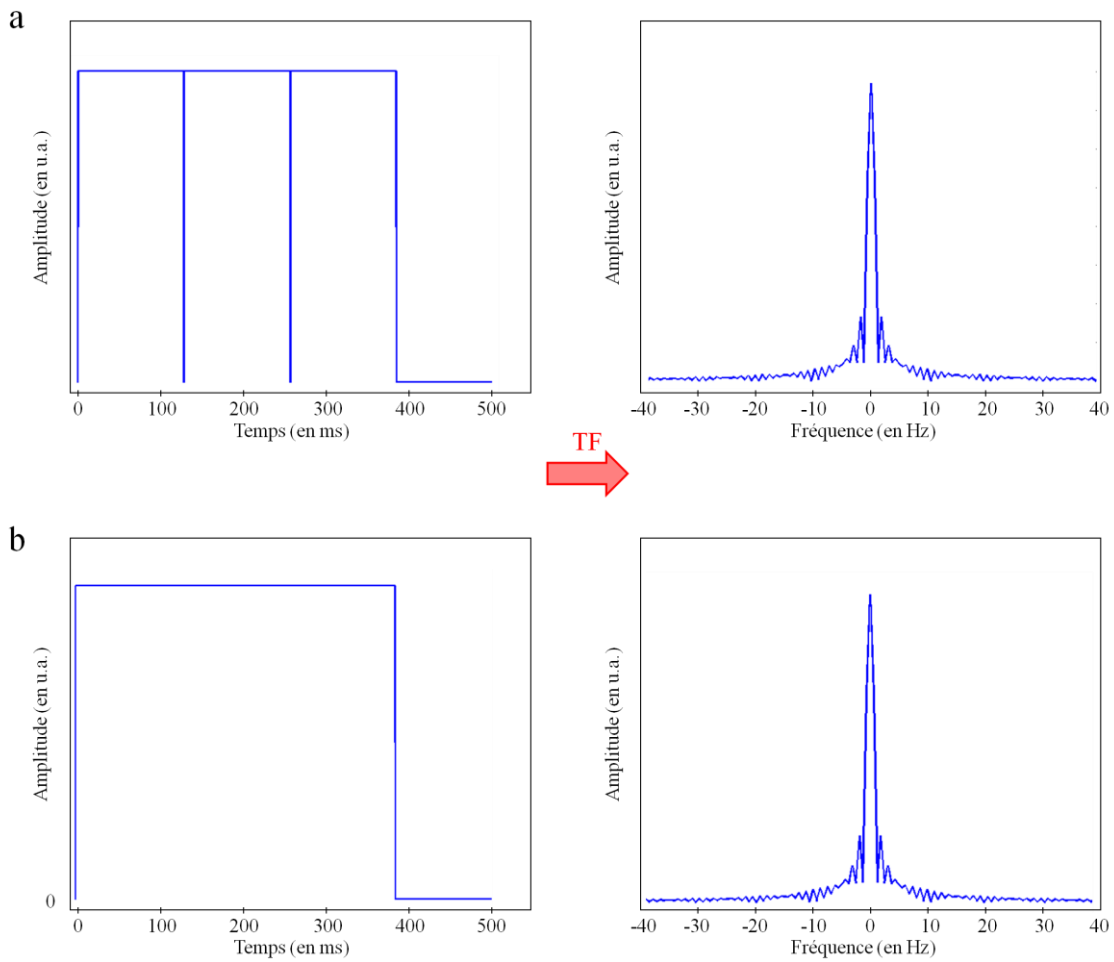


Figure F.V.6 : Profil spectral du module de saturation. *La largeur à mi-hauteur de la transformée de Fourier d'un train de 3 impulsions carrés de 128 ms* ***(a)*** *est de 4 Hz ce qui est équivalent à ce qui aurait été obtenu pour une unique impulsion carré de 384 ms* ***(b)****.*

Afin de confirmer l'effet cumulatif de notre module de saturation, nous avons évalué *in vitro* l'impact du délai entre chaque module de saturation. Pour cela, nous avons fait varier la durée du module de saturation pour un temps de répétition fixe de 5000 ms. Les données ont été acquises avec un lipoCEST similaire à ceux utilisés chez la souris et avec des paramètres de saturation optimaux (δ_{sat} = 8 ppm et B_1 = 7 µT). Comme l'illustre la figure F.V.7, le contraste

MTRasym croit rapidement avec le temps de saturation pour atteindre près de 95% de sa valeur maximale au-delà de 100 ms. Bien que nous ayons fait le choix d'appliquer notre saturation pendant 384 ms, le choix d'un temps de saturation plus court (T_{sat} ~ 200 ms) aurait été objectivement préférable. Cela aurait notamment permis de diminuer le TR d'un facteur 2 et d'augmenter la quantité de signal par unité de temps. Malheureusement, cette observation a été réalisée trop tardivement et constitue de fait une amélioration à appliquer pour une prochaine étude.

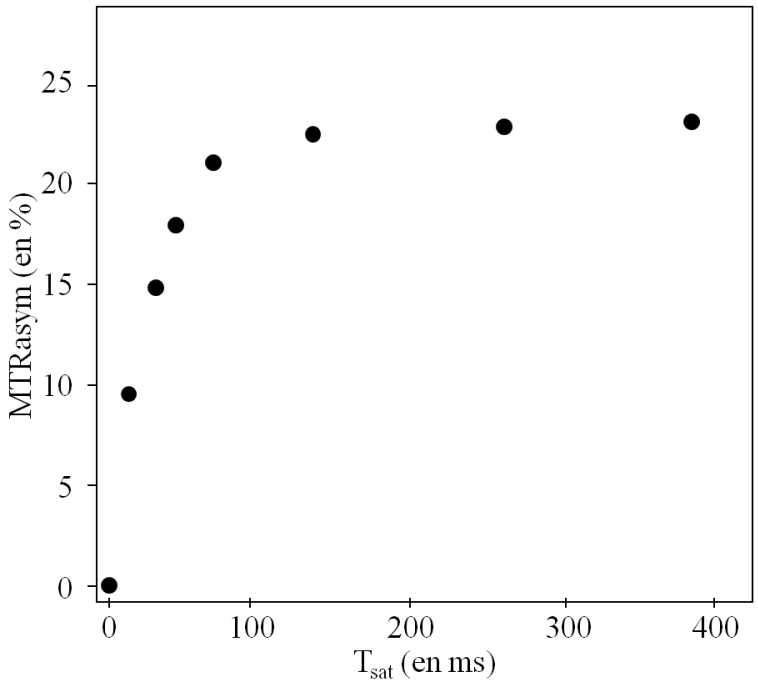


Figure F.V.7 : Evolution de l'intensité de l'effet CEST en fonction de T_{sat}. *Les données ont été acquises avec un lipoCEST comparable à celui utilisé pour notre étude in vivo. Les paramètres de saturation étaient : δ_{sat} = 8 ppm et B_1 = 7 µT.*

V.2.d Choix de la puissance et de la fréquence de saturation

Afin de déterminer les paramètres optimaux pour l'observation d'un effet CEST, nous avons simplement choisi d'appliquer les conditions de saturation permettant l'observation d'un contraste MTRasym maximum *in vitro*. Une série de Z-spectrum a été systématiquement acquise *in vitro* pour des fréquences de saturation δ_{sat} variant de -20 à 20 ppm et pour des

intensités de saturation variables B_1 de 0 à 8 µT pour chaque lot de lipoCEST. La série de Z-spectra asymétriques obtenue peut être avantageusement représentée en 2 dimensions. Un exemple de Z-spectrum 2D acquis sur un lot de RGD-lipoCEST est présenté sur la figure F.V.8.

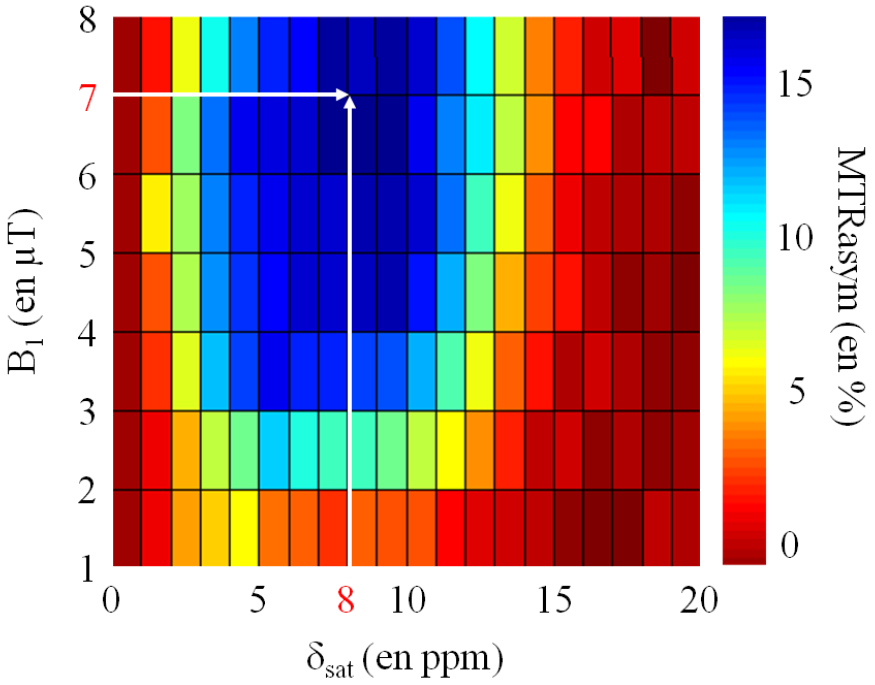


Figure F.V.8 : Z-spectrum 2D du RGD-lipoCEST. *Les paramètres de saturation optimaux sont $\delta_{sat.opt}$ = 8 ppm et B_{1opt} = 7. L'effet MTRasym dans ces conditions de saturation est de 17%. La concentration en RGD-lipoCEST est de 14 nM.*

Pour ce lipoCEST, comme pour tous les lots de lipoCEST utilisés pour l'étude *in vivo* chez la souris U87, les paramètres de saturation optimaux étaient : $\delta_{sat.opt}$ = 8 ppm et B_{1opt} = 7µT. Dans ces conditions, l'effet MTRasym est compris approximativement entre 17 et 20%. Ce sont ces conditions de saturations qui ont été utilisées pour acquérir les données CEST présentées dans le chapitre VI.

V.4 Acquisition des cartes de champs B_1 et B_0

V.4.a Contrôle de l'homogénéité du champ B_1

L'effet CEST est dépendant de l'intensité du module de saturation. Il est donc important de s'assurer de l'homogénéité du champ B_1 dans le champ de vue. Ceci est particulièrement pertinent lorsqu'une antenne de surface est utilisée ou lorsque la longueur d'onde de l'excitation RF est de dimension comparable à l'organe imagé comme c'est le cas notamment pour l'imagerie cérébrale chez l'homme à très haut champ magnétique. Afin de vérifier l'homogénéité du champ RF, nous avons systématiquement acquis une carte de B_1 préalablement aux acquisitions CEST *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de l'angle double *(Stollberger and Wach, 1996)* qui consiste à calculer la distribution du champ B_1 à partir de deux images d'écho de gradient acquises avec deux angles de bascule α_1 et α_2 (α_1 = 30°, α_2 = 60° et TR = 3000 ms). Le TR doit être suffisamment long pour que l'intensité I des images ne soit pas pondérée par un effet de relaxation T_1. Ces deux images permettent de calculer l'angle de bascule effectif α_{eff} dans l'image grâce à la relation suivante :

E38 $$\alpha_{eff} = cos^{-1}\left(\frac{I(\alpha_2)}{2.I(\alpha_1)}\right).$$

Le rapport α_{eff} / α_1 représente alors l'erreur commise sur l'angle de bascule. La carte de champ B_1 est alors extrapolée grâce à la relation suivante :

E39 $B_1 = \frac{\alpha_{eff}}{\alpha_1}.B_{1th.}$, avec $B_{1th.}$ la valeur théorique de l'impulsion RF.

Un exemple de carte B_1 est présenté figure F.V.9.a. On constate que le champ B_1 est relativement homogène dans l'ensemble du cerveau de la souris. En effet, la distribution du champ B_1 à travers le cerveau est représentée figure F.V.9.b et la valeur moyenne est de B_1 = 7,4 ± 0.7 µT (moyenne ± écart-type). La dispersion relative du champ B_1 est estimée à 9%.

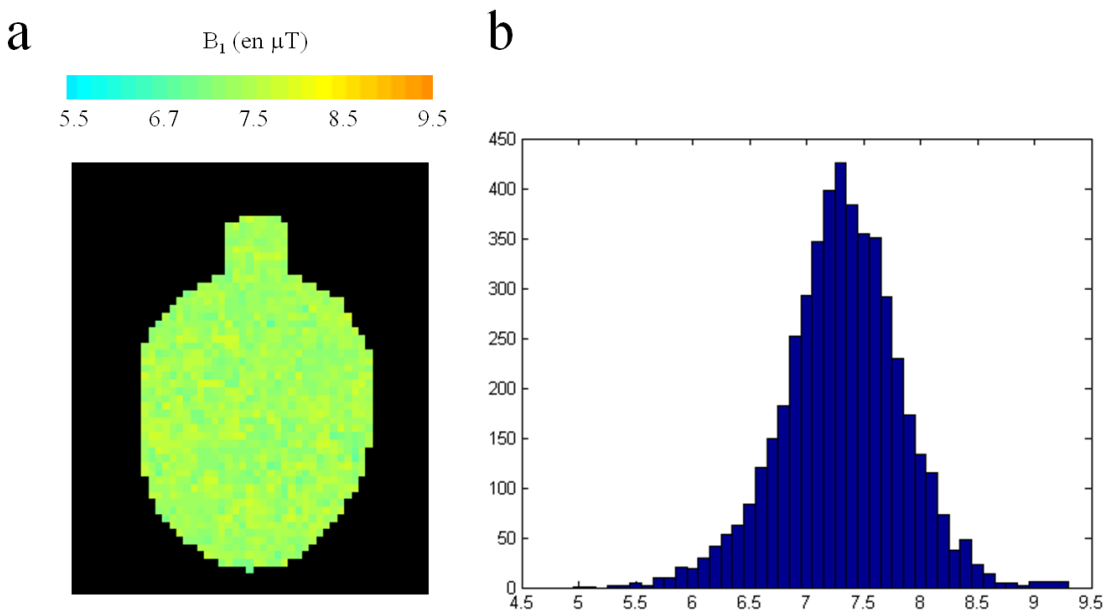


Figure F.V.9 : Carte typique de champ B_1. *La carte de champ B_1* ***(a)*** *a été acquise avec l'antenne quadrature volumique. Comme l'illustre l'histogramme* ***(b)****, le champ B_1 dans le cerveau de souris est raisonnablement homogène (B_1 = 7,4 ± 0.7 µT).*

Cette valeur est typique des antennes volumiques de petit diamètre utilisées pour l'imagerie préclinique *(Doty et al., 2007)*. Force est de constater que l'acquisition de cartes de champ B_1 n'est pas indispensable pour notre étude. Toutefois, dans la perspective de l'imagerie CEST clinique ou préclinique avec une antenne de surface, nous avons souhaité maintenir l'acquisition de cartes de B_1 en prévision d'une éventuelle correction pour ces inhomogénéités de B_1 en post-processing. Une telle correction a d'ailleurs été implémentée dans l'outil d'analyse quantitative présenté dans le chapitre VII.

V.4.b Contrôle de l'homogénéité du champ B_0

Dans notre protocole, l'intensité de saturation est de 7 µT. Nous sommes donc confrontés à un contraste MT endogène significatif, auquel s'ajoute un effet de saturation directe de l'eau libre. Afin de s'en affranchir, le contraste exploité en imagerie CEST correspond à la soustraction d'images acquises avec des saturations appliquées à $+\delta_{sat}$ et $-\delta_{sat}$. En présence d'inhomogénéités de champ B_0, ces deux impulsions de saturation ne sont plus appliquées de façon symétrique par rapport à la fréquence de l'eau en tout point de l'image

(Baguet and Roby, 1997; Sun et al., 2005). Par conséquent, la soustraction des effets MT et de saturation directe génère des artéfacts dépendant de l'intensité de ces inhomogénéités (jusqu'à 10%) dans l'image MTRasym *(Sun et al., 2007)*. Il est donc nécessaire de s'assurer d'une bonne homogénéité du champ B_0 dans l'organe ou à défaut de corriger pour de tels artéfacts en post-processing. Nous avons choisi d'acquérir systématiquement des cartes de B_0 selon la méthode WASSR (pour *WAter Saturation Shift Referencing*) proposée par l'équipe de Peter van Zijl *(Kim et al., 2009)*. Contrairement aux techniques d'acquisition conventionnelles de cartes de champ B_0 *(Maudsley et al., 1984; Tropp et al., 1989)* qui ne donnent accès qu'à une mesure relative du champ B_0, cette technique permet d'obtenir une carte de champ B_0 absolue grâce à l'acquisition d'une image de saturation de l'eau *(Kim et al., 2009)*. Pour cela, un Z-spectrum est acquis avec une impulsion de saturation de faible intensité et un pas fréquentiel fin autour de la fréquence de l'eau. La saturation appliquée est faible afin de limiter autant que possible les effets endogènes de transfert d'aimantation. En chaque pixel de l'image, le Z-spectrum est ajusté par une fonction super-lorentzienne afin de déterminer la fréquence de précession des protons libres.

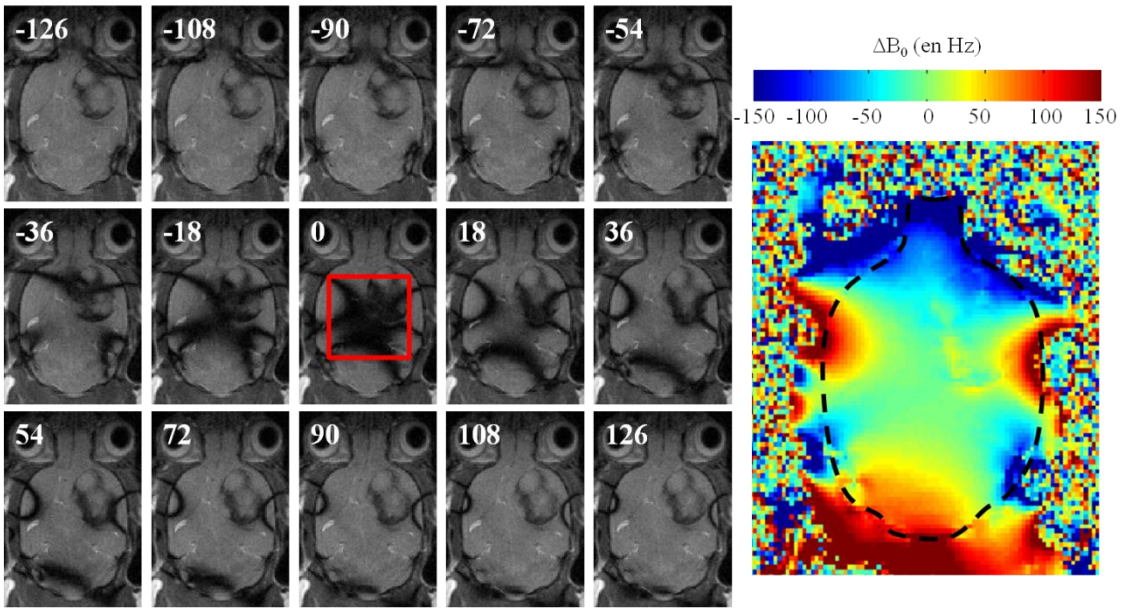


Figure F.V.10 : Images de saturation directe utilisées pour la méthode WASSR et carte de champ B_0. *La fréquence de l'impulsion de saturation est indiquée en haut à gauche de chaque image. Le carré rouge représente la zone dans laquelle la procédure « Mapshim » a été appliquée.*

Après avoir homogénéisé autant que faire se peut le champ B_0 dans une large zone d'intérêt (carré rouge, dimension typique : 8x8x5 mm^3) grâce à la procédure « Mapshim » de Bruker, la technique WASSR a été utilisée pour acquérir la carte de champ B_0. Une impulsion de saturation de 0,1 µT a été appliquée avec un pas fréquentiel de 9 Hz de -153 à 153 Hz pour acquérir un Z-spectrum. Une série d'images de saturation directe est présentée figure F.V.10 ainsi que la carte de champ B_0 correspondante. On constate que le champ est raisonnablement homogène dans la zone visée par la procédure de shim. Un spectre de l'eau acquis dans ce volume permet d'estimer la largeur à mi-hauteur du pic d'eau à ~ 20 Hz, correspondant plus ou moins à la distribution du champ B_0. Au-delà de ce volume, on constate des inhomogénéités significatives, allant de -150 Hz à +150 Hz. Ces inhomogénéités sont susceptibles de générer des artéfacts sur les bords de nos images CEST. C'est pourquoi une correction de ces artéfacts a été implémentée dans l'outil d'analyse quantitative présenté dans le chapitre VII.

V.5 Protocole d'imagerie CEST *in vivo*

Grâce aux différents éléments présentés dans ce chapitre, nous avons pu mettre en place un protocole adapté à l'imagerie CEST *in vivo* chez la souris (voir figure F.V.11).

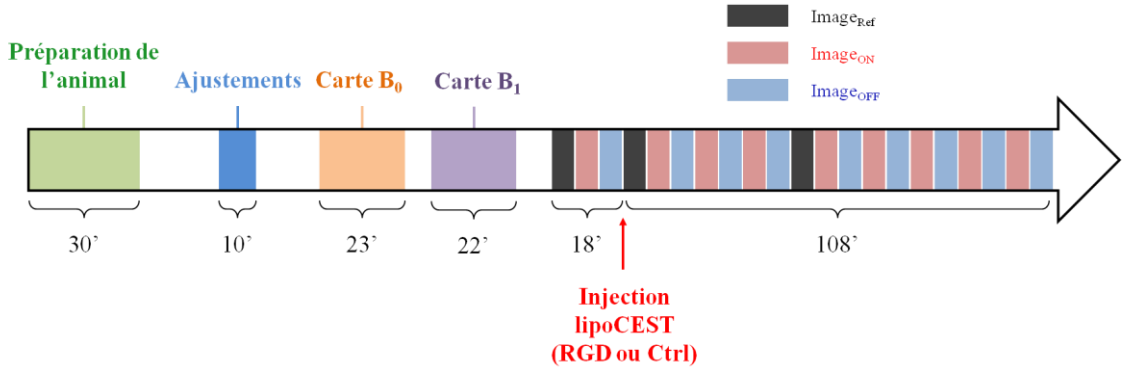


Figure F.V.11 : Protocole d'imagerie CEST in vivo. *Le temps total nécessaire par animal est d'environ 3,5h.*

Après pose du cathéter au niveau d'une des veines caudales, la souris est installée dans l'aimant. La longueur du cathéter permet notamment l'injection du lipoCEST sans déplacement de la souris. Avant injection du lipoCEST, les cartes de champs B_0 et B_1 ont été acquises systématiquement pour s'assurer de l'homogénéité des champs et pour la correction en post-

processing des effets CEST. Toutes les images utilisées pour le calcul des effets CEST ont été acquises avec la séquence CEST-MSME. Trois images anatomiques de références ($Image_{Ref}$) ont été acquises au cours du protocole notamment pour s'assurer de la stabilité du signal : une première avant l'injection du lipoCEST et deux autres aux temps t = 0' et 42' après injection du lipoCEST (voir figure F.V.11, rectangles noirs). Les images acquises avec la saturation appliquée à δ_{sat} = 8 ppm et δ_{sat} = -8 ppm sont désignées respectivement $Image_{ON}$ et $Image_{OFF}$ (voir figure F.V.11, rectangles roses et bleus respectivement). Les images CEST ont été acquises avant (t = 0') et après (t = 18', 30', 42', 60', 72', 84, 96', 108') injection du lipoCEST en alternant les fréquences de saturation positive et négative. L'intervalle moyen entre deux images CEST est de 13,5 min. Le temps nécessaire à une expérience *in vivo* est d'environ 3,5 h par animal. Ce protocole a été utilisé pour acquérir les données présentées dans le chapitre VI. Aucune souris n'est morte au cours de ce protocole.

Bibliographie du chapitre V

Baguet, E., and C. Roby, 1997, Off-resonance irradiation effect in steady-state NMR saturation transfer.: J Magn Reson, v. 128, p. 149-60.

