



HAL
open science

Imagerie photoacoustique couplée à l'échographie haute résolution et à la fluorescence infrarouge en oncologie préclinique translationnelle

Florian Raes

► **To cite this version:**

Florian Raes. Imagerie photoacoustique couplée à l'échographie haute résolution et à la fluorescence infrarouge en oncologie préclinique translationnelle. Médecine humaine et pathologie. Université d'Orléans, 2016. Français. NNT : 2016ORLE2082 . tel-01622628

HAL Id: tel-01622628

<https://theses.hal.science/tel-01622628>

Submitted on 24 Oct 2017

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.

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre d'Imagerie du **Petit Animal (CIPA)**, TAAM-UPS44 CNRS, Orléans

THÈSE présentée par :
Florian RAES

Soutenue le : **Vendredi 07 Octobre 2016**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie et Physique du Vivant

Imagerie Photoacoustique couplée à l'Échographie Haute Résolution et à la Fluorescence Infrarouge en oncologie préclinique translationnelle

THÈSE dirigée par :

Stéphanie LERONDEL
Alain LE PAPE

HDR, Ingénieure de Recherche CNRS, CIPA-TAAM, Orléans
Directeur de Recherche CNRS, CIPA-TAAM, Orléans

RAPPORTEURS :

François BRUNOTTE
Laurent BARTHOLIN

PU-PH Chef de service de Médecine Nucléaire, Dijon
HDR, Chargé de Recherche INSERM, Lyon

JURY :

François BRUNOTTE
Laurent BARTHOLIN
Elisabeth NOIRAUT
Sébastien PAPOT
Ayache BOUAKAZ
Alain LE PAPE
Stéphanie LERONDEL

PU-PH Chef de service de Médecine Nucléaire, Dijon
HDR, Chargé de Recherche INSERM, Lyon
HDR, Maître de conférences, INSERM, Clermont Ferrand
Professeur des Universités, CNRS, Poitiers **Président du Jury**
Directeur de Recherche INSERM, Tours
Directeur de Recherche CNRS, CIPA-TAAM, Orléans
HDR, Ingénieure de Recherche CNRS, CIPA-TAAM, Orléans

Membre invité :

Philippe TROCHET

Ingénieur d'application, FUJIFILM Visualsonics Inc., Amsterdam

Ce travail de thèse est le fruit d'une collaboration entre le Centre d'Imagerie du Petit Animal (CIPA), TAAM UPS44 du CNRS d'Orléans et l'entreprise FUJIFILM Visualsonics Inc.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur François Brunotte et le Docteur Laurent Bartholin d'avoir accepté la charge de rapporteurs et pour toutes leur précieuses propositions d'amélioration de ce manuscrit.

A mon jury d'avoir évalué mon travail et d'assister à sa défense.

A mon Directeur de Thèse, Monsieur le Docteur Alain Le Pape, Directeur de Recherche au CNRS, Orléans - Directeur scientifique du Centre d'Imagerie du Petit Animal. Pour le privilège de m'avoir proposé ce sujet si passionnant, pour avoir accepté de diriger ce travail de thèse et de m'apporter vos compétences pour le juger, merci. Pour l'enrichissante formation pour, et par la recherche, que vous m'avez enseignée, pour l'esprit d'initiative que vous m'avez appris à développer, pour toutes les connaissances sur l'imagerie et sur la recherche biomédicale que vous avez partagées avec moi, merci. Pour la disponibilité que vous m'avez accordée malgré votre planning chargé, ainsi que pour la confiance que vous m'avez donné dès mon arrivée au CIPA, je vous adresse mes sincères remerciements.

A ma Co-Directrice de Thèse, Madame le Docteur Stéphanie Lerondel, Responsable du Centre d'Imagerie du Petit Animal. Pour l'honneur que tu me fais de juger ce travail de thèse, merci. Merci également de m'avoir si bien accueilli au sein du CIPA, et d'avoir suivi et permis la progression de mon travail. Merci pour tous tes conseils, ta confiance, ta disponibilité et ta gentillesse, qui m'ont permis de m'épanouir pleinement dans ces travaux de recherche.

Je suis très honoré d'avoir été, Alain, votre dernier thésard, et Stéphanie, ton premier thésard ! Avec tous mes remerciements, je vous prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude, et de mon plus grand respect.

Je voudrais également exprimer toute mon affection à tout le reste de l'équipe du CIPA, qui m'a beaucoup appris sur l'imagerie, et avec qui j'ai passé un stage et des années de thèse très agréables et très enrichissantes, aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Merci à Marilyne et Stéphanie pour toutes les connaissances, aussi bien pratiques que théoriques que vous m'avez apprises, allant de la radioprotection jusqu'à la prise en charge du bien-être animal. Merci pour tout.

Merci à Julien, l'ingénieur à toute épreuve, de m'avoir appris à utiliser tous les appareils d'imagerie présents au CIPA, et de m'avoir donné toutes les astuces liées à leur utilisation. Merci d'avoir été un collègue du bureau formidable.

Merci à Sharuja, la dernière recrue talentueuse du CIPA, d'avoir participé avec intérêt à tous les projets exploratoires liés à l'imagerie ultrasonore (et autres) sur lesquels nous avons travaillé. Merci pour ces bons moments.

A toute l'équipe, pour votre rigueur et votre bonne humeur au quotidien, pour votre assistance et aide dans tous les projets qui m'ont été confiés, pour votre soutien au cours de ces quatre dernières années, je vous remercie.

Merci au Docteur Moussa Badiane, Médecin échographiste, Assistant en Biophysique Médecine Nucléaire et chargé d'enseignement à l'UFR des Sciences de la Santé de Saint Louis au Sénégal. Merci d'avoir été un co-doctorant formidable, avec qui j'ai pu apprendre et partager sur la recherche préclinique et clinique, et ai pu réaliser des protocoles expérimentaux sur la thématique du ganglion sentinelle. Merci pour ta jovialité lors de tes séjours en France. Avec toute mon amitié, Merci !

Un grand merci aux Docteurs Sabrina Pesnel, Marc Vandamme, Guillaume Réveillon, Guillaume Collet et Alexandra Foucault-Collet pour leurs conseils aussi bien en imagerie, que sur les travaux de recherche en général, ou les Thèses de Sciences.

Je tiens également à remercier tout particulièrement le Professeur Sébastien PAPOT et son équipe de l'IC2MP de Poitiers, pour les échanges très enrichissants que nous avons eus sur les thérapies anti-cancéreuses et les processus de « ciblage » de ceux-ci. Merci de m'avoir fait confiance et m'avoir laissé mener les études précliniques impliquant les différentes constructions moléculaires associées à la MMAE. Merci de m'avoir permis de travailler sur ce projet passionnant que j'ai suivi depuis mon stage de Master2. Un grand merci également au Docteur Jonathan Clarhaut avec qui j'ai suivi ces différents projets.

Merci à Ahlem Benlala, stagiaire de Master2 présente au CIPA pendant ma thèse, d'avoir apporté son aide et sa contribution aux études en cours, durant ce travail de recherche.

Merci au Docteur Cécile Frémond, directrice du TAAM, de m'avoir accordé sa confiance pour le déroulement de cette thèse au sein de l'Unité CNRS UPS44.

Merci également à toute l'équipe du TAAM. Un merci plus particulier à Corinne et Agnès, pour tous les services qu'elles m'ont rendus concernant la gestion des différentes missions et des nombreuses commandes passées pour mes recherches au CIPA. Merci à Sébastien Paturance pour son aide dans le montage des dossiers relatifs à l'éthique et au bien-être animal, pour ses conseils et les échanges fructueux que nous avons eus.

Merci aux docteurs Claudine Kieda, Catherine Grillon et Bouchra Rabhi du Centre de Biophysique Moléculaire, pour m'avoir permis d'utiliser leur appareil de mesure de pression partielle en oxygène, et de participer à des protocoles exploratoires sur une thérapie modulant l'oxygénation.

Merci aux docteurs Ayache Bouakaz, Chloé Arthuis et Anthony Novell pour m'avoir permis de travailler sur un projet très intéressant sur un modèle de retard de croissance intra-utérin. Merci de m'avoir apporté votre expertise sur l'imagerie de contraste ultrasonore.

Merci aux docteurs Carole Thomas et Stéphanie Lemaître de m'avoir fait découvrir les modèles de rétinoblastomes, et de m'avoir permis de les aider dans la mise en place de nouvelles approches par imagerie, visant à valider des concepts physiologiques.

Merci aux docteurs Elisabeth Miot-Noirault et Aurélien Voissière de m'avoir confié la mise en place d'un protocole d'étude par imagerie de modèles de chondrosarcomes, visant à caractériser le statut hypoxique tumoral avant l'utilisation d'une thérapie ciblant cette hypoxie.

Un grand merci à toute l'équipe de FUJIFILM Visualsonics Inc., avec qui j'ai été en contact tout au long de cette thèse. Merci beaucoup à Lydia Eidemueller, qui m'a accordé sa confiance et qui m'a permis de réaliser cette thèse. Merci à Moktar Boukerma et Marie Bayle Medinger, avec qui nous avons pu mettre en place les dossiers administratifs liés à ce partenariat de thèse.

Merci à Philippe Trochet qui a été mon interlocuteur et mon superviseur chez Visualsonics. Merci pour vos nombreux conseils pratiques concernant l'utilisation et l'interprétation de l'imagerie ultrasonore et photoacoustique, mais aussi pour votre analyse et votre vision de l'entreprise que vous m'avez fait découvrir. Merci pour votre disponibilité malgré vos obligations professionnelles, et pour les bons moments passés en votre présence.

Merci à Philippe Davault, pour son implication dans mes différentes missions et projets, et pour m'avoir apporté son soutien lors de mes interventions et présentations. Merci à Dieter Fuchs, Jithin Jose, Andrew Needles et Drew Heinmiller, pour leurs nombreux conseils et expertise scientifique sur l'imagerie photoacoustique, de m'avoir intégré aux différents projets de développement en cours et de m'avoir confié des essais stratégiques à réaliser. Merci à Sandra Meyer et Katrin Suppelt pour leur aide et soutien lors de missions à l'étranger. Merci à Alberto Losi pour m'avoir apporté son assistance dans le maintien en très bon état de fonctionnement du système.

DEDICACES :

A toutes les personnes que j'ai rencontrées au cours de mes études supérieures, en biologie et en pharmacie, et au cours de mes années de thèse, qui ont joué un rôle de près ou de loin dans mon parcours d'étudiant qui se clôture (enfin) par cette thèse de Sciences.

A Marion & Thomas, Justine & Alexandre, Marion & Gum's et Johan, pour tous ces instants mémorables partagés avec vous depuis de nombreuses années sur Dijon, Annecy, Lyon et ailleurs...

A Francis & Caroline, Camille & Hermès, Elodie & Romain, Sophie & Thomas, Sandrine & David, Guillemette, Jean-Bab, Mathieu, Totom, Le Pape, Charlotte & Romain, Camille & Christophe, Marie & Mathieu, Julie, Elodie & Brice, Laetitia & Guillaume, pour tous ces bons moments passés à vos côtés.

Je dédie cette thèse à mes parents, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, je vous remercie du fond du cœur. MERCI INFINIMENT, merci d'avoir toujours été là pour moi, merci d'avoir toujours veillé à mon confort, merci pour votre patience et votre aide pendant chacun de mes examens tout au long de ces interminables années d'étude, merci pour tous ces si bons moments passés en famille. Merci d'avoir été de si bons exemples.

Je dédie également ce travail à ma sœur Coralie et mon frère Mathieu, qui sont deux personnes absolument extraordinaires. Merci d'être comme vous êtes et de m'apporter cet équilibre et ce bonheur.

Enfin, je souhaite exprimer ici un immense MERCI et ma plus profonde reconnaissance à Anaïs. Je te remercie pour ton solide soutien à tout instant et à toute épreuve, pour ta patience exemplaire tout au long de ces années d'études et de ces longs moments passés loin de toi. Avec tout mon amour, MERCI, MERCI, MERCI !

Encore un grand MERCI à tous ceux qui me sont chers et qui m'ont soutenu pendant ces années. Une pensée particulière à mes grands-parents, parrain et marraine, oncles et tantes ainsi qu'à Petite-Anne, Zophie, le Zinc, Eloïse, Clot, Pinpin bleu, Carlos et Poumgling.

A toute ma famille,

A mes amis,

MERCI !!!

Table des matières

Remerciements	4
Sommaire	9
Liste des Abréviations	15
Liste des Figures	20
Liste des Annexes	25
Introduction	27
1. L'HYPOXIE TUMORALE	37
1.1. Phénoménologie de l'hypoxie tumorale	38
1.1.1. Biologie.....	38
1.1.2. Traitements radio-sensibilisateurs et ciblant l'hypoxie.....	44
1.1.3. Méthodes de mesures des paramètres d'oxygénation.....	47
1.1.3.1. Pression partielle en Oxygène PO ₂	47
1.1.3.1.1. Oxymétrie par fluorescence.....	47
1.1.3.1.2. Electrodes à Oxygène.....	47
1.1.3.1.3. Résonance paramagnétique électronique (RPE).....	48
1.1.3.1.4. Spectroscopie RMN du ¹⁹ F.....	49
1.1.3.1.5. Oxymétrie de Phosphorescence.....	49
1.1.3.2. Saturation de l'hémoglobine en Oxygène SO ₂	50
1.1.3.2.1. Oxymétrie de pouls.....	50
1.1.3.2.2. Spectroscopie dans le proche infrarouge (NIRS).....	50
1.1.3.2.3. Imagerie hyperspectrale (HIS).....	50
1.1.3.3. Etude indirecte de l'oxygénation tissulaire.....	51
1.1.3.3.1. Pimonidazole.....	51
1.1.3.3.2. Etanidazole pentaFluoré EF5.....	51
1.2. Imagerie de l'hypoxie tumorale : Etat de l'art	51
1.2.1. Imagerie TEP.....	52
1.2.1.1. Principe.....	52
1.2.1.2. Applications.....	52
1.2.1.3. Autres applications de l'imagerie TEP.....	59
1.2.2. Imagerie TEMP.....	59
1.2.2.1. Principe.....	59

1.2.2.2. Applications	60
1.2.2.3. Autres applications de l'imagerie TEMP	62
1.2.3. IRM.....	62
1.2.3.1. Principe	62
1.2.3.2. Applications	64
1.2.3.2.1. IRM BOLD	64
1.2.3.2.2. IRM FREEDOM	66
1.2.3.2.3. IRM PISTOL	66
1.2.3.2.4. IRM MOBILE	67
1.2.3.2.5. Imagerie RPE	68
1.2.3.2.6. IRM « Oxygen Enhanced » (OE-IRM)	69
1.2.3.3. Autres applications de l'IRM	70
1.2.4. Imagerie de fluorescence.....	70
1.2.4.1. Principe	70
1.2.4.2. Applications	77
1.2.4.3. Autres applications de l'imagerie de fluorescence	78
1.2.5. Imagerie Ultrasonore.....	78
1.2.5.1. B-Mode.....	79
1.2.5.1.1. Principe	79
1.2.5.1.2. Applications	81
1.2.5.1.3. Autres applications de l'échographie	81
1.2.5.2. Doppler.....	81
1.2.5.2.1. Principe	82
1.2.5.2.2. Applications	82
1.2.5.2.3. Autres applications de l'échographie Doppler	82
1.2.5.3. Imagerie de contraste.....	83
1.2.5.3.1. Principe	83
1.2.5.3.2. Applications	83
1.2.5.3.3. Autres applications de l'échographie de contraste	83
1.2.5.4. Imagerie Photoacoustique.....	85
1.2.5.4.1. Principe	85
1.2.5.4.2. Applications	88
1.2.5.4.3. Autres applications de l'imagerie photoacoustique	94
1.2.6. Imagerie de bioluminescence.....	95
1.2.6.1. Principe	95
1.2.6.2. Applications	98

1.2.6.3. Autres applications de l'imagerie de bioluminescence	99
1.3. Démarches expérimentales de validation	101
1.3.1. Mesures de la pression partielle en oxygène - OxyLite™	102
1.3.1.1. Matériels et Méthodes	102
1.3.1.2. Résultats	106
1.3.2. Immuno-marquage des complexes protéiques réduits	110
1.3.2.1. Matériels et Méthodes	110
1.3.2.2. Résultats	112
1.4. Application expérimentale <i>in vivo</i>	116
1.4.1. Limites de la bioluminescence	116
1.4.1.1. Matériels et Méthodes	116
1.4.1.2. Résultats	117
1.4.2. Etude longitudinale du développement de l'hypoxie par imagerie dans un modèle à cellules MDA-MB-231	119
1.4.2.1. Matériels et Méthodes	119
1.4.2.2. Résultats	119
1.4.3. Suivi de petites tumeurs et de tumeurs avancées MiaPaCa2-luc	121
1.4.3.1. Matériels et méthodes	121
1.4.3.2. Résultats - Petites tumeurs MiaPaCa2	124
1.4.3.3. Résultats - Tumeurs avancées MiaPaCa2	127
1.4.4. Suivi de tumeurs pulmonaires NCI-H460-luc	129
1.4.4.1. Limites des techniques conventionnelles pour l'imagerie Pulmonaire	129
1.4.4.2. Apport de l'imagerie photoacoustique et de l'échographie 3D	130
1.4.4.2.1. Matériels et méthodes	132
1.4.4.2.2. Résultats	136
 2. DÉVELOPPEMENT ET APPLICATION D'UNE PLATEFORME INTÉGRÉE D'IMAGERIE MULTI-MODALITÉ DÉDIÉE À L'ONCO-PHARMACOLOGIE EXPÉRIMENTALE	 149
2.1. Opérationnalité de la plateforme	150
2.1.1. Matériels et Méthodes	152
2.1.1.1. Imagerie de fluorescence et de bioluminescence	152
2.1.1.2. Mesures ultrasonores	157
2.1.2. Résultats	158
2.1.2.1. Imagerie de fluorescence et marquages fluorescents	158

2.1.2.1.1.	Marquage Cetuximab-IR-Dye800	159
2.1.2.1.2.	Marquage Cetuximab-AF750	159
2.1.2.1.3.	Marquage Cetuximab-ICG	159
2.1.2.2.	Imagerie de bioluminescence.....	159
2.1.2.3.	Mesures ultrasonores.....	160
2.2.	Exploitation des stratégies d'imagerie en oncologie expérimentale.....	163
2.2.1.	Constructions moléculaires à base de MonoMethyl Auristatine E.....	163
2.2.1.1.	La Monomethyl Auristatine E	163
2.2.1.2.	Prodrogues Thérapeutiques	164
2.2.1.2.1.	Prodrogue 1	164
2.2.1.2.2.	Prodrogue 2	166
2.2.1.2.3.	Prodrogue 3	166
2.2.2.	Comparaison de l'activité des différentes constructions moléculaires d'un nouveau concept de chimiothérapies.....	169
2.2.2.1.	Imagerie de l'activité des différentes formes moléculaires.....	169
2.2.2.1.1.	Matériels et Méthodes	169
2.2.2.1.2.	Résultats	171
2.2.2.2.	Imagerie multi-modale.....	175
2.2.2.2.1.	Matériels et Méthodes	175
2.2.2.2.2.	Résultats	177
2.2.3.	Détermination de la dose maximale tolérée - DMT.....	178
2.2.3.1.	MMAE libre	179
2.2.3.2.	Prodrogue 1 - Souris saines	181
2.2.3.3.	Prodrogue 1 - Souris porteuses de tumeurs	182
2.2.4.	Etudes d'efficacité de la Prodrogue 1.....	184
2.2.4.1.	Modèle de tumeurs pancréatiques humaines à un stade précoce	185
2.2.4.2.	Modèle de tumeurs pancréatiques humaines évoluées	191
2.2.4.3.	Modèle de tumeurs mammaires humaines	195
2.2.4.4.	Modèle de tumeurs pulmonaires humaines	201
2.2.5.	Evaluation du risque de toxicité de la prodrogue sur un modèle d'inflammation aigüe.....	206
2.2.5.1.	Matériels et Méthodes	206
2.2.5.2.	Résultats	209
2.3.	Discussion et Conclusion.....	213
3.	AUTRES CONTRIBUTIONS EN IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE POUR LA RECHERCHE BIOMEDICALE.....	227

3.1. Le ganglion sentinelle	228
3.1.1. La place du ganglion sentinelle en pratique clinique.....	228
3.1.2. Contexte des recherches sur le ganglion sentinelle :	
Partenariat Sénégalais.....	230
3.1.2.1. Mise en place des modèles Rongeurs d’envahissement ganglionnaire.....	232
3.1.2.1.1. Matériels et Méthodes - Modèle Rat	233
3.1.2.1.2. Résultats - Modèle Rat	234
3.1.2.1.3. Matériel et Méthodes - Modèle Souris	235
3.1.2.1.4. Résultats - Modèle Souris	236
3.1.2.2. Etude de lymphographie dynamique.....	237
3.1.2.2.1. Matériels et Méthodes - Imagerie Photoacoustique	238
3.1.2.2.2. Résultats - Imagerie Photoacoustique	239
3.1.2.2.3. Matériels et Méthodes - Imagerie de fluorescence	239
3.1.2.2.4. Résultats - Imagerie de fluorescence	242
3.1.2.3. Etude de l’envahissement ganglionnaire.....	245
3.1.2.3.1. Matériels et Méthodes	245
3.1.2.3.2. Résultats	247
3.1.3. Modèle de tumeurs mammaires spontanées chez le lapin.....	252
3.1.3.1. Imagerie TEMP.....	257
3.1.3.1.1. Matériels et Méthodes	257
3.1.3.1.2. Résultats	258
3.1.3.2. Imagerie de fluorescence.....	260
3.1.3.2.1. Matériels et Méthodes	260
3.1.3.2.2. Résultats	260
3.1.3.3. Imagerie échographique.....	265
3.1.3.3.1. Matériels et Méthodes	265
3.1.3.3.2. Résultats	265
3.1.3.4. Imagerie Photoacoustique.....	265
3.1.3.4.1. Matériels et Méthodes	265
3.1.3.4.2. Résultats	265
3.2. Exploration de chondrosarcomes orthotopiques par photoacoustique chez la souris	271
3.2.1. Matériels et Méthodes.....	271
3.2.2. Résultats.....	272
3.3. Exploration de rétinoblastomes orthotopiques par photoacoustique chez la	

souris	275
3.3.1. Matériels et Méthodes.....	275
3.3.2. Résultats.....	275
3.4. Exploration de l’oxygénation fœto-placentaire par imagerie photoacoustique chez la rate	279
3.4.1. Matériels et Méthodes.....	280
3.4.2. Résultats.....	282
Discussion Générale	287
Références Bibliographiques	303
Annexes	346
Résumé	399

Liste des Abréviations

¹³C	Carbone 13
⁶⁴Cu	Cuivre 64
2D	2 Dimensions
3D	3 Dimensions
¹⁸F	Fluor 18
¹⁸F-FAZA	FluoroAZomycinArabinofuranoside
¹⁸F-FDG	FluoroDésoxyGlocose
¹⁸F-FETA	FluoroETAnidazole
¹⁸F-FETNIM	FluoroEryThroNitroIMidazole
¹⁸F-HX4	Flortanidazole
¹⁸F-MISO	FluoroMISOmidazole
⁶⁷Ga	Galium 67
¹²⁴I	Iode 124
¹²⁴I-IAZA	IodoAZomycin-Arabinoside
¹¹¹In	Indium 111
¹³N	Azote 13
¹⁵O	Oxygène 15
3R	Réduire, Raffiner, Remplacer
^{99m}Tc	Technétium 99 métastable
Ac	Anticorps
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF680	AlexaFluor®680
AF750	AlexaFluor®750
ANOVA	ANalysis Of VAriance
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATCC	American Type Culture Collection

AMP	Adénosine Mono-Phosphate
AQ4N	Banoxantrone
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
ATSM	DiAcetyl-bis(N4-methylThioSeMicarbazone)
AUC	Aire sous la courbe
BLI	Bioluminescence Imaging (Imagerie de Bioluminescence)
BOLD	Blood Oxygen Level-Dependant
BPV	Bleu Patente V
CA-IX	Anhydrase Carbonique IX
CCD	Charge Coupled Device
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CIPA	Centre d'Imagerie du Petit Animal
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
CMRO₂	Cerebral Metabolic Rate of Oxygen
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CRB	Cube Reference Binding
Cy5.5	Cyanine 5.5
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
DMT	Dose Maximale Tolérée
dTE	differential Targeted Enhancement
ECG	ElectroCardioGramme
EF5	Etanidazole Pentafluoré
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EO9	Apaziquone
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ESM	Ecart Standard à la Moyenne
FIH	Facteur Inhibant HIF-1

FITC	Fluoresceine IsoThioCyanate
FMT	Fluorescence Molecular Tomography
FREEDOM	Fluorocarbon Relaxometry Using Echo Planar Imaging for Dynamic Oxygen Mapping
FR	Récepteur à l'acide folique
GLUT-1	Glucose Transporter 1
GS	Ganglion Sentinelle
Gy	Gray
HAP	Hypoxia Activated Prodrug
Hb	Hémoglobine
HbT	Hémoglobine Totale
HDMSO	HexaMethylDiSilOxane
H/E	Hématoxyline / Eosine
HIF-1α	Hypoxia Inducible Factor
HIS	Hyperspectral Imaging System
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Pression
HRE	Hypoxia Response Elements
IP	Intra-péritonéal
IV	Intraveineux
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IC2MP	Institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers
ICG	IndoCyanine Green (Vert d'indocyanine)
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IR-Dye800	InfraRed-Dye800
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LPS	Lipopolysaccharides
Luc	Qui exprime la Luciférase
MB	MicroBulles
MIP	Maximum Intensity Projection

MMAE	MonoMethyl Auristatine E
MOBILE	Mapping of Oxygen By Imaging Lipids relaxation
NIH	National Institute of Health (Etats-Unis)
NIRF	Near InfraRed Fluorescence
NIRS	Near InfraRed Spectroscopy
O₂	Oxygène
OCT	Optical Coherence Tomography
OE-IRM	Oxygen Enhanced - IRM
OSNA	One Step Nucleic acid Amplification
PA	PhotoAcoustique
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Peak Enhancement
PI3K/Akt	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase/Akt
PISTOL	Proton Imaging of Siloxanes to map Tissue Oxygenation Levels
PM	PhotoMultiplificateur
PO₂	Pression Partielle en Oxygène
PTD	PhotoThérapie Dynamique
PTSM	Pyruvaldehyde-bis (N4-methylThioSeMicarbazone)
QSP	Quantité Suffisante Pour
RCIU	Retard de Croissance Intra Utérin
RGD	Arginine - Glycine - Acide Aspartique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROI	Region Of Interest (Région d'Intérêt)
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
SEM	Erreur Standard à la Moyenne
SNC	Système Nerveux Central
SO₂	Saturation en Oxygène de l'hémoglobine
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography

SRM	Spectroscopie par Résonance Magnétique
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T1	Temps de relaxation longitudinal
T2	Temps de relaxation transversal
TA	Température ambiante
TDM-X	TomoDensitoMétrie X
TEMP	Tomographie d'Emission MonoPhotonique
TEP	Tomographie d'Emission de Positons
TGF	Transforming Growth Factor
TH-302	Evofosfamide
TH-4000	Tarloxitinib
TNFα	Tumor Necrosis Factor
TPZ	Tirapazamine
u.a.	unité arbitraire
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
WiR	Wash-in Rate

Liste des figures

Figure 1 : Processus de développement d'un médicament	33
Figure 2 : Processus de développement de sondes d'imagerie moléculaire	34
Figure 3 : Représentation de l'hypoxie chronique et aiguë	40
Figure 4 : Diffusion de l'O ₂ à travers le tissu tumoral	41
Figure 5 : Mécanisme de l'activation transcriptionnelle médiée par HIF1	43
Figure 6 : Principe de l'imagerie TEP	52
Figure 7 : Traceurs TEP de la famille des azolés	56
Figure 8 : Chronologie du développement des traceurs TEP de l'hypoxie	58
Figure 9 : Principe de l'imagerie TEMP	60
Figure 10 : Principe de l'IRM	63
Figure 11 : Principe de l'IRM, orientation des spins	63
Figure 12 : Exemple d'acquisition en IRM BOLD	65
Figure 13 : Exemple d'acquisition en IRM FREDOM	66
Figure 14 : Exemple d'acquisition en IRM PISTOL	67
Figure 15 : Exemple d'acquisition en IRM MOBILE	67
Figure 16 : Exemple d'acquisition en OE-IRM	69
Figure 17 : Bases physiques de la fluorescence	71
Figure 18 : Principe de l'imagerie de fluorescence	71
Figure 19 : Fluorescence par épi-illumination et trans-illumination	72
Figure 20 : Absorption des molécules endogènes dans le proche infrarouge	73
Figure 21 : Phénomène de diffusion de la lumière	74
Figure 22 : Principe de fonctionnement d'une sonde fluorescente activable	75
Figure 23 : Principaux fluorochromes utilisés dans le proche infrarouge	76
Figure 24 : Exemple d'acquisition en imagerie de fluorescence proche infrarouge	77
Figure 25 : Principe de l'échographie	79
Figure 26 : Schéma détaillé d'un transducteur linéaire d'échographie	80
Figure 27 : Caractéristiques des transducteurs linéaires hautes résolutions	80
Figure 28 : Exemple d'acquisition en Doppler couleur 3D	82
Figure 29 : Principe de l'imagerie photoacoustique	86
Figure 30 : Détail du transducteur bimodal d'échographie et de photoacoustique	86
Figure 31 : Etudes répertoriant les profondeurs d'imagerie atteinte par imagerie PA	88
Figure 32 : Spectre d'absorption de Hb et HbO ₂	90
Figure 33 : Différents modes PA liés aux mesures de l'Hb	91
Figure 34 : Spectres d'absorption de colorants et fluorochromes	92
Figure 35 : Exemple d'agents de contraste métalliques nanoparticulaires	93

Figure 36 : Identification des champs d'application clinique en imagerie PA.....	94
Figure 37 : Représentation schématique de la réaction de bioluminescence.....	95
Figure 38 : Principe de l'imagerie de bioluminescence.....	96
Figure 39 : Principe de la transfection lentivirale.....	97
Figure 40 : Exemple d'acquisition en imagerie de bioluminescence.....	98
Figure 41 : Les différentes techniques de mesure de l'hypoxie tumorale.....	100
Figure 42 : Positionnement des sondes OxyLite™.....	103
Figure 43 : Présentation du Vevo® LAZR.....	105
Figure 44 : Image d'un artefact dû à la présence de bulles d'air en PA.....	106
Figure 45 : Exemples d'acquisition PA sur une tumeur chez la souris.....	107
Figure 46 : Contrôle du positionnement de la sonde OxyLite™.....	108
Figure 47 : Mesure de la SO ₂ lors d'une variation de l'O ₂ gazeux administré.....	108
Figure 48 : Comparaison de données : SO ₂ Vs PO ₂	109
Figure 49 : Double implantation de sondes OxyLite™ au niveau tumoral.....	110
Figure 50 : Protocole de section des tumeurs pour les analyses histologiques.....	111
Figure 51 : Comparaison de l'histologie classique H/E aux données PA.....	113
Figure 52 : Comparaison de l'immuno-fluorescence du pimonidazole aux données PA.....	114
Figure 53 : Comparaison des signaux de BLI et échographies 3D.....	117
Figure 54 : Variation des signaux BLI en fonction du positionnement de l'animal.....	118
Figure 55 : Variation de la SO ₂ au cours de la croissance tumorale.....	120
Figure 56 : Modèle de tumeurs pancréatiques orthotopiques.....	122
Figure 57 : Positionnement de la souris sur la plaque chauffante.....	123
Figure 58 : Image B-Mode du pancréas sain.....	124
Figure 59 : Image échographique d'une tumeur pluri-lobée au sein du pancréas.....	125
Figure 60 : Tumeur pancréatique orthotopique.....	126
Figure 61 : Tumeur pancréatique orthotopique à un stade très précoce.....	126
Figure 62 : Image photoacoustique d'une petite tumeur pancréatique.....	127
Figure 63 : Image photoacoustique d'une tumeur pancréatique plus avancée.....	128
Figure 64 : Image photoacoustique OxyHemo et HemoMeaZure sur Mia-PaCa2.....	128
Figure 65 : Méthode de mesure du differential Targeted Enhancement dTE.....	134
Figure 66 : Méthodes de mesures des volumes tumoraux H460.....	135
Figure 67 : Régression non linéaire des données des tumeurs sous-cutanées H460.....	137
Figure 68 : Contrôle de la prise de greffe intra-bronchique.....	137
Figure 69 : Echographie sur poumon sain et poumon porteur de tumeur.....	139
Figure 70 : Evaluation des volumes tumoraux par TDM-X.....	140
Figure 71 : Régression non linéaire des données des tumeurs orthotopiques H460.....	141

Figure 72 : Imagerie de contraste et PA des tumeurs H460	142
Figure 73 : Imagerie moléculaire du VEGFR2 par échographie de contraste	143
Figure 74 : TDM-X avec et sans agent de contraste de tumeurs orthotopiques H460	145
Figure 75 : Organisation de la plateforme d'imagerie multimodale	151
Figure 76 : Dispositif d'illumination permettant l'imagerie de fluorescence	154
Figure 77 : Traitement des acquisitions de BLI	155
Figure 78 : Mise en œuvre de la plateforme	158
Figure 79 : Validation du marquage du cetuximab en fluorescence	160
Figure 80 : De la biophotonique à l'échographie et à la PA	161
Figure 81 : Evaluation de différents paramètres physiopathologiques	162
Figure 82 : Structure chimique de la molécule de MonoMéthyl Auristatine E	164
Figure 83 : Structure chimique de la Prodrogue 1	165
Figure 84 : Mécanisme de libération de la Prodrogue 1	166
Figure 85 : Structure chimique de la Prodrogue 2	167
Figure 86 : Mécanisme de libération de la Prodrogue 3	168
Figure 87 : Structure chimique de la Prodrogue 3	169
Figure 88 : Evolution du volume des tumeurs KB au cours du temps	172
Figure 89 : Suivi des poids des animaux au cours des traitements	173
Figure 90 : Courbe de survie des animaux porteurs de tumeurs KB	173
Figure 91 : Evolution des tumeurs KB au cours des traitements	174
Figure 92 : Analyse de la quantité relative de MMAE tumorale par HPLC/HRMS	175
Figure 93 : Paramètres mesurables en échographie de contraste non ciblé	176
Figure 94 : Imagerie multimodale sur le modèle de tumeurs KB	178
Figure 95 : Courbe de survie au cours de la DMT de la MMAE libre	180
Figure 96 : Suivi des poids des animaux au cours des traitements	180
Figure 97 : Courbe de survie au cours de la DMT de la Prodrogue 1	181
Figure 98 : Suivi des poids des animaux au cours des traitements	182
Figure 99 : Courbe de survie des animaux porteurs de tumeurs Mia-PaCa2	183
Figure 100 : Suivi des poids des animaux au cours des traitements	183
Figure 101 : Evolution des volumes tumoraux pancréatiques au cours de la DMT	183
Figure 102 : Evolution du volume des tumeurs Mia-PaCa2 au cours du temps	187
Figure 103 : Répartition des volumes tumoraux Mia-PaCa2 à J78	187
Figure 104 : Evolution des tumeurs Mia-PaCa2 au cours des traitements	188
Figure 105 : Suivi des poids des animaux au cours des traitements	189
Figure 106 : Imagerie multimodale sur le modèle de tumeurs Mia-PaCa2	190
Figure 107 : Evolution du volume des tumeurs Mia-PaCa2 au cours du temps	194

Figure 108 : Evolution des tumeurs Mia-PaCa2 au cours des traitements.....	194
Figure 109 : Courbe de survie des animaux porteurs de tumeurs Mia-PaCa2.....	195
Figure 110 : Evolution du volume des tumeurs MDA-MB-231 au cours du temps.....	197
Figure 111 : Répartition des volumes tumoraux Mia-PaCa2 à J48.....	198
Figure 112 : Evolution des tumeurs MDA-MB-231 au cours des traitements.....	198
Figure 113 : Suivi des poids des animaux au cours des traitements.....	199
Figure 114 : Imagerie multimodale sur le modèle de tumeurs MDA-MB-231.....	200
Figure 115 : Evolution du volume des tumeurs H460 au cours du temps.....	203
Figure 116 : Evolution des signaux BLI au cours des traitements.....	204
Figure 117 : Evaluation des signaux BLI à J48.....	205
Figure 118 : Suivi des poids des animaux au cours des traitements.....	205
Figure 119 : Imagerie de fluorescence d'un poumon inflammé.....	209
Figure 120 : Etude de la dose de LPS à utiliser.....	210
Figure 121 : Quantification des signaux NIRF pour validation des conditions.....	211
Figure 122 : Validation des conditions expérimentales.....	211
Figure 123 : Courbe de survie des animaux en fonction des conditions.....	212
Figure 124 : Tableau récapitulatif du nombre de décès des animaux.....	212
Figure 125 : Mesure du volume tumoral d'acquisitions TDM-X par une formule.....	217
Figure 126 : Suivi de la micro-biodistribution intra-tumorale.....	219
Figure 127 : Efficacité quantique de la caméra ORCA Flash 4.0 LT.....	220
Figure 128 : Cinétique de bioluminescence de métastases spontanées.....	222
Figure 129 : Imagerie multimodale sur le modèle de tumeurs H460.....	225
Figure 130 : Détection d'un ganglion sentinelle de cancer du sein.....	229
Figure 131 : Induction du modèle de ganglion sentinelle.....	234
Figure 132 : Détection par BLI des cellules Luc au niveau axillaire.....	235
Figure 133 : Détection des cellules au niveau axillaire par NIRF et BLI.....	237
Figure 134 : Spectre d'absorption de l'ICG.....	239
Figure 135 : Détection de l'ICG par PA au niveau axillaire.....	240
Figure 136 : Procédure de spectral unmixing sur un ganglion cervical.....	241
Figure 137 : Pic d'absorption de l'ICG au niveau du ganglion cervical.....	242
Figure 138 : Imagerie de fluorescence sur les ganglions axillaires.....	243
Figure 139 : Comparaison des signaux PA et NIRF de l'ICG.....	244
Figure 140 : Evaluation du quenching de fluorescence.....	248
Figure 141 : Ganglions brachiaux et axillaires.....	249
Figure 142 : Validation de la quantification de la BLI.....	249
Figure 143 : Imagerie de bioluminescence de ganglions envahis.....	250

Figure 144 : Imagerie NIRF <i>ex vivo</i> montrant l'invasion tumorale	251
Figure 145 : Composition du tripeptide RGD	253
Figure 146 : Expression d'intégrines en fonction de la pathologie cancéreuse	254
Figure 147 : Les différentes familles d'intégrines	255
Figure 148 : Test de compétition à la vitronectine	256
Figure 149 : Imagerie TEMP au radio-colloïdes de ^{99m} Tc des ganglions sentinelles	258
Figure 150 : Imagerie TEMP au radio-colloïdes de ^{99m} Tc des ganglions sentinelles	259
Figure 151 : Imagerie de fluorescence <i>ex vivo</i> d'une tumeur mammaire	261
Figure 152 : Imagerie de fluorescence <i>ex vivo</i> de ganglions envahis excisés	262
Figure 153 : Imagerie de fluorescence <i>ex vivo</i> de ganglions envahis excisés	263
Figure 154 : Imagerie de fluorescence <i>ex vivo</i> d'une tumeur utérine	264
Figure 155 : Image B-Mode d'une tumeur mammaire spontanée	266
Figure 156 : Visualisation B-Mode 3D d'une tumeur mammaire spontanée	266
Figure 157 : Image B-Mode d'une tumeur utérine spontanée	267
Figure 158 : Image B-Mode de ganglions excisés	268
Figure 159 : Image PA du ganglion excisé n°1	269
Figure 160 : Image PA du ganglion excisé n°3	269
Figure 161 : Imagerie multi-modale sur un modèle SC de chondrosarcome	273
Figure 162 : Imagerie multi-modale sur un modèle orthotopique de chondrosarcome	274
Figure 163 : Image PA d'un modèle orthotopique de rétinoblastome	276
Figure 164 : Image Doppler d'un modèle orthotopique de rétinoblastome	277
Figure 165 : Imagerie de contraste d'un modèle orthotopique de rétinoblastome	277
Figure 166 : Coupe histologique de l'œil tumoral	278
Figure 167 : Image B-Mode d'un fœtus de rat	282
Figure 168 : Image PA d'un fœtus de rat en fonction de l'oxygénation	283
Figure 169 : Changements de la SO ₂ au niveau de l'unité fœtoplacentaire	283
Figure 170 : Courbes ajustées correspondant aux changements de la SO ₂	284
Figure 171 : Diagramme en boîte montrant le ΔSO ₂ moyen	284
Figure 172 : Tableau récapitulatif de l'analyse quantitative de la SO ₂	285

Liste des Annexes

Annexe 1 : Sollicitations orales, posters et articles	346
Annexe 2 : Considérations éthiques	353
Annexe 3 : Précisions sur le « Spectral Unmixing » en NIRF	355
Annexe 4 : « Spectral Unmixing » en PA	356
Annexe 5 : Immuno-marquage fluorescent du pimonidazole	359
Annexe 6 : Précisions sur le « Binning » en imagerie optique	361
Annexe 7 : Article PloS ONE, Raes et al. (2016)	362
Annexe 8 : Article soumis, Renoux, Raes et al. (2016)	370
Annexe 9 : Référentiel de prise en charge du Ganglion Sentinelle	377
Annexe 10 : Article soumis, Badiane, Raes et al. (2016)	378
Annexe 11 : Article soumis, Voissière et al. (2016)	382
Annexe 12 : Article soumis, Arthuis et al. (2016)	384

Introduction

Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération anarchique de cellules tumorales au sein d'un organe, puis à distance lors de la formation de métastases. Il existe plus de 100 types de cancers différents qui sont souvent nommés en fonction des organes ou des tissus où se forment les tumeurs. Les cancers peuvent être décrits par le type de cellules impliquées, comme les cellules épithéliales ou squameuses, mais sont également classés en fonction de leurs particularités moléculaires par la mise en évidence grâce à des biopsies et à des analyses histologiques de la présence ou de l'absence de certains biomarqueurs. Les caractéristiques moléculaires des cancers obtenues par ces bilans font partie de l'arbre décisionnel pour la technique d'imagerie à utiliser, et l'imagerie peut elle-même contribuer à la caractérisation moléculaire des cancers, apportant ainsi des informations quant aux décisions prises sur le choix d'un futur traitement. Les cancers font partie des causes majeures de mortalité dans le monde. En 2012, il y a eu 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés aux cancers ^[1]. On estime que le nombre de nouveaux cas de cancer par an va progresser jusqu'à 22 millions au cours des 20 prochaines années. Plus de 60% des nouveaux cas de cancers apparaissent en Afrique, Asie, Amérique centrale et en Amérique du sud, et 70% des décès liés aux cancers surviennent également dans ces régions.