Delli Castelli, D., W. Dastrù, E. Terreno, E. Cittadino, F. Mainini, E. Torres, M. Spadaro, and S. Aime, 2010, In vivo MRI multicontrast kinetic analysis of the uptake and intracellular trafficking of paramagnetically labeled liposomes.: J Control Release, v. 144, p. 271-279.

Dixon, W. T., I. Hancu, S. J. Ratnakar, A. D. Sherry, R. E. Lenkinski, and D. C. Alsop, 2010, A multislice gradient echo pulse sequence for CEST imaging.: Magn Reson Med, v. 63, p. 253-6.

Doty, F., G. Entzminger, J. Kulkarni, K. Pamarthy, and J. Staab, 2007, Radio frequency coil technology for small-animal MRI: Nmr in Biomedicine, v. 20, p. 304-325.

Gallichan, D., J. Scholz, A. Bartsch, T. E. Behrens, M. D. Robson, and K. L. Miller, 2010, Addressing a systematic vibration artifact in diffusion-weighted MRI.: Hum Brain Mapp, v. 31, p. 193-202.

Hahn, E. L., 1950, Spin Echoes, Physical Review, vol. 80, Issue 4, pp. 580-594.

Kim, M., J. Gillen, B. Landman, J. Zhou, and P. van Zijl, 2009, Water Saturation Shift Referencing (WASSR) for Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) Experiments: Magnetic Resonance in Medicine, v. 61, p. 1441-1450.

Lee, J. N., and S. J. Riederer, 1987, The contrast-to-noise in relaxation time, synthetic, and weighted-sum MR images.: Magn Reson Med, v. 5, p. 13-22.

Liu, G., Y. Li, V. R. Sheth, and M. D. Pagel, 2011, Imaging In Vivo Extracellular pH with a Single Paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent.: Mol Imaging.

Maudsley, A., H. Simon, and S. Hilal, 1984, Magnetic field measurement by NMR imaging: J Phys E Sci Instrum, v. 17, p. 216-220.

Meiboom, S., and D. Gill, 1958, Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times, *Rev. Sci. Instr.* 29:688-91.

Mougin, O., R. Coxon, A. Pitiot, and P. Gowland, 2010, Magnetization transfer phenomenon in the human brain at 7 T.: Neuroimage, v. 49, p. 272-81.

Quesson, B., E. Thiaudière, C. Delalande, V. Dousset, J. F. Chateil, and P. Canioni, 1997, Magnetization transfer imaging in vivo of the rat brain at 4.7 T: interpretation using a

binary spin-bath model with a superLorentzian lineshape.: Magn Reson Med, v. 38, p. 974-80.

Sheth, V. R., Y. Li, L. Q. Chen, C. M. Howison, C. A. Flask, and M. D. Pagel, 2011, Measuring in vivo tumor pHe with CEST-FISP MRI. Magnetic Resonance in Medicine 2011, DOI 10.1002/mrm.23038: Magn Reson Med.

Stancanello, J., E. Terreno, D. D. Castelli, C. Cabella, F. Uggeri, and S. Aime, 2008, Development and validation of a smoothing-splines-based correction method for improving the analysis of CEST-MR images: Contrast Media & Molecular Imaging, v. 3, p. 136-149.

Stollberger, R., and P. Wach, 1996, Imaging of the active B-1 field in vivo: Magnetic Resonance in Medicine, v. 35, p. 246-251.

Sun, P., C. Farrar, and A. Sorensen, 2007, Correction for artifacts induced by B(0) and B(1) field inhomogeneities in pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) imaging.: Magn Reson Med, v. 58, p. 1207-15.

Sun, P., P. van Zijl, and J. Zhou, 2005, Optimization of the irradiation power in chemical exchange dependent saturation transfer experiments: Journal of Magnetic Resonance, v. 175, p. 193-200.

Terreno, E., D. D. Castelli, E. Violante, H. Sanders, N. Sommerdijk, and S. Aime, 2009a, Osmotically Shrunken LIPOCEST Agents: An Innovative Class of Magnetic Resonance Imaging Contrast Media Based on Chemical Exchange Saturation Transfer: Chemistry-a European Journal, v. 15, p. 1440-1448.

Terreno, E., J. Stancanello, D. Longo, D. Castelli, L. Milone, H. Sanders, M. Kok, F. Uggeri, and S. Aime, 2009b, Methods for an improved detection of the MRI-CEST effect.: Contrast Media Mol Imaging, v. 4, p. 237-47.

Tropp, J., K. Derby, C. Hawryszko, S. Sugiura, and H. Yamagata, 1989, Automated shimming of B0 for spectroscopic imaging: J Magn Reson, v. 85, p. 244-254.

van Zijl, P. C. M., C. K. Jones, J. Ren, C. R. Malloy, and A. D. Sherry, 2007, MR1 detection of glycogen in vivo by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST): Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, p. 4359-4364.

Zhou, J. Y., B. Lal, D. A. Wilson, J. Laterra, and P. C. M. van Zijl, 2003, Amide proton transfer (APT) contrast for imaging of brain tumors: Magnetic Resonance in Medicine, v. 50, p. 1120-1126.

CHAPITRE VI

Imagerie CEST de l'angiogenèse tumorale dans un modèle rongeur de tumeur cérébrale U87 à l'aide de lipoCEST fonctionnalisés

VI.1 Introduction

VI.1.a Enjeux de l'imagerie moléculaire de la tumeur cérébrale

Le cancer du système nerveux central est une pathologie en progression constante en Europe avec une augmentation de 1% par an sur la période 1980 à 2005 *(Belot et al., 2008)*. En France, environ 4000 nouveaux cas de tumeurs cérébrales malignes sont détectés chaque année. Ce sont la plupart du temps (50 à 60% des cas) des glioblastomes (voir figure F.VI.1). Il s'agit de tumeurs extrêmement agressives dont la croissance cellulaire est rapide. Elles sont de ce fait très difficilement maîtrisables et la survie des patients après diagnostic est seulement de trois mois. Même après une intervention chirurgicale pour réséquer le glioblastome et un traitement post-opératoire (chimiothérapie et radiothérapie), le taux de survie au glioblastome reste très faible, de l'ordre de 10% *(Lefranc, 2011)*.

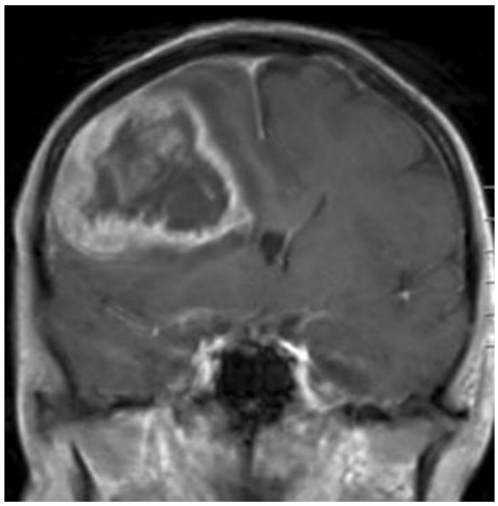


Figure F.VI.1 : Image RMN pondérée T_1 d'un glioblastome humain après injection d'agent de contraste à base de Gadolinium. *Illustration tirée de (Deprez, 2010).*

Afin de mieux prendre en charge les patients atteints de glioblastomes, des efforts importants sont actuellement réalisés pour trouver des biomarqueurs d'intérêt de la pathologie. Certains biomarqueurs exprimés lors de l'angiogenèse peuvent notamment se révéler être d'excellents indicateurs de l'évolution des glioblastomes *(Chamberlain et al., 2012)*. C'est pourquoi l'imagerie de l'angiogenèse tumorale constitue un axe de recherche dynamique en imagerie biomédicale. *(McDonald and Choyke, 2003; Schmieder et al., 2005; Winter et al., 2010)*. L'imagerie moléculaire a donc potentiellement un rôle capital à jouer car elle permettrait de suivre de façon non-invasive l'évolution de la pathologie, permettant ainsi d'évaluer précisément l'efficacité d'un traitement anti-tumoral.

VI.1.b Mécanisme de l'angiogenèse tumorale

Consécutivement à une mutation ou à un perturbateur endocrinien, une cellule gliale va se développer de façon anormale et anarchique par division cellulaire pour donner lieu à un glioblastome. Lorsqu'il est encore de petite taille (< 2 mm) les ressources énergétiques du milieu environnant sont suffisantes à sa croissance. Cependant, au-delà de cette taille, le glioblastome a besoin d'un apport plus important en oxygène et nutriments *(Folkman, 1971)*. En effet, les cellules les plus anciennes de la tumeur (le cœur de la tumeur) se retrouvent progressivement en hypoxie ce qui a pour conséquence de déclencher le processus d'angiogenèse tumorale. La libération massive de facteurs de croissance pro-angiogéniques appelés VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) *(Plate et al., 1992)* constitue l'élément principal de ce mécanisme. Sous l'effet des VEGF, des vaisseaux sanguins sont néoformés à partir des vaisseaux existants. Le mécanisme de l'angiogenèse est schématisé dans la figure F.VI.2. L'organisation des vaisseaux sanguins néoformés pour irriguer la tumeur est très différente de celle dans les tissus sains. En effet, les capillaires se développent de façon anarchique principalement en périphérie de la tumeur. Ceci peut être visualisé par IRM après injection d'un agent de contraste à base de Gadolinium (voir figure F.VI.1).

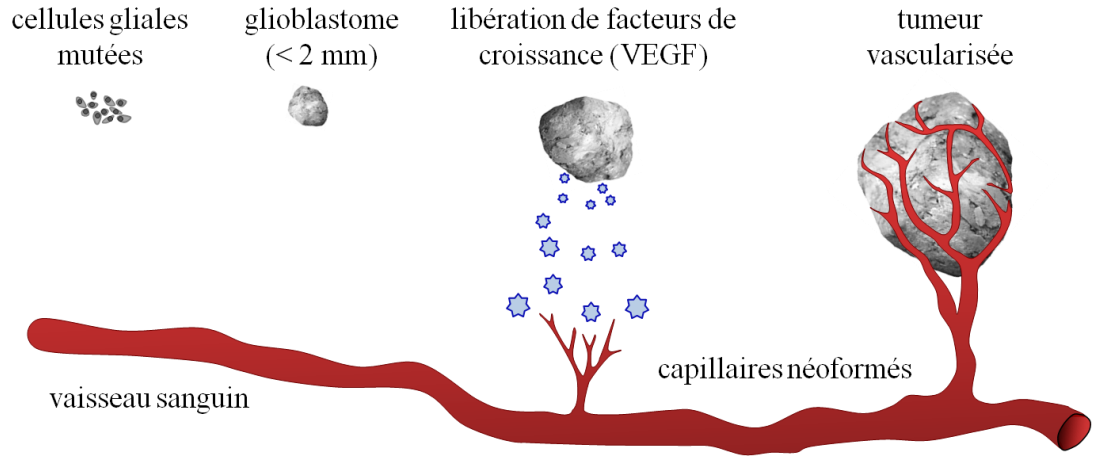


Figure F.VI.2 : Mécanisme de la néo-angiogenèse tumorale. *Dans un premier temps, des cellules gliales mutées vont croître de façon anarchique et incontrôlée. Lorsque le glioblastome atteint un diamètre supérieur à 2 mm, son cœur souffre d'hypoxie et des facteurs de croissance VEGF sont libérés pour favoriser le développement de nouveaux capillaires et assurer l'apport en oxygène et nutriments.*

VI.1.c Détection de l'angiogenèse tumorale

Lors du processus néo-angiogénique, un grand nombre de néovaisseaux sont recrutés pour irriguer la tumeur en expansion. La lumière de ces néovaisseaux est constituée de cellules endothéliales surexprimant des protéines de surface appelées intégrines. L'une d'entre elles, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été identifiée comme étant un marqueur de l'angiogenèse *(Brooks et al., 1994)*. Elle est donc potentiellement un bon indicateur de la croissance tumorale. Cette intégrine est constituée de deux domaines transmembranaires, les intégrines α_v et β_3 (voir figure F.VI.3). Le taux d'expression de la sous-unité α_v varie entre 3×10^3 et $1{,}4 \times 10^4$ sous-unités/cellule alors que celui de la sous-unité β_3 est compris entre $5{,}3 \times 10^2$ et $1{,}1 \times 10^4$ sous-unités/cellule *(Benedetto et al., 2006)*. L'avantage de cette intégrine est qu'elle est surexprimée en grande quantité par les cellules nouvellement formées mais pas par les cellules matures *(Akers et al., 2010)*. De plus, un autre intérêt de ce biomarqueur de l'angiogenèse tumorale est son accessibilité. En effet, l'intégrine est exprimée à la surface des vaisseaux sanguins ce qui en fait une cible vasculaire. Par conséquent, elle est accessible via la circulation sanguine à des agents de contraste présentant un diamètre hydrodynamique important (> 100 nm) *(Kobayashi and Lin, 2006; Meyer et al., 2006)*. Par ailleurs, l'association des deux intégrines crée au milieu un site de

liaison qui peut être reconnu de façon spécifique par un peptide RGD correspondant à la séquence d'acides aminés arginine, glycine et acide aspartique *(Smith and Cheresh, 1990)*. Ce peptide a une très bonne affinité avec le site de liaison de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (de l'ordre du nanomolaire *(Ye et al., 2006)*). Une stratégie d'imagerie moléculaire relativement commune pour la détection de l'angiogenèse tumorale consiste donc à cibler l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à l'aide d'agents de contraste fonctionnalisés présentant le peptide RGD greffé à la surface *(Schmieder et al., 2008)*.

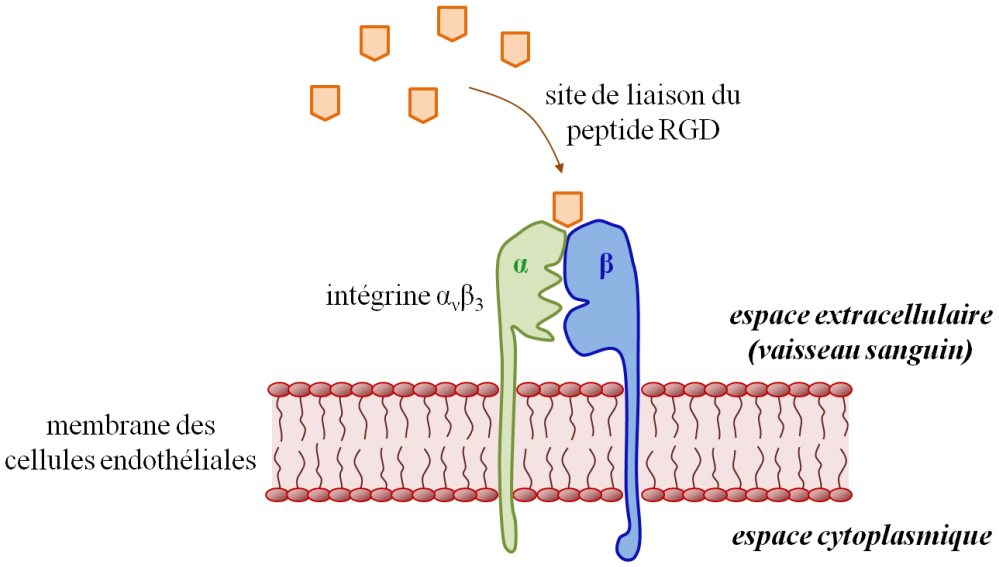


Figure F.VI.3 : Schéma d'une intégrine $\alpha_v\beta_3$. *Elle est exprimée à la surface des capillaires néoformés lors de l'angiogenèse tumorale. Le site de liaison des protéines α_v et β_3 est reconnu avec une bonne affinité par le peptide RGD.*

Dans cette étude, nous avons adopté la même stratégie pour évaluer l'imagerie moléculaire par IRM-CEST de la néo-angiogenèse à l'aide de lipoCEST fonctionnalisés chez la souris U87. Nos observations ont par la suite été validées par des données d'immunohistochimie et d'imagerie de fluorescence.

VI.2 Matériels et Méthodes

VI.2.a Modèle animal

Les expériences de cette étude ont été menées sur des souris auxquelles des cellules malignes de glioblastomes humains (U87MG, ATCC, Rockville, Etats-Unis) ont été implantées au niveau du noyau caudé selon un protocole conforme aux réglementations européennes (86/609) et françaises (87/848). Les cellules U87MG ont été cultivées dans un milieu classique pour la culture cellulaire (milieu Eagle modifié de Dulbecco avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% de glutamine et 1% de gentamicine). Les tumeurs ont ensuite été induites par injection de 1,2 x 10^5 cellules directement dans le parenchyme cérébrale des souris. Nous avons utilisé des souris immunodéprimées (nude NU/NU, Janvier, France) afin de favoriser la croissance tumorale. Une image anatomique de référence permet de visualiser clairement la tumeur (voir figure F.VI.4).

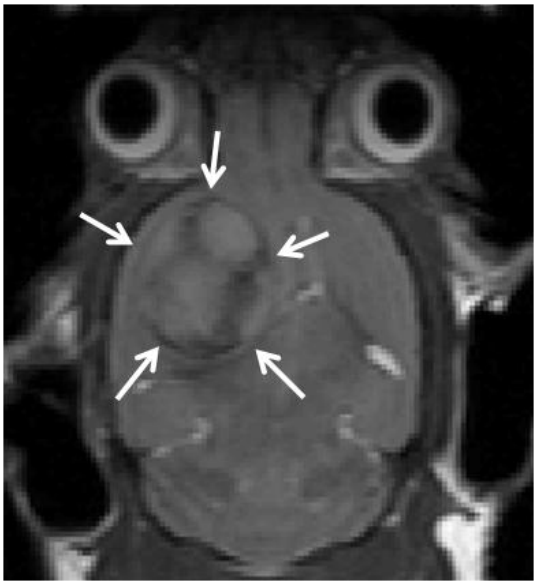


Figure F.VI.4 : Image anatomique de référence d'une souris avec un glioblastome U87. *La tumeur cérébrale est délimitée par les flèches blanches. Le diamètre typique des tumeurs était compris entre 2 et 5 mm. L'image a été acquise avec la séquence MSME présentée dans le chapitre V.*

Le modèle de tumeur U87 est couramment utilisé pour l'évaluation d'agents de contraste fonctionnalisés avec un peptide RGD *(Kiessling et al., 2009; Li et al., 2011)*.

Cependant, ce modèle est relativement peu documenté et il y a peu d'informations sur la croissance des tumeurs, sur le potentiel angiogénique de ces glioblastomes ou encore sur le taux d'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Certains articles mentionnent simplement un volume tumoral minimum d'environ 30 mm^3 (diamètre > 2 mm) à partir duquel l'angiogenèse tumorale est déclenchée *(Khemtong et al., 2009; Morawski et al., 2004; Schmieder et al., 2005)*. Pour notre étude, cette taille critique était atteinte au bout de 2 semaines environ ainsi que l'illustre la figure F.VI.5. On voit que la tumeur commence à se développer environ 7 jours après l'implantation des cellules U87MG puis croît de façon linéaire les 3 semaines suivantes. Dans cette étude, les diamètres des tumeurs étaient compris entre 2 et 5 mm. Il était donc raisonnable de penser que le processus angiogénique était enclenché pour l'ensemble des souris.

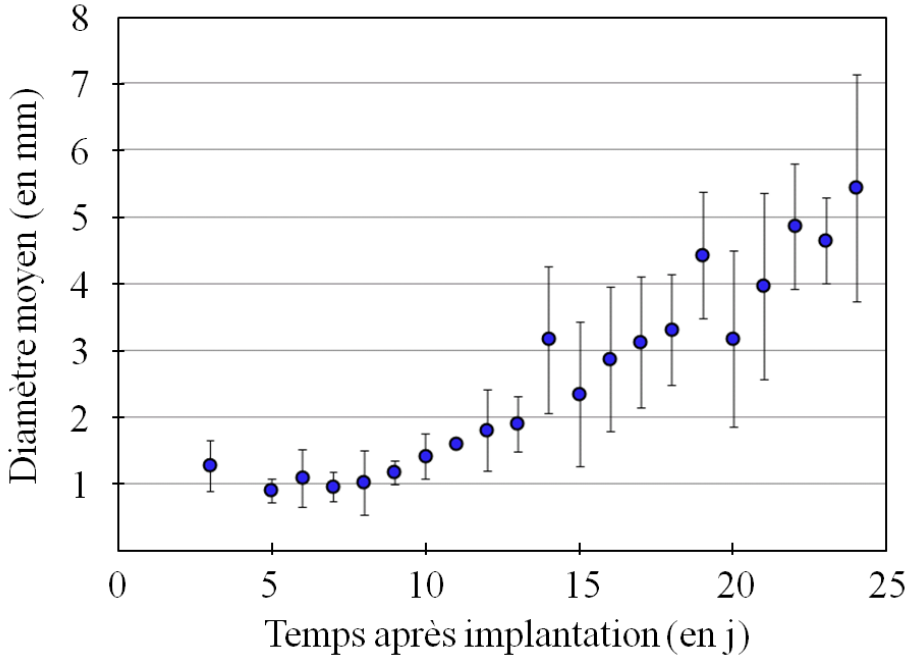


Figure F.VI.5 : Evolution de la taille de la tumeur en fonction du nombre de jours après implantation. *A postériori, nous avons compilé les diamètres moyens des tumeurs observées à l'occasion d'examens IRM de contrôle sur l'ensemble des souris utilisées.*

VI.2.b Protocole d'imagerie

Vingt-quatre souris implantées avec une tumeur cérébrale U87 ont été utilisées. Elles ont été aléatoirement réparties en deux groupes de 12 souris ; un groupe injecté avec le lipoCEST fonctionnalisé (RGD-lipoCEST) et un groupe injecté avec le lipoCEST sans peptide RGD (Ctrl-lipoCEST). Un cathéter a été posé dans une des veines caudales pour pouvoir administrer l'agent de contraste par voie intraveineuse (IV) sans sortir l'animal de l'aimant. Un bolus de 200 µL d'agent de contraste est injecté en 1 minute ce qui correspond à une dose en nanoparticules de 0,32 nmol/kg ou 87 µmol/kg de complexes de Tm(III). Le protocole d'imagerie est détaillé dans le chapitre V (voir figure F.V.11). Par ailleurs, à l'occasion d'une expérience préliminaire, un Z-spectrum *in vivo* a été acquis dans un cerveau de souris afin d'estimer la contribution endogène du contraste MT et APT.

VI.2.c Analyse par région d'intérêt du contraste CEST

L'effet MTRasym est calculé pour chacune des souris des deux groupes (RGD- et Ctrl-lipoCEST) et dans deux ROI : la « tumeur » et la zone « controlatérale ». Les ROI ont été tracées manuellement sur les images anatomiques de référence en évitant les bords du cerveau. Les ROI bleue et rouge délimitent respectivement la tumeur et la zone controlatérale (voir figure F.VI.6). Afin de ne pas introduire un biais entre les deux groupes (tumeur et controlatérale), nous avons, dans la mesure du possible, tracé des ROI incluant un nombre comparable de pixels. En conséquence, nous comparons les contrastes CEST moyens dans chacune de ces zones entre chaque groupe. Nous avons donc 4 sous-groupes correspondant à :

- RGD-lipoCEST dans la tumeur
- RGD-lipoCEST dans la zone controlatérale
- Ctrl-lipoCEST dans la tumeur
- Ctrl-lipoCEST dans la zone controlatérale.

Dans les graphes présentés dans ce chapitre, les barres d'erreur correspondent à la variabilité inter-individuelle. La significativité statistique (p-value) des différences de contraste CEST entre chacun des groupes a été évaluée à l'aide d'un test de Student non-apparié. Le seuil de significativité a été fixé à $p \leq 0{,}01$.