Les cellules cancéreuses diffèrent des cellules normales de nombreuses manières, ce qui leur permet de croître et devenir invasives sans aucun contrôle. Une caractéristique importante est que les cellules cancéreuses sont moins spécialisées que les cellules normales. Autrement dit, alors que les cellules normales se différencient en types cellulaires très distincts avec des fonctions spécifiques, les cellules cancéreuses ne le font pas. C'est une des raisons pour lesquelles les cellules cancéreuses continuent de se diviser sans s'arrêter ^[2]. De plus, elles sont capables d'ignorer les signaux qui normalement dictent aux cellules saines l'arrêt de leurs divisions ou leur entrée dans un processus de mort cellulaire programmée, ou apoptose, que les organismes utilisent pour se débarrasser des cellules inutiles. Les cellules tumorales sont capables d'influencer leur microenvironnement, comme les cellules normales, les molécules et les vaisseaux environnants pour se nourrir ^[3]. Par exemple, les cellules cancéreuses peuvent induire, par des cellules normales voisines, la formation de vaisseaux sanguins qui alimenteront les tumeurs avec de l'oxygène et les nutriments dont elles ont besoin pour croître. Les cellules cancéreuses sont également capables d'échapper au système immunitaire, un réseau d'organes, de tissus et de cellules spécialisées qui protège le corps contre les infections. Bien que le système immunitaire élimine habituellement les cellules

endommagées ou anormales du corps, certaines cellules cancéreuses sont capables de se « masquer » vis-à-vis du système immunitaire et peuvent aussi l'utiliser afin de survivre et croître.

La recherche fondamentale en biologie des cancers est souvent vue comme à « haut risque », en partie parce que les applications cliniques d'un projet de recherche donné ne sont pas forcément évidentes lorsque le projet est initié. Cependant, les connaissances acquises à partir d'études sur la biologie des cellules cancéreuses améliorent non seulement notre compréhension de la maladie, mais elles sont aussi essentielles pour le développement de nouvelles thérapeutiques qui profiteront aux patients.

Au cours des dernières décennies, les découvertes et les innovations thérapeutiques ont connu un essor important dans le domaine biomédical. Depuis 2002, le NIH (National Institute of Health) a entamé un processus de rationalisation pour la recherche afin d'identifier les déficits et les opportunités de la recherche biomédicale. La recherche translationnelle a notamment permis un changement radical dans la façon dont la science a évolué depuis des dizaines d'années. Dans le but d'améliorer la santé humaine, les découvertes scientifiques doivent déboucher, via des programmes de R&D, vers des applications cliniques, en mettant à profit cette recherche translationnelle, qui se définit comme le chaînon manquant entre recherche fondamentale et recherche clinique ^[4,5]. De telles découvertes commencent typiquement par des travaux de recherche fondamentale (« from bench »), où les scientifiques étudient des maladies au niveau moléculaire, pour enfin aboutir au niveau clinique, au lit du patient (« to bedside »). La recherche translationnelle a pour objectif de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la pertinence d'hypothèses biologiques, de nouvelles méthodes pour le diagnostic, ou de prévenir le risque de cancer, ou encore de déterminer les bases biologiques d'une observation faite en clinique, en développant les applications médicales à partir des connaissances les plus récentes. Cette recherche translationnelle, pour être efficace, doit nécessairement se développer en prenant en compte, dès le départ, les défis cliniques, afin de permettre un transfert rapide de la recherche vers le patient. Cet échange bidirectionnel continu a pour conséquence une amélioration du dialogue entre fundamentalistes et cliniciens : de la recherche vers le patient, et du patient vers la recherche (recherche translationnelle inverse) ^[6,7]. On a donc d'une part l'orientation de la recherche fondamentale vers des problèmes pertinents au regard de la clinique, et d'autre part, l'accès efficace des cliniciens aux avancées les plus récemment acquises dans les

laboratoires. Le but de la recherche translationnelle est donc d'assurer, dans un contexte pluridisciplinaire orienté vers un but précis, que les découvertes les plus importantes et les plus prometteuses soient identifiées et aillent plus loin dans le processus de développement grâce à une transition régulière et continue entre recherche translationnelle en amont et essais cliniques en finalité.

En permettant des études longitudinales avec un suivi au cours du temps de l'évolution d'une pathologie chez le même animal, l'imagerie non-invasive permet d'améliorer la pertinence des résultats. En effet, chaque animal peut être considéré comme son propre contrôle, réduisant ainsi les sources de variabilités expérimentales. De plus, étant donné qu'un seul animal fournit des informations à différents temps, un plus petit nombre d'animaux est requis pour obtenir des résultats statistiquement suffisants. Cette pratique permet une réduction des coûts de recherche et des temps nécessaires pour atteindre les conclusions escomptées. Grâce à ces avantages, l'imagerie préclinique peut considérablement accélérer la découverte de nouveaux médicaments en permettant des tests rapides d'agents d'imagerie, et de médicaments, et peut aussi contribuer à la confirmation des hypothèses de recherche. En utilisant l'animal comme « modèle d'étude » pour l'évaluation préclinique *in vivo* de l'efficacité de traitements, de la sensibilité et de la spécificité de certains ciblage, ou encore de la biodistribution, l'imagerie *in vivo* s'inscrit parfaitement dans le cadre de la législation actuelle, qui vise à épargner la vie d'animaux en respectant la règle des 3R de l'expérimentation animale (Remplacement, Réduction et Raffinement) énoncée par Russel et Burch en 1959 [8,9]. L'imagerie préclinique pour l'innovation thérapeutique chez la souris se décline en deux axes majeurs qui sont l'imagerie de modèles conventionnels, ainsi que l'imagerie de modèles transgéniques. Des avantages similaires peuvent être trouvés lors de l'imagerie de modèles animaux génétiquement modifiés, afin de dépister des phénotypes correspondants à des pathologies humaines, conduisant à des études mécanistiques plus prédictives de l'efficacité de certaines thérapies dans la perspective du futur passage en clinique. L'imagerie joue en effet un rôle important dans l'identification et la comparaison de différents phénotypes de maladies humaines, et peut accélérer les observations traditionnelles, ainsi que les tests biologiques et analyses moléculaires à réaliser. Dans ce contexte, le développement de modèles murins transgéniques de pathologies humaines requiert des explorations de phénotypage des animaux pour lesquels l'imagerie constitue une ressource non-invasive et non-destructrice incontournable.

Grâce à l'évolution de la démarche médicale, l'imagerie dédiée initialement au diagnostic et au bilan d'extension, s'est orientée également vers une démarche d'évaluation et de suivi, plus ou moins précoce des pathologies en cours de traitement. Cette démarche a permis d'apporter aux cliniciens de nouveaux moyens pour adapter les schémas thérapeutiques, et permettra d'aller vers une médecine personnalisée. C'est ainsi que grâce à la recherche translationnelle, l'imagerie préclinique s'est imposée dans les mentalités et a permis des échanges importants entre le domaine médical appliqué et la recherche fondamentale, et de fournir de nouvelles pistes d'explorations. Devant l'intérêt de l'imagerie préclinique, les innovations aussi bien technologiques et méthodologiques, que les innovations pour le développement de nouvelles modalités d'imagerie ont émergé. L'imagerie *in vivo* sert donc de cadre commun pour l'observation des animaux et des humains, donnant un pont entre recherche biomédicale et amélioration de la santé humaine. En utilisant l'expérience acquise sur les modèles animaux, les technologies d'imagerie développées pour l'évaluation de médicaments chez la souris peuvent aussi bien être translatées chez l'Homme. De la même manière, les modalités les plus efficaces testées chez la souris peuvent être utilisées à des fins diagnostiques chez l'Humain sans ajouter de coûts de développements technologiques significatifs supplémentaires.

En général, la plupart des techniques diagnostiques qui sont utilisées en routine en clinique ont des équivalents pour la recherche préclinique, qui incluent la tomodensitométrie X (TDM-X, autrement dit le « scanner »), la tomographie d'émission de positons (TEP), la tomographie d'émission mono-photonique (TEMP), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'échographie. La TDM-X, l'IRM et l'échographie sont des modalités qui permettent d'obtenir des informations anatomiques, mais également d'obtenir des données fonctionnelles et moléculaires, grâce à l'utilisation de protocoles particuliers (en IRM), d'agents de contrastes et de sondes d'imagerie moléculaire. Les imageries TEP et TEMP sont des imageries fonctionnelles et moléculaires exclusivement.

Issue de l'imagerie médicale, l'imagerie du petit animal a donc connu au cours des 15 dernières années des développements considérables pour offrir des appareils permettant, chez des animaux aussi petits que des souris de 20g, de réaliser des examens de performances quasi identiques à ceux pratiqués chez l'Homme. Plusieurs modalités d'imagerie fonctionnelles et moléculaires ont été développées plus particulièrement pour le petit animal comme l'imagerie optique (imagerie de bioluminescente (BLI) et de fluorescence dans le proche infrarouge (Near InfraRed Fluorescence, NIRF), microscopie intravitale...) et l'imagerie photoacoustique (PA). L'imagerie *in vivo* s'est donc imposée de plus en plus comme une stratégie incontournable pour l'innovation biopharmaceutique.

Après cette phase de développements technologiques menés par les laboratoires de recherche en imagerie et les industriels, la TDM-X, l'IRM, l'échographie, la PA, la TEMP et la TEP complétées par la BLI et la NIRF *in vivo* sont désormais disponibles avec un statut d'outils exploitables par les biologistes pour la recherche biomédicale et le développement de nouveaux médicaments. Les points importants à considérer lors de l'utilisation des ressources d'imagerie sont l'exploitation en multimodalité, le stockage de données pouvant atteindre le téraoctet, le strict respect du statut sanitaire des animaux en cours d'examen, ainsi que l'assurance qualité incluant la définition de procédures de contrôle qualité représentatives des conditions d'exploitation et celle des systèmes informatiques. Pour l'évaluation préclinique, une technique d'imagerie doit avoir une résolution spatiale adaptée pour l'étude de petits animaux (entre 10 et 100µm jusqu'au millimètre, pour les imageries dites anatomiques) et une sensibilité suffisante pour détecter des événements biochimiques tels que de petits changements cliniquement pertinents au cours du temps. Chaque technique d'imagerie possède aussi ses avantages et ses limites, le choix de la modalité d'imagerie, ou la combinaison de techniques qui seront mis en œuvre étant déterminés par une question biologique spécifique. Généralement, les techniques d'imagerie sont plus complémentaires que concurrentes. Par conséquent, de nombreux systèmes hybrides qui combinent deux modalités (une imagerie anatomique et une imagerie fonctionnelle/moléculaire), ou plus, sont disponibles commercialement. Les logiciels de reconstruction et les algorithmes ont également subi des développements pour permettre ces acquisitions multimodales avec recadrage et superpositions anatomiques des images (« co-registation »).

L'imagerie moléculaire tend à prendre une place de plus en plus importante en imagerie *in vivo* tant médicale que préclinique [10,11]. On trouve plusieurs définitions dans la littérature du terme « imagerie moléculaire » qui a été positionnée au début du 21^{ème} siècle comme une discipline au carrefour entre la biologie moléculaire et l'imagerie *in vivo*. Elle est définie comme la visualisation, la caractérisation et la quantification de processus biologiques aux niveaux cellulaire et moléculaire chez les organismes vivants. A l'aide des procédures d'imagerie moléculaire, les voies moléculaires et cellulaires et les mécanismes pathologiques peuvent être étudiés dans leur environnement physiologique, dans le but d'identifier leur origine et leur régulation, et les processus associés conduisant à une maladie constituée. C'est un concept très novateur qui est différent de l'imagerie diagnostique classique, où les découvertes documentées montrent principalement l'effet final des altérations moléculaires. Les technologies d'imagerie moléculaire évoluent

actuellement dans le but de fournir des “biopsies en temps réel” ou de véritables signatures biologiques pour le diagnostic instantané, le suivi thérapeutique et la médecine personnalisée [12]. Les outils de diagnostic, permettant d'identifier les anomalies moléculaires spécifiques dans les tumeurs, sont également importants dans un contexte de médecine de précision.

Le développement technologique des systèmes d'imagerie compte beaucoup sur l'imagerie du petit animal *in vivo* en cancérologie pour étudier la faisabilité de la conception de sondes d'imagerie, et la possibilité de l'intensification de l'utilisation en routine chez l'Humain [13]. Les stratégies sélectionnées pour l'imagerie du petit animal en cancérologie dépendent souvent du but expérimental, qui peut être :

- La détection de la tumeur primaire et celle des métastases
- La détection de tumeurs à des stades pré-néoplasiques ou la détection de tumeurs plus évoluées, à des stades tardifs, ainsi que la compréhension des processus impliqués dans la métastase
- Les mesures quantitatives concernant la délivrance effective d'agents thérapeutiques au niveau des cibles pathologiques
- Le suivi de cellules ou de molécules pour la visualisation de leur biodistribution

Ces facteurs dictent le choix de la résolution, de la vitesse d'acquisition, de la quantification, du rapport signal sur bruit et de l'agent de contraste à utiliser par les chercheurs. Le défi pour que de nouvelles thérapies puissent émerger est gigantesque. La réduction de temps et de coût pour la « drug discovery » moderne et le développement de médicament est nécessaire. Un élément important pour accélérer la « drug discovery » et les procédés de développement associés, reste l'identification rapide de candidats médicaments par opposition aux substances incapables d'interagir avec les cibles, avant que des sommes colossales soient investies.

Nous savons que la recherche, dans le domaine du médicament, est un processus long. Entre l'identification de la cible jusqu'à la mise sur le marché d'une molécule, il peut s'écouler de nombreuses années (10 ans environ) avec des études pour lesquelles l'imagerie est fortement contributive depuis la sélection des molécules « leads » et les études mécanistiques jusqu'aux phases de preuve d'efficacité (Figure 1). En ce qui concerne les molécules anti-cancéreuses, le développement des médicaments peut parfois être plus rapide. S'ils ont démontré une efficacité préclinique et/ou clinique remarquable, dans une indication où les traitements actuels sont très limités (trop toxiques ou pas efficaces), ils peuvent bénéficier d'un processus de développement accéléré,

associé à un environnement économique favorable, afin que cette nouvelle thérapie soit disponible pour tous plus rapidement que par le processus de mise sur le marché classique [14]. On parle alors de médicament orphelin (« Orphan Drug »).

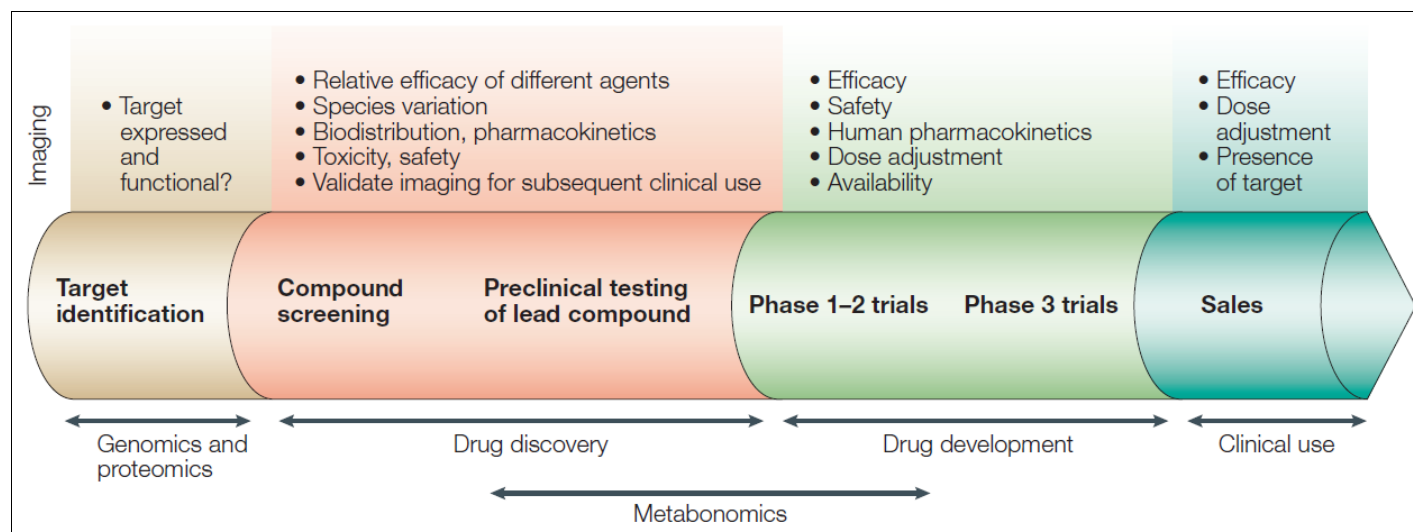


Figure 1 : Processus de développement d'un médicament incluant l'intervention potentielle de l'imagerie fonctionnelle et moléculaire (d'après [15]).

En complétant par des sondes d'imagerie moléculaire les tests diagnostiques conventionnels d'imagerie, les chercheurs déterminent de plus en plus l'expression de marqueurs moléculaires à différents stades de la maladie [16]. Avec l'arrivée de nouvelles sondes, de nouvelles méthodes et de nouveaux appareils d'imagerie dédiés, les processus de développement pharmaceutique sont significativement accélérés. La convergence des innovations a permis la création de méthodes de mesure plus précises, plus sensibles et associées à de meilleures résolutions chez les organismes vivants, particulièrement chez le petit animal. C'est pourquoi l'imagerie moléculaire préclinique devrait constituer un apport significatif pour un large secteur d'activité de découvertes comme la biologie des cibles thérapeutiques, le criblage de composés, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie, l'évaluation de l'efficacité des traitements chez les animaux modèles, la mise en évidence de cibles moléculaires tumorales, l'étude du métabolisme et du microenvironnement tumoral ou encore éventuellement les essais cliniques.

Cependant, les étapes de développement de sondes d'imagerie et de traceurs sont un processus multi-étapes complexe, qui nécessite des validations *in vitro* et *in vivo*, puis chez l'animal avant que leurs tests soient possibles chez l'Homme. La Figure 2 présente les différentes étapes du développement de sondes d'imagerie moléculaire, quel que soit

le type d'imagerie considérée. Le développement de ces sondes est nécessairement pluridisciplinaire puisqu'il fait appel à la chimie, la biologie, la physique, l'informatique et la médecine.

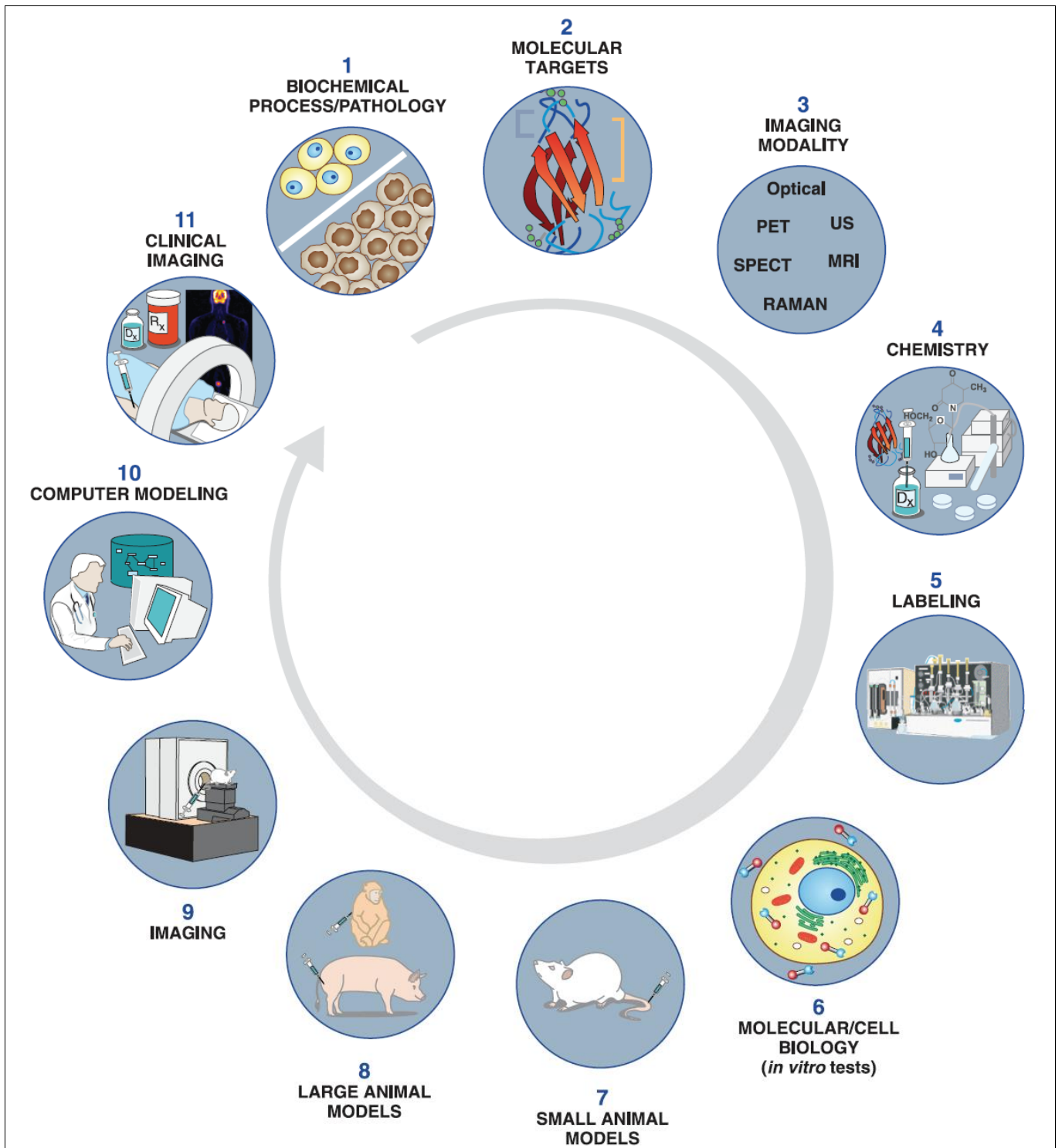


Figure 2 : Processus de développement de sondes d'imagerie moléculaire (d'après [17]).

L'adaptation des thérapies à la spécificité de chaque cancer augmente le besoin en modèles expérimentaux pour réaliser les premières évaluations de traitements ou d'agents biologiques [18,19]. Des progrès significatifs ont été faits ces dernières années dans le domaine de l'imagerie de modèles tumoraux (principalement chez la souris). Il est donc possible d'envisager des questions pertinentes concernant les traitements antitumoraux et le rôle des voies moléculaires impliquées chez l'animal, qui ne peuvent pas l'être directement chez les sujets humains. Le développement de nouvelles techniques d'imagerie via de nouveaux traceurs et systèmes rapporteurs permet donc des mesures spécifiques, hautement sensibles et quantitatives sur un large panel de paramètres tumoraux [20].

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s'intéresse à l'imagerie photoacoustique couplée à l'échographie et à la fluorescence infrarouge, en recherche préclinique translationnelle. L'imagerie photoacoustique est une modalité récente exploitée encore presque exclusivement en recherche préclinique (même si quelques essais cliniques viennent d'être lancés très récemment). Cette technologie en pleine expansion fournit des informations morphologiques, fonctionnelles et moléculaires qui peuvent être comparées en temps réel avec les données échographiques correspondantes. Le principe de cette modalité sera abordé dans la suite du manuscrit. Ce travail s'articule en trois thématiques principales qui sont détaillées ci-après.

Dans un premier temps, une revue bibliographique sur l'hypoxie tumorale sera présentée. Nous montrerons les implications de l'hypoxie lors du développement de la pathologie cancéreuse, ainsi que les méthodes qui permettent de la mesurer, notamment les approches par imagerie. Nous développerons ensuite les démarches expérimentales mises en œuvre au laboratoire pour démontrer son apparition et suivre son évolution à l'aide de développements méthodologiques dans des modèles représentatifs de la pathologie tumorale.

Dans un second temps, nous nous intéresserons au développement d'une plateforme d'imagerie multimodale, permettant une confrontation conjointe des données de bioluminescence, de fluorescence infrarouge ainsi que celles obtenues par imagerie photoacoustique et échographique. Nous détaillerons les avantages et les limitations des approches multimodales pour le suivi du développement de tumeurs et de l'hypoxie tumorale, faisant suite à leur validation préalable. Nous présenterons ensuite la mise en œuvre de l'imagerie multimodalité pour le développement de prodrogues thérapeutiques, permettant ainsi de confronter des données d'hypoxie tumorale avec des données de prolifération tumorale, de vascularisation et d'expression de biomarqueurs, essentielles à

la compréhension du phénomène pathologique. L'évaluation *in vivo* du mécanisme de libération de ces prodrogues, sur un modèle tumoral validé grâce à des *données in vitro* précédemment acquises, permettra d'identifier la prodrogue ayant le potentiel thérapeutique le plus important. Par la suite, nous nous pencherons plus particulièrement sur l'évaluation de l'efficacité de cette prodrogue d'intérêt innovante par imagerie multimodalité dans différents modèles précliniques orthotopiques de cancers sélectionnés pour leur pertinence vis-à-vis des situations cliniques, notamment par leur caractéristique de chimiorésistance due à la présence d'hypoxie. Ces investigations se poursuivront par l'évaluation d'un risque potentiel associé au mécanisme de libération de cette prodrogue dans un modèle préclinique d'inflammation pulmonaire aigu.

Enfin, la dernière partie de ce travail proposera un aperçu de la contribution de l'imagerie photoacoustique dans différents projets expérimentaux, notamment concernant la thématique du ganglion sentinelle dans un modèle d'invasion contrôlée. Cette approche translationnelle mettra en évidence les mesures possibles *in vivo* de paramètres inaccessibles par d'autres techniques, pour proposer une nouvelle stratégie de détection et de quantification de la charge tumorale présente dans un ganglion envahi.

Considérations éthiques :

Toutes les études sur animaux ont été réalisées en accord avec les référentiels européens en matière d'éthique (Directive Européenne 2010/63/EU) et ont été approuvées par le comité d'éthique Régional (Comité d'Éthique en expérimentation animale Campus CNRS d'Orléans C2EA-03). Chacune des saisines ayant été validée pour la réalisation des procédures présentées tout au long de ce travail de thèse a été reportée en Annexe 2.

Partie 1

L'hypoxie tumorale

1. L'HYPOXIE TUMORALE

SECTION BIBLIOGRAPHIQUE :

1.1. Phénoménologie de l'hypoxie tumorale

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

1.1.1. Biologie

Le statut d'oxygénation des tumeurs est déterminé par la consommation des cellules tumorales et par l'apport en oxygène (O_2) via la vascularisation. L'oxygénation tumorale est aussi influencée par une variété de propriétés vasculaires comme la densité des vaisseaux fonctionnels, le volume sanguin tumoral, le débit sanguin, la saturation en oxygène du sang (SO_2), la pression partielle en oxygène (PO_2) tissulaire et la vitesse de diffusion de l' O_2 à l'intérieur de la tumeur. La PO_2 sanguine est un paramètre qui caractérise la quantité d' O_2 au niveau du compartiment vasculaire et dont l'un des reflets est la SO_2 . La PO_2 et SO_2 sanguine conditionnent la diffusibilité de l'oxygène aux organes et varient en fonction de la consommation en O_2 de ces organes. La PO_2 cellulaire et tissulaire reflète, elle, la teneur en oxygène effectivement présent dans ces cellules et tissus. Chez l'homme, la PO_2 moyennée entre les tissus et le sang se situe entre 35 et 40mmHg, et la SO_2 moyennée entre les compartiments sanguins artériels et veineux est d'environ 65%. L'hypoxie tumorale correspond à une PO_2 tissulaire inférieure à 10mmHg.

Les tumeurs subissent de multiples altérations métaboliques pour s'adapter à leur microenvironnement. Une des altérations les plus importantes est l'adaptation à l'hypoxie. Les tumeurs, comme les tissus sains, ont besoin d'un apport en oxygène et en nutriments pour maintenir une croissance cellulaire. Cependant, à cause d'une prolifération rapide et incontrôlée, le taux de consommation en oxygène est plus important que les apports, ce qui crée un phénomène d'hypoxie [21,22].

D'un côté, la multiplication rapide des cellules tumorales entraîne leur éloignement progressif des vaisseaux sanguins et donc une baisse progressive de l'oxygène utilisable. Les cellules privées d'oxygène voient alors leur métabolisme se ralentir et une exposition prolongée en condition hypoxique peut conduire à la mort cellulaire (nécrose). D'un autre côté, l'hypoxie tend à activer des mécanismes de défense qui induisent un caractère agressif dans les tumeurs. Ce phénomène altère la progression tumorale en augmentant l'angiogenèse et les besoins en glucose.

Dans un environnement pauvre en oxygène, les cellules hypoxiques passent facilement d'une respiration aérobie à la glycolyse anaérobie, ce qui augmente leur consommation en glucose et la production de pyruvate. Ces cellules peuvent alors continuer à fonctionner en utilisant cette voie métabolique, même si les conditions d'oxygénation revenaient à la normale. On parle d'effet Warburg [23]. Nous pouvons distinguer 3 types d'hypoxie différents, chacun causé par un certain nombre de facteurs qui sont en majorité liés au statut perfusionnel des tumeurs :

- L'hypoxie chronique, qui est le résultat d'une augmentation de la distance entre les vaisseaux sanguins et le tissu, ne permettant plus une bonne diffusion de l'oxygène (Figure 3). Ce phénomène apparaît lorsque la tumeur croît rapidement, et que le besoin en O₂ est trop important. Les cellules situées à environ 80µm des vaisseaux sanguins voient leur apport en O₂ diminué, et plus cette distance augmente, plus l'hypoxie sera importante. De plus, les sens de circulation dans le réseau de micro-vaisseaux associés à un endothélium moins fonctionnel exacerbent ce processus [24] (Figure 4).
- L'hypoxie anémique, résultant d'une réduction des capacités de transport de l'O₂. Différentes études indiquent que la capacité de transport de l'oxygène pour les tumeurs est réduite. Un taux d'hémoglobine en dessous du seuil normal chez un individu pourrait contribuer à l'hypoxie tumorale. Cet effet est d'autant plus intense quand l'hypoxie anémique est associée à un taux de perfusion diminué de la tumeur [24,25].
- L'hypoxie aiguë, qui est causée par un flux sanguin insuffisant vers les tissus (Figure 1). En raison d'une prolifération rapide et d'une néo-angiogenèse perturbée, la micro-vascularisation tumorale devient structurellement et fonctionnellement anormale. Nous pouvons retrouver des défauts d'organisation du réseau vasculaire, des défauts de régularité des fenestrations au niveau de l'endothélium, des dilatations ou encore des vaisseaux allongés et tortueux. Ces facteurs combinés

provoquent une diminution de la pression intravasculaire, ce qui empêche le sang d'arriver correctement à l'intérieur de la tumeur. Au final, cela engendre donc une hypoxie liée à la perfusion, conduisant elle-même à une hypoxie ischémique transitoire [24].

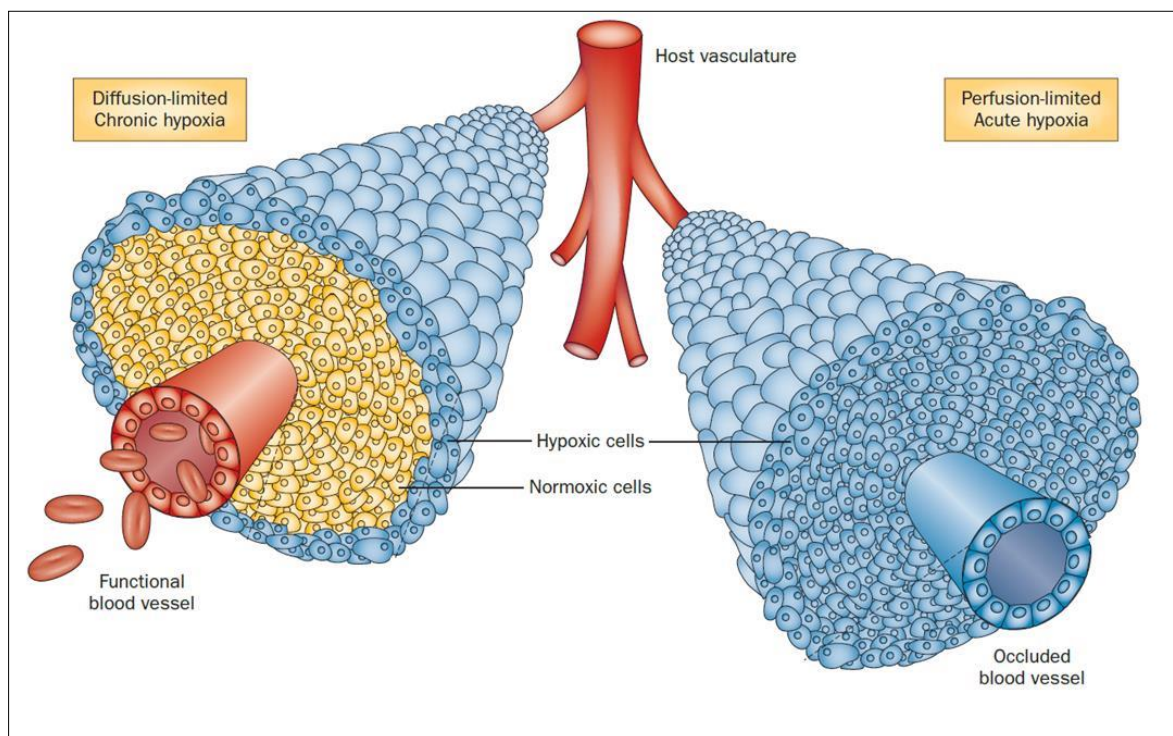


Figure 3 : Représentation de deux types d'hypoxie différents : l'hypoxie chronique à gauche et l'hypoxie aiguë à droite. (d'après [26]).

A noter que dans les années 1980, une autre notion d'hypoxie a été suggérée, il s'agit de « l'hypoxie cyclique » [27]. Ce terme indique que ce processus est dynamique [28,29]. La cinétique de l'hypoxie cyclique est complexe, incluant des cycles de temps allant de quelques cycles par heures à quelques cycles par jours, où l'oxygénation de la tumeur va fluctuer entre hypoxie sévère et hypoxie légère. Les caractéristiques spatiales de l'hypoxie cyclique concernent les réseaux de micro-vaisseaux plutôt que les micro-vaisseaux isolés. Elle peut impliquer des grandes régions tumorales ou des régions plus disséminées, et elle a été à l'origine du développement de stratégies d'administration des chimiothérapies basées sur la chronobiologie de ce phénomène. Une des conséquences de l'hypoxie cyclique qui a été démontrée, est l'augmentation du potentiel métastatique des cellules tumorales qui sont sujettes à des périodes d'hypoxie suivies de périodes de ré-oxygénations [30].

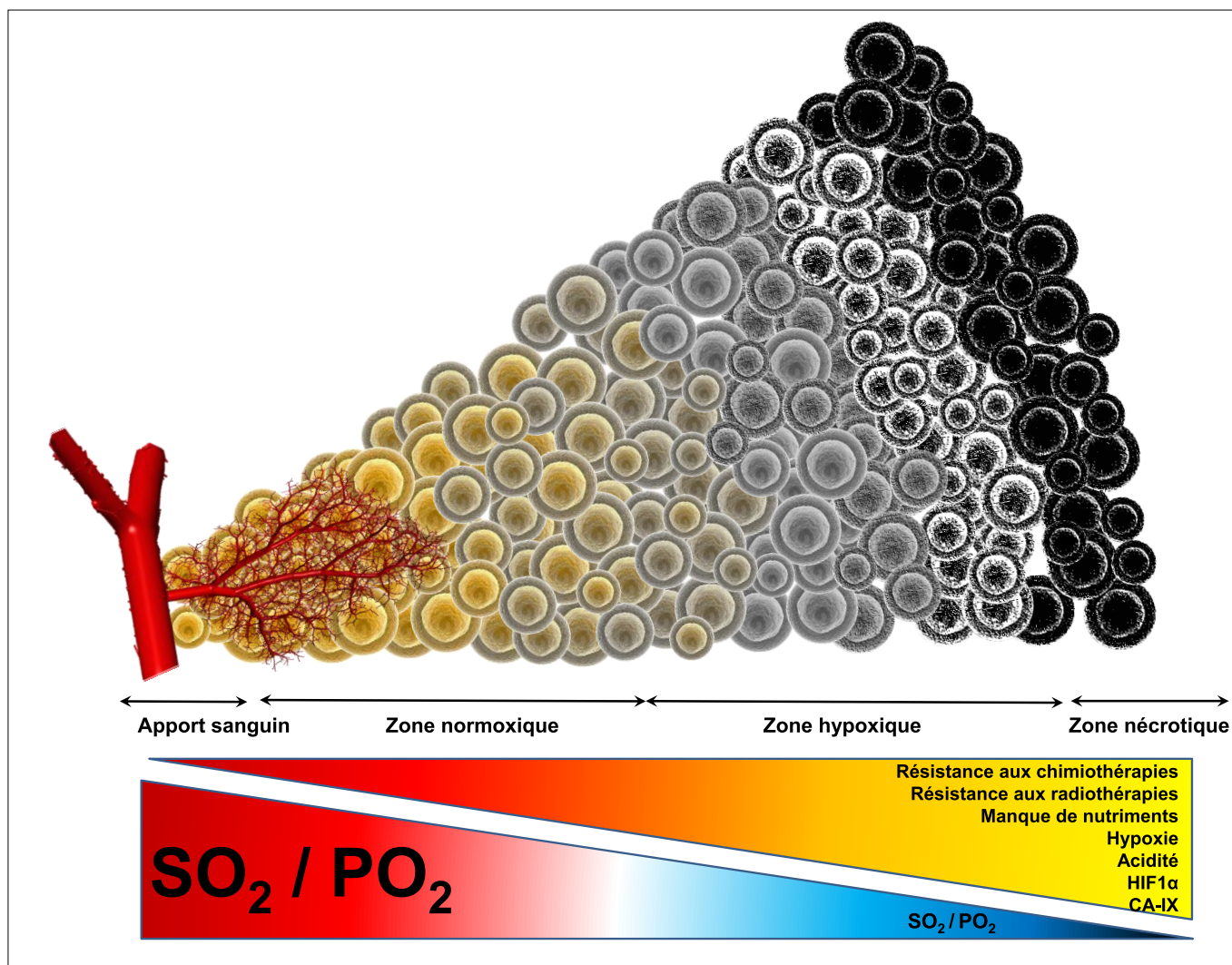


Figure 4 : Hypoxie du point de vue de la diffusion de l'O₂ à travers le tissu tumoral (CIPA 2016).

De plus, nous savons que les traitements cytotoxiques et par radiothérapie modifient brutalement le statut perfusionnel tumoral ainsi que les gradients d'oxygénation préexistants. C'est ainsi qu'il est observé des phénomènes hypoxiques transitoires post traitement à cause de la perturbation du métabolisme des cellules et de leur apport en nutriments.

Les marqueurs endogènes de l'hypoxie :

- HIF1α :

Les cellules tumorales s'adaptent pour survivre et croître en conditions hypoxiques grâce aux effets du facteur de transcription HIF1α (Hypoxia Inducible Factors α). Celui-ci est dégradé en permanence dans les tissus normoxiques (Figure 5). En conditions hypoxiques, HIF1α déclenche des processus moléculaires multiples qui stimulent la croissance de la tumeur, la prolifération et le potentiel métastatique. Les mécanismes de

croissance et de survie, tels que l'angiogenèse, via le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), la régulation du pH par l'intermédiaire de l'anhydrase carbonique IX (CA-IX) et le métabolisme, via le transporteur de glucose (GLUT-1), sont surexprimés en réponse à l'hypoxie [31]. Les facteurs de transcription, qui contrôlent la prolifération cellulaire, la survie cellulaire par l'intermédiaire du facteur nucléaire kappa des cellules B activées (NF-kB), et l'apoptose, par l'intermédiaire des activateurs de la transcription (STAT3, p53), sont également rehaussés dans les cellules tumorales hypoxiques. Dans le cas des cellules tumorales, HIF1 α possède un récepteur modifié qui permet sa liaison à un facteur de suppression tumorale (le facteur von Hippel-Lindau, VHL), ce qui empêche sa dégradation. HIF1 α est donc modifié et se lie à des éléments de réponses spécifiques de l'hypoxie. La modulation résultant de cette liaison entraîne une stimulation de l'expression du VEGF et de l'EPO (Erythropoïétine). Cette augmentation de l'expression de facteur est une réponse de sauvegarde, mais qui devient délétère en privilégiant la croissance tumorale [32].

- L'Anhydrase Carbonique IX (CA-IX) :

La CA-IX, est une enzyme qui catalyse la transformation réversible entre l'anion bicarbonate et le CO₂. Son expression est élevée lorsque la PO₂ est en dessous de 20mmHg [33,34]. En accord avec sa fonction de modulateur de pH tissulaire, la CA-IX joue un rôle dans l'acidité tumorale, spécialement lors de conditions hypoxiques, ce qui peut nuire à l'efficacité de certains médicaments. Des forts taux d'expression de CA-IX ont été trouvés pour certains types de cancers. L'expression de la CA-IX semble également être liée avec une moindre survie des patients lors de la prise en charge du cancer, et semblerait donc être un facteur de pronostic négatif. Toutefois, le rôle de l'expression de CA-IX est encore mal compris et semble être très complexe.

- Le transporteur de glucose GLUT-1 :

Le transporteur de glucose GLUT-1 est une protéine membranaire qui facilite la translocation du glucose à travers les membranes cellulaires. A cause de l'intensification de la glycolyse sous des conditions hypoxiques, ce transporteur est surexprimé pour satisfaire la consommation des cellules hypoxiques. De nombreux types de tumeurs présentent des niveaux élevés de GLUT-1 [35], et sa surexpression est retrouvée majoritairement dans les cancers de la tête et du cou et de l'utérus [36,37]. L'expression de ce transporteur est responsable de la faible réponse aux traitements sur les cancers de la tête et du cou et les cancers de la vessie [38,39].

- L'ostéopontine :

L'ostéopontine fait partie de la famille des glycoprotéines se liant aux intégrines. C'est une glycoprotéine acide phosphorylée qui se lie à certaines intégrines via son motif RGD (cf 3.1.3). Elle est exprimée dans différents types cellulaires comme les cellules endothéliales pour le remodelage vasculaire. L'ostéopontine est surexprimée sous des conditions hypoxiques via l'activation d'*Akt* et la stimulation de *ras* [40] (qui sont des protéines kinase intervenant dans la régulation, la différenciation et la survie cellulaire, favorisant ainsi la transformation en cellules cancéreuses).

L'hypoxie tumorale est de plus en plus considérée comme un biomarqueur de progression tumorale [22], de malignité [41], et de réponse aux thérapies [42,43]. De plus, l'hypoxie est bien définie comme un stimulus pouvant permettre l'activation de prodrogues [44] ou une cible pour les thérapies géniques visant à réguler l'hypoxie [45].

Nous savons également que les cellules hypoxiques se divisent peu [46]. Les tumeurs hypoxiques sont connues pour être plus agressives, résistantes aux traitements (du fait de l'activation de gènes impliquant une diminution de la sensibilité aux thérapies) et plus en capacité de dissémination métastatique plus importante [21,47-49]. C'est pourquoi évaluer le statut d'oxygénation des tumeurs dans leur microenvironnement et pouvoir réaliser une imagerie *in vivo* de l'oxygénation serait primordial, car cela renseignerait ainsi sur le pronostic des patients.