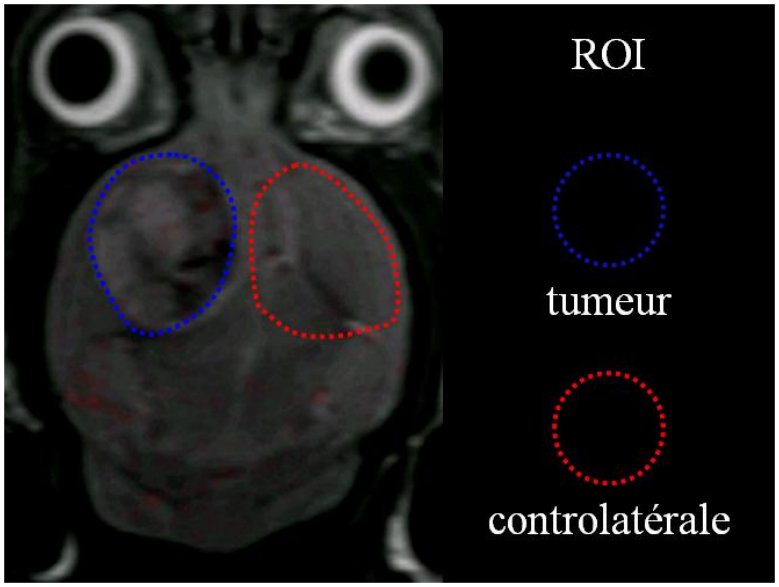


Figure F.VI.6 : Délimitation manuelle des ROI. *La taille typique des ROI était d'environ 500 pixels.*

VI.2.d Histologie et microscopie de fluorescence

Afin de valider les résultats obtenus par IRM-CEST, nous avons prélevé le cerveau de deux souris de chacun des groupes (RGD- et Ctrl-lipoCEST) pour les analyser par histologie. Deux méthodes de sacrifice de l'animal ont été comparées. Dans un cas, les souris ont été sacrifiées par perfusion intracardiaque avec une solution de paraformaldehyde (PFA) à 4% afin de rincer tout le sang présent dans le cerveau (condition « perfusée »). Dans l'autre cas, les animaux ont été sacrifiés par ponction intracardiaque pour enlever une majorité de sang circulant mais sans rincer le sang présent dans les petits capillaires (condition « non-perfusée »). Après des bains successifs dans des solutions de PFA pour fixer les tissus et dans des solutions de sucrose pour cryoprotéger les tissus, les cerveaux ont été coupés avec une épaisseur de coupe de 20 µm à l'aide d'un microtome. Les coupes ont ensuite été marquées avec un anticorps primaire reconnaissant $\alpha_v\beta_3$ et un anticorps secondaire couplé au fluorochrome FITC pour voir l'expression de la cible par microscopie de fluorescence ($\lambda_{excitation}$ = 495 nm et $\lambda_{emission}$ = 517 nm). Les lipoCEST sont visualisés directement par fluorescence grâce à la rhodamine incorporée dans leur membrane ($\lambda_{excitation}$ = 557 nm et $\lambda_{emission}$ = 571 nm). La localisation de la

tumeur sur les coupes histologiques a été réalisée grâce à un marquage hématoxyline et érythrosine qui colore les protéines du cytoplasme et les noyaux cellulaires.

VI.3 Résultats

VI.3.a Caractérisation des lipoCEST et du contraste MT

Les RGD- et Ctrl-lipoCEST ont été caractérisés au chapitre IV et les paramètres de saturation optimaux ont été déterminés à l'aide de leur Z-spectrum 2D ($\delta_{sat.opt}$ = 8 ppm and B_{1opt} = 7 µT, voir figure F.IV.5).

Afin d'estimer le contraste MT endogène, un Z-spectrum a été acquis *in vivo* dans le cerveau de souris (voir figure F.VI.7). Dans des conditions de saturation optimales pour les lipoCEST, l'effet MT est large et symétrique (ON : 71,74 ± 0,25% ; OFF : 71,64 ± 0,31%), ce qui implique un effet MTRasym relativement petit (0,10 ± 0,31%).

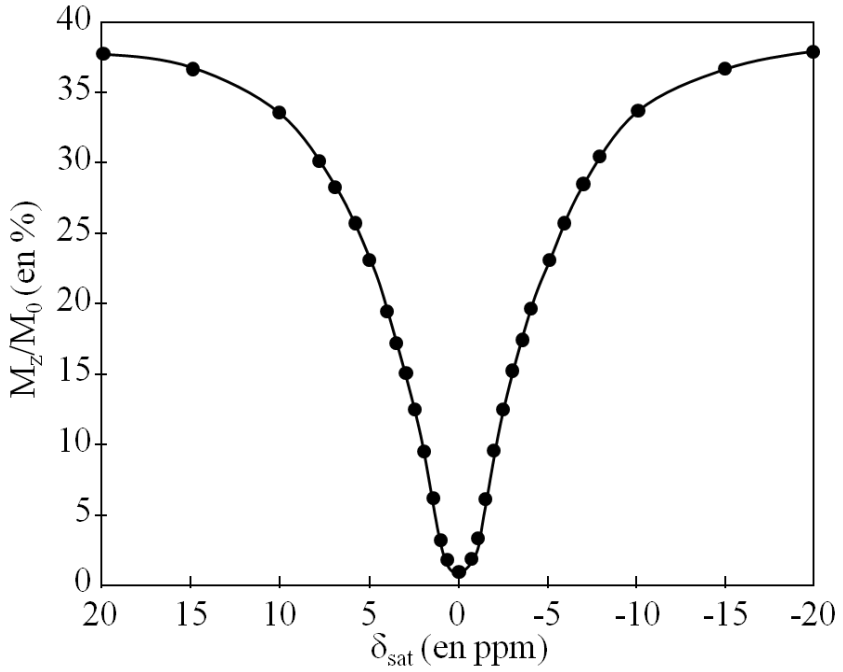


Figure F.VI.7 : Z-spectra in vivo acquis dans un cerveau de souris. *L'effet MTRasym est de 0,10 ± 0,31% avec des conditions de saturation δ_{sat} = 8 ppm et B_1 = 7 µT.*

VI.3.b Détection *in vivo* des lipoCEST

Dans un premier temps, nous avons évalué le contraste endogène dans le cerveau de toutes les souris. Pour cela, nous avons calculé l'effet MTRasym sur tous les pixels présents dans le cerveau de toutes les souris utilisées (correspondant à 1,7 x 10^6 pixels). Le MTRasym moyen était alors de 0,1 ± 0,4%, ce qui est en accord avec l'effet MTRasym déterminé sur le Z-spectrum. Afin de mieux visualiser le contraste CEST provenant des lipoCEST, nous avons déterminé un seuil à partir de la moyenne et de l'écart type de l'effet MT (0,1 + 0,4 = 0,5%). Ce seuil a été appliqué aux images CEST présentées dans ce chapitre. La figure F.VI.8 présente deux séries d'images CEST correspondant à l'injection du RGD- ou Ctrl-lipoCEST. Pour les deux lipoCEST, les images démontrent une prise de contraste dans tout le cerveau. On remarque également que les pixels les plus intenses sont situés à la périphérie de la tumeur. On peut noter que le contraste CEST diminue globalement au cours du temps dans le cas de l'injection du Ctrl-lipoCEST (voir figure F.VI.8.b). En revanche, il semble que le signal persiste dans la tumeur après injection du RGD-lipoCEST (voir figure F.VI.8.a). Bien que des études précédentes aient établi la possibilité de détecter des lipoCEST *in vivo (Terreno et al., 2008),* ce résultat constitue la première visualisation d'un lipoCEST *in vivo* à la suite d'une injection IV *(Flament et al., 2012).*

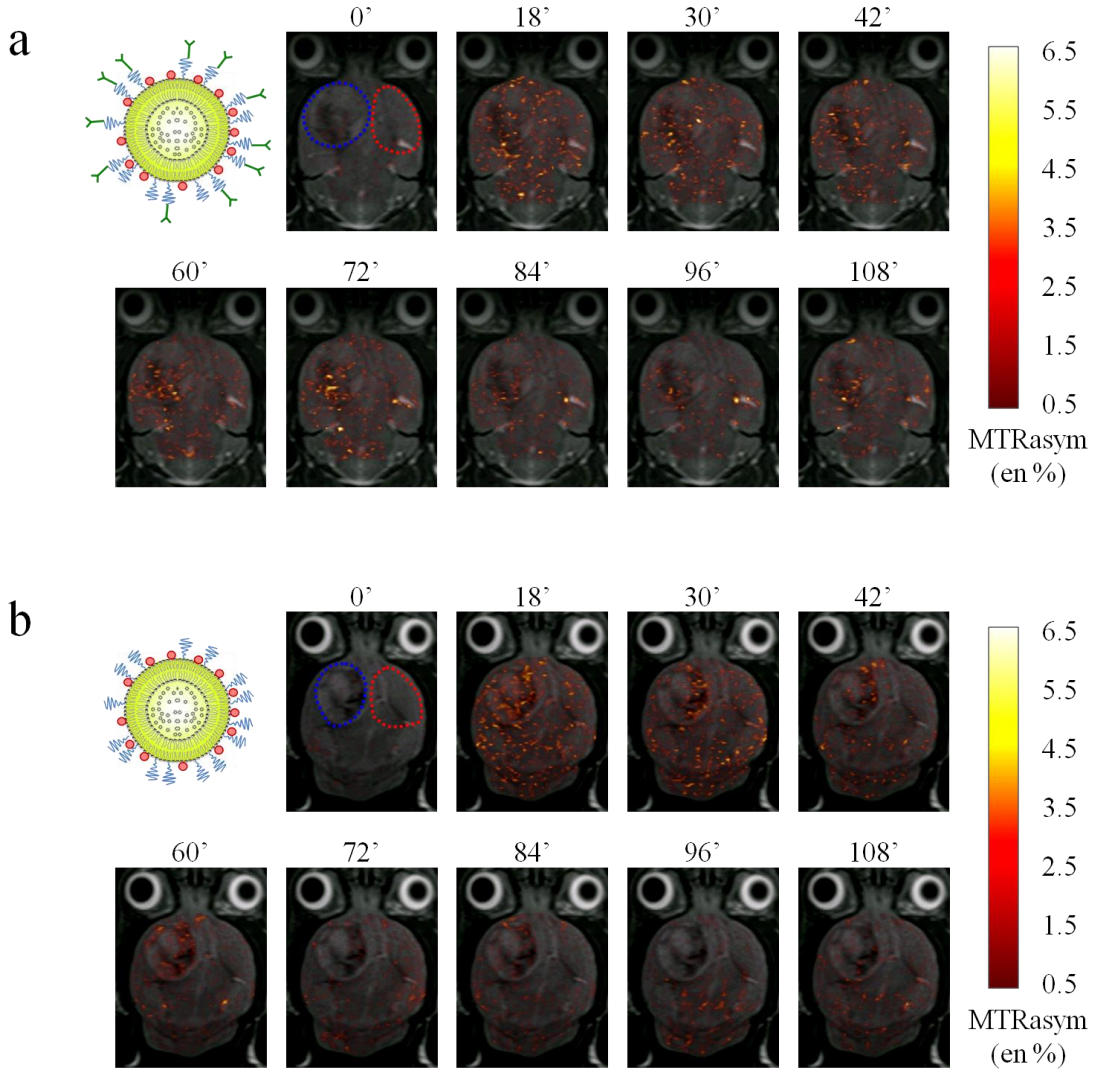


Figure F.VI.8 : Visualisation in vivo des lipoCEST. *Deux souris U87 ont été injectées avec le RGD-lipoCEST* ***(a)*** *ou le Ctrl-lipoCEST* ***(b)****. Les images CEST ont été acquises avant (0') et pendant 2 heures après injection avec un intervalle temporel de 13,5 min. Les zones tumeur et controlatérale sont délimitées par les ROI bleue et rouge respectivement.*

VI.3.c Sensibilité et persistance du contraste CEST

Du fait des inhomogénéités importantes constatées sur les images CEST à travers les deux cohortes, il nous est difficile d'établir ce résultat pour chaque série de données CEST individuelle. Aussi, pour contourner cette limitation de sensibilité, nous avons opté pour une analyse de groupe de nos résultats. Les valeurs de MTRasym moyennes calculées dans chaque

ROI ont donc été moyennées à leur tour pour chaque cohorte (n = 12). La figure F.VI.9 montre les décours temporels du MTRasym moyen pour chacun des sous-groupes.

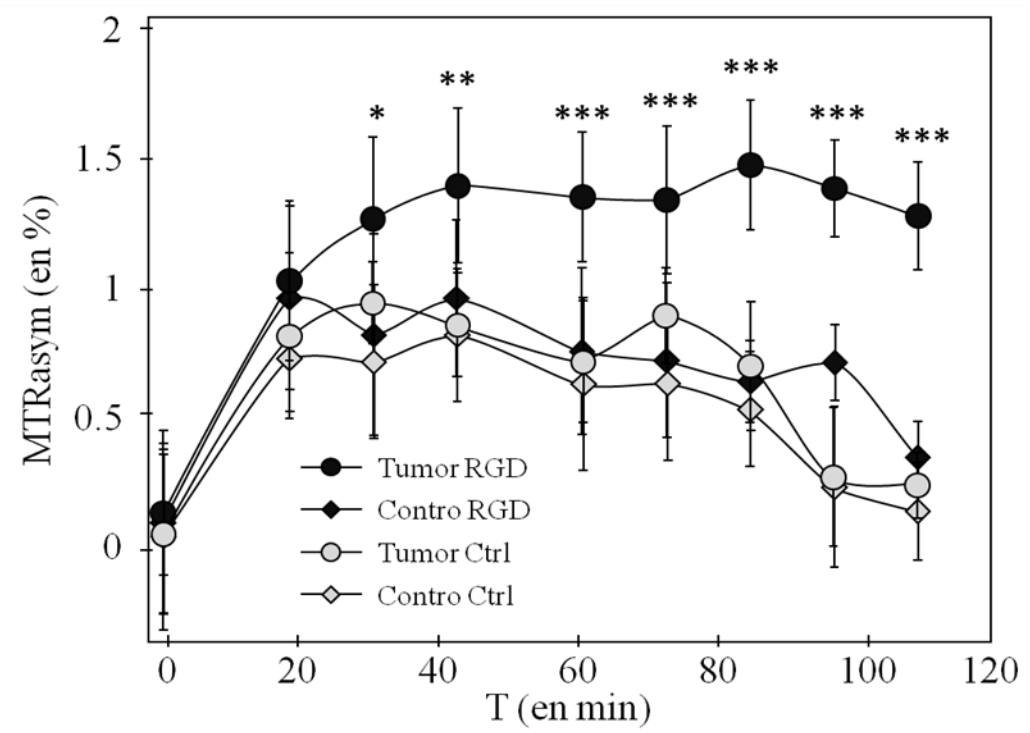


Figure F.VI.9 : Décours temporels du contraste CEST. *La valeur moyenne de l'effet MTRasym a été calculée pour chaque pas temporel et pour chaque sous-groupe (n = 12). Un astérisque indique la significativité statistique (p ≤ 0,01) entre la condition RGD-lipoCEST dans la tumeur et chacune des trois autres conditions.*

De l'observation de ces courbes, on constate que :

- les effets MTRasym moyens calculés dans les ROI « tumeur » (points gris) et « controlatérale » (losanges gris) après injection de Ctrl-lipoCEST et dans la ROI « controlatérale » (losanges noirs) après injection de RGD-lipoCEST sont similaires,
- l'effet MTRasym moyen calculé dans la tumeur après injection de RGD-lipoCEST (points noirs) est supérieur aux autres conditions.

En effet, dans les trois premières conditions, le contraste CEST croît jusqu'à un maximum de 0,95 ± 0,35% pendant la première heure puis décroît pour atteindre une valeur

moyenne de 0,24 ± 0,15% après 108 minutes. A contrario, avec le RGD-lipoCEST, le contraste dans la tumeur se stabilise autour de 1,4% après la première heure. En dépit des variations inter-individuelles (les écarts-types variant de 0,15% à 0,38%), l'application d'un test de Student permet de confirmer que le contraste dans la tumeur après injection de RGD-lipoCEST est statistiquement différent des autres conditions une heure après injection. Le tableau T.VI.1 résume les valeurs de significativité statistique calculées pour chaque pas temporel entre les effets MTRasym dans la tumeur avec le RGD-lipoCEST et les trois autres conditions.

p-value	18'	30'	42'	60'	72'	84'	96'	108'
Contro RGD	0,412	0,060	0,043	0,010	0,010	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$
Tumeur Ctrl	0,221	0,062	0,009	0,002	0,009	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$
Contro Ctrl	0,103	0,010	0,009	0,004	0,004	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$

Tableau T.VI.1 : P-values calculées à l'aide d'un test de Student. *Pour chaque pas temporel, les effets MTRasym calculés dans la tumeur avec le RGD-lipoCEST ont été comparés avec les trois autres conditions.*

Bien que l'examen des décours temporels moyens permette d'établir la prise de contraste particulière du RGD-lipoCEST au niveau de la tumeur, cela ne suffit pas à discriminer les trois autres conditions. C'est pourquoi les effets MTRasym ont été moyennés pour la 1ère et la 2ème heure post-injection. Comme l'indique la figure F.VI.10.a, les tests statistiques entre les trois conditions contrôle ne révèlent aucune différence significative, même après moyenne (p-values au minimum de 0,19). En revanche, cette moyenne temporelle permet notamment de confirmer la significativité de la prise de contraste CEST dans la tumeur avec le RGD-lipoCEST pendant la 1ère heure ($p < 0,05$). Cette moyenne temporelle a également été effectuée sur les images présentées figure F.VI.8. Désormais, la persistance du contraste CEST dans la tumeur avec le RGD-lipoCEST est plus évidente, notamment pour la 2ème heure (voir figure F.VI.10.b).

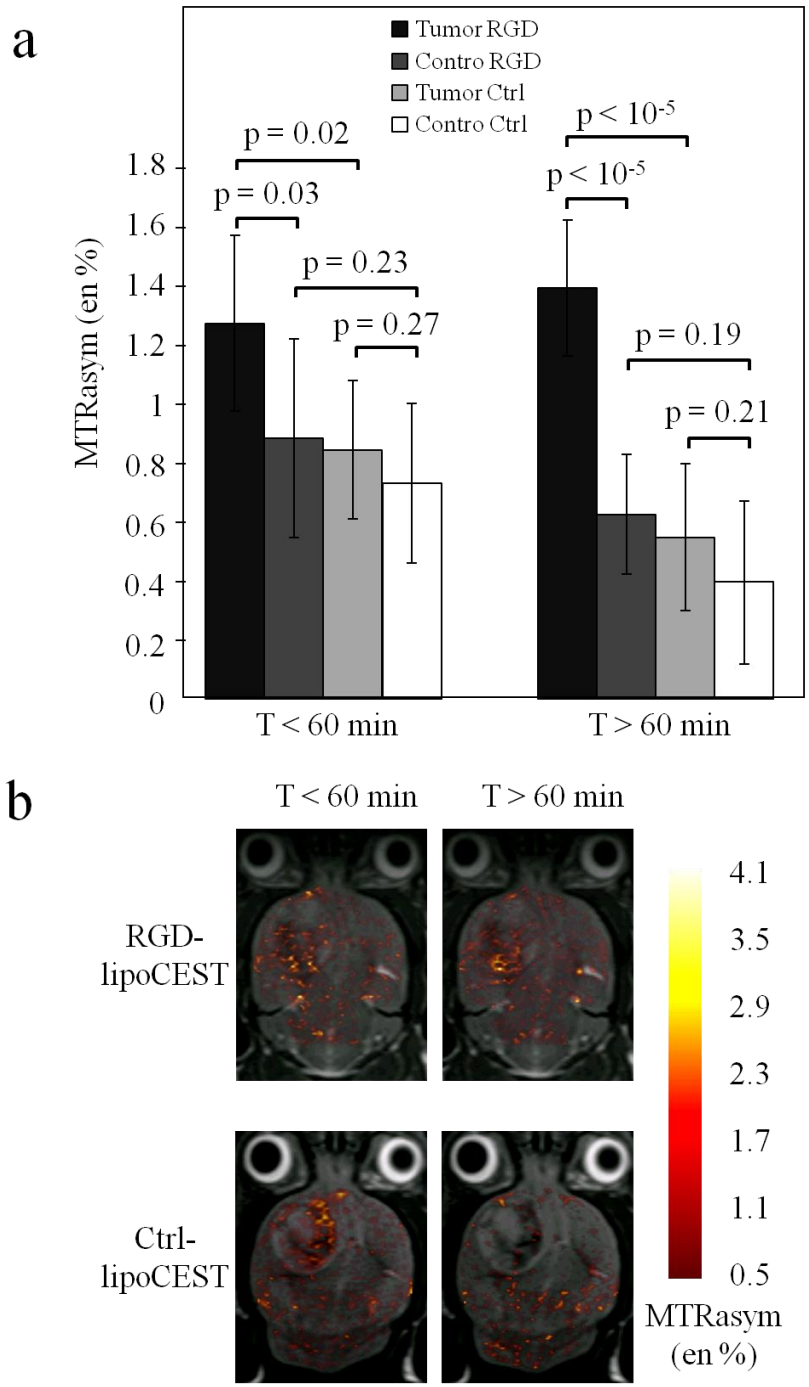


Figure F.VI.10 : Persistance du contraste CEST. *Les effets MTRasym acquis pendant la première (T < 60 min) et la deuxième (T > 60 min) heure ont été moyennés pour chacun des 4 sous-groupes (**a**). La même opération a été appliquée aux images présentées sur la figure F.VI.8 (**b**).*

VI.3.d Validation histologique

Afin de valider les observations faites par IRM-CEST, les images de fluorescence ont été acquises dans une zone à cheval entre la tumeur et les tissus sains, matérialisée par le carré noir (figure F.VI.11, 1ère colonne). Comme l'indiquent les images de marquage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (figure F.VI.11, 2ème colonne), il y a une bonne expression de la cible pour chacune des souris utilisées pour la validation histologique. On remarque que l'expression de $\alpha_v\beta_3$ est plus intense à la périphérie de la tumeur, là où la densité de néovaisseaux est la plus importante. Par ailleurs, on remarque des formes en ellipse correspondant à des sections de vaisseaux sanguins (figure F.VI.11, 2ème colonne, encart blanc). Ceci confirme que l'intégrine endothéliale est surexprimée et qu'elle est accessible pour notre agent lipoCEST.