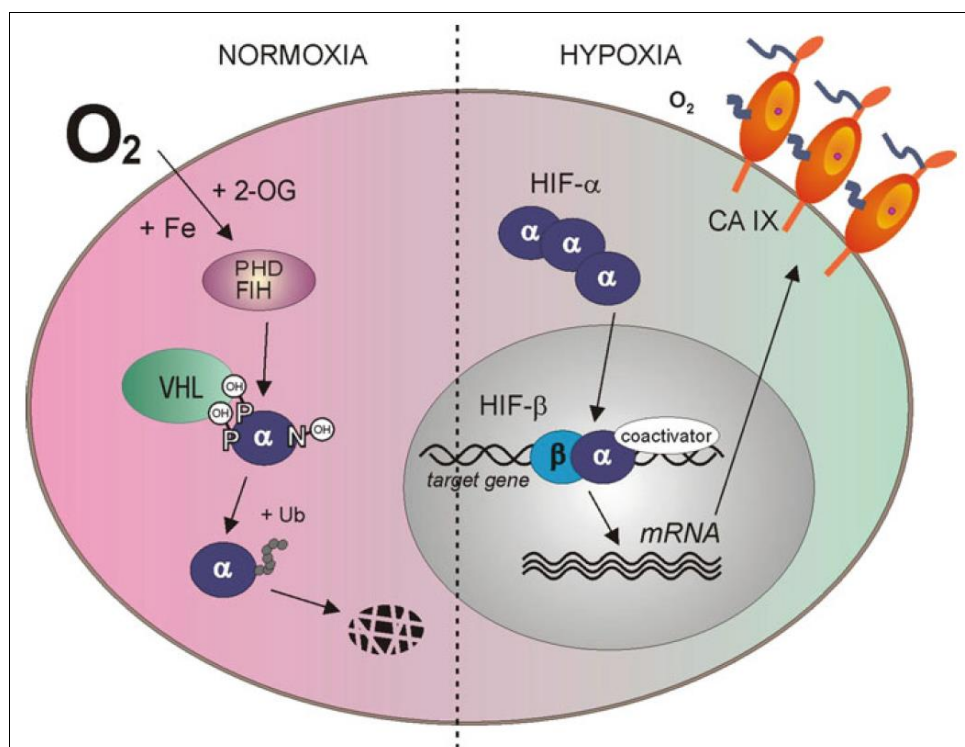


Figure 5 : Mécanisme de l'activation transcriptionnelle de gènes cibles médiée par HIF1. (d'après [50]).

1.1.2. Traitements radio-sensibilisateurs et ciblant l'hypoxie

Dans cette catégorie de traitements, nous retrouvons les radio-sensibilisateurs ainsi que les prodrogues ciblant l'hypoxie tumorale (Hypoxia Activated Prodrugs, HAP). Les radio-sensibilisateurs sont utilisés en association avec une radiothérapie, afin d'en potentialiser son effet. Le mécanisme de la radio-sensibilisation induite par les molécules d'intérêt (très électrophiles) réside dans leur mimétisme avec l'O₂ radicalaire lors d'une irradiation, interagissant ainsi avec les molécules provenant de la radiolyse de l'eau, rendant par la suite ces cellules radio-sensibles. Les HAP, elles, ciblent le proche-environnement hypoxique de la tumeur afin de ne mettre en contact les composés cytotoxiques qu'à cet endroit précis. Nous retrouvons ainsi :

Nimorazole :

Le nimorazole appartient à la classe des 5-Nitroimidazoles et agit comme un radio-sensibilisateur. Il a été utilisé dans de nombreuses phases cliniques pour le traitement des cancers de la tête et du cou par radiothérapie ^[51].

Tirapazamine :

Le tirapazamine (TPZ) est un N-Oxide aromatique développé initialement dans les années 1980. Il est réduit par des réductases (tels que le cytochrome P450) pour générer des espèces radicalaires, qui en absence d'O₂, conduisent à créer des dommages au niveau de l'ADN ^[52]. La sélectivité de la molécule pour l'hypoxie a été montrée sur de nombreuses lignées cellulaires, ainsi que dans différentes études *in vivo*, démontrant son efficacité en combinaison avec de la radiothérapie et de la chimiothérapie par cisplatine sur des xénogreffes de tumeurs humaines ^[53].

Evofofamide :

L'evofofamide (TH-302) est un composé à base de 2-Nitroimidazole conjugué à une moutarde bromo-isophosphoramine ^[54]. Le 2-Nitroimidazole contenu dans ce composé agit comme un détecteur de concentration en O₂ ^[55] Il a été montré que son efficacité est plus importante en condition hypoxique que normoxique ^[54,56,57]. Ce composé cible également les cellules tumorales hypoxiques dans des modèles de xénogreffes de tumeurs *in vivo* ^[58]. Cette prodrogue est actuellement en cours d'essais cliniques et est développée en combinaison avec un test compagnon permettant d'inclure les patients dans les études. Ce test compagnon est par ailleurs un marqueur développé pour

l'imagerie de l'hypoxie par Tomographie d'Emission de Positons TEP (¹⁸F-HX4) et sera détaillé au paragraphe 1.2.1.2.

Tarloxotinib :

Le tarloxotinib (TH-4000) est une HAP actuellement évaluée en phase clinique. Elle libère un inhibiteur de tyrosine-kinase du récepteur du facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) en condition hypoxique, améliorant ainsi la sélectivité et permettant de contourner certaines des toxicités existantes liées à l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine-kinase. Des études précliniques ont montré son efficacité sur des tumeurs pulmonaires [59,60]. TH-4000 est actuellement en phase II pour le traitement de cancer du poumon, de la tête et du cou et du mélanome.

Apaziquone :

L'apaziquone (EO9) est une indolequinone dérivée de la mitomycine C, initialement synthétisée en 1987. Cette molécule est réduite par des oxydoréductases (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réductase, NADPH réductase) pour créer des dommages sur l'ADN en conditions normoxiques et hypoxiques. L'activation de la NADPH réductase détermine la capacité de la molécule à cibler les cellules hypoxiques. EO9 est également considérée comme une HAP, mais seulement au niveau des cellules qui présentent la NADPH réductase en faible quantité [61,62]. De multiples essais cliniques de phase I, II et III ont été lancés avec ce composé pour le traitement de différents types de tumeurs, mais les effets n'ont pas été significatifs, probablement dûs à son utilisation seule, par rapport aux autres HAP [63-65].

Banoxantrone :

Le banoxantrone (AQ4N) est un N-oxide aliphatique métabolisé par le cytochrome P450 et par la NO synthase inductible en AQ4, qui est un inhibiteur de topoisomérase II [66,67]. L'activation de cette molécule se fait non-seulement au niveau des cellules tumorales hypoxiques, mais également au niveau des macrophages associés aux tumeurs. L'AQ4 inhibe l'activité de la topoisomérase des cellules hypoxiques lorsqu'elles essaient de ré-entrer en cycle cellulaire. Cette molécule a montré des effets antitumoraux dans des modèles précliniques de cancers, en combinaison avec de la radiothérapie [68,69]. Des études ont également montré le potentiel anti-métastatique de ce composé en ciblant les lésions hypoxiques présentes au niveau ganglionnaire [70]. L'AQ4N possède également des propriétés antiangiogéniques sous des conditions normoxiques, en ciblant

l'endothélium cellulaire [71]. Il a également été testé dans des phases cliniques en combinaison avec la radiothérapie [72-74].

PR-104 :

Le PR-104 est une pré-prodrogue nitro-aromatique, qui est hydrolysée par les phosphatases présentes dans la circulation sanguine en PR-104A, puis métabolisée en PR-104H et PR-104M, ces deux derniers métabolites provoquant des liaisons d'ADN inter-brins (empêchant la réplication et la transcription des cellules). Le PR-104 peut cibler aussi bien les cellules tumorales normales que les cellules hypoxiques. Des études plus récentes ont montré que le PR-104 était actif sur les régions hypoxiques de cancers du sein triple-négatifs [75]. Ce composé est actuellement en cours d'essais cliniques pour le traitement de différents types de leucémies [76]. Il posséderait également un effet sur les niches hypoxiques de la moelle osseuse présentes dans les cas de leucémies, et sera évalué prochainement en clinique.

Synthèse-conclusion :

Les HAP de classe I (tirapazamine, N-Oxides) sont actives sous conditions relativement hypoxiques. En revanche, les HAP de classe II (nitro-composés, TH-302, PR-104) sont activées sous des conditions hypoxiques extrêmes et ont des molécules effectrices relativement stables qui peuvent diffuser des cellules cibles (cellules hypoxiques) vers les cellules voisines, favorisant un effet « bystander » [77,78]. L'effet bystander correspond au phénomène par lequel les dommages causés aux cellules se répercutent sur les cellules voisines, sans qu'elles aient été en contact direct avec le composé cytotoxique.

Il y a un besoin important de technologies permettant le diagnostic du statut hypoxique des tumeurs, car cela conditionne le développement clinique des thérapies basées sur l'hypoxie.

L'évaluation de l'hypoxie tumorale est très précieuse pour les radiothérapeutes, les chirurgiens et les oncologues pour leurs pratiques quotidiennes. Mais cette évaluation est aussi très importante pour les entreprises pharmaceutiques et biotechnologiques qui développent des stratégies de traitements basées sur l'hypoxie. De nombreuses études cliniques ont montré que la plupart des tumeurs solides, quel que soit leur site d'origine, présentent des régions hypoxiques [79].

Les traitements ciblés de l'hypoxie permettent une amélioration du contrôle local de la tumeur et une amélioration de la survie des patients. De nombreuses nouvelles thérapies ciblant l'hypoxie, de plus en plus prometteuses, voient le jour, ce qui donne de bons espoirs quant aux traitements de ces tumeurs particulièrement résistantes aux thérapies conventionnelles.

1.1.3. Méthodes de mesures des paramètres d'oxygénation

1.1.3.1. Pression partielle en Oxygène PO₂

1.1.3.1.1. Oxymétrie par fluorescence

L'oxymétrie par fluorescence est basée sur le principe de « quenching » (cf 1.2.4.1) de la fluorescence du ruthénium en présence d'oxygène [80,81]. Les sondes sont des fibres optiques au bout desquelles est inséré un cône de ruthénium (un fluorochrome). Une lumière excitatrice permet d'exciter le cône de ruthénium. En présence d'O₂, la fluorescence diminue du fait du quenching de la fluorescence du ruthénium par l'O₂. La fluorescence du ruthénium est donc inversement proportionnelle à la pression partielle en O₂ présente au bout de la sonde [38]. Cette mesure peut être réalisée par un appareil commercial, l'OxyLite™ (Oxford Optronix). C'est une technique qui ne consomme pas d'O₂ et qui permet des mesures en temps réel rapide de la PO₂. Elle est considérée comme une technique de référence, pour la validation d'autres techniques de mesures de l'oxygénation (les sondes étant compatibles avec les champs magnétiques présents dans les imageurs IRM, ainsi qu'avec des explorations par échographie et photoacoustique). Le diamètre des fibres optiques étant faible (220µm), l'OxyLite™ permet une exploration minimalement invasive et a été utilisé pour mesurer des PO₂ au niveau de tumeurs hépatiques, et cérébrales [39]. Les inconvénients de cette technique sont sa sensibilité aux mouvements, son caractère invasif et l'incapacité de pouvoir réaliser des mesures répétées au même endroit au cours du temps.

Néanmoins, de nombreuses équipes utilisent l'OxyLite™ pour l'obtention d'informations sur l'oxygénation tumorale dans des modèles précliniques [82-86]. C'est la technique que nous avons utilisée pour nos études de validation, qui seront détaillées au paragraphe 1.3.1.

1.1.3.1.2. Electrodes à Oxygène

Cette technique de mesure de la PO₂ est basée sur la mesure du courant se formant entre une anode et une cathode (électrode polarographique), après ionisation de l'O₂ (mesure du courant électrique résultant de la réduction électrochimique de l'O₂ à la cathode). La

PO₂ ainsi obtenue est proportionnelle au courant mesuré à la cathode. La microélectrode Eppendorf™, commercialement disponible, a été très largement utilisée pour des mesures d'oxygénation *in vivo* [87]. Cette électrode a été utilisée pour mesurer la PO₂ dans différents types de tumeurs [88-90]. Typiquement, plus d'une centaine de mesures sont générées dans les régions tumorales accessibles, fournissant un aperçu du statut hypoxique de la tumeur. Les inconvénients de cette technique sont la consommation d'oxygène pour pouvoir réaliser la mesure, le faible rapport signal sur bruit, et l'impossibilité de faire des mesures répétées à cause de sa nature invasive. L'utilisation de cette technique est également réservée à des utilisateurs expérimentés et les variabilités inter-opérateurs sont grandes.

1.1.3.1.3. Résonance paramagnétique électronique (RPE)

Mesurer l'oxygénation tissulaire via la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) revient à étudier les atomes dotés d'électrons non-appariés. Les concepts de RPE sont les mêmes que ceux de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), sauf que ce sont les spins des électrons qui sont excités à la place des spins des noyaux atomiques. Le paramagnétisme de l'oxygène moléculaire vient du fait qu'il possède deux électrons non-appariés, ce qui permet d'obtenir un spectre RPE de l'O₂ gazeux (l'O₂ dissout étant pratiquement indétectable à cause de sa raie de résonance trop large).

L'oxymétrie RPE est une technique qui peut fournir des mesures répétées de moyennes de PO₂ tumorales avec de faibles perturbations du microenvironnement, et a été très largement utilisée pour des mesures de PO₂ chez des animaux modèles [91-93]. Il est également possible de mesurer la PO₂ de manière indirecte par RPE, en s'intéressant à la réaction d'un agent de contraste paramagnétique administré dans le tissu d'intérêt. La technique communément employée évalue l'élargissement de la raie de résonance (liée au T2, cf. paragraphe 1.2.3.) du produit injecté (qui est paramagnétique) en fonction de la PO₂. Les produits de contraste peuvent être solubles, ou sous forme particulières. On retrouve par exemple les radicaux triaryl-methyl solubles, ainsi que les particules insolubles de phtalocyanine de lithium, ayant chacun des caractéristiques propres vis-à-vis de la PO₂. Les agents de contraste paramagnétiques solubles peuvent être injectés par voie intraveineuse (IV), tandis que les particules sont administrées localement, sous forme d'injections intra-tumorales.

Le spectre RPE reflète donc la pression partielle en O₂ à la surface des agrégats des substances paramagnétiques et permet des mesures de PO₂. Un gradient de champ magnétique est utilisé pour séparer le spectre RPE des agents de contraste présents dans

les tissus pour déterminer la PO₂ du tissu. Une oxymétrie RPE multi-site utilisant des gradients de champ magnétique permet d'élargir les applications *in vivo* en réalisant des mesures de PO₂ simultanée sur plusieurs sites dans un tissu d'intérêt [94,95]. Bien que ne fournissant pas de données d'imagerie, cette méthode est intéressante, peu chère et permet d'obtenir des mesures répétées et relativement non-invasives de la PO₂ au cours du temps. Elle ne permet pas de localisation spatiale de la mesure, mais n'est pas limitée par la profondeur du tissu d'intérêt.

1.1.3.1.4. Spectroscopie RMN du ¹⁹F

Cette technique met en œuvre des sondes moléculaires perfluorées pour quantifier les concentrations d'oxygène tissulaire avec une très haute sensibilité [96]. Ces mesures sont possibles du fait de l'existence d'une relation linéaire entre la PO₂ et le taux de relaxation T1 des sondes perfluorées [97]. Une étude récente a montré une utilisation exploratoire de la spectroscopie de ¹⁹F pour détecter les tissus hypoxiques chez des patients, en utilisant le SR4554, une sonde fluorée à base de 2-Nitroimidazole [98]. Une quantité plus importante d'atomes de fluor pourrait augmenter la sensibilité de cette technique, mais des tests de confirmation sont encore nécessaires.

1.1.3.1.5. Oxymétrie de Phosphorescence

La mesure de l'oxygène par oxymétrie de phosphorescence nécessite l'injection d'un composé phosphorescent dans la circulation sanguine et la mesure des changements induits par l'oxygène au cours du temps de vie de phosphorescence [99,100]. Un guide lumineux est utilisé pour focaliser la lumière excitatrice à partir de la surface du tissu, qui est ensuite détecté par un phosphorimètre. Cette technique a été utilisée *in vivo* [101,102], mais le développement des sondes est toujours en cours. Le phosphorimètre utilise des photomultiplicateurs pour mesurer le signal de phosphorescence, et obtenir les temps de vie, et les amplitudes de la sonde phosphorescente injectée. Les données obtenues avec cette technique fournissent des histogrammes de PO₂ sur la région analysée. L'oxymétrie de phosphorescence a été utilisée pour étudier la distribution de l'oxygène dans la vascularisation et au niveau de tumeurs chez la souris [103,104]. Un avantage de cette technique est son caractère non-invasif, permettant des mesures répétées. Un des inconvénients de cette technique est dû à la nécessité d'injecter un produit phosphorescent en IV.

Récemment, l'insertion de molécules phosphorescentes embarquées à l'intérieur d'une aiguille a permis de réaliser des mesures d'oxygénation à la surface des tissus cérébraux et des tumeurs accessibles [81,105,106].

1.1.3.2. Saturation de l'hémoglobine en Oxygène SO_2

1.1.3.2.1. Oxymétrie de pouls

L'oxymétrie de pouls permet une mesure indirecte de la saturation de l'hémoglobine sanguine qui est très bien adaptée aux mesures de la SO_2 en clinique humaine. C'est une technique non-invasive basée sur l'absorption différentielle de lumière rouge et infrarouge par l'Hémoglobine désoxygénée (Hb) et l'Hb oxygénée [107]. Le rapport des absorptions de la lumière est converti en ratio d'Hb et d'Hb oxygénée. L'oxymètre de pouls est un appareil qui possède des diodes, l'une émettant dans le rouge, l'autre dans l'infrarouge, associées à un photodétecteur. L'inconvénient pour les mesures d'oxygénation tumorale est que ces oxymètres dédiés aux mesures de SO_2 au niveau des extrémités (doigts, orteils, lobes d'oreilles), ne permettent pas d'explorer les tumeurs internes.

1.1.3.2.2. Spectroscopie dans le proche infrarouge (NIRS)

La spectroscopie dans le proche infrarouge est une technique non-invasive et très résolutive permettant de mesurer la SO_2 en temps réel [108,109]. Elle utilise la différence d'absorption optique de l'Hb et l'Hb oxygénée existant dans le proche infrarouge. Cette technique ne permet pas de mesurer directement la PO_2 , mais fournit des informations de SO_2 sur le versant vasculaire. Elle souffre d'un inconvénient majeur qui est la faible profondeur d'action, limitée à moins de 1mm.

1.1.3.2.3. Imagerie hyperspectrale (HIS)

L'imagerie hyperspectrale (HIS) est basée sur des analyses de la réflectance, qui est rétrodiffusée et modifiée spectralement par le tissu, afin d'obtenir la SO_2 sanguine [110]. Le principe de fonctionnement est similaire à celui de la spectroscopie proche infrarouge, mais les données sont collectées à partir de plusieurs longueurs d'onde. Cette technique a été utilisée pour mesurer la SO_2 de tumeurs chez la souris et également la SO_2 tissulaire chez l'Homme [111,112]. Les inconvénients majeurs de cette technique reposent sur le manque de précision, la complexité d'analyse des données et l'impossibilité de réaliser des mesures directes de l'oxygénation.

1.1.3.3. Etude indirecte de l'oxygénation tissulaire

1.1.3.3.1. Pimonidazole

Le pimonidazole est un marqueur exogène de l'hypoxie, dérivé du 2-Nitroimidazole. Le pimonidazole a tout d'abord été développé comme un agent radio-sensibilisateur pour une amélioration d'efficacité par rapport au misonidazole ^[113], mais il a échoué au cours des essais cliniques, ne démontrant pas son efficacité ^[114]. Ce composé forme des adduits avec les protéines réduites. Il est possible d'administrer ce composé par voie orale ou par injection intraveineuse quelques heures avant la biopsie. La détection de l'hypoxie au niveau des tissus est basée sur la mise en évidence par immuno-histochimie des adduits protéiques formés entre le pimonidazole et les protéines réduites, par des anticorps en utilisant des kits commerciaux. Ce procédé a été utilisé pour des études de validation qui seront détaillées au paragraphe 1.3.2.

1.1.3.3.2. Etanidazole pentaFluoré EF5

L'EF5 (etanidazole pentafluoré) est un dérivé 2-Nitroimidazole exogène. C'est un biomarqueur qui est caractérisé par sa distribution rapide *in vivo* à travers les tissus grâce à son caractère lipophile ^[115]. Il est administré aux patient 24-48H avant la biopsie tumorale ou la résection chirurgicale complète ^[116].

La quantification des niveaux d'oxygène sur les tissus marqués à l'EF5 est réalisée en calculant un indice de fixation d'EF5 dans le tissu d'intérêt par rapport à la fixation maximale observée sur la coupe, après immuno-marquage fluorescent du composé. Cette méthode est appelée Cube Reference Binding (CRB). Le pourcentage de liaison de l'EF5 est ensuite comparé à une échelle préétablie de PO₂, ce qui permet des estimations de PO₂ comprises entre 0,75 et 75mmHg ^[116-118]. Un indice CRB de 100% correspond à une anoxie (0mmHg), tandis qu'un indice de 1% correspond à la PO₂ physiologique (76mmHg).

1.2. Imagerie de l'hypoxie tumorale : Etat de l'art

Dans cette revue bibliographique, seules les applications d'imagerie permettant de mesurer des paramètres d'oxygénation seront détaillées. Les autres types d'applications en recherche biomédicale et en pratique clinique courante seront rapidement évoqués en fin de chacun des paragraphes.

1.2.1. Imagerie TEP

1.2.1.1. Principe

La Tomographie d'Emission de Positons (TEP) est une technique d'imagerie scintigraphique fonctionnelle et moléculaire utilisée en médecine nucléaire. Elle est basée sur l'utilisation d'un traceur marqué par un radio-isotope émetteur de positon donc émettant un rayonnement β^+ . Ce positon, va alors s'annihiler avec un électron pour donner simultanément 2 photons gamma (γ) de 511keV dans des directions opposées (180°).

La détection des photons est réalisée en coïncidence. Cela revient à comptabiliser le nombre d'annihilations intervenues sur une ligne de coïncidence traversant cet objet en joignant deux détecteurs diamétralement opposés. Chaque détecteur élémentaire est réparti sur une couronne fixe. Les détecteurs sont composés d'un cristal scintillateur ainsi que d'un photomultiplicateur qui transforme l'énergie des photons γ en signal électrique. Dans les imageurs TEP, il n'y a pas de rotation des détecteurs autour du sujet, la couronne de détecteurs étant fixe (Figure 6).