L'examen des images de rhodamine (figure F.VI.11, 3ème colonne) chez les souris « non-perfusées » révèle la présence des lipoCEST dans le cerveau (figure F.VI.11, 1ère et 3ème lignes). Par ailleurs, la correspondance des images d'immunohistochimie et de rhodamine (figure F.VI.11, 4ème colonne) permet d'apprécier la localisation des lipoCEST majoritairement à l'intérieur des vaisseaux (figure F.VI.11, 4ème colonne, encart blanc). En revanche, il n'y a plus de signal rhodamine visible dans le cerveau perfusé ayant reçu le Ctrl-lipoCEST (figure F.VI.11, 2ème ligne). A contrario, le signal rhodamine persiste, même après perfusion, dans le cas du cerveau ayant reçu le RGD-lipoCEST (figure F.VI.11, 4ème ligne). Enfin, la superposition des deux images de marquage immunohistochimique et de rhodamine permet d'apprécier la colocalisation du RGD-lipoCEST et de sa cible $\alpha_v\beta_3$ (figure F.VI.11, 4ème ligne, 4ème colonne). Cette observation constitue un argument fort en faveur d'une association spécifique du RGD-lipoCEST avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

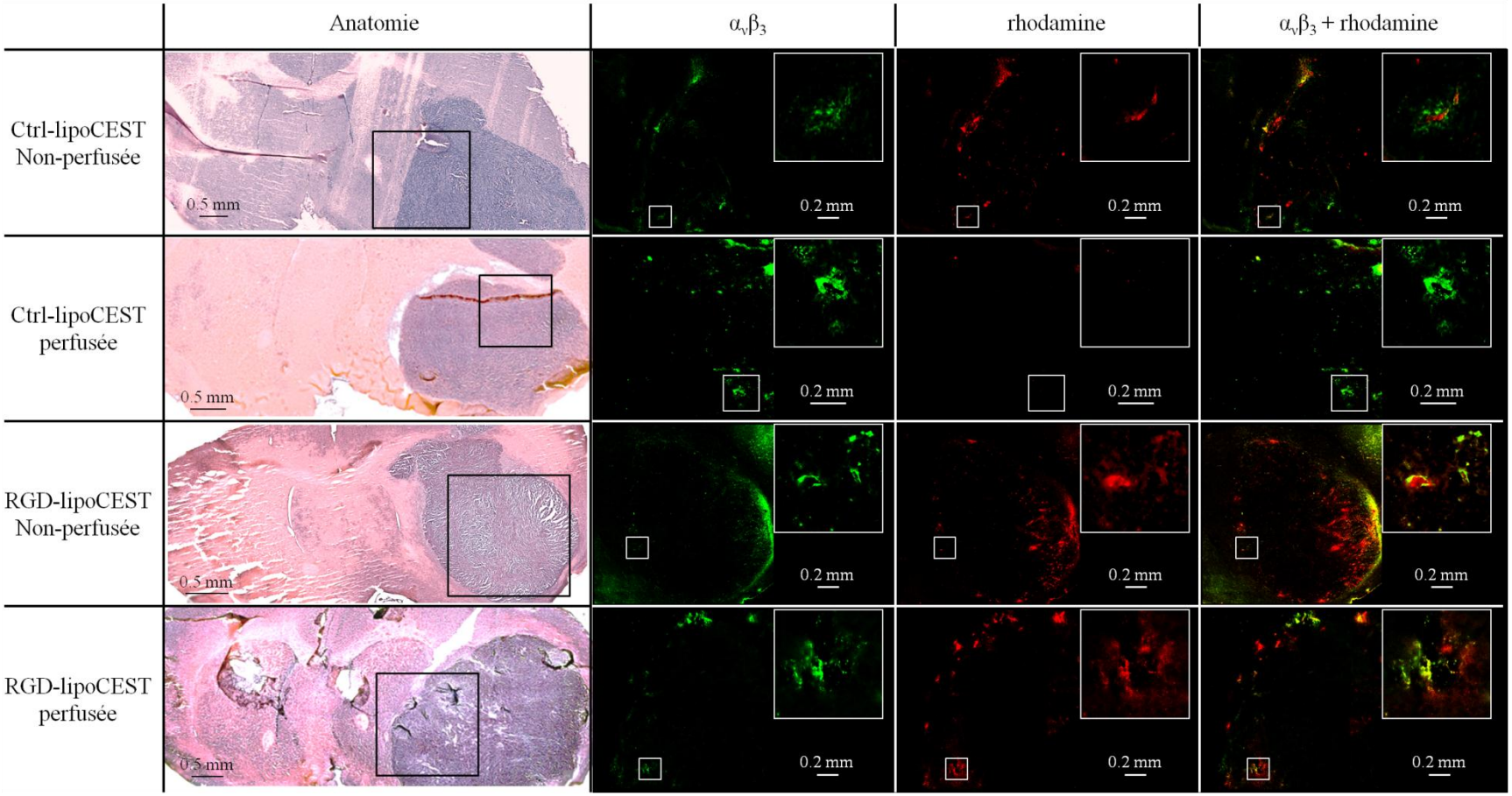


Figure F.VI.11 : Colocalisation du RGD-lipoCEST avec la cible $\alpha_v\beta_3$ dans la tumeur. *Après acquisition des images CEST, quatre souris ont été sacrifiées soit par ponction intracardiaque (« non-perfusée »), soit par perfusion avec du PFA 4% (« perfusée »). Le cerveau a été prélevé et coupé pour visualiser la tumeur (marquage hématoxyline et érythrosine, 1ère colonne). Les récepteurs $\alpha_v\beta_3$ sont visualisés grâce à un marquage immunohistochimique et un anticorps secondaire couplé au FITC (fluorescence verte, 2ème colonne). Les lipoCEST sont directement visualisés grâce à la rhodamine incorporée dans leur membrane (fluorescence rouge, 3ème colonne). La superposition des deux images montre une bonne colocalisation du RGD-lipoCEST avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (4ème colonne). Pour chaque cerveau, un zoom sur un vaisseau est montré dans l'encart blanc.*

VI.4 Discussion

VI.4.a Taille des tumeurs U87

L'examen des MTRasym nous permet d'identifier une relation entre les plus petites valeurs de contraste CEST et les plus petites tumeurs constatées à travers les deux cohortes. En effet, 4 animaux dont les diamètres moyens des tumeurs étaient compris entre 2,0 et 2,2 mm présentaient les effets MTRasym les plus faibles. Ceci n'est pas étonnant car l'angiogenèse est un phénomène qui se manifeste à un stade avancé du développement tumoral *(Schmieder et al., 2008)*. Toutefois, cette variabilité de taille de tumeurs est objectivement la même entre les deux cohortes. En effet, le diamètre moyen des tumeurs à travers chaque cohorte était de 3,7 ± 1,1 mm pour le groupe RGD-lipoCEST et de 4,0 ± 1,0 mm pour le groupe Ctrl-lipoCEST. Il est donc peu probable que les différences de MTRasym constatées entre les 2 groupes soient imputables au modèle en lui-même.

VI.4.b Significativité statistique des contrastes CEST observés

Nous venons de voir que malgré des images CEST relativement bruitées et des effets MTRasym variables au sein des cohortes, une analyse de groupe permet de mettre en évidence des différences statistiques entre les effets CEST provenant des RGD- et Ctrl-lipoCEST dans la tumeur à partir d'une heure post-injection. Cependant, on peut se demander si l'effet MTRasym mesuré à l'intérieur de chaque ROI provient bien d'un « vrai » effet CEST. Dans une publication parue en 2009 *(Liu et al., 2009)*, les auteurs ont défini un seuil au-delà duquel la significativité statistique du contraste CEST mesuré dans une ROI est démontrée. Ce seuil repose sur le calcul du CNR entre les images CEST pré- et post-injection. Ce CNR est défini ainsi :

E40 $$CNR = contraste_{post-pre} / \left(\sqrt{2}.SD\right).$$

Le terme $contraste_{post-pre}$ correspond à la différence de signal entre les images CEST pré- et post-injection dans la ROI. Le bruit est estimé en multipliant l'écart-type (SD) mesuré dans une ROI dans l'air par √2 *(Haacke et al., 1999)*. En considérant une distribution gaussienne du

bruit, Liu et collaborateurs ont démontré que le CNR devait être supérieur à $2\sqrt{2}$ pour avoir une probabilité de 95% d'observer un contraste CEST entre les images pré-injection et post-injection.

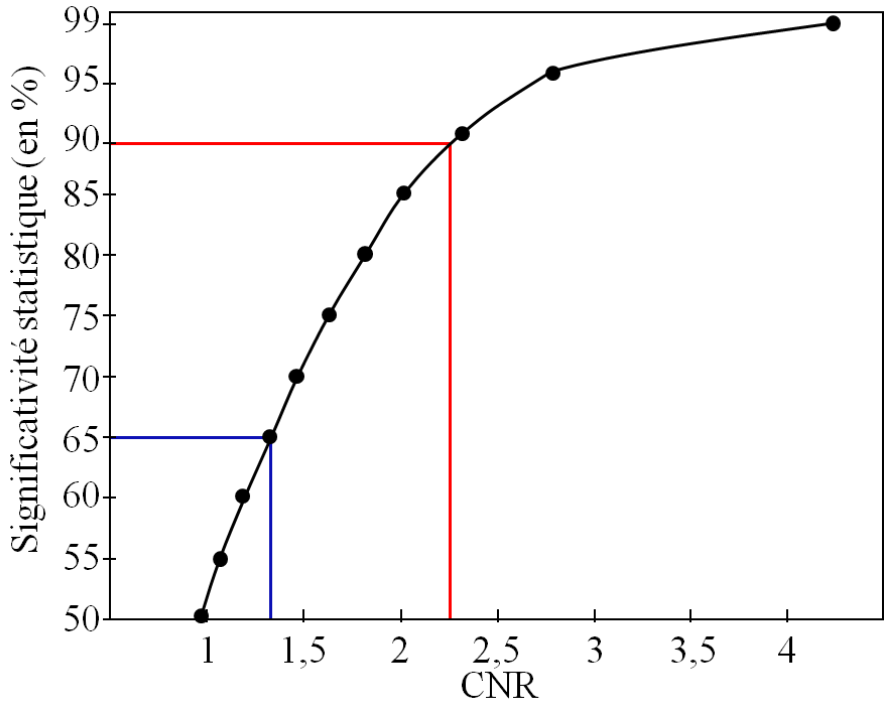


Figure F.VI.12 : Significativité statistique en fonction du CNR. *Les CNR maximums calculés dans la tumeur pour chaque cohorte sont de 2,2 et 1,3 pour le RGD- et Ctrl-lipoCEST respectivement. Cela correspond à des probabilités d'observation d'un effet CEST de 90% et 65% respectivement.*

Dans notre cas, les valeurs maximales de CNR obtenues après moyenne sur l'ensemble de chaque cohorte (n = 12) étaient de 2,2 avec le RGD-lipoCEST (voir figure F.VI.12, ligne rouge) et 1,3 avec le Ctrl-lipoCEST (voir figure F.VI.12, ligne bleue). Ces valeurs de CNR correspondent donc respectivement à des probabilités de 90% et 65% que le contraste soit dû à la présence de lipoCEST. La significativité statistique de visualiser un contraste dû au Ctrl-lipoCEST dans le cerveau est relativement faible. Ceci paraît logique car le Ctrl-lipoCEST injecté par voie IV se distribue dans la circulation sanguine et se retrouve trop dilué pour être visualisé dans le cerveau. A contrario, le RGD-lipoCEST qui a une affinité particulière pour les récepteurs $\alpha_v\beta_3$ surexprimés au niveau de la tumeur, se concentre dans la zone tumorale. Par conséquent, ceci permet de détecter un effet CEST avec une significativité satisfaisante.

VI.4.c Justification du contraste CEST

Les résultats CEST présentés précédemment attestaient d'un contraste CEST dans la tumeur avec le RGD-lipoCEST significativement différent des trois autres conditions. De plus, l'expérience d'immunohistochimie nous a permis de nous assurer de la validité de notre modèle tumoral car les quatre souris testées exprimaient bien l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, notamment à la surface des vaisseaux en périphérie de la tumeur (*Akers et al., 2010; Eliceiri and Cheresh, 2000; Schmieder et al., 2005)*. Cette expérience nous a aussi permis de montrer qu'après perfusion, seul le signal provenant du RGD-lipoCEST persiste et colocalise avec le signal $\alpha_v\beta_3$. Tous ces résultats argumentent donc en faveur d'une association spécifique entre le RGD-lipoCEST et sa cible $\alpha_v\beta_3$. Pour autant, cette association ne justifie pas le contraste CEST observé dans les 3 autres conditions. Ainsi, une partie non négligeable du contraste CEST observé correspond à une accumulation non spécifique des lipoCEST dans les capillaires. En effet, étant donné que l'imagerie CEST est peu sensible aux agents circulant rapidement, les lipoCEST qui sont dans les gros vaisseaux sanguins et les artères contribuent peu au contraste CEST. Comme le montrent les images de microscopie électronique tirées de l'article de McDonald et collaborateurs *(McDonald and Choyke, 2003)*, les tissus tumoraux (voir figure F.VI.13.a) ont une vascularisation beaucoup plus dense et anarchique que celle des tissus sains (voir figure F.VI.13.b).

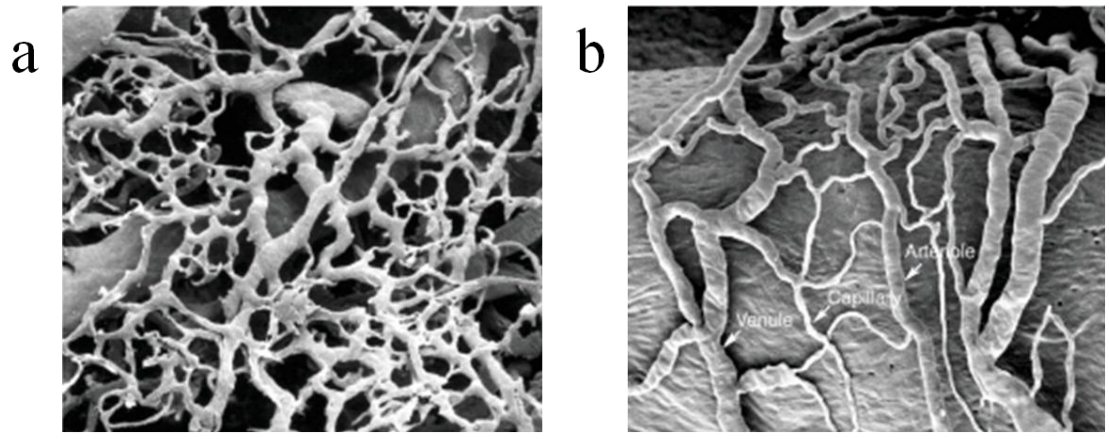


Figure F.VI.13 : Vascularisation des tissus tumoraux et sains. *Les images de microscopie électronique montrent la différence de vascularisation en les tissus tumoraux (**a**) et sains (**b**) dans un modèle souris de tumeur cérébrale. Les images sont tirées de (McDonald and Choyke, 2003).*

Ainsi, la probabilité que les lipoCEST stagnent au niveau de la tumeur est donc plus importante que dans les tissus sains. De plus, les lipoCEST peuvent également s'accumuler de façon non spécifique dans la tumeur à cause de l'effet de rétention et de perméabilité (*Baban and Seymour, 1998; Seymour, 1992*). Ces deux phénomènes permettent alors d'expliquer que l'effet MTRasym soit légèrement supérieur dans la tumeur que dans la zone controlatérale avec le Ctrl-lipoCEST.

VI.4.d Avantages et limitations des lipoCEST

Des études ont déjà montré qu'il était possible de visualiser des paraCEST *in vivo*, même après une injection IV *(Ali et al., 2009; Cai et al., 2011; Jones et al., 2010; Li et al., 2011; Liu et al., 2009)*. Cependant, pour obtenir une sensibilité de détection suffisante, la plupart des études sont menées avec des paramètres de saturation optimaux pour la détection des paraCEST. Etant donné que ces complexes paramagnétiques ont un taux d'échange relativement rapide, ils nécessitent l'utilisation d'impulsions de saturation intenses (jusqu'à 30 μT). Une telle saturation peut engendrer un dépôt d'énergie important et donc un échauffement des tissus. Par conséquent, le recours à de telles impulsions de saturation constitue sans doute une limitation à l'utilisation des paraCEST pour l'IRM-CEST clinique. Un des avantages des lipoCEST réside dans la présence d'une bicouche lipidique qui ralentit les échanges de protons. En conséquence, les lipoCEST nécessitent des conditions de saturations plus modestes (voir l'équation ***E34***).

En termes de sensibilité de détection également, les lipoCEST présentent un net avantage par rapport aux paraCEST. En effet, l'équipe de Silvio Aime a montré qu'il était possible d'atteindre une limite de détection de 90 pM *in vitro* avec des lipoCEST *(Aime et al., 2005)*. *In vivo*, cette limite est plus modeste (nous l'estimons à 1 nM) en raison des effets de transfert d'aimantation endogènes et des inhomogénéités de champs B_0 et B_1. Cependant dans le cas des paraCEST, cette limite de détection est environ 10^5 fois plus basse *(Wu et al., 2008)*. Les lipoCEST sont donc des agents CEST compétitifs par rapport aux paraCEST, et objectivement de meilleurs candidats pour l'imagerie moléculaire par IRM-CEST.

En termes de toxicité, on peut comparer la toxicité des lipoCEST et notamment des complexes encapsulés à celle de complexes paramagnétiques de Gadolinium. Dans la mesure où la stabilité thermodynamique des complexes de Tm(III) est comparable à celle des complexes de Gd(III) et que la toxicité du Tm(III) est similaire aux autres Lanthanides *(Hutcheson et al., 1975)*, on peut espérer une faible toxicité des agents lipoCEST à dose équivalente. C'est le cas

pour notre étude puisque la dose de complexes de Tm(III) injectée était en moyenne de 87 µmol/kg, ce qui est inférieur à la dose maximale de 100 µmol/kg recommandée pour l'injection clinique des agents de contraste à base de Gadolinium.

Comme nous l'avons déjà illustré dans le chapitre IV, bien que les RGD- et Ctrl-lipoCEST soient identiques (au peptide RGD près), leurs Z-spectra sont légèrement différents. Cette différence pourrait être liée à l'incorporation de peptide RGD dans la membrane. Une modification du taux d'échange transmembranaire pourrait alors en découler. Toutefois, à notre connaissance, un tel effet n'a été rapporté par aucune équipe travaillant sur la fonctionnalisation d'agents liposomaux. L'hypothèse que nous retenons pour expliquer cette différence concerne la synthèse relativement complexe des lipoCEST. En effet, des variations subtiles sur la concentration en complexes de Tm(III) internalisés ou sur la distribution en taille des liposomes pourraient se manifester par une modulation du déplacement chimique des molécules d'eau internes au lipoCEST ainsi que de l'effet MTRasym maximal.

VI.5 Conclusion

Grâce à la collaboration avec notre partenaire industriel Guerbet, nous avons pu mettre au point un lipoCEST compatible avec une utilisation *in vivo*. Les résultats présentés dans ce chapitre constituent à notre connaissance, la première visualisation d'un lipoCEST *in vivo* dans un cerveau de souris consécutivement à une injection IV *(Flament et al., 2012)*. De plus, grâce à la fonctionnalisation d'un lipoCEST par greffage d'un peptide RGD à sa surface, nous avons pu apporter une première preuve de concept de la détection par IRM-CEST de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ impliquée dans le processus de l'angiogenèse tumorale. En effet, des différences significatives ont été observées entre la zone tumorale avec le RGD-lipoCEST et la zone controlatérale avec le même lipoCEST ainsi qu'avec le Ctrl-lipoCEST. Ces observations ont été confortées par des résultats d'immunohistochimie et de microcopie de fluorescence. L'ensemble tend à démontrer une association spécifique du RGD-lipoCEST avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Bibliographie du chapitre VI

Aime, S., D. D. Castelli, and E. Terreno, 2005, Highly sensitive MRI chemical exchange saturation transfer agents using liposomes: Angewandte Chemie-International Edition, v. 44, p. 5513-5515.

Akers, W., Z. Zhang, M. Berezin, Y. Ye, A. Agee, K. Guo, R. Fuhrhop, S. Wickline, G. Lanza, and S. Achilefu, 2010, Targeting of alpha(v)beta(3)-integrins expressed on tumor tissue and neovasculature using fluorescent small molecules and nanoparticles: Nanomedicine, v. 5, p. 715-726.

Ali, M. M., G. Liu, T. Shah, C. A. Flask, and M. D. Pagel, 2009, Using two chemical exchange saturation transfer magnetic resonance imaging contrast agents for molecular imaging studies.: Acc Chem Res, v. 42, p. 915-24.

Baban, D. F., and L. W. Seymour, 1998, Control of tumour vascular permeability.: Adv Drug Deliv Rev, v. 34, p. 109-119.

Belot, A., P. Grosclaude, N. Bossard, E. Jougla, E. Benhamou, P. Delafosse, A. V. Guizard, F. Molinié, A. Danzon, S. Bara, A. M. Bouvier, B. Trétarre, F. Binder-Foucard, M. Colonna, L. Daubisse, G. Hédelin, G. Launoy, N. Le Stang, M. Maynadié, A. Monnereau, X. Troussard, J. Faivre, A. Collignon, I. Janoray, P. Arveux, A. Buemi, N. Raverdy, C. Schvartz, M. Bovet, L. Chérié-Challine, J. Estève, L. Remontet, and M. Velten, 2008, Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005.: Rev Epidemiol Sante Publique, v. 56, p. 159-75.

Benedetto, S., R. Pulito, S. G. Crich, G. Tarone, S. Aime, L. Silengo, and J. Hamm, 2006, Quantification of the expression level of integrin receptor alpha(v)beta3 in cell lines and MR imaging with antibody-coated iron oxide particles.: Magn Reson Med, v. 56, p. 711-6.

Brooks, P. C., R. A. Clark, and D. A. Cheresh, 1994, Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis.: Science, v. 264, p. 569-71.

Cai, K., G. E. Kiefer, S. D. Caruthers, S. A. Wickline, G. M. Lanza, and P. M. Winter, 2011, Quantification of water exchange kinetics for targeted PARACEST perfluorocarbon nanoparticles.: NMR Biomed.

Chamberlain, M. C., T. Cloughsey, D. A. Reardon, and P. Y. Wen, 2012, A novel treatment for glioblastoma: integrin inhibition.: Expert Rev Neurother, v. 12, p. 421-35.

Deprez, M., 2010, http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_24723/tumeur-cerebrale-combattre-la-recidive.

Eliceiri, B., and D. Cheresh, 2000, Role of alpha nu integrins during angiogenesis: Cancer Journal, v. 6, p. S245-S249.

Flament, J., F. Geffroy, C. Medina, C. Robic, J. F. Mayer, S. Mériaux, J. Valette, P. Robert, M. Port, D. Le Bihan, F. Lethimonnier, and F. Boumezbeur, 2012, In vivo CEST MR imaging of U87 mice brain tumor angiogenesis using targeted LipoCEST contrast agent at 7 T.: Magn Reson Med.

Folkman, J., 1971, Tumor angiogenesis: therapeutic implications.: N Engl J Med, v. 285, p. 1182-6.

Haacke, E., R. Brown, M. Thompson, and R. Venkateson, 1999, Magnetic resonance imaging: physical principles and sequence design: New York, p 349.

Hutcheson, D. P., D. H. Gray, B. Venugopal, and T. D. Luckey, 1975, Studies of nutritional safety of some heavy metals in mice.: J Nutr, v. 105, p. 670-5.

Jones, C., A. Li, M. Suchy, R. Hudson, R. Menon, and R. Bartha, 2010, In Vivo Detection of PARACEST Agents With Relaxation Correction: Magnetic Resonance in Medicine, v. 63, p. 1184-1192.

Khemtong, C., C. Kessinger, J. Ren, E. Bey, S. Yang, J. Guthi, D. Boothman, A. Sherry, and J. Gao, 2009, In vivo Off-Resonance Saturation Magnetic Resonance Imaging of alpha(v)beta(3)-Targeted Superparamagnetic Nanoparticles: Cancer Research, v. 69, p. 1651-1658.

Kiessling, F., J. Huppert, C. Zhang, J. Jayapaul, S. Zwick, E. Woenne, M. Mueller, H. Zentgraf, M. Eisenhut, Y. Addadi, M. Neeman, and W. Semmler, 2009, RGD-labeled USPIO Inhibits Adhesion and Endocytotic Activity of alpha(v)beta(3)-Integrin-expressing Glioma Cells and Only Accumulates in the Vascular Tumor Compartment: Radiology, v. 253, p. 462-469.

Kobayashi, H., and P. C. Lin, 2006, Nanotechnology for antiangiogenic cancer therapy.: Nanomedicine (Lond), v. 1, p. 17-22.

Lefranc, F., 2011, Traitement des glioblastomes en 2011.

Li, A., M. Suchy, C. Li, J. Gati, S. Meakin, R. Hudson, R. Menon, and R. Bartha, 2011, In Vivo Detection of MRI-PARACEST Agents in Mouse Brain Tumors at 9.4 T: Magnetic Resonance in Medicine, v. 66, p. 67-72.

Liu, G., M. M. Ali, B. Yoo, M. A. Griswold, J. A. Tkach, and M. D. Pagel, 2009, PARACEST MRI with improved temporal resolution.: Magn Reson Med, v. 61, p. 399-408.

McDonald, D. M., and P. L. Choyke, 2003, Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic.: Nat Med, v. 9, p. 713-25.

Meyer, A., J. Auernheimer, A. Modlinger, and H. Kessler, 2006, Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting.: Curr Pharm Des, v. 12, p. 2723-47.

Morawski, A., P. Winter, X. Yu, R. Fuhrhop, M. Scott, F. Hockett, J. Robertson, P. Gaffney, G. Lanza, and S. Wickline, 2004, Quantitative "magnetic resonance immunohistochemistry" with ligand-targeted F-19 nanoparticles: Magnetic Resonance in Medicine, v. 52, p. 1255-1262.

Plate, K. H., G. Breier, H. A. Weich, and W. Risau, 1992, Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo.: Nature, v. 359, p. 845-8.

Schmieder, A., S. Caruthers, H. Zhang, T. Williams, J. Robertson, S. Wickline, and G. Lanza, 2008, Three-dimensional MR mapping of angiogenesis with alpha(5)beta(1)(alpha(v)beta(3))-targeted theranostic nanoparticles in the MDA-MB-435 xenograft mouse model: Faseb Journal, v. 22, p. 4179-4189.

Schmieder, A., P. Winter, S. Caruthers, T. Harris, T. Williams, J. Allen, E. Lacy, H. Zhang, M. Scott, G. Hu, J. Robertson, S. Wickline, and G. Lanza, 2005, Molecular MR imaging of melanoma angiogenesis with alpha(nu)beta(3)-targeted paramagnetic nanoparticles: Magnetic Resonance in Medicine, v. 53, p. 621-627.

Seymour, L. W., 1992, Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates.: Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, v. 9, p. 135-87.

Smith, J. W., and D. A. Cheresh, 1990, Integrin (alpha v beta 3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor.: J Biol Chem, v. 265, p. 2168-72.