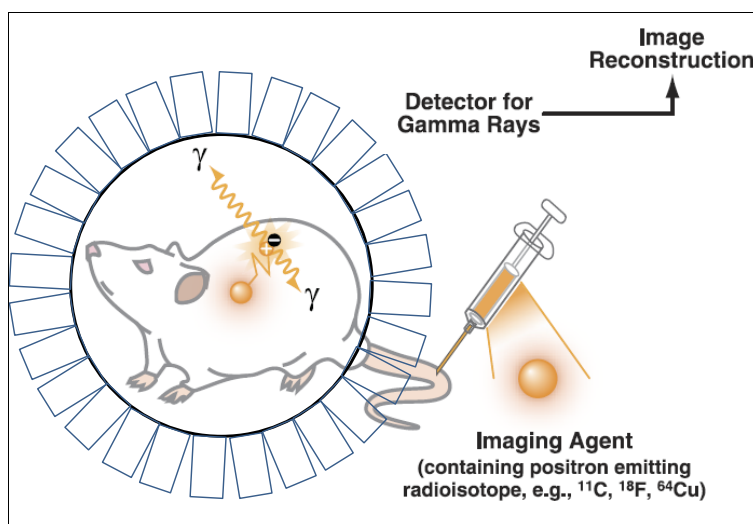


Figure 6 : Principe de l'imagerie TEP. (d'après [16]).

1.2.1.2. Applications

L'imagerie de l'hypoxie en TEP est une technique non-invasive qui utilise des radio-traceurs pour mettre en évidence des territoires hypoxiques. Ces traceurs sont injectés par voie IV, puis après un temps de diffusion du traceur, les images sont acquises. Comme la plupart des modalités d'imagerie *in vivo*, cette approche permet de réaliser des mesures répétées au cours du temps.

Parmi les émetteurs β^+ utilisés comme traceurs radioactifs en TEP, on retrouve le ^{18}F ($T_{1/2} = 1,83\text{H}$), le ^{11}C ($T_{1/2} = 20,4\text{min}$), l' ^{124}I ($T_{1/2} = 4,18\text{J}$), le ^{64}Cu ($T_{1/2} = 12,7\text{H}$), le ^{13}N ($T_{1/2} = 9,97\text{min}$), le ^{89}Zr ($T_{1/2} = 78,4\text{H}$), ou encore l' ^{15}O ($T_{1/2} = 2,04\text{min}$).

Les principaux traceurs TEP utilisés pour l'imagerie de l'hypoxie sont les suivants :

^{18}F -MISO :

Le ^{18}F -FluoroMISONidazole ou ^{18}F -MISO est un composé de la famille des Nitroimidazoles inspiré des radio-sensibilisateurs de la même famille (pimonidazole et misonidazole).

Le ^{18}F -MISO est le traceur prédominant utilisé pour détecter l'hypoxie en TEP [119]. Grâce à son caractère lipophile, la pénétration intracellulaire et l'accumulation du ^{18}F -MISO dans les cellules hypoxiques est rapide (environ 4H), et le temps d'élimination par les cellules normoxiques s'effectue dans les 30 minutes suivant son injection.

Des études précliniques ont démontré la relation inversement proportionnelle existant entre le ^{18}F -MISO et les valeurs de PO_2 [120]. Une étude clinique a suggéré qu'une imagerie précoce au ^{18}F -MISO fournit des informations pronostiques liées à la réoxygénation tumorale [121].

Cependant, des variabilités dans les examens ont par exemple été montrées chez le même patient qui a subi 3 imageries consécutives [122]. Cette accumulation variable du traceur pourrait compliquer la décision à prendre concernant le schéma thérapeutique de radiothérapie sur les zones hypoxiques intra-tumorales.

Connaissant les caractéristiques du ^{18}F -MISO pour l'imagerie, d'autres radio-traceurs à base de 2-Nitroimidazole ont été développés afin d'optimiser l'imagerie de l'hypoxie.

^{18}F -HX4 :

Le ^{18}F -flortanidazole, aussi connu sous le nom ^{18}F -HX4 est également un radio-traceur dérivé du 2-Nitroimidazole, possédant une meilleure solubilité et une meilleure clairance. Contrairement au ^{18}F -MISO, ce composé est plus hydrophile. Sa biodistribution est caractérisée par une diminution de son accumulation au niveau cérébral et cardiaque [123], mais également au niveau gastro-intestinal, permettant d'imager la région abdominale. De plus sa clairance est plus rapide, ce qui permettrait de réaliser les examens d'imagerie plus précocement.

L'accumulation *in vivo* du ^{18}F -HX4 a été corrélée avec un immuno-marquage du pimonidazole chez le rongeur, montrant la relation existant entre l'hypoxie et l'accumulation du traceur [124].

De plus, son accumulation dans différents types de tumeurs est très reproductible, avec une meilleure sensibilité et spécificité que le ^{18}F -MISO [124-126].

Ce traceur est actuellement évalué en essai clinique, comme test compagnon d'une prodrogue activable en condition hypoxique (cf. paragraphe 1.1.2.) [125].

^{18}F -FAZA:

Le ^{18}F -FluoroAZomycinArabinofuranoside (^{18}F -FAZA) est un radio-traceur hydrophile contenant du ribose, et possédant des caractéristiques de clairance et de ciblage améliorées. Des études précliniques ont montré qu'il diffuse et est éliminé plus rapidement que le ^{18}F -MISO [127,128], et que son accumulation est bien corrélée avec un marquage au pimonidazole [83,129,130]. Des études cliniques ont démonté la faisabilité de déterminer le statut hypoxique des tumeurs pour inclure des patients dans des protocoles de traitement à base de radio-sensibilisateurs et de radiothérapie [131-133].

^{124}I -IAZA :

Le ^{124}I -IAZA correspond au ^{124}I -IodoAZomycinArabinoside. C'est l'analogue du ^{18}F -FAZA marqué avec de l'iode 124 (^{124}I). Des études menées sur un modèle de carcinome épidermoïde chez la souris ont montré que le ^{18}F -FAZA possédait un meilleur rapport tumeur/bruit que le ^{18}F -MISO et le ^{124}I -IAZA, et que le rapport tumeur/bruit du ^{124}I -IAZA était augmenté avec le temps. Ces résultats ont probablement contribué à abandonner ce radiotraceur.

^{18}F -EF5 :

Le ^{18}F -pentaFluorinated Etanidazole (^{18}F -EF5) est l'analogue du marqueur exogène de l'hypoxie EF5 marqué au ^{18}F . Ce radio-traceur est très lipophile et possède de nombreux atomes de fluor [142]. Son caractère lipophile lui permet de diffuser rapidement et de manière homogène dans tous les tissus. L'accumulation du ^{18}F -EF5 a été montrée comme faible dans des modèles de tumeurs normoxiques chez les rongeurs, par rapport à son accumulation importante dans les tumeurs hypoxiques [134]. De plus, la différence d'hypoxie entre différents types de tumeurs a pu être mise en évidence avec le ^{18}F -EF5 [135].

Des études cliniques sur le ^{18}F -EF5 ont été menées, montrant l'accumulation du traceur dans les zones hypoxiques de tumeurs de la tête et du cou, ainsi que dans des glioblastomes [115,136].

^{18}F -EF3 :

Le ^{18}F -EF3 est un analogue de la même famille que l'EF5 marqué au ^{18}F . Une étude de phase I a été menée afin d'évaluer la pharmacocinétique et la biodistribution de ce composé, et a montré que le ^{18}F -EF3 était bien toléré et s'accumule bien au niveau des zones hypoxiques de tumeurs de la tête et du cou [137].

^{18}F -EF1 :

Le ^{18}F -EF1 est un analogue de la même famille que l'EF5 marqué au ^{18}F . L'imagerie de l'hypoxie de ce traceur a été évaluée dans des modèles de tumeurs chez le rat, mettant en évidence son fort potentiel pour marquer l'hypoxie tumorale [138].

^{18}F -FETINIM :

Le ^{18}F -FETNIM correspond au ^{18}F -fluoroerythronitroimidazole. Ce radio-traceur de la famille des azolés a été majoritairement étudié en phases cliniques, chez des patients présentant des tumeurs de la tête et du cou. Les données montrent que l'accumulation du ^{18}F -FETNIM est très variable et dépendante de la perfusion [139].

^{18}F -FETA :

Le ^{18}F -FETA correspond au ^{18}F -fluoroetanidazole, un autre radio-traceur de la famille des azolés. Des études précliniques sur ce traceur ont conclu qu'il possède des propriétés adéquates et est stable *in vivo*, s'accumulant au niveau des zones hypoxiques (en comparaison avec des mesures de PO_2) [140].

La Figure 7 présente les différentes structures moléculaires des traceurs TEP de la famille des azolés, montrant leurs similitudes de structure.

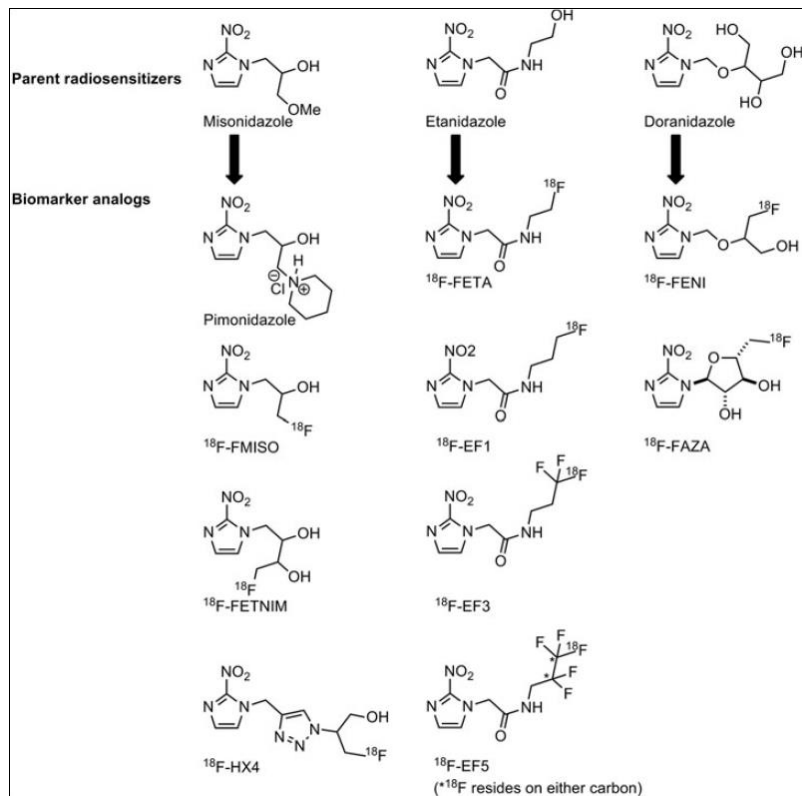


Figure 7 : Traceurs TEP de la famille des azolés. (d'après [141]).

[Cu]-ATSM :

Le [Cu]-(diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone)), connu sous le nom de Cu-ATSM, utilise les propriétés d'oxydation/réduction du cuivre pour sélectivement s'accumuler dans les tissus [142]. Il est possible de marquer l'ATSM avec différents isotopes du Cu, comme par exemple le ⁶⁴Cu, le ⁶²Cu ou encore le ⁶⁰Cu. Les deux avantages majeurs du Cu-ATSM par rapport aux dérivés 2-Nitroimidazole sont les temps possibles d'imagerie plus précoces (30 minutes après injection du radio-traceur [143]) et un meilleur rapport signal du traceur/bruit de fond.

Deux études précliniques menées sur le ⁶⁴Cu-ATSM et le ¹⁸F-FDG ont montré des distributions tumorales similaires [144,145], le ¹⁸F-FDG étant plus localisé au niveau des régions pré-nécrotiques.

Le ⁶⁰Cu-ATSM a permis d'identifier les patients répondeurs ou non, pour rentrer dans des protocoles thérapeutiques de radiothérapie avec ou sans chimiothérapie [146].

Le ⁶⁴Cu-ATSM, ayant la plus longue des demi-vies des émetteurs du cuivre, a également un bon potentiel pour imager l'hypoxie de tumeurs humaines [147].

¹⁸F-FDG :

Le ¹⁸F-FDG correspond au 18F-FluoroDésoxyGlocose.

Comme mentionné précédemment, les tumeurs malignes et hypoxiques présentent des taux élevés de transporteurs de glucose du fait de leur consommation accrue de glucose. Des équipes se sont intéressées à la mise en évidence des zones tumorales hypoxiques en fonction de leur consommation en glucose. Cependant cette mesure du métabolisme ne permet pas la distinction entre les cellules normoxiques et hypoxiques. C'est pourquoi les études qui ont été menées dans ce sens n'ont pas permis de mettre en évidence le lien entre hypoxie et accumulation de ¹⁸F-FDG [148-150].

A noter que l'¹⁵O peut être utilisé pour réaliser des mesures du métabolisme de l'oxygène au niveau cérébral (Cerebral Metabolic Rate of Oxygen, CMRO₂). Cette technique consiste en l'injection IV d'eau ou l'inhalation de CO₂, tous deux marqués à l'¹⁵O. Des études cliniques ont montré la corrélation existante entre le CRMO₂ et la fixation de ¹⁸F-MISO au niveau de régions cérébrales ischémiées [151]. La mesure du CMRO₂ est pour le moment réservée à l'exploration des ischémies cérébrales, et non à des pathologies tumorales. Une technique équivalente au CMRO₂ pourra probablement être utilisée pour évaluer le métabolisme de l'O₂ par les tumeurs. La très courte demie vie de l'¹⁵O rend ce type d'approche relativement complexe de mise en œuvre.

En cancérologie, la mesure de l'hypoxie par le ¹⁸F-FMISO ou le ¹⁸F-FAZA peut être accompagnée par des quantifications de flux sanguins et de volumes sanguins à l'¹⁵O [152,153], afin d'évaluer la perfusion tumorale simultanément. Ces données permettent d'extrapoler la perfusion sanguine à la quantité de chimiothérapies qui est délivrée aux tumeurs lors de l'évaluation de traitements anticancéreux, ou encore d'évaluer l'efficacité de traitements antiangiogéniques [154].

Synthèse-conclusion :

Les traceurs TEP ont largement été utilisés pour évaluer l'hypoxie tumorale, et ce depuis de nombreuses années (Figure 8). A l'exclusion du ¹⁸F-FDG, sous des conditions normoxiques, les cellules vont intégrer puis relarguer le radio-traceur, sans qu'il y ait d'accumulation intracellulaire.

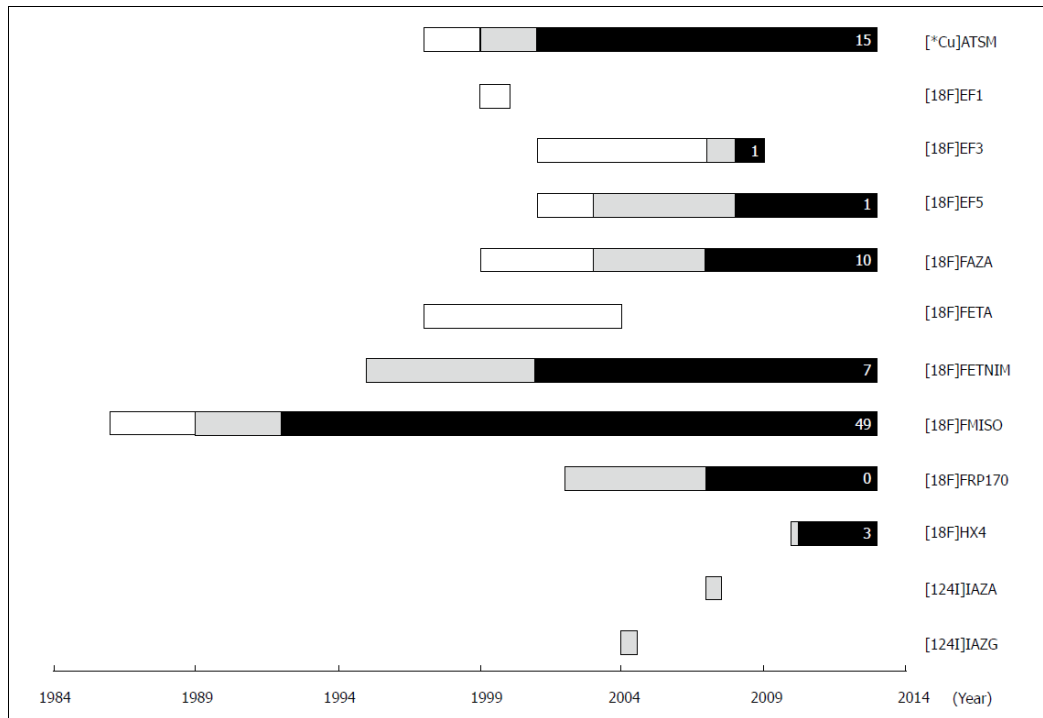


Figure 8 : Chronologie du développement et de l'évaluation des traceurs spécifiques de l'hypoxie évalués en imagerie TEP clinique ou préclinique. (Blanc = *in vitro* ; Gris = préclinique ; Noir = clinique. Les chiffres correspondent au nombre d'études cliniques publiées, excepté celles concernant le cerveau) (d'après [154]).

Une des principales limites pour l'imagerie TEP de l'hypoxie de tumeurs présentes au niveau abdominal chez le petit animal (tumeurs colorectales, digestives...), est le bruit de fond trop important présent lié à la présence de la flore anaérobie), qui empêche la distinction spécifique des zones hypoxiques.

Sous des conditions hypoxiques, le manque d'oxygène conduit à une accumulation des traceurs chimiquement réduits, qui à l'intérieur de la cellule vont se dé-chélater et/ou se lier de manière covalente aux protéines riches en fonctions thiol [149]. Les enzymes telles que les cytochromes et les nitro-réductases participent donc à l'accumulation des radio-métabolites dans les cellules hypoxiques vivantes, mais non nécrotiques. La différence entre l'accumulation et le relargage du traceur par les cellules hypoxiques ou normoxiques permet une identification de ces cellules vivant en conditions hypoxiques.

A noter qu'il existe également des traceur TEP de l'anhydrase carbonique IX [155]. Tous les traceurs présentés, offrent des caractéristiques différentes. Le traceur d'hypoxie ultime n'a pas encore été développé, mais les différents traceurs existants permettent pour le moment d'apporter des informations importantes pour le traitement des patients [156].

1.2.1.3. Autres applications de l'imagerie TEP

En cancérologie, la principale indication de l'imagerie TEP consiste en l'utilisation du ^{18}F -FDG pour l'identification des tumeurs et métastases ou l'évaluation de la réponse à une thérapie [157]. Pour des applications précliniques, un certain nombre d'équipes de recherche en imagerie s'intéressent au marquage d'anticorps pour l'imagerie TEP [158], comme par exemple les marquages au ^{89}Zr [159,160] ou encore au ^{64}Cu [161].

On retrouve également beaucoup d'applications TEP en neurologie, en cardiologie. Compte tenu de la résolution millimétrique de la TEP, cette modalité est souvent couplée à la tomodensitométrie-X, afin d'obtenir un repérage anatomique qui permet d'identifier avec précision la localisation des signaux TEP par rapport aux organes considérés.

1.2.2. Imagerie TEMP

1.2.2.1. Principe

La Tomographie d'Emission MonoPhotonique (TEMP) ou SPECT en anglais (Single Photon Emission Computed Tomography) est une modalité d'imagerie scintigraphique fonctionnelle et moléculaire utilisée en médecine nucléaire.

Elle met en œuvre des traceurs (d'une fonction physiologique donnée) qui vont être marqués par des radioéléments émetteurs de rayonnement gamma (γ). Le photon γ émis passe à travers le collimateur pour arriver sur un cristal. Celui-ci absorbe l'énergie du photon γ qu'il convertit en photoélectron. Le photoélectron est alors ensuite pris en charge par un photomultiplicateur qui transforme le signal reçu en un signal électrique.

Généralement un collimateur parallèle est placé devant un cristal afin de sélectionner les rayons γ arrivant de manière perpendiculaire à l'axe du détecteur. La gamma caméra effectue une rotation autour du sujet afin d'obtenir des informations sous différentes incidences. Un algorithme de reconstruction permet par la suite de recréer une image en 3D à partir des données acquises au cours de la rotation de la caméra (Figure 9).

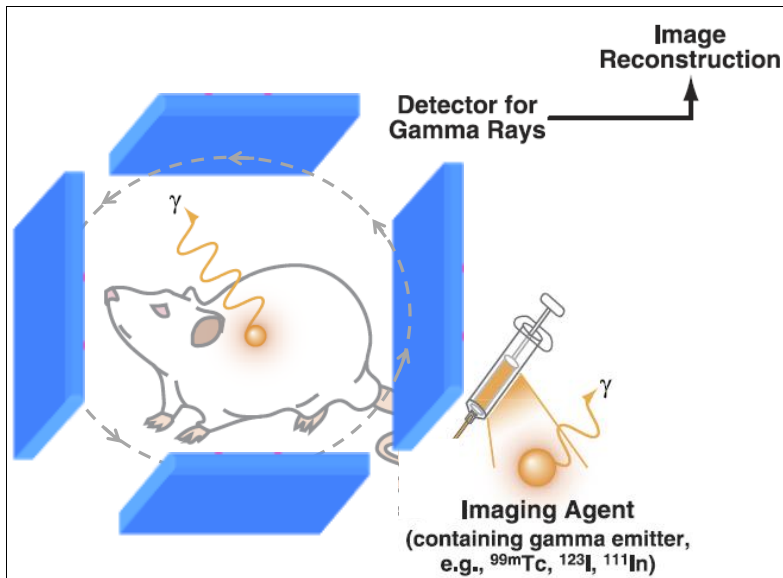


Figure 9 : Principe de l'imagerie TEMP. (d'après [16]).