Terreno, E., D. D. Castelli, L. Milone, S. Rollet, J. Stancanello, E. Violante, and S. Aime, 2008, First ex-vivo MRI co-localization of two LIPOCEST agents: Contrast Media and amp; Molecular Imaging, v. 3, p. 38-43.

Winter, P., S. Caruthers, J. Allen, K. Cai, T. Williams, G. Lanza, and S. Wickline, 2010, Molecular Imaging of Angiogenic Therapy in Peripheral Vascular Disease With alpha(v)beta(3)-Integrin-Targeted Nanoparticles: Magnetic Resonance in Medicine, v. 64, p. 369-376.

Ye, Y., S. Bloch, B. Xu, and S. Achilefu, 2006, Design, synthesis, and evaluation of near infrared fluorescent multimeric RGD peptides for targeting tumors.: J Med Chem, v. 49, p. 2268-75.

CHAPITRE VII
Semi-quantification des lipoCEST *in vivo*

La finalité de l'imagerie moléculaire est la quantification d'une cible ou d'un processus biologique *in vivo*. Malheureusement, cette information ne peut que rarement être extraite directement des images que ce soit en imagerie optique, en imagerie nucléaire ou en IRM. Il est toutefois possible de remonter à l'information biologique via une chaîne de traitements des données d'imagerie moléculaire qui peut schématiquement se décomposer en deux étapes (voir figure F.II.1). Tout d'abord une modélisation physico-chimique permet de lier une intensité de signal ou de contraste à une quantité d'agent d'imagerie. Ensuite, une modélisation compartimentale permet d'estimer à partir des variations temporelles de concentration en agent d'imagerie la concentration de la cible biologique ou un flux d'intérêt. Comme toute modélisation, chacune de ces étapes ne peut espérer être plus qu'une approximation savante de la réalité. Néanmoins, cette démarche demeure nécessaire à la maturation d'une approche d'imagerie moléculaire.

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré la possibilité de détecter *in vivo* un lipoCEST injecté par voie intraveineuse dans un modèle souris de tumeur cérébrale. Nous avons également montré que le lipoCEST fonctionnalisé s'associait préférentiellement avec sa cible, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, surexprimée lors de l'angiogenèse tumorale. Au cours de ce chapitre, nous nous engageons sur le chemin restant à parcourir pour faire de l'imagerie des agents lipoCEST fonctionnalisés une modalité d'imagerie moléculaire à part entière. Pour cela, nous proposons un outil d'analyse quantitative permettant d'estimer la concentration de nos agents lipoCEST *in vivo*. Cet outil repose sur la modélisation des processus d'échange de protons *in vivo*. Les effets CEST endogènes sont pris en compte afin de déterminer la contribution spécifique des lipoCEST au contraste et ainsi en déduire leur concentration. Dans un premier temps, cet outil a été validé *in vitro*. Puis, nous avons analysé les données CEST présentées dans le chapitre VI afin d'estimer la quantité de lipoCEST spécifiquement liés à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

VII.1 Modélisation des échanges de protons *in vivo* en présence d'agents CEST

VII.1.a Modèle à 4 compartiments

Il a déjà été montré que les échanges entre deux groupes de protons à l'origine du contraste MT endogène, à savoir les protons de l'eau libre (protons A) et les protons liés aux macromolécules (protons B), peuvent être décrits par un modèle à 2 compartiments *(Edzes and Samulski, 1977; Grad et al., 1991; Morrison and Henkelman, 1995)*. Ce modèle est décrit par les équations de Bloch-McConnell présentées dans le chapitre III *(McConnell, 1958; Woessner, 1961; Woessner et al., 2005)*. Cependant, ce modèle ne permet pas de décrire tous les échanges de protons *in vivo*, notamment ceux relatifs aux protons amides à l'origine du contraste APT *(Goffeney et al., 2001)*. Par conséquent, un troisième groupe de protons (protons C) a été ajouté au modèle pour décrire le contraste APT. Bien qu'il existe une grande variété de protons NH *in vivo*, ce groupe peut être modélisé comme un ensemble de protons équivalents de fréquence de précession moyenne à -3,5 ppm de l'eau libre *(Zhou et al., 2004)*. Enfin, l'objectif de notre modélisation étant la quantification des lipoCEST, nous avons ajouté un 4ème groupe de protons, les protons D. Ces protons correspondent aux protons déplacés fréquentiellement par les lipoCEST. Le modèle utilisé dans ce chapitre est donc un modèle à 4 compartiments qui est très similaire à celui développé par l'équipe de Robert Bartha pour modéliser les processus d'échanges de protons dans un milieu biologique avec des agents paraCEST *(Li et al., 2008)*. Etant donné que les groupes B, C et D sont relativement peu concentrés, nous faisons l'hypothèse que les échanges entre ces 3 groupes sont négligeables. La figure F.VII.1 présente une vue schématique de notre modèle d'échange de protons à 4 compartiments.

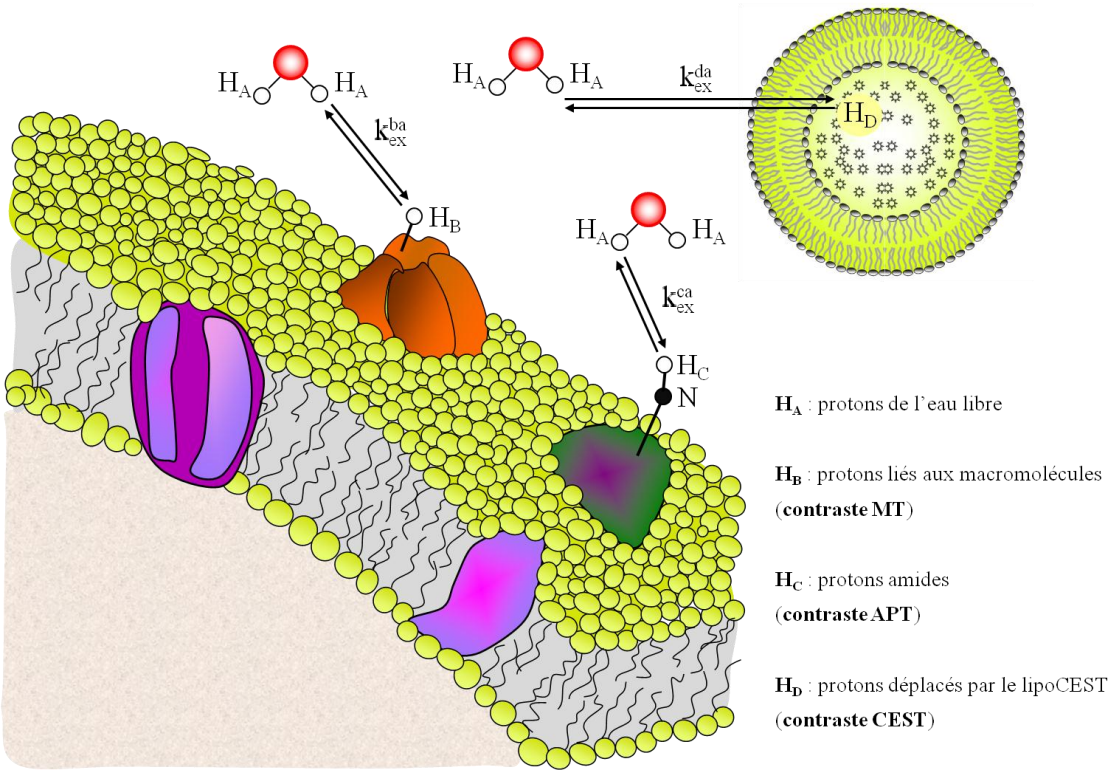


Figure F.VI.1 : Schéma du modèle d'échange de protons à 4 compartiments. *Les protons de l'eau libre (H_A) sont en échange avec les protons liés aux macromolécules (H_B), avec les protons amides (H_C) et avec les protons déplacés par le lipoCEST (H_D). Les taux d'échanges entre les protons H_A et les protons H_B, H_C et H_D sont notés respectivement* k_{ex}^{ba}, k_{ex}^{ca}, k_{ex}^{da}.

Ce modèle à 4 compartiments est décrit par un système de 12 équations différentielles :

E41 $$\frac{dM_x^a}{dt} = -\frac{M_x^a}{T_2^a} - k_{ex}^{ab}M_x^a - k_{ex}^{ac}M_x^a - k_{ex}^{ad}M_x^a + k_{ex}^{ba}M_x^b + k_{ex}^{ca}M_x^c + k_{ex}^{da}M_x^d - 2\pi(\Delta_a - \delta_{sat})M_y^a,$$

E42 $$\frac{dM_x^b}{dt} = -\frac{M_x^b}{T_2^b} - k_{ex}^{ba}M_x^b + k_{ex}^{ab}M_x^a - 2\pi(\Delta_b - \delta_{sat})M_y^b,$$

E43 $$\frac{dM_x^c}{dt} = -\frac{M_x^c}{T_2^c} - k_{ex}^{ca}M_x^c + k_{ex}^{ac}M_x^a - 2\pi(\Delta_c - \delta_{sat})M_y^c,$$

E44 $$\frac{dM_x^d}{dt} = -\frac{M_x^d}{T_2^d} - k_{ex}^{da}M_x^d + k_{ex}^{ad}M_x^a - 2\pi(\Delta_d - \delta_{sat})M_y^d,$$

E45 $$\frac{dM_y^a}{dt} = 2\pi(\Delta_a - \delta_{sat})M_x^a - \frac{M_y^a}{T_2^a} - k_{ex}^{ab}M_y^a - k_{ex}^{ac}M_y^a - k_{ex}^{ad}M_y^a + k_{ex}^{ba}M_y^b + k_{ex}^{ca}M_y^c + k_{ex}^{da}M_y^d - \omega_1 M_z^a,$$

E46 $$\frac{dM_y^b}{dt} = 2\pi(\Delta_b - \delta_{sat})M_x^b + k_{ex}^{ab}M_y^a - \frac{M_y^b}{T_2^b} - k_{ex}^{ba}M_y^b - \omega_1 M_z^b,$$

E47 $$\frac{dM_y^c}{dt} = 2\pi(\Delta_c - \delta_{sat})M_x^c + k_{ex}^{ac}M_y^a - \frac{M_y^c}{T_2^c} - k_{ex}^{ca}M_y^c - \omega_1 M_z^c,$$

E48 $$\frac{dM_y^d}{dt} = 2\pi(\Delta_d - \delta_{sat})M_x^d + k_{ex}^{ad}M_y^a - \frac{M_y^d}{T_2^d} - k_{ex}^{da}M_y^d - \omega_1 M_z^d,$$

E49 $$\frac{dM_z^a}{dt} = \frac{M_0^a}{T_1^a} + \omega_1 M_y^a - \frac{M_z^a}{T_1^a} - k_{ex}^{ab}M_z^a - k_{ex}^{ac}M_z^a - k_{ex}^{ad}M_z^a + k_{ex}^{ba}M_z^b + k_{ex}^{ca}M_z^c + k_{ex}^{da}M_z^d,$$

E50 $$\frac{dM_z^b}{dt} = \frac{M_0^b}{T_1^b} + \omega_1 M_y^b + k_{ex}^{ab}M_z^a - \frac{M_z^b}{T_1^b} - k_{ex}^{ba}M_z^b,$$

E51 $$\frac{dM_z^c}{dt} = \frac{M_0^c}{T_1^c} + \omega_1 M_y^c + k_{ex}^{ac}M_z^a - \frac{M_z^c}{T_1^c} - k_{ex}^{ca}M_z^c,$$

E52 $$\frac{dM_z^d}{dt} = \frac{M_0^d}{T_1^d} + \omega_1 M_y^d + k_{ex}^{ad}M_z^a - \frac{M_z^d}{T_1^d} - k_{ex}^{da}M_z^d,$$

auxquelles s'ajoutent les relations suivantes, correspondantes aux équations de conservation de la masse pour chacun des groupes de protons :

E53 $$\left.\frac{dM_z^b}{dt}\right|_{ss} = 0 = -k_{ex}^{ba}M_0^b + k_{ex}^{ab}M_0^a,$$

E54 $$\left.\frac{dM_z^c}{dt}\right|_{ss} = 0 = -k_{ex}^{ca}M_0^c + k_{ex}^{ac}M_0^a,$$

E55 $$\left.\frac{dM_z^d}{dt}\right|_{ss} = 0 = -k_{ex}^{da}M_0^d + k_{ex}^{ad}M_0^a.$$

Les paramètres utilisés dans ce modèle pour caractériser le processus d'échange de protons relatifs au groupe de protons i sont :

M_0^i : l'aimantation initiale,

$M_{x,y,z}^i$: l'aimantation selon les directions x, y ou z,

T_1^i : le temps de relaxation longitudinal,

T_2^i : le temps de relaxation transversal,

k_{ex}^{ij} : le taux d'échange avec le groupe de protons j,

Δ_i : la fréquence de Larmor,

δ_{sat} : la fréquence de l'impulsion de saturation,

ω_1 : l'intensité de l'impulsion de saturation.

Les fractions de chaque groupe de protons B, C et D par rapport au groupe de proton A correspondent au rapport des aimantations à l'équilibre tel que :

E56 $f_{ia} = \frac{M_0^i}{M_0^a}$, avec i = b, c et d.

On a d'ailleurs, en raison des équations ***E53***, ***E54*** et ***E55***, les relations suivantes :

E57 $k_{ex}^{ab} = k_{ex}^{ba} \frac{M_0^b}{M_0^a} = k_{ex}^{ba} . f_{ba}$,

E58 $k_{ex}^{ac} = k_{ex}^{ca} \frac{M_0^c}{M_0^a} = k_{ex}^{ca} . f_{ca}$,

E59 $k_{ex}^{ad} = k_{ex}^{da} \frac{M_0^d}{M_0^a} = k_{ex}^{da} . f_{da}$.

Dans le cas des lipoCEST, la grandeur d'intérêt est la concentration en lipoCEST et non la concentration en protons déplacés par le lipoCEST. De ce fait, le rapport f_{da} correspond à :

E60 $f_{da} = \frac{M_0^d}{M_0^a} = \frac{C_{lipoCEST} . n_{lipoCEST}}{C_{H_2O}}$.

avec $C_{lipoCEST}$ la concentration en nanoparticules, $n_{lipoCEST}$ le nombre de molécules d'eau déplacées par lipoCEST et C_{H_2O} la concentration en molécules d'eau libres du milieu.

Dans une expérience CEST, l'impulsion de saturation est appliquée relativement longtemps. L'aimantation peut alors être décrite par les solutions à l'état d'équilibre ce qui permet de simplifier le système d'équations. Une autre simplification consiste à éliminer les termes d'échange pour les composantes transverses du groupe B *(Ceckler et al., 2001; Henkelman et al., 1993)*. Sous ces conditions, la combinaison des équations ***E42*** et ***E46*** donne :

E61 $$M_y^b = -\frac{\omega_1 T_2^b}{1+(2\pi(\Delta_b - \delta_{sat}))^2 (T_2^b)^2} M_z^b .$$

En remplaçant cette expression dans l'équation ***E50***, on obtient :

E62 $$\frac{dM_z^b}{dt} = \frac{M_0^b}{T_1^b} + k_{ex}^{ab} M_z^a - \frac{M_z^b}{T_1^b} - k_{ex}^{ba} M_z^b - \pi\omega_1^2 g\left((\Delta_b - \delta_{sat}), T_2^b\right) M_z^b$$, avec

E63 $$g\left((\Delta_b - \delta_{sat}), T_2^b\right) = \frac{T_2^b}{\pi} \frac{1}{1+(2\pi(\Delta_b - \delta_{sat}))^2 (T_2^b)^2} .$$

$g\left((\Delta_b - \delta_{sat}), T_2^b\right)$ représente la distribution du groupe de protons B. Elle est en théorie décrite par une fonction lorentzienne mais des études précédentes ont montré que la distribution des protons liés aux macromolécules était mieux modélisée par une fonction super-lorentzienne *(Ceckler et al., 2001; Li et al., 2008; Morrison and Henkelman, 1995)* dont l'équation est :

E64 $$g\left((\Delta_b - \delta_{sat}), T_2^b\right) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^{\pi/2} \frac{T_2^b}{\left|3\cos^2\theta - 1\right|} exp\left[-2\left(\frac{2\pi(\Delta_b - \delta_{sat}) T_2^b}{3\cos^2\theta - 1}\right)^2\right] \sin\theta d\theta .$$

Il est en théorie possible de résoudre numériquement ce système de 12 équations différentielles à l'aide de Matlab. Cependant, cette résolution serait coûteuse en temps et peu pratique pour ajuster nos données expérimentales. La stratégie adoptée par Li et collaborateurs est de réécrire ce système sous forme matricielle *(Li et al., 2008)* :

E65 $$\frac{dM}{dt} = AM + B .$$

La solution à l'équation ***E65*** peut être estimée à l'aide de Matlab et correspond au calcul numérique de l'expression ***E66*** :

E66 $$M = \left(M_0 + \frac{B}{A} \right) exp(At) - \frac{B}{A}.$$

VII.1.b Détermination des paramètres du modèle pour les contrastes APT et MT

Afin de déterminer les paramètres d'échange de protons pour les contrastes endogènes MT et APT, nous avons considéré un modèle à 3 compartiments comportant les protons A (eau libre), B (protons liés aux macromolécules) et C (protons NH). Les protons D relatifs aux lipoCEST ont donc été exclus pour ce modèle. Ce modèle à 3 compartiments a déjà été décrit dans la littérature pour déterminer de façon quantitative les échanges de protons endogènes à l'origine des contrastes MT et APT *(Li et al., 2008; Woessner et al., 2005)*.

Afin de déterminer ces paramètres d'échange, nous avons acquis des Z-spectra *in vivo* sur des cerveaux de trois souris saines. L'impulsion de saturation a été appliquée à une fréquence allant de -20 ppm à +20 ppm avec un pas de 1 ppm et 5 intensités de B_1 ont été utilisées (B_1 = 0,5 / 1 / 2 / 5 / 7 µT). Par ailleurs, deux Z-spectra ont été acquis *in vivo* dans une tumeur cérébrale de souris U87 avec 2 intensités de saturation (B_1 = 0,5 et 1 µT). Nous avons choisi de distinguer 3 types tissulaires différents, à savoir la matière grise (MG), la matière blanche (MB) et la tumeur (Tu). Les ROI ont été segmentées manuellement sur une image anatomique de référence. Les ROI utilisées sont présentées sur la figure F.VII.2.

Les Z-spectra moyens de chaque ROI ont ensuite été ajusté à l'aide de notre modèle à 3 compartiments (protons A, B et C). Afin de réduire le nombre de variables et pour faciliter l'ajustement des données par le modèle, nous avons fait les hypothèses suivantes :

- Les temps de relaxation T_1^a et T_2^a de chaque ROI sont égaux aux temps de relaxation apparents T_1 et T_2 moyens (moyenne ± écart-type) estimés à 7T à l'aide respectivement d'une séquence d'écho de gradient précédée d'un module d'inversion-récupération *(Deichmann and Haase, 1992)* et de la séquence MSME. Les valeurs moyennes de T_1 / T_2 ont été estimées égales à 1890 / 53 ms, 1673 / 41 ms et 2318 / 62 ms pour les types tissulaires MG, MB et Tu respectivement.

- Bien que segmentés, les Z-spectra acquis dans le liquide céphalorachidien (LCR) n'ont pas été exploités. En effet, le LCR est un compartiment ne comportant pas ou peu de macromolécules *(Felgenhauer, 1974)*. Par conséquent, nous avons assimilé le LCR à de l'eau.
- Les valeurs initiales des paramètres pour l'ajustement ont été considérées égales à la moyenne des valeurs trouvées dans la littérature lorsque celles-ci étaient disponibles. Toutes ces valeurs sont reportées dans la colonne « Valeurs de la littérature » du tableau T.VII.1.

Bien que la tumeur ne soit pas un tissu homogène, nous avons considéré des paramètres moyens pour décrire les échanges de protons dans la tumeur.

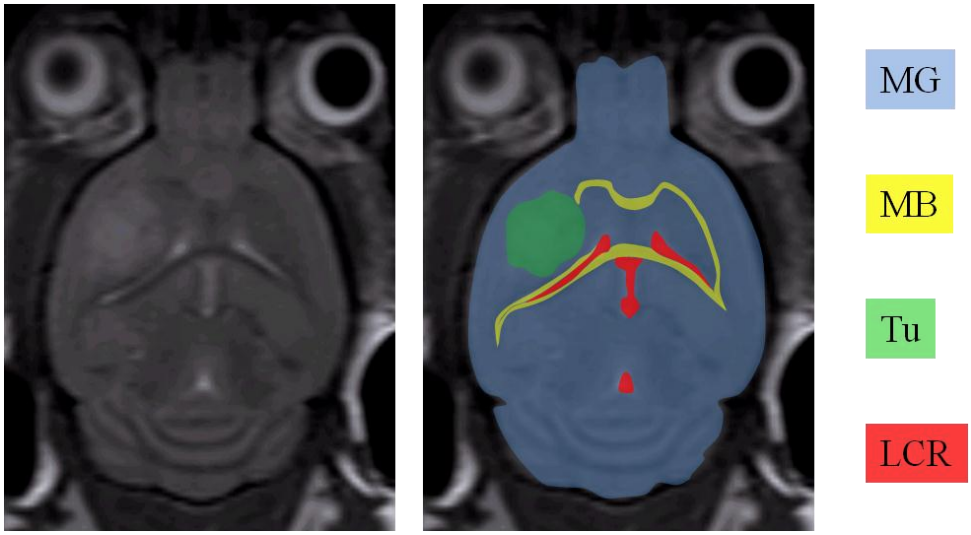
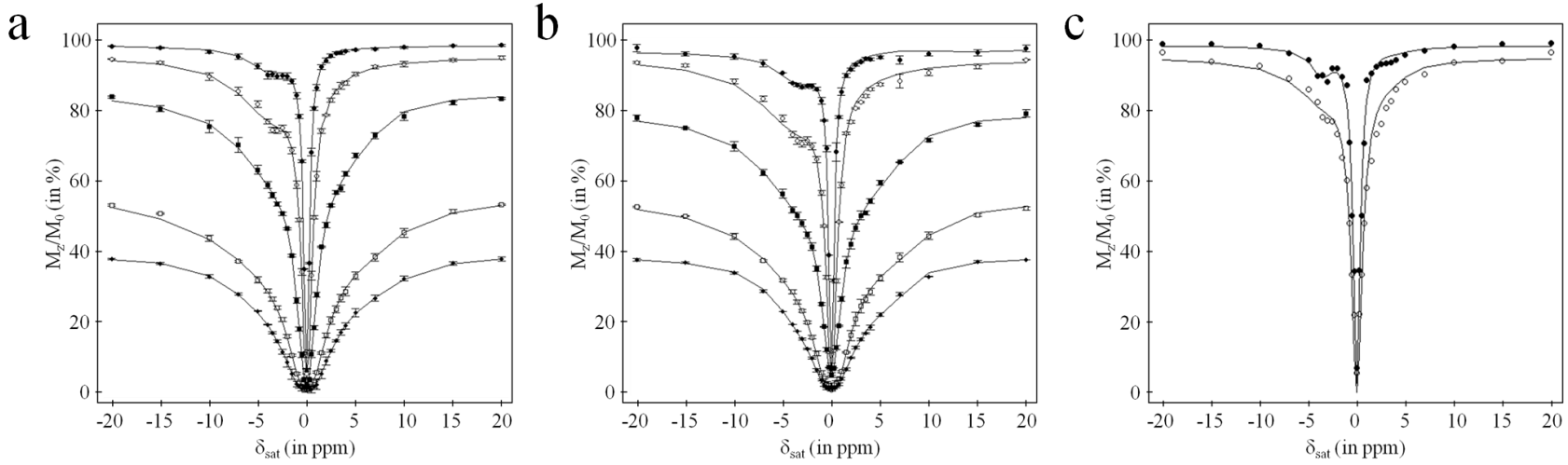


Figure F.VII.2 : Régions d'intérêt des Z-spectra. *Les ROI utilisées pour l'ajustement des Z-spectra sont la matière grise (MG, ROI bleue), la matière blanche (MB, ROI jaune) et la tumeur (Tu, ROI verte). Le liquide céphalo-rachidien (LCR, ROI rouge) a été segmenté mais les Z-spectra n'ont pas été analysés.*

Les Z-spectra moyens de chaque ROI acquis avec les différentes intensités de saturation sont présentés sur la figure F.VII.3. L'ajustement de chaque Z-spectrum par le modèle à 3 compartiments est représenté par une ligne continue et les paramètres déterminés sont reportés dans le tableau T.VII.1.