Les avancées technologiques associées à des améliorations en matière de conception des collimateurs ont permis de voir apparaître des collimateurs non plus sous forme de grilles à ouvertures perpendiculaires, mais sous forme de multiples trous qui permettent d'augmenter la résolution sur les imageurs précliniques. En effet, l'utilisation de collimateurs « multi-pinholes » multiplexés ayant chacun une orientation définie permet de sélectionner l'incidence des photons γ qui arrivent sous forme d'un faisceau conique sur le détecteur et d'augmenter de manière très importante la résolution (de l'ordre de 0,2 à 1mm de résolution pour les systèmes de dernière génération), tout en préservant une bonne sensibilité. Les acquisitions peuvent être réalisées selon une rotation autour du même champ de vue, soit de manière hélicoïdale, permettant d'acquérir un champ de vue plus important.

1.2.2.2. Applications

L'imagerie de l'hypoxie en TEMP utilise des radio-traceurs qui vont cibler l'hypoxie tumorale. Ces traceurs sont injectés par voie IV, puis après un temps de diffusion du traceurs, les images sont acquises. Cette technique permet des mesures répétées.

Parmi les émetteurs γ en TEMP, on retrouve le ^{99m}Tc ($T_{1/2} = 6,02\text{H}$), ^{123}I ($T_{1/2} = 13,2\text{H}$), ^{125}I ($T_{1/2} = 59,9\text{J}$), le ^{67}Ga ($T_{1/2} = 3,26\text{J}$) ou encore ^{111}In ($T_{1/2} = 2,8\text{J}$).

Les principaux traceurs TEMP utilisés pour l'imagerie de l'hypoxie sont les suivants :

¹²³I-IAZA et ¹²⁵I-IAZA :

On retrouve le IAZA (IodaAZomycinArabinoside) déjà évoqué dans le paragraphe TEP. Dans les toutes premières études réalisées avec le IAZA, des synthèses avec le ¹²⁵I ont été décrites, sur un modèle de tumeur chez la souris. *In vitro*, le IAZA a également été montré comme réalisant des liaisons hypoxie-dépendantes sur des cellules tumorales [162]. Le ¹²³I-IAZA a été utilisé en phase clinique pour l'évaluation de l'hypoxie dans des cancers du poumon et des cancers de la tête et du cou [163].

^{99m}Tc-BMS 181321 :

Le BMS181321 a été le premier radio-traceur à base de 2-Nitroimidazole marqué au ^{99m}Tc à être largement étudié pour l'imagerie TEMP [164]. Il a montré une accumulation sélective dans les cellules hypoxiques *in vitro* et *in vivo*, mais n'a pas été retenu du fait de son instabilité, de sa faible clairance sanguine et du fort bruit détecté dans les tissus normaux [165].

^{99m}Tc-BRU59-21 :

Le BRU59-21 est un analogue de seconde génération du BMS181321, qui possède une meilleure stabilité *in vitro*. Des essais cliniques ont démontré son innocuité et sa biodistribution chez des patients présentant des cancers coliques et de la tête et du cou. L'évaluation *in vivo* de l'hypoxie par ce traceur a également été évaluée, démontrant sa propension à s'accumuler au niveau des zones hypoxiques, en confrontation avec un immuno-marquage au pimonidazole [166].

^{99m}Tc-HL-91 :

Le ^{99m}Tc-HL91 a été évalué *in vitro* et *in vivo* sur des souris porteuses de fibrosarcomes et a démontré son accumulation sélective dans les cellules et tumeurs hypoxiques [167]. Des données cliniques ont également montré une accumulation de ce composé au niveau tumoral [168]. Évalué dans le cancer du poumon, ce traceur s'est accumulé au niveau tumoral et les auteurs ont ainsi suggéré son utilisation potentielle pour la prédiction de la réponse des patients aux traitements [169].

Synthèse :

L'imagerie TEMP est plus communément utilisée que la TEP, en particulier le ^{99m}Tc possède de nombreux avantages, qui incluent sa disponibilité, son faible coût, sa demi-vie

adaptée aux mesures de l'hypoxie comparé au ^{18}F . A noter que le ^{125}I est un radio-isotope de faible énergie, ne permettant pas de réaliser son imagerie chez l'Homme.

1.2.2.3. Autres applications de l'imagerie TEMP

Les autres applications en médecine nucléaire de la TEMP sont nombreuses et variées car il est potentiellement possible de s'intéresser à toutes les grandes fonctions physiologiques. On peut citer les imageries de perfusion (cérébrale et myocardique), l'étude du système lymphatique, de la thyroïde et de nombreux organes. Elle peut être également appliquée à des mesures de débit sanguin, ou encore de paramètres ventilatoires. Cette modalité est souvent couplée à la tomodensitométrie-X afin d'obtenir un repérage anatomique qui permettra d'identifier avec précision la localisation des signaux TEMP par rapport aux organes considérés. La bimodalité TEMP-TDM-X est également utilisée pour la réalisation de cartes d'absorption des rayons X nécessaires à l'exploitation quantitative de la TEMP. A noter qu'il existe des différences entre termes de résolution entre l'imagerie TEP et TEMP lorsque l'on compare les appareils cliniques et précliniques. Les systèmes TEP précliniques souffrent d'un manque de résolution (environ 1,5mm) tandis que la résolution peut être excellente en TEMP (environ 0,5mm). En clinique, les systèmes TEP sont plus performants. Ces performances dictent la stratégie à adopter en fonction de l'état d'avancement de la recherche (amont ou aval) et du résultat à atteindre. Effectivement le métabolisme des petits animaux étant bien plus rapide que celui de l'homme, il est parfois nécessaire d'utiliser une technique plus particulièrement adaptée à l'homme, qui ne le sera pas forcément pour l'animal.

1.2.3. IRM

1.2.3.1. Principe

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) nécessite la mise en œuvre d'un champ magnétique produit par un aimant. Le sujet est placé dans ce champ magnétique où les noyaux atomiques des molécules présentes dans le champ possèdent alors des caractéristiques de spins nucléaires spécifiques, qui sont orientés de manière parallèle et antiparallèle à ce champ magnétique (Figure 10).

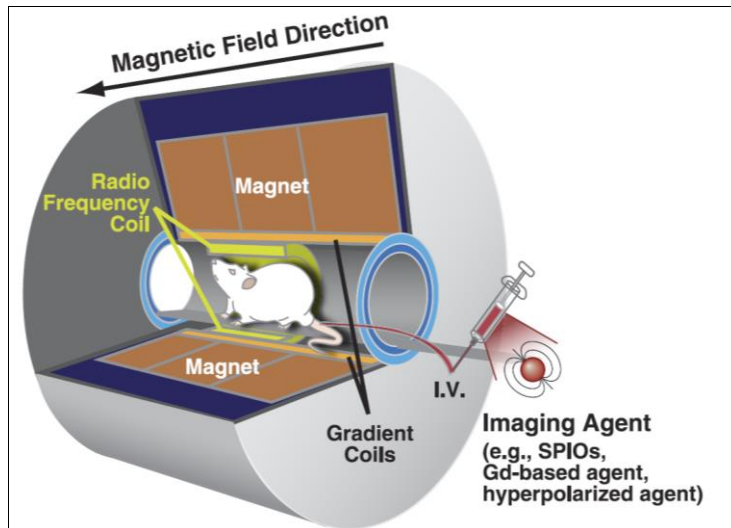


Figure 10 : Principe de l'IRM. (d'après [16]).

On utilise ensuite une antenne qui va produire une onde radio-fréquence et qui va déstabiliser les protons pour les mettre en résonance (mise en présence d'une onde dont la fréquence correspond à sa propre fréquence). La radio-fréquence va ensuite être coupée, ce qui va provoquer une relaxation des spins des protons. On obtient alors un signal RMN (Figure 11).

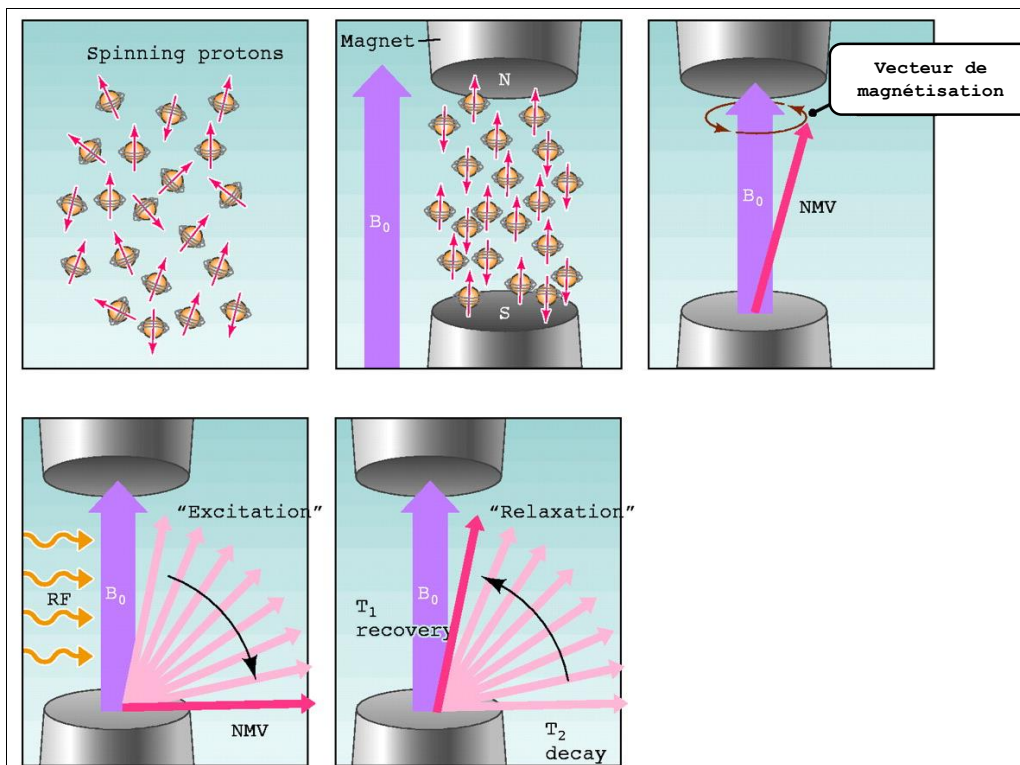


Figure 11 : Principe de l'IRM. Les spins des protons sont initialement aléatoires, puis orientés sous l'effet du champ magnétique. La radio-fréquence excite et dévie le vecteur de magnétisation. Le retour à l'état de base avant excitation est appelé relaxation, permettant la mesure des T1 et T2. (d'après [170]).

Les 2 formes de relaxation pour le retour à l'équilibre sont les relaxations « spin-lattice » (relaxation longitudinale) et « spin-spin » (relaxation transversale). Le contraste entre les différents tissus en IRM est généré par la différence dans les temps de relaxation de chaque tissu. La relaxation longitudinale, T1, est caractéristique d'un tissu donné et varie en fonction de la structure moléculaire. T1 est utilisé afin de pondérer les images, et est très dépendant du champ magnétique B_0 initial appliqué par l'aimant. La relaxation transversale, T2, est également caractéristique d'un tissu et est mise à profit pour pondérer les images. A noter que les T1 et T2 des liquides sont supérieurs aux T1 et T2 des solides. Les vitesses de relaxation correspondantes aux taux de relaxation sont données par le R1 et R2 ($R1=1/T1$ et $R2=1/T2$).

1.2.3.2. Applications

L'IRM permet de réaliser des images anatomiques des tissus grâce à la résonance des noyaux d'H présents dans les molécules d'eau, principal constituant des organismes vivants. C'est une technique très résolutive et non-irradiante. L'IRM bénéficie d'un large spectre d'agents de contraste. En cancérologie, l'IRM permet de mettre en évidence le caractère agressif d'une tumeur en fonction de la vitesse à laquelle elle fixe un agent de contraste [171].

D'autres noyaux peuvent également être imagés, comme par exemple le ^{32}P , le ^{13}C , le ^{23}Na le ^{19}F ou encore le ^{17}O . L'exploration de ces noyaux est généralement réalisée par spectroscopie de résonance magnétique (SRM), ou par imagerie spectrale.

L'IRM présente l'avantage d'être une imagerie sans limites de profondeur de pénétration, à haute résolution, et permettant d'obtenir un contraste bien meilleur qu'en TDM-X pour les tissus mous. Cependant l'IRM souffre de sa sensibilité, comparée aux autres techniques d'imagerie, ce qui peut engendrer des temps d'acquisition longs. Il est donc parfois nécessaire d'utiliser des agents de contraste pour obtenir le signal adéquat.

1.2.3.2.1. IRM BOLD

L'IRM BOLD « Blood Oxygenation Level-Dependent » est une technique d'IRM fonctionnelle qui au lieu d'utiliser des agents de contraste, est basée sur des mesures de l'hémoglobine désoxygénée endogène.

Quand la saturation en O_2 de l'hémoglobine augmente, le fer présent au niveau des ses sous-unités de l'hème passe d'un état de haut spin paramagnétique (sous faible PO_2) à un état de faible spin diamagnétique (sous haute PO_2). L'hémoglobine désoxygénée

augmente donc la vitesse de relaxation transversale $R2^*$ ($R2^*=1/T2^*$) de l'eau dans le sang et les tissus environnants.

Les sources de contraste en IRM BOLD incluent les variations des valeurs de T1 (taux de relaxation longitudinal) et T2* (taux de relaxation transversal) [172]. Le T1 est sensible à l'oxygène dissout, qui agit alors comme un agent de contraste paramagnétique T1 [173]. Le T2* est lui sensible au ratio relatif Hb/Hb_{oxygénée} [174].

L'Hb désoxygénée étant paramagnétique, comparée à l'Hb oxygénée qui elle ne l'est pas, les régions qui contiennent de forts taux d'Hb oxygénée apparaissent de manière moins intense en T2*. Le $R2^*$ ne mesure pas directement la SO_2 , c'est pourquoi il est nécessaire de connaître le volume sanguin dans le tissu imagé, afin de déduire les informations sur l'oxygénation (Figure 12). Par conséquent, si un tissu est perfusé, présentant un $R2^*$ fort par rapport à une autre région au sein du même tissu, on peut considérer que la région de haut $R2^*$ est plus hypoxique [175].

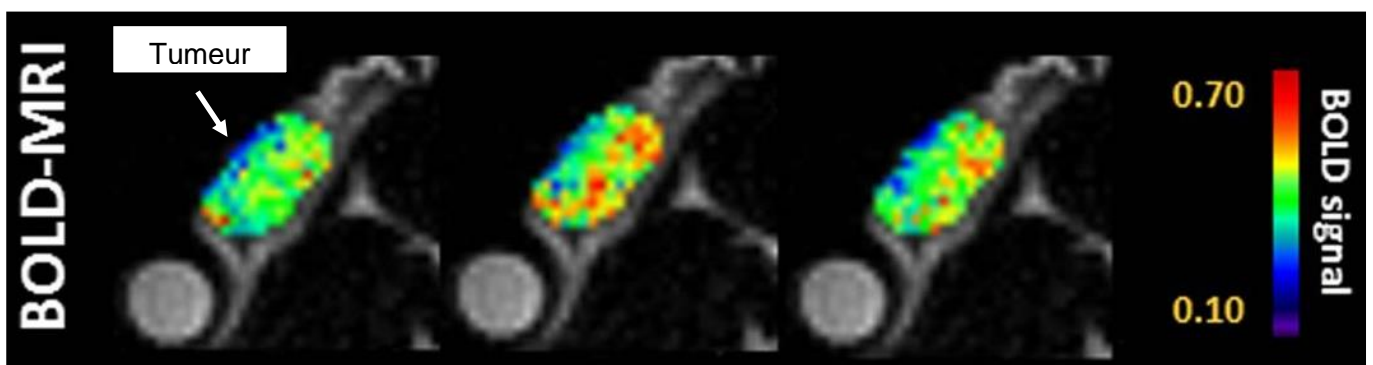


Figure 12 : Exemple d'IRM BOLD sur une tumeur de la tête et du cou en sous-cutané chez la souris. (d'après [176]).

Récemment, des études cliniques et précliniques ont décrit les corrélations entre l'IRM BOLD et la réponse à des traitements par chimiothérapie et radiothérapie. Nous pouvons citer ici l'exemple d'une étude réalisée chez le rat, où il a été montré que le signal BOLD mesuré était corrélé avec un retard de croissance tumorale après administration d'un gaz respiratoire hyperoxique (carbogène : 95% O₂, 5% CO₂) pendant un traitement par irradiation, dans un modèle de tumeurs prostatiques [177]. De plus, l'IRM BOLD a été utilisée pour évaluer la réponse précoce à une chimiothérapie chez des patientes ayant un cancer du sein [178].

Ces résultats montrent l'utilité de l'IRM BOLD comme un moyen non-invasif permettant l'identification des régions hypoxiques de cancers.

1.2.3.2.2. IRM FREDOM

L'IRM FREDOM pour « Fluorocarbon Relaxometry using Echo planar imaging for Dynamic Oxygen Mapping » permet de cartographier quantitativement la PO_2 de manière rapide et très précise, particulièrement lorsque nous sommes en présence d'un tissu très hypoxique ($PO_2 < 10 \text{ mmHg}$) (Figure 13).

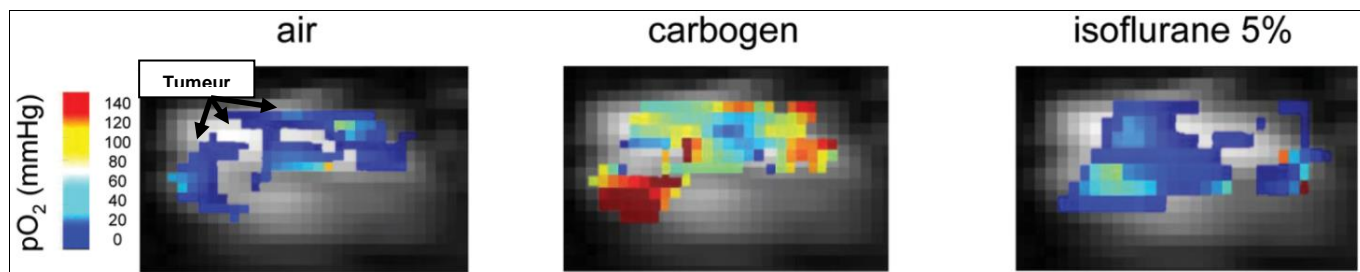


Figure 13 : Exemple d'IRM FREDOM sur une tumeur hépatique chez la souris en fonction d'une respiration sous air, sous O_2 95%, ou sous air+isoflurane 5%. (d'après [179]).

Le produit de contraste utilisé est l'hexafluorobenzène, qui est un perfluorocarbène. Il doit être injecté dans de multiples endroits (répartis dans tout le volume tumoral), directement dans le tissu à analyser sous un très faible volume. Une calibration *in vitro* préalable est nécessaire pour obtenir une courbe étalon des R_1 en fonction de différentes PO_2 .

Cette technique est donc basée sur l'IRM du Fluor 19. L'IRM FREDOM est possible du fait de la relation linéaire existante entre la PO_2 et R_1 . La PO_2 est obtenue par mesure de T_1 suivant des séquences d'acquisition prédéfinies de type PBRS-EPI-ARDVARC. Ces séquences correspondent au « Pulse Burst Saturation Recovery », « Echo Planar Imaging », et « Alternated Relaxation Delays with Variable Acquisition to Reduce Clearance effects » [180].

1.2.3.2.3. IRM PISTOL

L'IRM PISTOL pour « Proton Imaging of Siloxanes to map Tissue Oxygenation Levels » est une technique d'imagerie oxymétrique basée sur la résonance magnétique du proton, qui permet de mesurer de manière quantitative l'oxygénation tissulaire [96]. Récemment, l'hexamethyldisiloxane (HDMSO) a été identifiée comme sonde permettant des mesures de PO_2 en utilisant la relaxométrie du HDMSO. Pour cela, cet agent de contraste doit également être injecté directement dans le tissu d'intérêt [181]. Cette technique exploite la relation linéaire R_1 de l'HDMSO avec l'oxygénation tissulaire. L'imagerie du HDMSO est réalisée sans aucune contribution des signaux de graisse et d'eau (Figure 14).

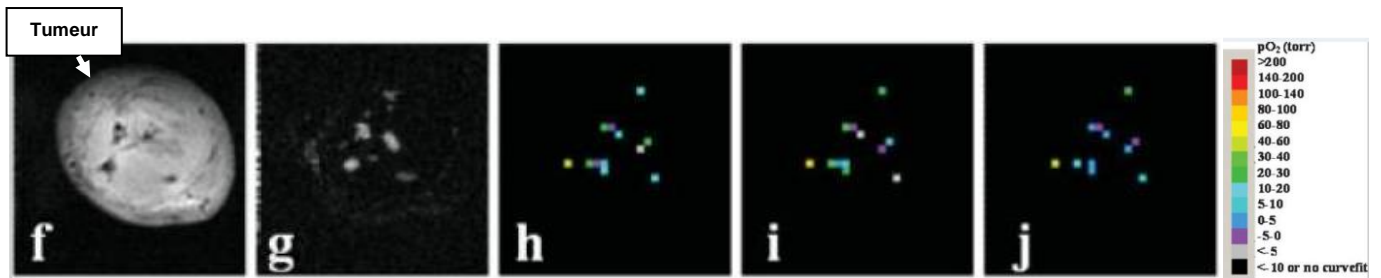


Figure 14 : Exemple d'images IRM PISTOL sur une tumeur prostatique chez le rat. f) Tumeur prostatique, g) signal de base, h) animal sous air, i) après 30 min à 95% d'O₂, j) après 30 min de retour à l'air. (d'après [96]).

Elle peut faciliter les mesures répétées et non-invasives de l'oxygénation et permettrait de fournir des informations dynamiques sur les changements d'oxygénation avant et après des traitements activés en présence d'hypoxie [182].