B_1 = 0,5 µT (●) / 1 µT (○) / 2 µT (■) / 5 µT (□) / 7 µT (◆)

Figure F.VII.3 : Ajustement des Z-spectra in vivo. *Les Z-spectra in vivo acquis dans chacune des 3 ROI étudiées sont présentés ; MG* ***(a)****, MB* ***(b)****, Tu* ***(c)****. Les ajustements réalisés grâce au modèle sont représentés par une ligne continue.*

	Valeurs ajustées			Valeurs de la littérature		
Paramètres	MG	MB	Tu	MG	MB	Tu
k_{ex}^{ba} (Hz)	43 ± 7	36 ± 2	44 ± 6	34[1]; 50[2]; 53[3]; 44[4]	25[1]; 61[3]; 26[4]	48[4]
k_{ex}^{ca} (Hz)	29 ± 4	32 ± 3	29 ± 3	30[2]; 28[5,6]		30[6]
Δ_b (Hz)	109 ± 68	118 ± 61	-11 ± 86	0[2]		
Δ_c (Hz)	-1033 ± 29	-1036 ± 26	-1031 ± 31	-1050[2,6]		-1050[6]
T_1^b (ms)	941 ± 86	866 ± 69	976 ± 173	1200[3]		
T_2^b (µs)	14 ± 4	14 ± 3	15 ± 3	11[1,3]; 10[2,4]	12[1];11[4]	10,3[4]
T_1^c (ms)	840 ± 90	803 ± 108	835 ± 35	769[5]		
T_2^c (ms)	10 ± 4	9 ± 5	10 ± 3			
f_{ba} (%)	7,9 ± 0,9	14,2 ± 1,1	4,4 ± 0,6	7[1]; 9[2]; 7,5[3]; 6,6[4]	16[1]; 13[3,4]	3,9[4]
f_{ca} (%)	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,1[5]; 0,09[6]		0,17[6]

Tableau T.VII.1 : Paramètres d'échange endogènes. *Les paramètres correspondant aux types tissulaires MG, MB et Tu sont présentés ainsi que les valeurs de références trouvées dans la littérature.* [1]*(Sled and Pike, 2001) ;* [2]*(Mougin et al., 2010) ;* [3]*(Smith and Cheresh, 1990) ;* [4]*(Underhill et al., 2011) ;* [5]*(Zhou et al., 2004);* [6]*(Zhou et al., 2003a).*

Ainsi que l'illustre la figure F.VII.3, notre modèle permet d'ajuster correctement nos données expérimentales. Par ailleurs, les paramètres d'échanges de protons estimés et résumés dans le tableau T.VII.1 sont globalement en accord avec ceux rapportés dans la littérature. On peut donc raisonnablement considérer que notre modèle décrit correctement les processus d'échanges endogènes. Néanmoins, nous pouvons faire quelques commentaires sur la pertinence de ces paramètres :

- Les taux d'échange k_{ex}^{ba} et k_{ex}^{ca} sont comparables entre les différents types tissulaires y compris pour la tumeur. Ce résultat paraît cohérent car la mobilité des protons dans la couche d'hydratation des macromolécules dans les différents tissus est relativement stable.
- Δ_b et Δ_c sont comparables dans les 3 types tissulaires à l'exception de Δ_b dans la tumeur. Ceci semble pointer une distribution des macromolécules plus symétrique dans la tumeur que dans les tissus sains. Toutefois, nous n'avons pas trouvé de données dans la littérature étayant cette observation.
- Les écart-types constatés pour certains paramètres d'échange sont importants. C'est notamment le cas des T_1 des protons H_B et H_C. Cette grande variabilité est liée au peu d'influence que ces paramètres ont sur le taux de saturation des molécules d'eau libres *(Tyler and Gowland, 2005)*. Par exemple, une variation de T_1^b de 500 à 1000 ms n'entraine une augmentation du PTR que de 0,01%.
- La fraction f_{ba} est le paramètre qui varie le plus entre les différentes ROI (~4%, ~8% et ~14% pour les types tissulaires Tu, MG et MB). Ceci est logique puisque f_{ba} a un impact presque proportionnel sur le PTR telle que l'illustre l'équation ***E32*** présentée au chapitre III. Les valeurs déterminées par ailleurs sont en accord avec la littérature.
- De façon similaire, la fraction de protons f_{ca} est assez bien estimée. Ce paramètre varie peu dans les tissus sains (0,10% dans MG et 0,13% dans MB) mais est plus important dans la tumeur (0,19%). En considérant une concentration en eau respective de 43,3 M, 35,8 M et 45,0 M pour les types tissulaires MG, MB et Tu *(Kiricuta and Simplaceanu, 1975; Lentner, 1981)*, ces valeurs de f_{ca} correspondent à des concentrations en protons amides de 86,6 mM, 93,1 mM et 171 mM respectivement. Ces valeurs sont en accord avec les valeurs reportées pour le cerveau de rat *(Zhou et al., 2003a)*.
- Globalement, on remarque un impact plus important des paramètres d'échange des protons B, relativement aux protons C. Cette différence de sensibilité est liée non seulement à la plus grande concentration de macromolécules, mais aussi aux intensités

de saturation (> 1 µT), pour lesquelles le taux de saturation des protons A liés à l'échange chimique avec les protons C est déjà maximum.

- Il a été démontré que des paramètres physiologiques comme le pH *(Gregory et al., 1983; McMahon et al., 2006; Zhou et al., 2003b)* ou la température *(Ceckler et al., 2001; Gregory et al., 1983)* pouvaient influencer de façon significative la mobilité de ces protons. Or notre modèle ne considère pas ces variables. On ne peut donc exclure des erreurs d'estimation du MT et APT pour nos données *in vivo* en cas de variations significatives de pH ou de température.

VII.1.c Détermination des paramètres du modèle pour les lipoCEST

Afin de déterminer les paramètres d'échange de protons relatifs au lipoCEST, nous avons considéré un modèle à 2 compartiments comportant les protons A (eau libre) et les protons D (protons déplacés par le lipoCEST). Des Z-spectra ont été acquis sur un fantôme de lipoCEST avec 10 intensités de B_1 différentes (1 / 2 / 3 / 4 / 5 / 6 / 7 / 8 / 9 / 10 µT) et une fréquence de saturation δ_{sat} variant de -25 à 25 ppm avec un pas de 1 ppm. La concentration en nanoparticules dans le fantôme utilisé était $C_{lipoCEST}$ = 14 nM. Ces Z-spectra ont ensuite été ajustés et les paramètres d'échange estimés (moyenne ± écart-type, n=10). La figure F.VII.4.a présente les Z-spectra expérimentaux (points) ainsi que l'ajustement grâce au modèle à 2 compartiments (ligne continue). Seuls les Z-spectra acquis avec une intensité de saturation impaire sont présentés pour alléger la figure. Comme défini précédemment (voir chapitre V), ces Z-spectra sont représentés en tant que Z-spectrum 2D en figure F.VII.4.b.

Les paramètres déterminés grâce à ces ajustements sont : k_{ex}^{da} = 327 ± 13 Hz, T_1^d = 45 ± 9 ms, T_2^d = 2,0 ± 0,7 ms et f_{da} = 1,49 ± 0,03 %. Bien que la réalité des échanges de protons dans les lipoCEST soit plus complexe, la qualité des ajustements confirme la validité phénoménologique de notre modèle. La fraction de protons H_D correspond bien à la concentration connue en $C_{lipoCEST}$ = 14,0 ± 0,3 nM. Cette concentration en lipoCEST a été dérivée de l'équation ***E60*** avec C_{H_2O} = 55 M et $n_{lipoCEST}$ = 5,8 x 10^7 molécules d'eau par lipoCEST en considérant un diamètre hydrodynamique du lipoCEST d_H = 170 nm et une épaisseur de la bicouche lipidique e = 10 nm, soit un rayon interne r_i = 75 nm (voir figure F.VII.5). Il est important de noter que cette estimation de f_{da} implique l'interaction de chaque molécule d'eau intra-liposomale avec au moins un complexe paramagnétique.

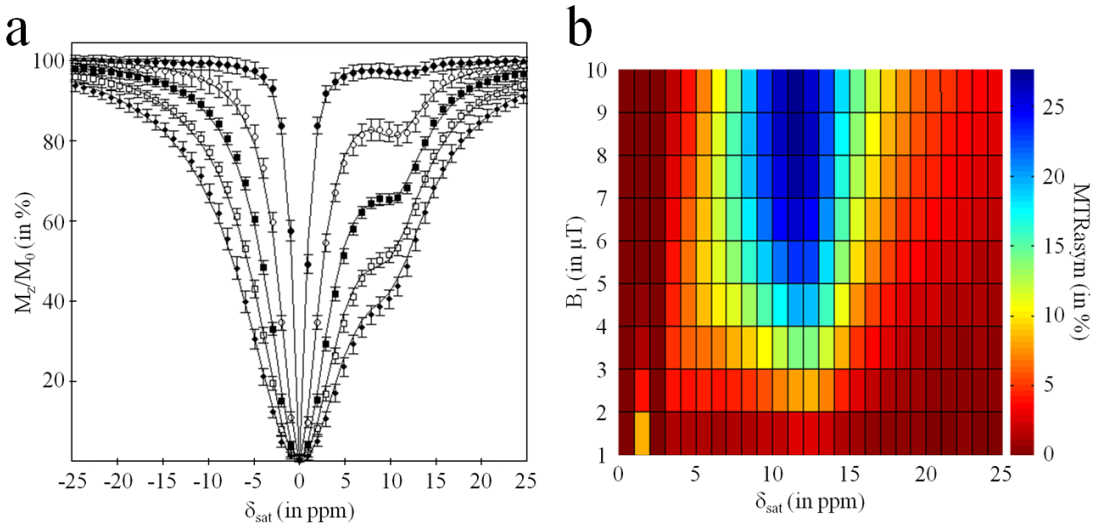


Figure F.VII.4 : Détermination des paramètres d'échange exogènes. *(**a**) : Z-spectra acquis sur un tube de lipoCEST à une concentration $C_{lipoCEST}$ = 14 nM avec cinq valeurs de B_1 (1 µT (points noirs) / 3 µT (points blancs) / 5 µT (carrés noirs) / 7 µT (carrés blancs) / 9 µT (losanges noirs)) et leurs ajustements réalisés grâce au modèle à 2 compartiments (ligne continue) ; (**b**) : Z-spectrum 2D correspondant.*

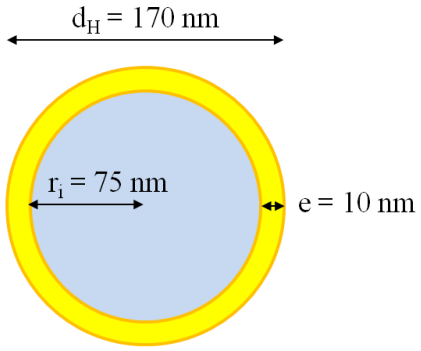


Figure F.VII.5 : Schéma d'un lipoCEST avec les dimensions utilisées pour le calcul du nombre de molécules d'eau internes $n_{lipoCEST}$.

Les paramètres de saturation optimaux pour ce lipoCEST sont $\delta_{sat.opt}$ = 11 ppm, B_{1opt} = 7 µT et l'effet MTRasym correspondant est de 27%. D'après la relation ***E34***, le B_1 optimum permet de renseigner sur la valeur du taux d'échange. Par conséquent, nous pouvons vérifier que le taux d'échange estimé par ajustement des Z-spectra (k_{ex}^{da} = 327 ± 13 Hz,) correspond

approximativement à $2\pi.\gamma.B_{1opt}$ (= 298 Hz). Ceci permet de confirmer la validité de la relation ***E34*** pour nos lipoCEST.

VII.2 Outil d'Analyse Quantitative (OAQ)

VII.2.a Architecture de l'Outil d'Analyse Quantitative

Comme nous l'avons présenté dans le chapitre II, la chaîne de traitements pour la quantification en imagerie moléculaire se décompose en 3 étapes, à savoir l'acquisition des données, la quantification de l'agent de contraste puis la quantification de la cible biologique (voir figure F.II.1). Ici, nous détaillons l'Outil d'Analyse Quantitative (noté OAQ) que nous avons développé durant cette thèse afin de satisfaire la deuxième étape et de quantifier les agents lipoCEST *in vivo* dans des tissus biologiques. L'architecture de l'OAQ est représentée de façon schématique sur la figure F.VII.6.

La première étape de l'OAQ consiste à définir les masques correspondant aux trois types tissulaires considérés par segmentation manuelle sur le jeu de données à analyser. Cette étape est réalisée sur une image anatomique de référence. Pour chaque pixel $\boldsymbol{r}$ de l'image, on affecte un indice $\boldsymbol{s}$ (avec $\boldsymbol{s}$ = MG, MB ou Tu) permettant de classifier la nature du pixel. Le jeu de paramètre d'échange pour chaque classe est noté $\boldsymbol{\{P\}_s}$.

La deuxième étape consiste à simuler à l'aide de notre modèle à 4 compartiments le transfert de saturation dans le pixel $\boldsymbol{r}$: $\boldsymbol{MTRasym_{sim}(C_{lipoCEST}, \{P\}_s, B_0(r), B_1(r))}$ en fonction des paramètres d'échange $\boldsymbol{\{P\}_s}$ et des valeurs expérimentales des champs $\boldsymbol{B_0(r)}$ et $\boldsymbol{B_1(r)}$ en ce pixel. Ce calcul est réalisé pour une gamme de concentrations en lipoCEST comprise entre 0 et 50 nM avec un pas de 0,01 nM. On établit ainsi pour chaque pixel un abaque liant le contraste MTRasym à la concentration en lipoCEST. La comparaison de la valeur expérimentale de l'effet CEST $\boldsymbol{MTRasym_{exp}(r)}$ avec l'abaque permet d'estimer la concentration en lipoCEST en ce pixel. Ce processus est répété en chaque pixel afin d'établir la carte de concentration en lipoCEST $\boldsymbol{C_{lipoCEST}(r)}$.

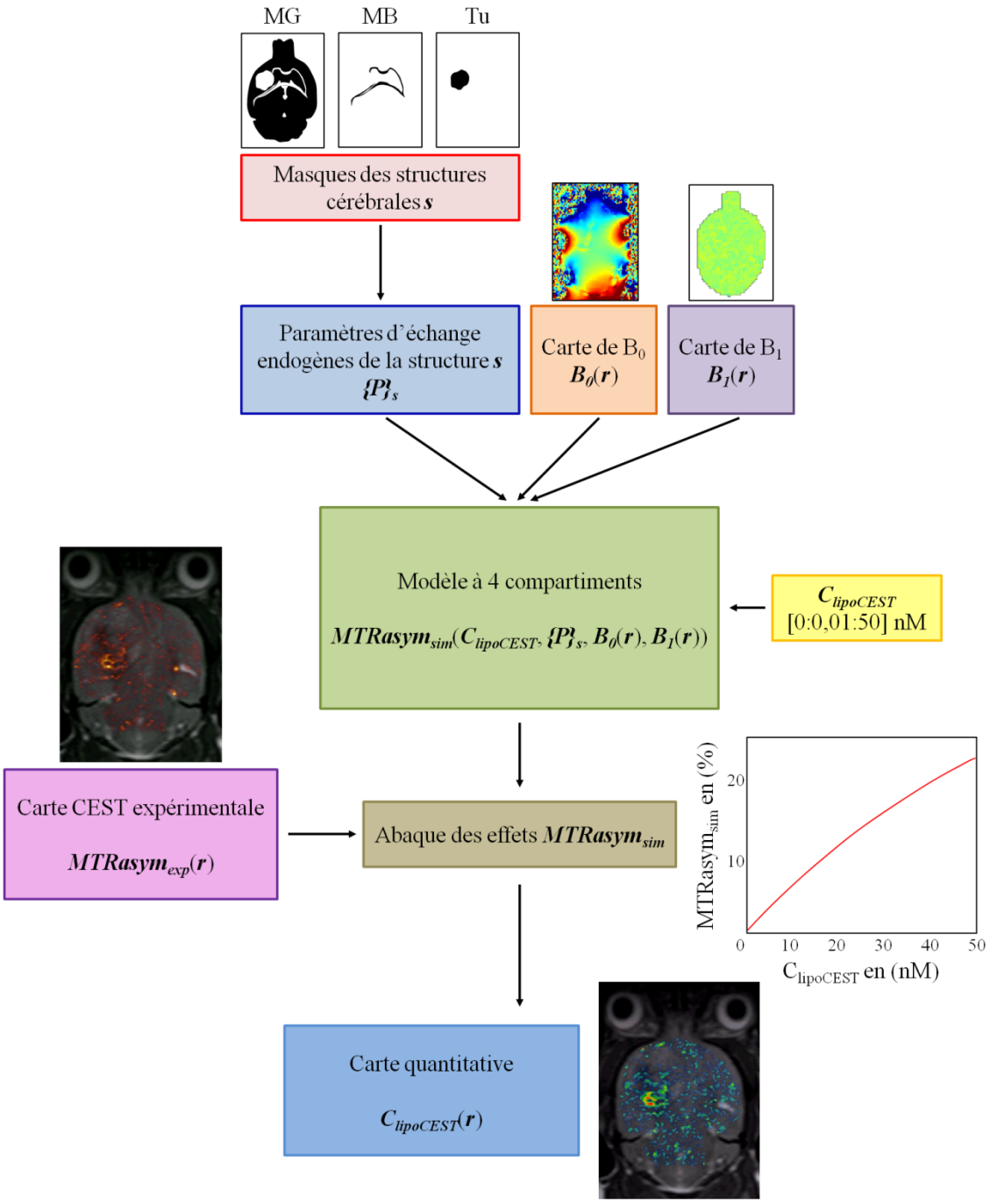


Figure F.VII.6 : Quantification des données CEST par l'Outil d'Analyse Quantitative. *En chaque pixel* ***r****, les paramètres d'échange* $\{P\}_s$ *estimés précédemment pour le type tissulaire considéré* ***s*** *sont utilisés en combinaison avec les valeurs des champs* $B_0(r)$ *et* $B_1(r)$ *afin de calculer le contraste* $MTRasym_{sim}(C_{lipoCEST}, \{P\}_s, B_0(r), B_1(r))$ *en fonction de la concentration en lipoCEST pour une gamme de 0 à 50 nM. La concentration en lipoCEST est alors estimée par comparaison avec le contraste* $MTRasym_{exp}(r)$ *expérimental. Cette opération est répétée pour chaque point de l'image afin de définir la carte de concentration en lipoCEST* $C_{lipoCEST}(r)$.

Conformément à nos remarques concernant l'impact des inhomogénéités de champs B_0 et B_1 (voir Chapitre V) sur le calcul de l'effet MTRasym, nous avons grâce à l'OAQ l'opportunité de considérer les véritables valeurs des champs B_0 et B_1. Ces valeurs permettent de réactualiser en chaque point **r**, les fréquences de Larmor Δ_i et l'intensité ω_1 de l'impulsion de saturation. Ainsi, les inhomogénéités de champs B_0 et B_1 sont prises en compte dans le calcul de $\boldsymbol{C_{lipoCEST}(r)}$. La carte de concentration est donc théoriquement exempte d'artefacts liés à ces inhomogénéités.

VII.2.b Validation *in vitro* de l'OAQ

Afin de valider notre OAQ, nous avons testé son efficacité sur un fantôme contenant des lipoCEST à une concentration variable. Une galerie de 5 tubes avec une concentration en lipoCEST de 0 / 0,1 / 0,5 / 1 / 10 nM a été utilisée (voir figure F.VII.7.a). Les solutions ont été obtenues par dilutions successives de la solution mère à $C_{lipoCEST}$ = 25 nM. La concentration de la solution mère a été déterminée par une technique de spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ou ICP-AES pour *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*) avec une précision de 10%. Des cartes de champs B_0 et B_1 (voir figures F.VII.7.c et .d respectivement) ont été acquises selon les méthodes décrites dans le chapitre V. Une image CEST a été acquise grâce à la séquence CEST-MSME avec une impulsion de saturation appliquée à δ_{sat} = 11 ppm et B_1 = 7 µT (voir figure F.VII.7.b).

Référence $C_{lipoCEST}$ (nM)	$C_{lipoCEST}$ calculée avec correction de B_0 et B_1		$C_{lipoCEST}$ calculée sans correction de B_0 et B_1	
	Moyenne (nM)	SD (nM)	Moyenne (nM)	SD (nM)
0	0,07	0,07	0,12	0,10
0,1	0,11	0,07	0,15	0,11
0,5	0,45	0,09	0,63	0,13
1	0,94	0,12	1,34	0,19
10	10,12	0,27	8,69	0,83

Tableau T.VII.2 : Validation in vitro de l'OAQ. *La concentration en lipoCEST (moyenne ± écart-type) a été calculée dans chaque tube avec et sans correction des champs B_0 et B_1.*

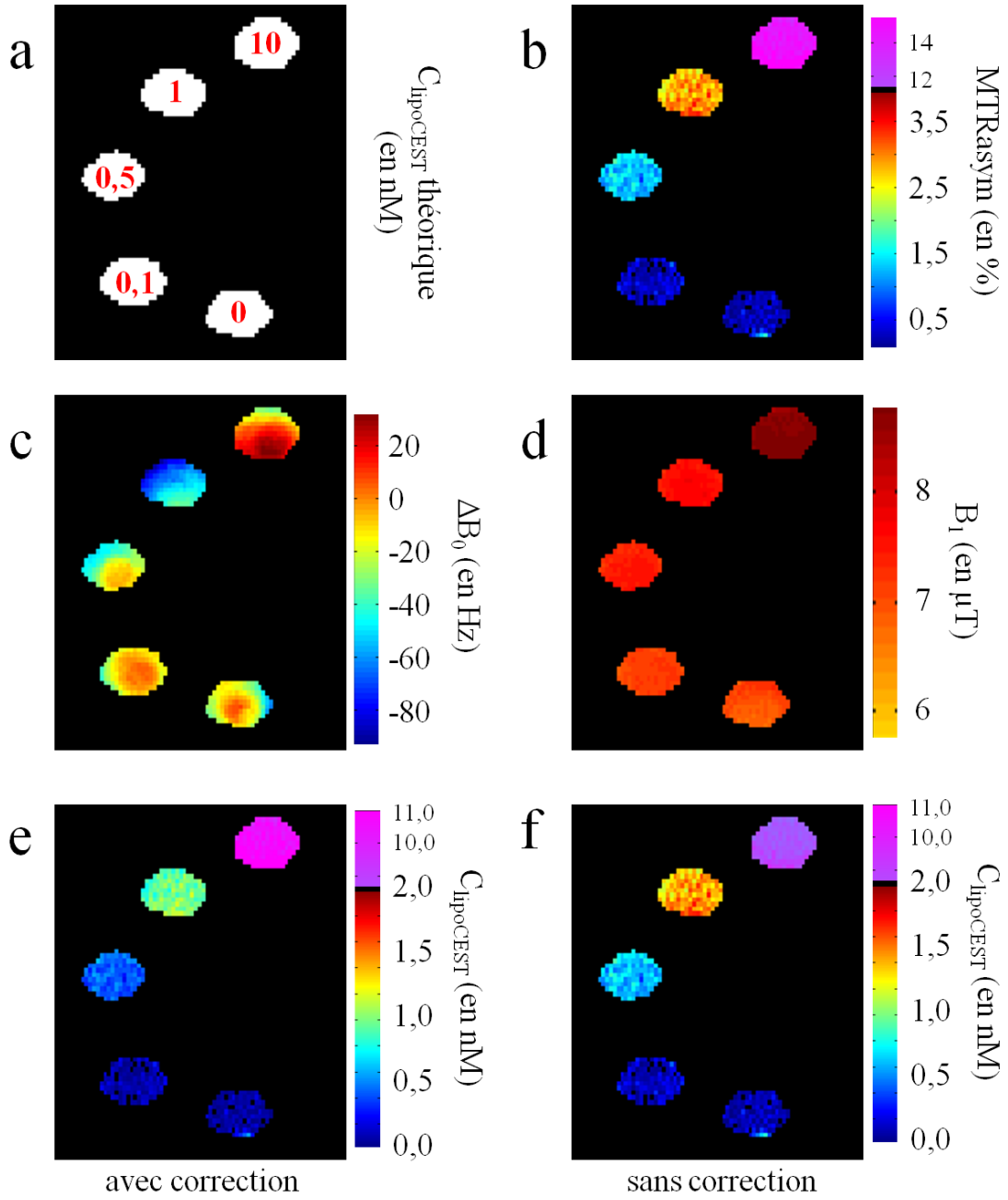


Figure F.VII.7 : Validation in vitro de l'OAQ. ***(a)*** *: galerie de fantômes utilisée ($C_{lipoCEST}$ = 0 / 0,1 / 0,5 / 1 / 10 nM) ;* ***(b)*** *: image CEST acquise avec δ_{sat} = 11 ppm et B_1 = 7 µT ;* ***(c)*** *: carte de champ B_0 et* ***(d)*** *: carte de champ B_1 ;* ***(e)*** *: carte quantitative et* ***(f)*** *: carte quantitative sans prise en compte des champs B_0 et B_1. Etant donné que la gamme des concentrations était large, deux échelles de couleurs ont été utilisées pour afficher chaque tube avec une dynamique adaptée. Les tubes avec une concentration comprise entre 0 et 1 nM sont affichés avec l'échelle de couleur « **jet** » de Matlab sur une gamme de concentrations de 0 à 2 nM. Le tube à 10 nM est affiché avec l'échelle de couleur « **cool** » de Matlab sur une gamme de concentrations de 9 à 11 nM.*

Le tableau T.VII.2 résume les concentrations (moyenne ± écart-type dans le tube) estimées avec l'OAQ avec ou sans prise en compte des valeurs expérimentales des champs B_0 et B_1. On constate que les concentrations estimées sont en accord avec la concentration théorique pour l'ensemble de la gamme de concentrations. L'écart maximal avec correction de B_0 et B_1 est de 0,12 nM tandis qu'il est de 1,31 nM sans correction. Ceci démontre l'importance d'acquérir et de considérer les champs B_0 et B_1 dans le calcul de la concentration.

Par ailleurs, nous estimons que la limite de détectabilité *in vitro* de nos agents lipoCEST est de l'ordre de 100 pM, ce qui est compatible avec les résultats publiés par l'équipe de Silvio Aime *(Aime et al., 2005).* Bien que nos fantômes soient homogènes, nous observons des écart-types allant jusqu'à 0,27 nM. Ceci nous permet d'estimer la précision de notre OAQ à environ 300 pM.

VII.3 Application *in vivo* de l'OAQ chez la souris U87

VII.3.a Quantification des lipoCEST *in vivo*

Afin d'évaluer l'OAQ *in vivo*, nous l'avons appliqué aux données d'imagerie CEST présentées au chapitre précédent. Compte tenu du temps important nécessaire à l'analyse quantitative de l'ensemble des données *in vivo*, nous avons choisi d'illustrer la quantification sur les images CEST présentées figures F.VI.8 et F.VI.9. Les données quantifiées à l'aide de l'OAQ sont présentées figures F.VII.8 et F.VII.9.

A l'examen des cartes quantitatives présentées sur la figure F.VII.8, on constate que les concentrations en lipoCEST les plus importantes sont détectées dans le cerveau de la souris injectée avec le RGD-lipoCEST à la périphérie de la tumeur ($C_{lipoCEST}$ ~ 4,2 nM). Néanmoins, du fait de la sensibilité modeste des images CEST, les cartes quantitatives présentent des inhomogénéités importantes. Par conséquent, nous avons adopté la même approche d'analyse de groupe que celle présentée au chapitre VI pour contourner cette limitation. Nous rappelons que les 24 souris ont été réparties en deux groupes de 12 souris (injectées avec le RGD ou le Ctrl-lipoCEST) et la concentration moyenne en lipoCEST a été calculée dans deux ROI (la tumeur et la zone controlatérale). Les barres d'erreur correspondent donc à la variabilité inter-individuelle. Les décours temporels de la concentration pour les 4 sous-groupes sont présentés sur la figure F.VII.9. Les p-values ont été calculées pour chaque pas temporel entre la concentration en

RGD-lipoCEST dans la tumeur et les trois autres conditions (voir tableau T.VII.3). Un astérisque indique qu'un seuil de significativité statistique inférieur à 0,01 est atteint ($p \leq 0,01$) entre la condition RGD-lipoCEST dans la tumeur et une des trois autres conditions.

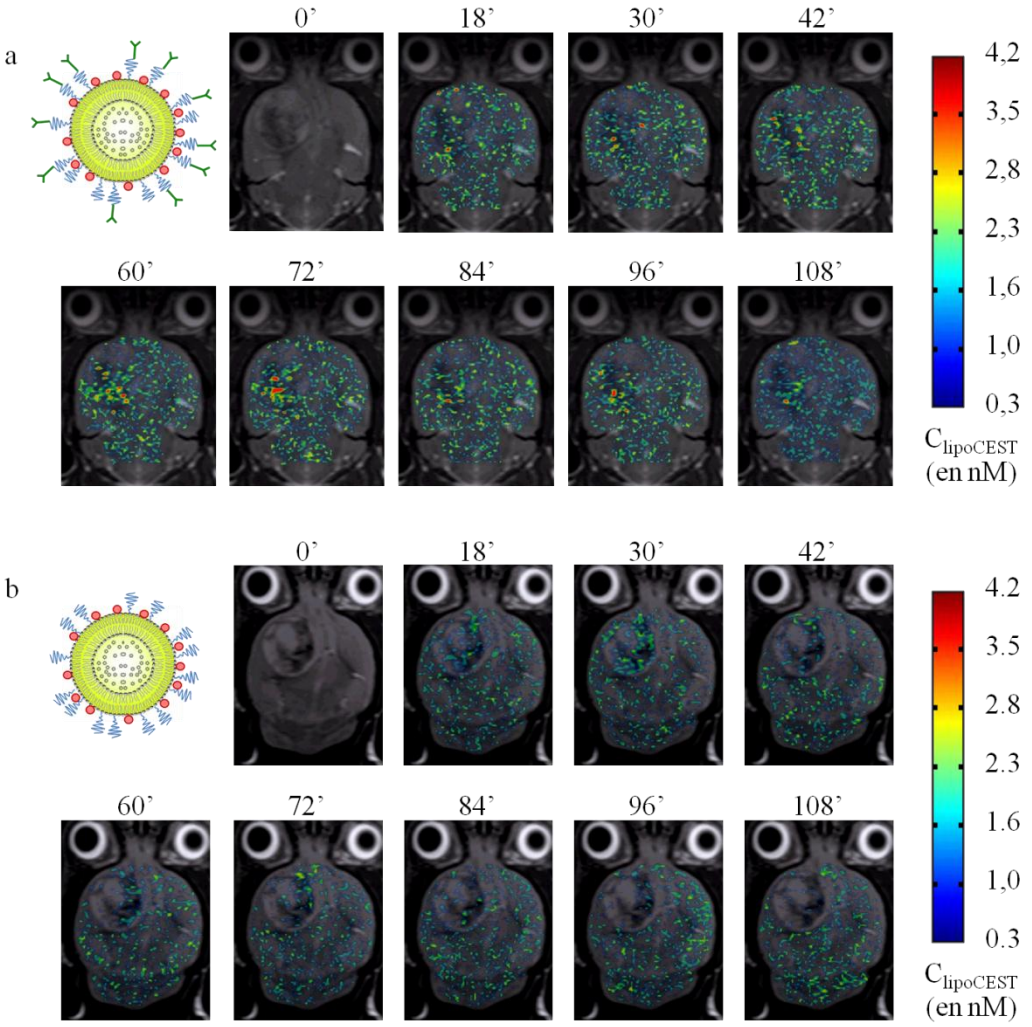


Figure F.V.8 : Cartes de concentration en lipoCEST. *Les cartes quantitatives en RGD- **(a)** et Ctrl-lipoCEST **(b)** ont été calculées à partir des images CEST présentées figures F.VI.8.a et .b.*

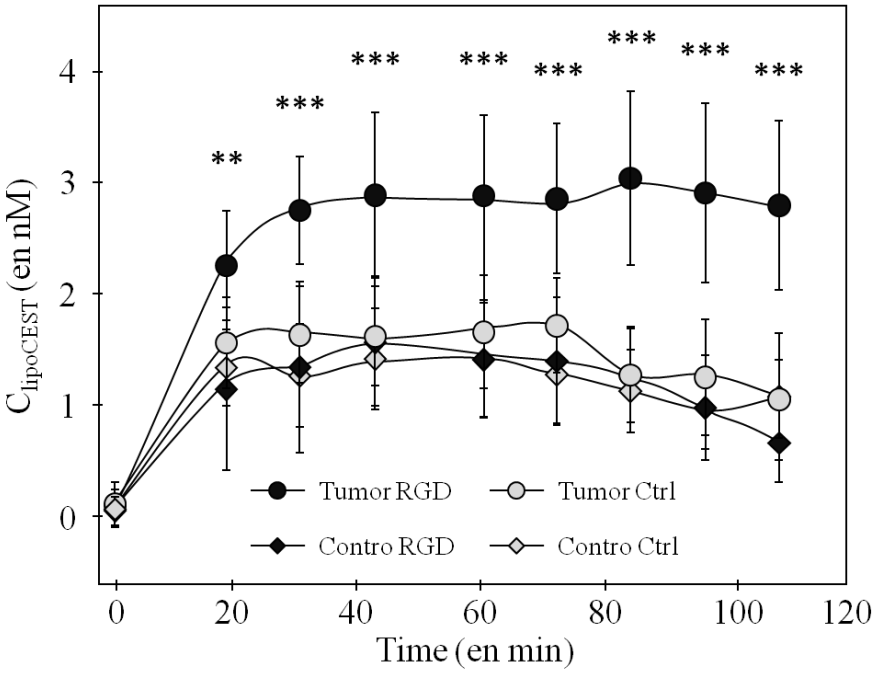


Figure F.VII.9 : Décours temporels de la concentration en lipoCEST. *La valeur moyenne de $C_{lipoCEST}$ a été calculée pour chaque ROI et pour chaque sous-groupe (n =12) à l'aide de l'OAQ.*

p-value	18'	30'	42'	60'	72'	84'	96'	108'
Contro RGD	0,007	$< 10^{-3}$	0,001	$< 10^{-3}$	0,002	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$
Tumeur Ctrl	0,031	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	0,003	0,008	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$
Contro Ctrl	0,006	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$

Tableau T.VII.3 : P-values calculées à l'aide d'un test de Student. *Pour chaque pas temporel, les concentrations moyennes calculées dans la tumeur avec le RGD-lipoCEST ont été comparées avec celles des trois autres conditions.*

De façon générale, les observations réalisées sur le contraste CEST restent valident pour les variations de concentration en fonction du temps. On remarque que dès 18 minutes post-injection, la concentration de RGD-lipoCEST dans la tumeur est significativement différente des concentrations dans la zone controlatérale avec les RGD- et Ctrl-lipoCEST. Au-delà, cette différence se confirme avec les trois conditions contrôle. La concentration de RGD-lipoCEST dans la tumeur est en moyenne de 2,79 ± 0,21 nM sur les 2 heures d'acquisition post-injection.

Dans les trois autres conditions, les concentrations sont plus faibles et la concentration maximale atteinte parmi ces trois conditions contrôle est de 1,71 ± 0,46 nM.

Conformément aux conclusions de l'étude présentée au chapitre VI, il est raisonnable de considérer au moins deux contributions au contraste CEST observé. Une première partie provient d'agents lipoCEST (Ctrl- et RGD-lipoCEST) liés de façon non spécifique ou circulant lentement dans les capillaires. Une seconde partie correspond aux agents RGD-lipoCEST liés spécifiquement à leur cible $\alpha_v\beta_3$. Des données d'immunohistochimie et d'imagerie de fluorescence nous avaient d'ailleurs permis de conforter ces résultats. D'après les courbes de concentration, on peut ainsi estimer la quantité de RGD-lipoCEST spécifiquement associée à sa cible. Au bout de 2 heures post-injection, la concentration en RGD-lipoCEST dans la tumeur est de 2,79 ± 0,21 nM alors qu'elle est en moyenne de 0,94 ± 0,23 nM pour les trois autres conditions. Ainsi, nous pouvons estimer que la concentration maximale de RGD-lipoCEST spécifiquement lié à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est d'approximativement 1,8 nM.

Evidemment, il est nécessaire de considérer avec prudence cette valeur pour plusieurs raisons. D'une part, cette valeur a été estimée sans effort de modélisation compartimentale. D'autre part, les paramètres utilisés dans l'OAQ pour décrire les échanges entre les groupes de protons A et D ont été déterminés *in vitro* et nous avons fait l'hypothèse qu'ils restent valident *in vivo*. Or nous ne connaissons pas l'influence du milieu biologique sur les paramètres d'échange et il est difficile d'envisager une estimation de ces paramètres *in vivo*. Cela constitue donc une limitation importante à notre approche. Par conséquent, nous jugeons plus raisonnable de parler de semi-quantification des lipoCEST *in vivo*.

VII.4.b Vers la modélisation compartimentale

Si la chaîne de traitements que nous venons de présenter ne permet pas encore de déterminer la concentration en intégrines $\alpha_v\beta_3$, elle permet néanmoins de quantifier, ou plus justement d'estimer la quantité d'agents lipoCEST associés spécifiquement à ce biomarqueur. Dans le chapitre II, nous avions défini l'imagerie moléculaire comme une modalité d'imagerie non invasive permettant de quantifier *in vivo* une cible biologique grâce à la quantification d'un agent de contraste et à la modélisation de la dynamique de prise de contraste. Pour tendre vers notre objectif initial qui était de mettre en place un protocole d'imagerie moléculaire par IRM-CEST, il nous reste donc à franchir la dernière étape qu'est la modélisation compartimentale.

Pour cela, il faut définir un modèle aussi réaliste que possible permettant de décrire la dynamique de prise de contraste. L'analyse des données CEST, des résultats d'immunohistochimie et de microscopie de fluorescence nous permet d'interpréter la prise de contraste. Il semblerait que la distribution des lipoCEST après une injection IV puisse être vue comme un modèle simple à 3 compartiments (voir figure F.VII.10).

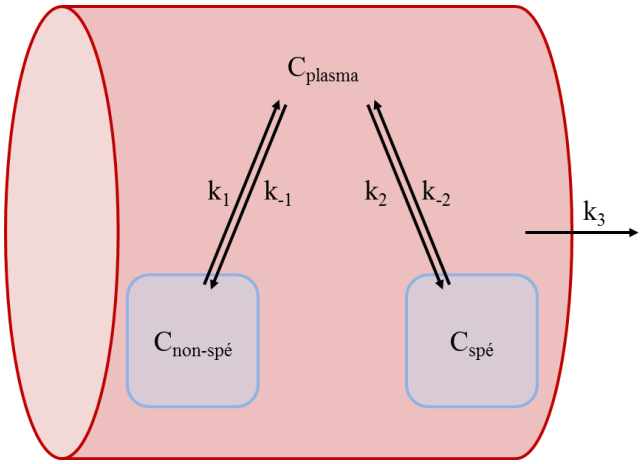


Figure F.VII.10 : Modèle à 3 compartiments pour décrire la dynamique de prise de contraste CEST.

Le premier compartiment représente le plasma sanguin et la concentration en lipoCEST circulant $C_{plasma}(t)$ correspond à la fonction d'entrée plasmatique de ce modèle. Les lipoCEST s'accumulent dans deux compartiments tissulaires et sont éliminés par le S.R.E à un taux k_3. Le premier compartiment tissulaire correspond aux lipoCEST non spécifiquement liés à leur cible et leur concentration est notée $C_{non\text{-}spé}(t)$. Les taux k_1 et k_{-1} correspondent à l'entrée et à la sortie des lipoCEST du premier compartiment tissulaire. Enfin, le second compartiment tissulaire représente les lipoCEST liés spécifiquement à leur cible $\alpha_v\beta_3$. Leur concentration est notée $C_{spé}(t)$. Les constantes k_2 et k_{-2} reflètent les constantes d'association et de dissociation du RGD-lipoCEST avec $\alpha_v\beta_3$.

Afin d'exploiter nos courbes à l'aide de ce modèle, il nous manque de nombreuses informations. Tout d'abord, il est très délicat de mesurer notre fonction d'entrée directement en imagerie CEST. Ceci est dû à la saturation inefficace des spins circulant dans les artères et les veines en IRM-CEST. Une alternative (que nous n'avons pas mise en place) aurait pu consister à doser la concentration en lipoCEST au cours de nos expériences à partir de prélèvements sanguins. Nous ne disposons donc pas de fonction d'entrée plasmatique. Une seconde lacune tient à notre ignorance des constantes d'association et de dissociation du RGD-lipoCEST avec

sa cible *in vitro*. Une approche possible pour pallier à cette information manquante aurait consisté à réaliser des expériences de compétition entre notre agent RGD-lipoCEST et un peptide dont les des constantes d'association et de dissociation avec $\alpha_v\beta_3$ sont connues. En raison de toutes ces insuffisances, il nous est impossible d'exploiter ces courbes en modélisation compartimentale.

Toutefois, afin d'aller plus loin que la simple détection et semi-quantification de nos agents lipoCEST, nous avons décidé d'adopter une approche purement descriptive *(Fan et al., 2004)*. Pour cela, nous proposons d'utiliser un modèle simpliste d'« entrée/sortie » qui consiste à ajuster de façon empirique les décours temporels avec une fonction biexponentielle :

E67 $$C(t) = C_0.(1 - e^{\frac{-t}{T_{in}}}).e^{\frac{-t}{T_{out}}}.$$

Ce type de modèle est bien adapté pour décrire phénoménologiquement des courbes présentant une phase d'« entrée » de l'agent de contraste dans le tissus avec un temps T_{in} suivie d'une phase de « sortie » (ou de stagnation) avec un temps T_{out}. Le paramètre C_0 représente la concentration maximale atteignable en absence d'élimination du produit.

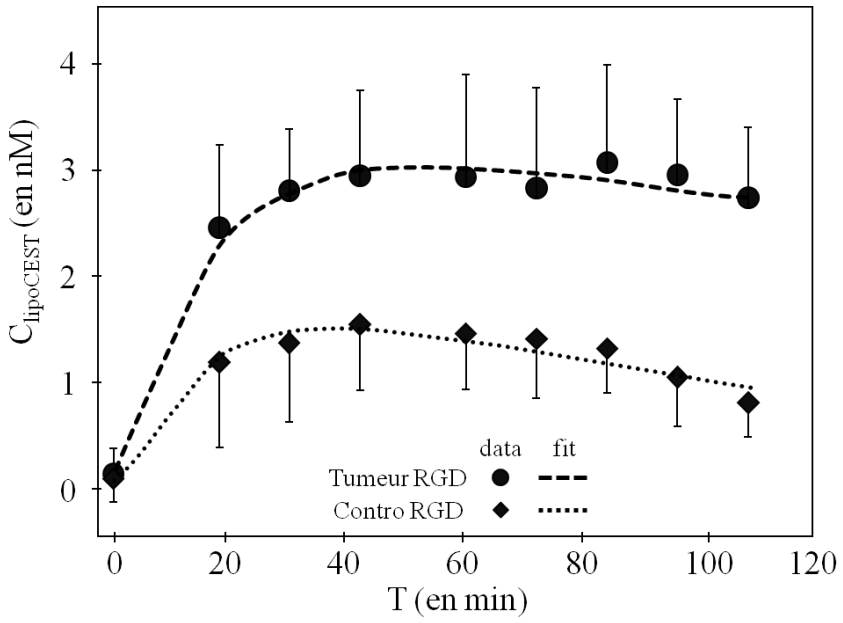


Figure F.VII.11 : Ajustement des décours temporels de la concentration en lipoCEST par une fonction biexponentielle. *Les ronds et les losanges noirs correspondent respectivement à la concentration en RGD-lipoCEST calculée dans la tumeur et dans la zone controlatérale.*

Nous avons donc appliqué ce modèle aux décours temporels présentés sur la figure F.VII.9 afin de déterminer le jeu de paramètres (C_0, T_{in}, T_{out}) pour chacune des 4 conditions. Le résultat de l'ajustement des courbes obtenues avec le RGD-lipoCEST est présenté dans la figure F.VII.11 et l'ensemble des paramètres déterminés pour les 4 conditions est résumé dans le tableau T.VII.4. Pour l'ensemble des 4 conditions, on constate que les temps d'accumulation sont comparables, avec des T_{in} variant de 16 à 20 minutes. Ceci paraît logique dans la mesure où les deux lipoCEST sont de taille similaire. Leur mobilité dans la circulation sanguine notamment dans les capillaires est donc comparable. Le T_{in} n'est pas un paramètre discriminant RGD- et Ctrl-lipoCEST. On notera néanmoins que la résolution temporelle de nos courbes (13,5 min) n'est pas favorable à une estimation précise de ce paramètre. En revanche, l'analyse des temps de sortie T_{out} se révèle plus intéressante. En effet, les T_{out} déterminés pour le Ctrl- ou RGD-lipoCEST dans la zone controlatérale sont similaires (entre 112 et 141 min), tandis que dans la tumeur, le T_{out} du RGD-lipoCEST est environ trois fois plus important (345 min). Ce paramètre reflétant plus ou moins le temps de demi-vie du lipoCEST, cette observation confirme la longue rétention du RGD-lipoCEST au niveau de la tumeur probablement en raison de sa liaison spécifique à sa cible $\alpha_v\beta_3$. Par ailleurs, les T_{out} pour les trois conditions contrôle sont compatibles avec les temps de demi-vie plasmatiques rapportés dans la littérature pour ce type de nanoparticules de l'ordre de 90 à 120 minutes *(Delli Castelli et al., 2010; Schmieder et al., 2005; Winter et al., 2010).*

	RGD-lipoCEST Tumeur	RGD-lipoCEST Contro	Ctrl-lipoCEST Tumeur	Ctrl-lipoCEST Contro
T_{in} (en min)	17	20	19	16
T_{out} (en min)	345	112	116	141
C_0 (en nM)	3,7	1,6	1,9	1,5
R^2	0,99	0,95	0,97	0,97

Figure T.VII.4 : Paramètres T_{in}, T_{out} et C_0 du modèle pour les 4 conditions. *Le coefficient de corrélation R^2 est indiqué afin de donner une idée de la qualité de l'ajustement des données par la fonction biexponentielle.*

Enfin, l'association spécifique du RGD-lipoCEST avec sa cible dans la tumeur se manifeste également au niveau du paramètre C_0. En effet, C_0 reflète la concentration maximale en lipoCEST dans le tissu. Les valeurs sont très proches dans la région controlatérale (1,6 et 1,5

nM). On remarque également que C_0 dans la tumeur avec le Ctrl-lipoCEST (1,9 nM) est légèrement supérieur à ceux trouvés dans la zone controlatérale. Cette différence notable est probablement liée à l'effet de rétention et de perméabilité de la tumeur *(Seymour, 1992)*. En revanche, C_0 dans la tumeur avec le RGD-lipoCEST est environ deux fois plus important (3,7 nM). Comme précédemment, on peut estimer la concentration maximale de RGD-lipoCEST spécifiquement lié à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en soustrayant ces deux dernières valeurs de C_0. Celle-ci est encore de 1,8 nM.

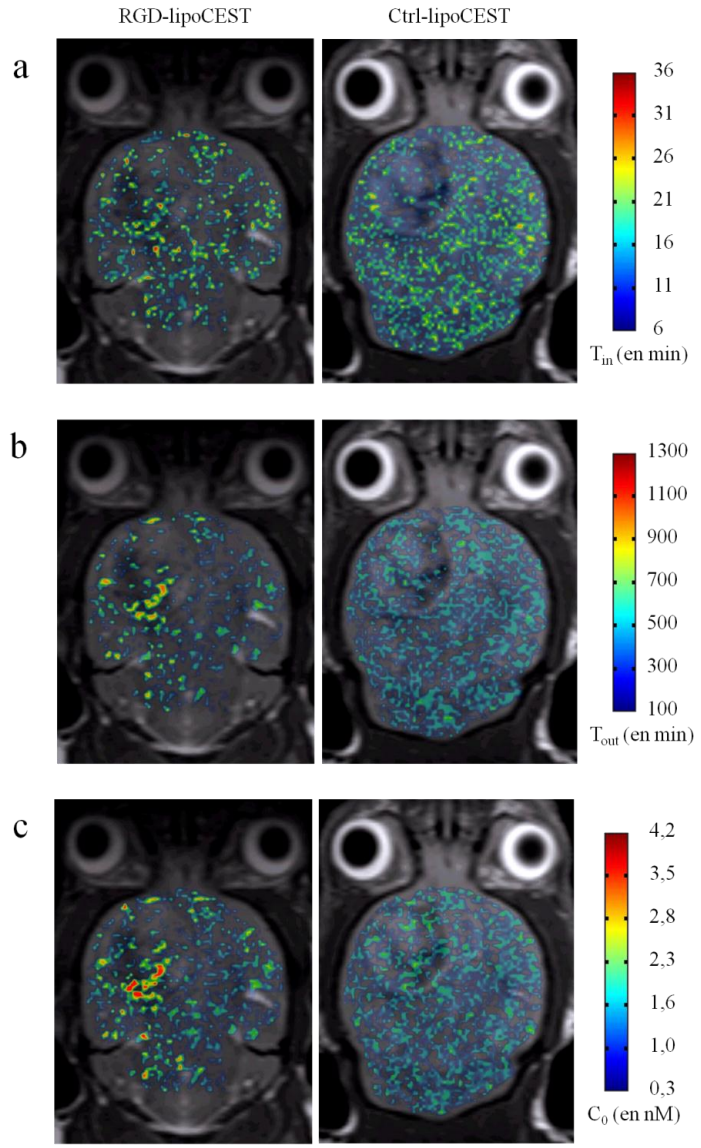


Figure F.VII.12 : Cartes paramétriques T_{in} (a), T_{out} (b) et C_0 (c). *Le décours temporel de la concentration en lipoCEST de chaque pixel a été ajusté grâce à la fonction biexponentielle. Les ajustements présentant des coefficients de corrélation $R^2 < 0,6$ ont été masqués.*

Les ajustements présentés dans le paragraphe précédents ont été réalisés à partir des données moyennées dans les ROI et à travers les 12 animaux de la cohorte. Si cela permet de gagner en robustesse et en puissance statistique, toute information spatiale et propre à chaque individu est perdue. Par conséquent, nous avons voulu tester ce modèle sur des données individuelles. Nous avons pour cela utilisé les deux souris témoins dont les images CEST et les cartes de concentrations sont présentées sur les figures F.VI.8 et F.VII.8. En chaque pixel de l'image, le décours temporel de la concentration en lipoCEST a été tracé puis a été ajusté à l'aide du modèle d'« entrée/sortie ». Ceci nous a donc permis de cartographier les paramètres T_{in}, T_{out} et C_0 pour des données individuelles. Les cartes paramétriques sont présentées respectivement sur les figures F.VII.12.a, .b et .c. Etant donné que les images étaient assez bruitées, nous avons fixé un critère d'exclusion déterminé par la qualité de l'ajustement. Ainsi, tous les pixels dont le coefficient de corrélation R^2 entre la courbe expérimentale et l'ajustement était inférieur à 0,6 ont été masqués. Les observations générales que l'on peut tirer de ces cartes paramétriques sont similaires à celles du tableau T.VII.4. En revanche, ces cartes permettent de conserver l'information spatiale perdue lors de l'analyse de groupe. A ce titre, les cartes de T_{out} et de C_0 pour le RGD-lipoCEST sont particulièrement intéressantes car elles permettent de mettre en évidence une zone importante et continue de pixels d'intérêt entièrement incluse dans la tumeur.

VII.5 Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre qu'il était possible de quantifier des lipoCEST *in vivo* grâce à un Outil d'Analyse Quantitative reposant sur un modèle à 4 compartiments des échanges de protons. De plus, grâce à la prise en compte des inhomogénéités de champs B_0 et B_1 la précision de notre OAQ a pu être estimée à 300 pM *in vitro*. L'OAQ a ensuite été appliqué avec succès sur les données acquises après injection IV de RGD et Ctrl-lipoCEST dans des souris portant des tumeurs intracérébrales U87. La concentration maximale en RGD-lipoCEST spécifiquement liés aux récepteurs $\alpha_v\beta_3$ a été estimée à 1,8 nM. Cette étude permet de démontrer pour la première fois la faisabilité de la détection et de la quantification de lipoCEST *in vivo* spécifiquement liés à une cible biologique. Cependant, le chemin à parcourir pour remonter jusqu'à la quantification de la cible biologique reste encore long et de toute évidence, les données dont nous disposions ici ne nous permettaient pas d'y accéder.

Bibliographie du chapitre VII

Aime, S., D. D. Castelli, and E. Terreno, 2005, Highly sensitive MRI chemical exchange saturation transfer agents using liposomes: Angewandte Chemie-International Edition, v. 44, p. 5513-5515.

Ceckler, T., J. Maneval, and B. Melkowits, 2001, Modeling magnetization transfer using a three-pool model and physically meaningful constraints on the fitting parameters: Journal of Magnetic Resonance, v. 151, p. 9-27.

Deichmann, R., and A. Haase, 1992, Quantification of T1 values by SNAPSHOT-FLASH NMR imaging: J Magn Reson, v. 96, p. 608–612.

Delli Castelli, D., W. Dastrù, E. Terreno, E. Cittadino, F. Mainini, E. Torres, M. Spadaro, and S. Aime, 2010, In vivo MRI multicontrast kinetic analysis of the uptake and intracellular trafficking of paramagnetically labeled liposomes.: J Control Release, v. 144, p. 271-279.

Edzes, H. T., and E. T. Samulski, 1977, Cross relaxation and spin diffusion in the proton NMR or hydrated collagen.: Nature, v. 265, p. 521-3.

Fan, X., M. Medved, J. N. River, M. Zamora, C. Corot, P. Robert, P. Bourrinet, M. Lipton, R. M. Culp, and G. S. Karczmar, 2004, New model for analysis of dynamic contrast-enhanced MRI data distinguishes metastatic from nonmetastatic transplanted rodent prostate tumors.: Magn Reson Med, v. 51, p. 487-94.

Goffeney, N., J. W. M. Bulte, J. Duyn, L. H. Bryant, and P. C. M. van Zijl, 2001, Sensitive NMR detection of cationic-polymer-based gene delivery systems using saturation transfer via proton exchange: Journal of the American Chemical Society, v. 123, p. 8628-8629.

Grad, J., D. Mendelson, F. Hyder, and R. G. Bryant, 1991, Applications of nuclear magnetic cross-relaxation spectroscopy to tissues.: Magn Reson Med, v. 17, p. 452-9.

Gregory, R., L. Crabo, A. Percy, and A. Rosenberg, 1983, Water catalysis of peptide hydrogen isotope exchange.: Biochemistry, v. 22, p. 910-7.

Henkelman, R. M., X. Huang, Q. S. Xiang, G. J. Stanisz, S. D. Swanson, and M. J. Bronskill, 1993, Quantitative interpretation of magnetization transfer.: Magn Reson Med, v. 29, p. 759-66.

Kiricuta, I., and V. Simplaceanu, 1975, Tissue Water Content and Nuclear Magnetic Resonance in Normal and Tumor Tissues: Cancer Research, v. 35, p. 1164 - 1167.

Lentner, C., 1981, Geigy scientific tables: Bâle.

Li, A. X., R. H. E. Hudson, J. W. Barrett, C. K. Jones, S. H. Pasternak, and R. Bartha, 2008, Four-Pool Modeling of Proton Exchange Processes in Biological Systems in the Presence of MRI-Paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer (PARACEST) Agents: Magnetic Resonance in Medicine, v. 60, p. 1197-1206.

McConnell, H., 1958, Reaction rates by nuclear magnetic resonance: J Chem Phys, v. 58, p. 430-431.

McMahon, M. T., A. A. Gilad, J. Y. Zhou, P. Z. Sun, J. W. M. Bulte, and P. C. M. van Zijl, 2006, Quantifying exchange rates in chemical exchange saturation transfer agents using the saturation time and saturation power dependencies of the magnetization transfer effect on the magnetic resonance imaging signal (QUEST and QUESP): pH calibration for poly-L-lysine and a starburst dendrimer: Magnetic Resonance in Medicine, v. 55, p. 836-847.

Morrison, C., and R. M. Henkelman, 1995, A model for magnetization transfer in tissues.: Magn Reson Med, v. 33, p. 475-82.

Mougin, O., R. Coxon, A. Pitiot, and P. Gowland, 2010, Magnetization transfer phenomenon in the human brain at 7 T.: Neuroimage, v. 49, p. 272-81.

Schmieder, A., P. Winter, S. Caruthers, T. Harris, T. Williams, J. Allen, E. Lacy, H. Zhang, M. Scott, G. Hu, J. Robertson, S. Wickline, and G. Lanza, 2005, Molecular MR imaging of melanoma angiogenesis with alpha(nu)beta(3)-targeted paramagnetic nanoparticles: Magnetic Resonance in Medicine, v. 53, p. 621-627.

Seymour, L. W., 1992, Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates.: Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, v. 9, p. 135-87.

Sled, J. G., and G. B. Pike, 2001, Quantitative imaging of magnetization transfer exchange and relaxation properties in vivo using MRI.: Magn Reson Med, v. 46, p. 923-31.

Smith, J. W., and D. A. Cheresh, 1990, Integrin (alpha v beta 3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor.: J Biol Chem, v. 265, p. 2168-72.

Tyler, D. J., and P. A. Gowland, 2005, Rapid quantitation of magnetization transfer using pulsed off-resonance irradiation and echo planar imaging.: Magn Reson Med, v. 53, p. 103-9.

Underhill, H. R., R. C. Rostomily, A. M. Mikheev, C. Yuan, and V. L. Yarnykh, 2011, Fast bound pool fraction imaging of the in vivo rat brain: association with myelin content and validation in the C6 glioma model.: Neuroimage, v. 54, p. 2052-65.

Winter, P., S. Caruthers, J. Allen, K. Cai, T. Williams, G. Lanza, and S. Wickline, 2010, Molecular Imaging of Angiogenic Therapy in Peripheral Vascular Disease With alpha(v)beta(3)-Integrin-Targeted Nanoparticles: Magnetic Resonance in Medicine, v. 64, p. 369-376.

Woessner, D., 1961, Nuclear transfer in nuclear magnetic resonance pulse experiments: J Chem Phys, v. 35, p. 41-48.

Woessner, D. E., S. R. Zhang, M. E. Merritt, and A. D. Sherry, 2005, Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI: Magnetic Resonance in Medicine, v. 53, p. 790-799.

Zhou, J. Y., B. Lal, D. A. Wilson, J. Laterra, and P. C. M. van Zijl, 2003a, Amide proton transfer (APT) contrast for imaging of brain tumors: Magnetic Resonance in Medicine, v. 50, p. 1120-1126.

Zhou, J. Y., J. F. Payen, D. A. Wilson, R. J. Traystman, and P. C. M. van Zijl, 2003b, Using the amide proton signals of intracellular proteins and peptides to detect pH effects in MRI: Nature Medicine, v. 9, p. 1085-1090.

Zhou, J. Y., D. A. Wilson, P. Z. Sun, J. A. Klaus, and P. C. M. van Zijl, 2004, Quantitative description of proton exchange processes between water and endogenous and exogenous agents for WEX, CEST, and APT experiments: Magnetic Resonance in Medicine, v. 51, p. 945-952.

CHAPITRE VIII
Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était de développer l'imagerie de transfert de saturation d'agents de contraste fonctionnalisés pour l'imagerie moléculaire par IRM de la tumeur cérébrale chez la souris à haut champ magnétique.

En collaboration avec l'équipe de Recherche et Développement de Guerbet, nous avons optimisé la formulation d'agent CEST liposomaux : les lipoCEST. Ensemble, nous avons notamment validé l'intérêt d'utiliser des complexes de Lanthanide ayant un nombre de coordination **q** supérieur à 1 et celui de multimères de DOTA. Une formulation de lipoCEST a été retenue répondant aux contraintes de l'imagerie CEST *in vivo*. Bien que ces agents lipoCEST présentent des caractéristiques satisfaisantes pour une visualisation *in vivo*, certains axes d'optimisation demeurent à explorer pour accroître le déplacement chimique au-delà de 10 ppm ou améliorer la mono-dispersité des liposomes. L'encapsulation du complexe tétramérique de DOTA (voir figure F.IV.2, formule **[5]**) s'est notamment révélée problématique. A l'avenir, des artifices pourraient être mis en œuvre pour réduire la forte viscosité de la solution de complexes tétramériques. En perspective, l'encapsulation de complexes multimériques présentant des nombres de coordination $\mathbf{q} > 1$ est très excitante. Ceci permettrait théoriquement d'atteindre des déplacements de l'ordre de 20 ppm tout en conservant des lipoCEST sphériques compatibles avec l'utilisation *in vivo*. Pour notre protocole d'imagerie CEST *in vivo*, nous avons utilisé un lipoCEST présentant des caractéristiques CEST relativement modestes ($\Delta \sim 8$ ppm). Ceci nous a néanmoins permis d'atteindre un seuil de sensibilité *in vivo* de l'ordre du nanomolaire. Un doublement du déplacement chimique des lipoCEST permettrait en théorie de gagner un facteur ~ 2 en sensibilité du fait de la réduction des effets MT et APT endogènes.

Au cours de cette thèse, nous avons surtout apporté la preuve de contraste de l'imagerie moléculaire par IRM-CEST. Il s'agit de la première visualisation d'agent lipoCEST *in vivo* consécutivement à une injection intraveineuse *(Flament et al., 2012)*. La sensibilité nanomolaire atteinte peut paraitre limitante pour la détection de cibles en concentration sub-nanomolaire, elle n'en constitue pas moins un saut significatif en sensibilité pour l'imagerie RMN en général et en particulier pour l'imagerie CEST. De plus, la preuve de concept établie pour la détection de

l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimée lors de l'angiogenèse tumorale à l'aide de lipoCEST fonctionnalisés avec un peptide RGD nous semble convaincante *(Flament et al., 2012)*. D'autant que nos résultats d'immunohistochimie et d'imagerie de fluorescence ont permis de confirmer la spécificité de l'association du RGD-lipoCEST avec sa cible, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Enfin, nous avons engagé un premier pas vers la quantification des agents lipoCEST et la modélisation compartimentale des dynamiques d'imagerie moléculaire par IRM-CEST. Pour cela, nous avons développé un Outil d'Analyse Quantitative. Cet outil repose sur une modélisation phénoménologique des processus d'échange de protons *in vivo* à l'aide d'un modèle à 4 compartiments. L'OAQ a été validé *in vitro* avec une précision de quantification de l'ordre de 300 pM. L'application aux données CEST *in vivo* nous a permis d'estimer à 1,8 nM la concentration maximale de lipoCEST fonctionnalisés spécifiquement liés à la cible $\alpha_v\beta_3$. Toutefois, la validité des paramètres d'échange déterminés *in vitro* étant questionnable, il est plus prudent de parler de semi-quantification.

Outre les développements possibles en chimie, il existe également de nombreux axes d'amélioration envisageables pour l'acquisition et le traitement de donnés CEST. Le premier axe est méthodologique. Pour cette étude, nous avons adopté une approche conservatrice utilisant une séquence CEST-MSME relativement lente. Une optimisation du temps de saturation (voir figure F.V.7) et du temps de répétition devrait aisément nous permettre de réduire le temps d'acquisition d'une image CEST d'un facteur 2. Par ailleurs, d'autres séquences d'imagerie rapide ont été proposées récemment pour l'imagerie CEST *(Shah et al., 2011)*. Nous-mêmes avons explorés la piste d'une séquence zoom-EPI adiabatique compatible avec l'utilisation d'antenne de surface plus sensible et pour laquelle le rapport signal-sur-bruit normalisé était prometteur *(Flament et al., 2011)*.

Une seconde piste consiste à adapter notre protocole d'imagerie chez la souris U87. Les courbes (figure F.VI.9) ainsi que les valeurs de T_{out} (tableau T.VII.4) suggèrent qu'il aurait été préférable d'imager les souris sur une période plus longue afin de minimiser la contribution des lipoCEST circulant ou non spécifiquement liés à leur cible. Un temps d'observation de 4 heures aurait probablement permis d'améliorer le contraste CEST dans la tumeur et sa périphérie.

Enfin, notre analyse des données CEST (notamment l'OAQ) souffre de n'être pas suffisamment automatisée et pourrait grandement bénéficier d'une programmation optimisée de ces étapes de calculs. La segmentation manuelle des types tissulaires et la définition des régions d'intérêt est fastidieuse et peu reproductible. Afin de gagner en robustesse et accélérer la quantification des images CEST, il serait enfin nécessaire d'implémenter une étape préliminaire de seuillage statistique des pixels présentant un contraste CEST significatif.

En conclusion, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont permis de faire avancer l'imagerie RMN vers une plus grande sensibilité et spécificité vis-à-vis de la détection de processus biologiques d'intérêt pour l'imagerie médicale de demain. Cette ambition portée par l'ensemble du projet Iseult, a permis de mettre au point et d'évaluer une nouvelle génération d'agents de contraste fonctionnalisés, ouvrant ainsi de nouveaux horizons pour l'imagerie moléculaire par IRM. Des études menées sur le même modèle de tumeurs cérébrales avec des agents nanoparticulaires fonctionnalisés en combinaison avec des séquences d'imagerie quantitative T_1, T_2 ou ^{19}F ont également montré que l'angiogenèse tumorale pouvait être ciblée de façon spécifique avec une sensibilité nanomolaire *(Giraudeau et al., 2012)*. Chaque modalité de contraste possédant ses caractéristiques propres, l'utilisation combinée des ces agents de contraste permettrait de tirer profit des avantages de chacune d'elles, ouvrant ainsi un champ d'exploration multimodale de pathologies cérébrales particulièrement excitant.

Bibliographie du chapitre VIII

Flament, J., F. Geffroy, C. Medina, C. Robic, J. F. Mayer, S. Mériaux, J. Valette, P. Robert, M. Port, D. Le Bihan, F. Lethimonnier, and F. Boumezbeur, 2012, In vivo CEST MR imaging of U87 mice brain tumor angiogenesis using targeted LipoCEST contrast agent at 7 T.: Magn Reson Med.

Flament, J., B. Marty, C. Giraudeau, S. Ahmed Ghaly, S. Mériaux, C. Medina, C. Robic, M. Port, F. Lethimonnier, G. Bloch, D. Le Bihan, F. Boumezbeur, and J. Valette, 2011, Optimized protocol for in vivo CEST-based MRI using zoom EPI adiabatic (zEPIa) sequence: ISMRM 2010, Stockholm, Suède.

Giraudeau, C., J. Flament, B. Marty, F. Geffroy, C. Médina, C. Robic, P. Robert, M. Port, D. Le Bihan, J. Valette, S. Mériaux, F. Boumezbeur, and F. Lethimonnier, 2012, Comparison of three MRI molecular imaging modalities: Application to angiogenesis imaging in a brain tumor mouse model: ISMRM 2012, Melbourne, Australie.

Shah, T., L. Lu, K. Dell, M. Pagel, M. Griswold, and C. Flask, 2011, CEST-FISP: A Novel Technique for Rapid Chemical Exchange Saturation Transfer MRI at 7 T: Magnetic Resonance in Medicine, v. 65, p. 432-437.

Annexe

Articles dans des revues scientifiques

Flament J, Geffroy F, Medina C, Robic C, Mayer J.F, Mériaux S, Valette J, Robert P, Port M, Le Bihan D, Lethimonnier F, Boumezbeur F. *In Vivo CEST MR Imaging of U87 Mice Brain Tumor Angiogenesis Using Targeted LipoCEST Contrast Agent at 7T*. Magn Reson in Med. 2012; DOI : 10.1002/mrm.24217.

Giraudeau C, Flament J, Marty B, Boumezbeur F, Mériaux S, Robic C, Port M, Tsapis N, Fattal E, Giacomini E, Lethimonnier F, Le Bihan D, Valette J. *A new paradigm for high-sensitivity ^{19}F magnetic resonance imaging of perfluorooctylbromide*. Magn Reson Med. 2010 Apr;63(4):1119-24.

Communications avec actes

PARAMAP: an Automated Imaging Analysis Tool for Quantitative CEST Molecular Imaging: Validation in vitro. EPOS 4652, ISMRM 2009, Honolulu, USA.

Five-site modeling of protons chemical exchange processes for in vivo CEST-based molecular imaging. Oral 292, ESMRMB 2009, Antalya, Turquie.

Quantitative CEST molecular imaging. In vitro and in vivo validation with LipoCEST contrast agent. Oral 208, ESMRMB 2009, Antalya, Turquie.

Optimized protocol for in vivo CEST-based MRI using zoom EPI adiabatic (zEPIa) sequence. Poster, ISMRM 2010, Stockholm, Suède.

Five-site modeling of protons chemical exchange processes for in vivo CEST-based molecular imaging. Poster, ISMRM 2010, Stockholm, Suède.

In vivo $\alpha_v\beta_3$ CEST-based molecular imaging using RGD-LipoCEST in U87 mice brain tumor. Poster, ISMRM 2010, Stockholm, Suède.

Comparison of contrast modalities using Dysprosium-based MRI Contrast Agent. Poster, WMIC 2010, Kyoto, Japon.

In vivo $\alpha_v\beta_3$ CEST-based molecular imaging using RGD-LipoCEST in U87 mice brain tumor. Poster, WMIC 2010, Kyoto, Japon.

Novel 3D cell culture medium for characterization of contrast agent in the MRI environment. Poster, WMIC 2010, Kyoto, Japon.

In vivo LipoCEST CA accumulation around U87 mice brain tumor demonstrated by in vivo CEST MRI and ex vivo fluorescence microscopy. EPOS 4497, ISMRM 2011, Montréal, Canada.

Molecular MRI of U87 mice brain tumor angiogenesis using targeted LipoCEST contrast agent and histological validation. Oral 155, ESMRMB 2011, Leipzig, Allemagne.

Molecular Magnetic Resonance Imaging of U87 mice brain tumor angiogenesis using targeted LipoCEST contrast agent and histological validation. Poster, WMIC 2011, San Diego, Etats-Unis.

Semi-quantification of lipoCEST CA in vivo. Application to molecular imaging of αvβ3 integrins expressed during angiogenesis using targeted lipoCEST CA in a tumor mouse brain model. EPOS, ISMRM 2012, Melbourne, Australie.

Communications sans acte

Comparison of three MRI molecular imaging modalities : Application to angiogenesis imaging in a brain tumor mouse model. Oral, GDR Imagiv 2011, Paris, France.

Imagerie moléculaire par IRM CEST de la néo-angiogenèse tumorale chez la souris à l'aide d'agents de contraste lipoCEST fonctionnalisés. Poster, GDR Imagiv2011, Paris, France.

Article en cours de soumission

Flament J, Medina C, Marty B, Giraudeau C, Geffroy F, Djemaï B, Mériaux S, Valette J, Robic C, Port M, Le Bihan D, Lethimonnier F, Boumezbeur F. *In vivo quantitative CEST-MRI using a four-site realistic model of protons*. NMR in Biomedicine. En cours de soumission.

DÉVELOPPEMENT DE L'IMAGERIE RMN PAR AGENTS CEST : APPLICATION À UN MODÈLE RONGEUR DE TUMEUR CÉRÉBRALE

L'objectif de cette thèse est de développer l'imagerie de transfert de saturation des agents de contraste lipoCEST pour la détection de l'angiogenèse dans un modèle souris de tumeur cérébrale U87. Un lipoCEST offrant un seuil de sensibilité *in vitro* de 100 pM est optimisé afin de répondre aux contraintes de l'imagerie CEST *in vivo*. Grâce à la mise en place d'un dispositif expérimental dédié à l'imagerie CEST, nous évaluons les performances des lipoCEST pour détecter de façon spécifique l'angiogenèse tumorale. Nous montrons pour la première fois qu'il est possible de détecter un lipoCEST *in vivo* dans un cerveau de souris suite à une injection intraveineuse. De plus, l'utilisation d'un lipoCEST fonctionnalisé avec un peptide RGD permet de cibler spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimée lors de l'angiogenèse tumorale. L'association spécifique du RGD-lipoCEST est confirmée grâce à des données d'immunohistochimie et de microscopie de fluorescence. Enfin, dans le but de tendre vers un protocole d'imagerie moléculaire par IRM-CEST, nous mettons en place un outil de quantification des lipoCEST. Cet outil repose sur la modélisation des processus d'échange de protons *in vivo*. Grâce à la prise en compte des inhomogénéités de champs B_0 et B_1 qui peuvent se révéler être délétères pour le contraste CEST, nous démontrons que la précision de notre outil de quantification est de 300 pM *in vitro*. La quantification des données CEST acquises chez la souris U87 permet d'estimer à 1,8 nM la concentration maximale en RGD-lipoCEST liés à leur cible moléculaire.

Mots-clés : IRM, CEST, lipoCEST, tumeur U87, angiogenèse tumorale, peptide RGD, intégrine $\alpha_v\beta_3$, modélisation, quantification.