1.2.3.2.4. IRM MOBILE

L'IRM MOBILE pour « Mapping of Oxygen By Imaging Lipids relaxation » est basée sur les propriétés de relaxation des lipides tissulaires [183]. Elle permet l'appréciation du paramètre de relaxation R1 des lipides et est consécutive à une technique émergente qui évalue le R1 global, lui-même influencé par le R1 de l'eau. Comme les techniques basées sur le R1 sont sensibles à l'oxygénation des tissus, elles semblent être complémentaires à l'imagerie fonctionnelle IRM BOLD évaluant la relaxation du paramètre R2* [184]. Le R1 des lipides est plus sensible que le R1 de l'eau par rapport aux variations d'oxygénation. Pour déterminer la valeur R1 des lipides comme un marqueur endogène sensible de l'oxygénation tissulaire, des études ont été menées sur des modèles d'hypoxie tumorale et d'ischémie en réalisant des changements de concentrations en O₂ dans le mélange gazeux respiratoire administré aux animaux (Figure 15).

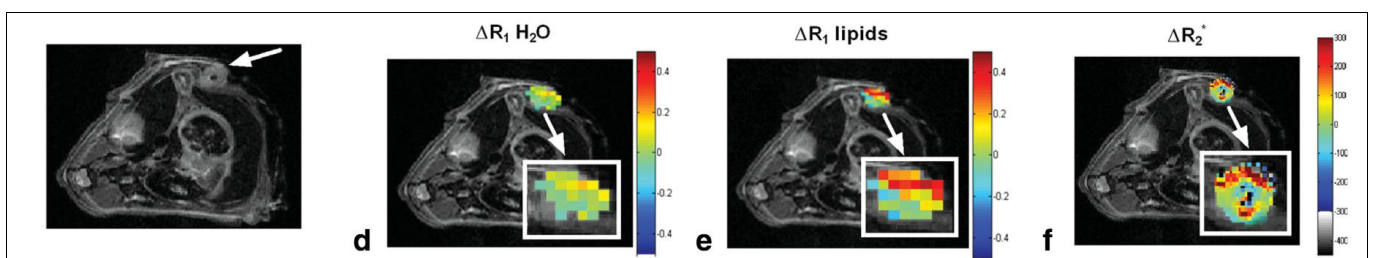


Figure 15 : Image en IRM MOBILE d'une tumeur mammaire sous-cutanée chez la souris. Cartes des changements de relaxation en réponse à une exposition à de l'oxygène 95% ($\Delta R = R_{95\% O_2} - R_{air}$). (d'après [183]).

En effet, la cartographie en T2*, en référence à l'IRM BOLD, est sensible aux variations d'oxygénation dans le compartiment vasculaire et permet de suivre les changements d'oxygénation tissulaires [185,186]. Cependant, l'IRM BOLD a montré des limites en termes

de relations quantitatives entre l'intensité du signal et la PO₂ tissulaire, et est une méthode sensible aux changements de quantité en Hb totale ^[187,189].

Des essais cliniques suggèrent que l'IRM MOBILE et l'IRM BOLD seraient en fait des approches complémentaires ^[183].

L'IRM MOBILE est donc une technique sensible, non-invasive, corrélée aux valeurs de PO₂ et est potentiellement un marqueur quantitatif de l'oxygénation tumorale, puisqu'elle est sensible aux changements positifs ou négatifs de l'oxygénation.

Même si elle nécessite encore des validations pour son utilisation en routine chez des patients, cette technique est translatable en clinique et est prometteuse pour de futures études qui pourraient s'intéresser au suivi de l'oxygénation tumorale en réponse à des traitements antiangiogéniques et pour planifier les radiothérapies ^[190,191].

1.2.3.2.5. Imagerie RPE

Basée sur le même principe que la RPE classique, l'imagerie RPE est une technique d'imagerie par résonance magnétique non-invasive, bas champ et qui utilise des traceurs paramagnétiques pour donner des images quantitatives haute résolution de l'oxygénation tumorale et tissulaire. Les bases fondamentales de l'oxymétrie par imagerie RPE découlent de la nature paramagnétique de l'O₂ provenant de ses 2 électrons non-appariés.

L'interaction entre les produits paramagnétiques et l'O₂ élargit la largeur de la raie de résonance en fonction de la concentration en O₂, fournissant ainsi une mesure quantitative sous forme de cartes de la distribution de PO₂ tissulaire ^[192].

De plus, l'imagerie par IRM couplée en utilisant un résonateur commun, permet une superposition fiable des cartes de PO₂ acquise par RPE avec les images physiologiques et métaboliques correspondantes, permettant une évaluation complète du microenvironnement tumoral ^[193]. En effet, au cours de l'excitation RPE une image par RMN peut être acquise, bénéficiant de l'effet « overhauser » (transfert de polarisation des électrons aux protons, permettant ainsi le rehaussement du signal RMN, et par conséquent permettant une acquisition d'image IRM).

L'imagerie RPE est actuellement mise en œuvre pour cartographier la PO₂ chez les animaux ^[194]. Des études précliniques ont été menées dans le but de comparer les données acquises en RPE et des mesures OxyLite™, et ont démontré une forte

corrélation entre les 2 modalités [194]. L'imagerie RPE permet également de pouvoir suivre les réponses des tumeurs à des traitements vis-à-vis de leur statut d'oxygénation.

Actuellement, l'imagerie RPE n'est disponible que pour des applications précliniques, cependant il y a un grand intérêt à pousser plus loin les investigations pour une utilisation clinique potentielle [195]. Il est tout de même à noter que cette technique souffre d'un mauvais rapport signal sur bruit pour les basses fréquences, que les acquisitions sont longues, et que malheureusement pour le moment, les agents de contraste ne sont pas encore approuvés par les autorités de sûreté du médicament [196].

1.2.3.2.6. IRM « Oxygen Enhanced » (OE-IRM)

Le principe de l'OE-IRM est basé principalement sur la mesure de R_1 , qui est sensible aux concentrations de l'oxygène présent dans le liquide interstitiel et le plasma [197]. Cette approche inclut l'évaluation du R_1 après un changement de la concentration en O_2 dans le mélange gazeux respiratoire administré au sujet. Cette technique permet d'obtenir des cartes de libération de l'oxygène (par évaluation des ΔR_1) en identifiant les tissus entièrement saturés en O_2 , sans mettre en évidence directement l'hypoxie tissulaire. Toutefois, il faut réaliser une correction de la perfusion pour les tumeurs qui présentent de larges zones nécrotiques (Figure 16).

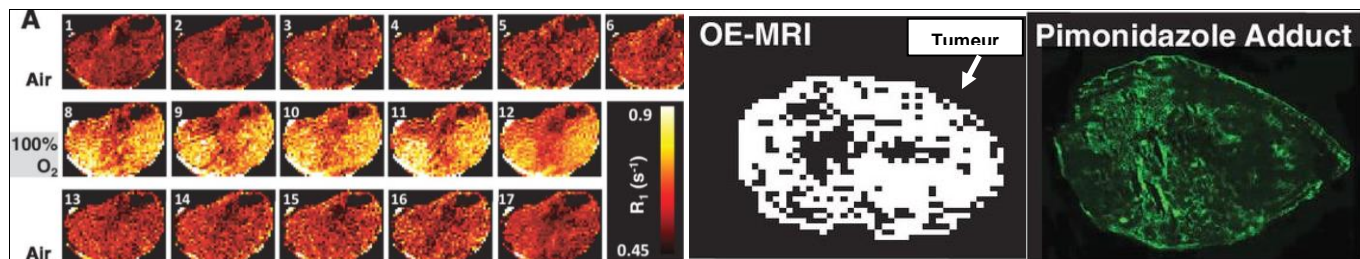


Figure 16 : Exemple d'imagerie OE-IRM. A) Exemples de cartes R_1 obtenues au cours du changement de concentration en oxygène dans le mélange gazeux respiratoire administré à l'animal, sur un carcinome rénal sous-cutané. B) OE-IRM binarisée et comparaison à l'immuno-histologie au pimonidazole. (d'après [197]).

L'avantage de la méthode OE-IRM par rapport aux autres techniques d'imagerie de l'hypoxie, est la possibilité de faire des mesures répétées, ce qui permet par exemple l'évaluation de l'hypoxie cyclique et l'évaluation des réponses aux approches de modification de l'hypoxie. Cette technique possède également une meilleure résolution spatiale que la TEP, qui peut également être utilisée avec une augmentation de la teneur en oxygène administré au patient [198]. En effet, les examens réalisés avec des variations de l' O_2 ne sont pas exclusifs de l'IRM, puisque la modulation du taux d' O_2 administré au sujet permet par exemple d'identifier avec certitude les régions hypoxiques et nécrotiques par imagerie photoacoustique (cf 1.2.5.4.2. et 1.3.1.).

Synthèse :

Ces différentes méthodes de mesure par IRM permettent de mesurer soit des PO₂ soit des SO₂. En acquérant et quantifiant ces 2 paramètres sur les mêmes animaux ou individus, cela pourrait permettre de mieux comprendre la relation entre la PO₂ et la SO₂ au sein d'une tumeur et d'apporter des informations capitales sur les phénomènes liés à l'hypoxie. Ainsi il serait possible de comprendre les mécanismes d'échanges gazeux de l'Hb lorsque le sang afflue vers les zones hypoxiques, ou encore évaluer si la variation de la SO₂ et de la PO₂ suit la même courbe qu'au niveau de tissus sains.

1.2.3.3. Autres applications de l'IRM

Les autres applications de l'IRM en pratique médicale sont nombreuses. On peut citer l'angio-IRM, la cholangio-IRM, l'IRM-fonctionnelle et l'étude des pathologies du système nerveux central pour la neurologie, l'étude de pathologies ostéo-articulaires ou encore cardiologiques.

1.2.4. Imagerie de fluorescence

1.2.4.1. Principe

Le principe de la fluorescence repose sur l'excitation d'un fluorochrome à une longueur d'onde (λ) particulière, avec réémission d'un signal de fluorescence à une énergie plus faible, donc de longueur d'onde plus grande. L'excitation d'un électron de la couche électronique externe du fluorochrome va absorber l'énergie d'un photon de la lumière excitatrice incidente, qui va alors passer de l'état S₀, à l'état excité S₁'. Une première étape de relaxation non-radiative va permettre d'évacuer une partie du surplus énergétique, essentiellement sous forme de chaleur, pour atteindre l'état excité de plus basse énergie S₁. Une seconde étape provoquera la perte de l'énergie nécessaire au retour à l'état fondamental par l'émission d'un photon de fluorescence (Figure 17A). Pour les fluorochromes, la longueur d'onde qui sépare le pic d'excitation et le pic d'émission, est appelé décalage de Stokes (Figure 17B). L'imagerie de fluorescence est largement handicapée par le phénomène d'autofluorescence (qui est détaillé plus loin dans le manuscrit). Ce problème est en partie contourné grâce à la mise en œuvre de systèmes fluorescents dans le rouge.

En imagerie de fluorescence infrarouge (NIRF), l'utilisation de photons de basse énergie implique que la pénétration est limitée en profondeur, ce qui rend impossible l'étude de tissus profonds chez l'Homme et l'animal [199].

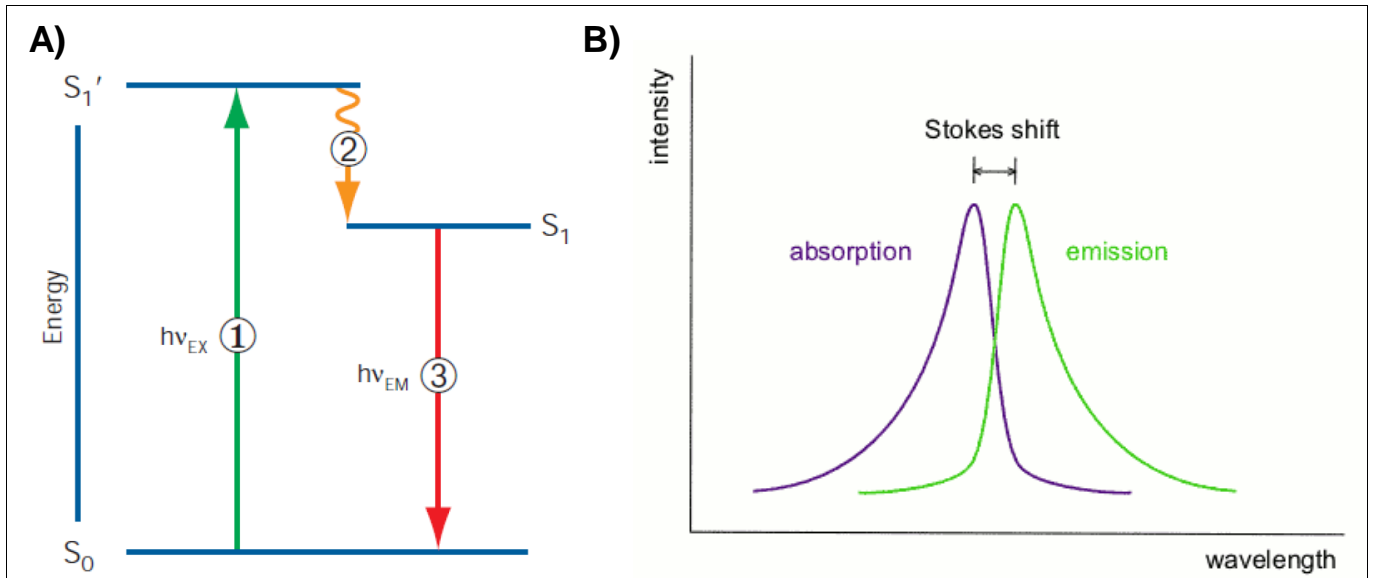


Figure 17 : Bases physiques de la fluorescence. A) Diagramme de Jablonski illustrant le principe de la fluorescence. 1) excitation, 2) relaxation vibrationnelle et 3) émission de fluorescence. B) Décalage de Stokes entre le pic d'excitation et le pic d'émission. (d'après [200]).

La NIRF requiert l'utilisation de caméras, pouvant posséder différents types de capteurs, qui permettent la transformation des photons de fluorescence en signal électrique analogique, aboutissant à l'obtention d'une image. Ces capteurs peuvent être de différents principes. On retrouve principalement les CCD (Charged Coupled Device) et les CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductors). Les CCD convertissent les photons reçus en électrons grâce à l'effet photoélectrique. Les électrons sont ensuite collectés au niveau des puits de potentiel. La quantité de lumière reçue est proportionnelle au nombre d'électrons collectés. Les capteurs CMOS, eux, sont composés de photodiodes comprenant chacune leur convertisseur de charge/tension. La vitesse de lecture ainsi que leur faible coût en font des capteurs intéressants pour l'imagerie (Figure 18).

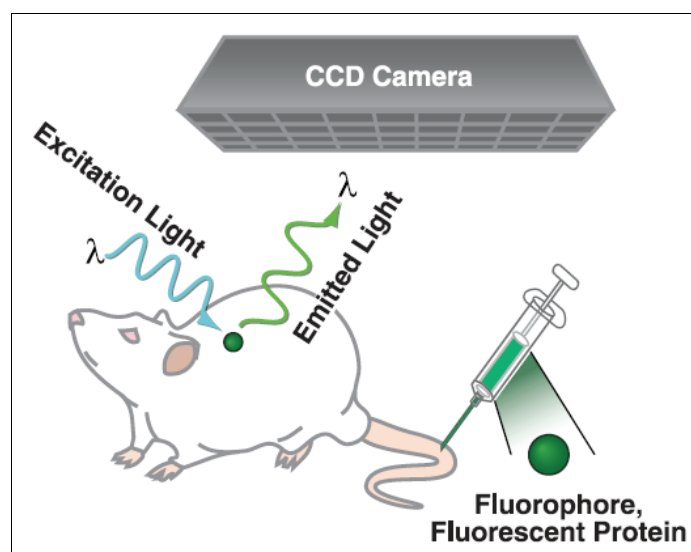


Figure 18 : Principe de l'imagerie de fluorescence (d'après [16]).

On distingue 2 types d'imagerie de fluorescence : l'imagerie par réflectance ou par trans-illumination (Figure 19).

- La fluorescence par réflectance (ou épi-illumination) utilise une source d'excitation lumineuse provenant du même endroit que le système de détection. Elle est très bien adaptée pour les foyers superficiels en raison de la faible distance parcourue par les photons entre l'excitation et l'émission. De plus la diffusion et l'absorption sont également limitées.
- La fluorescence par trans-illumination utilise une source d'excitation lumineuse qui se situe à l'opposé du système de détection. Cette configuration oblige la lumière à traverser les tissus d'intérêt avant de rejoindre le détecteur mais offre l'avantage de limiter de bruit de fond d'excitation, améliorant ainsi le rapport signal/bruit.

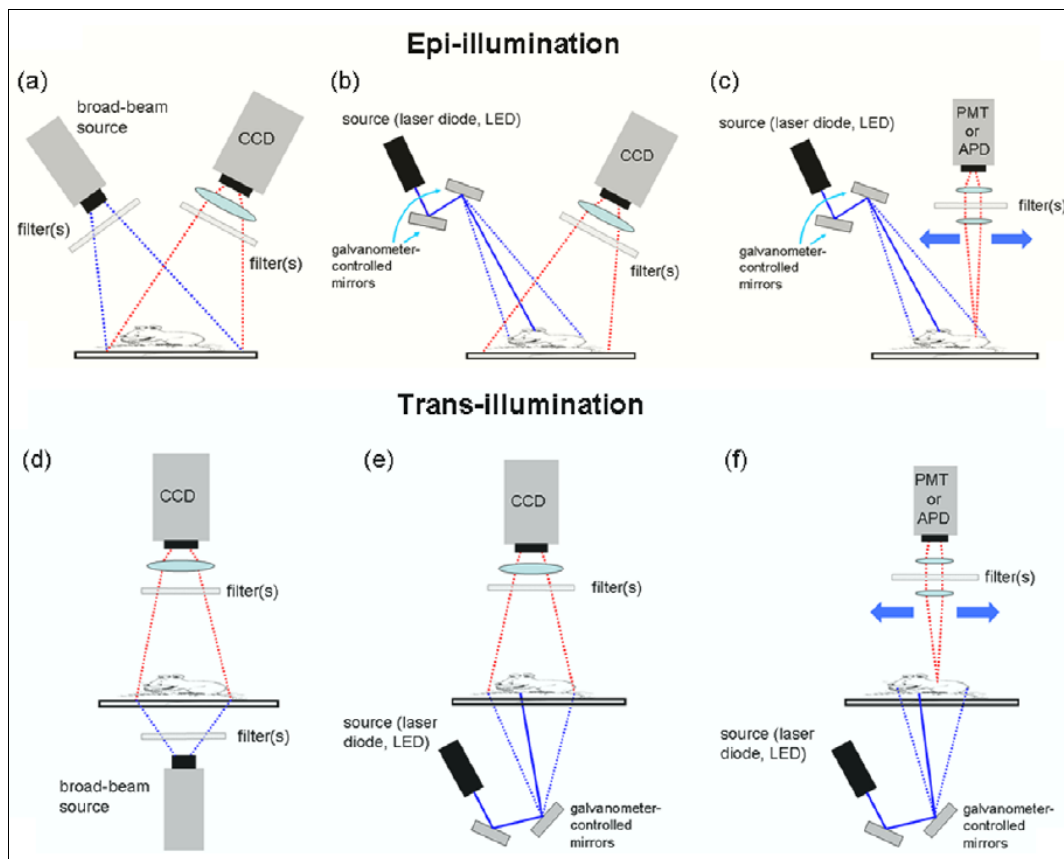


Figure 19 : Présentation des différentes modalités d'imagerie de la fluorescence par épi-illumination et par trans-illumination. (d'après [199]).

Quelques points clés à connaître en imagerie de fluorescence :

Les sondes de fluorescence :

Les sondes de fluorescence sont des composés qui intègrent le plus souvent un fluorochrome et une molécule de ciblage. On peut citer par exemple l'IntegriSense®680,

qui est une sonde commerciale (Perkin Elmer®) possédant un motif « RGD-like » permettant le ciblage des intégrines, associée à un fluorochrome (l'AlexaFluor®680).

L'absorption :

L'absorption correspond à la quantité de photons qui sont absorbés par les molécules dans les tissus. Cette absorption est dépendante de la longueur d'onde et est principalement opérée par l'Hb, la mélanine, les lipides ou encore l'eau, comme nous pouvons le voir en Figure 20.

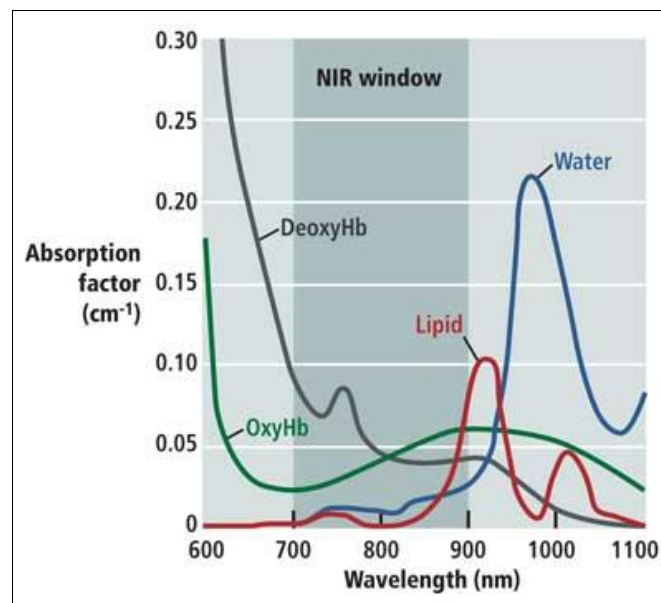


Figure 20 : Absorption des molécules endogènes dans le proche infrarouge.

La diffusion :

La diffusion correspond au parcours que font les photons au sein d'un milieu inhomogène. Le changement d'interface (les milieux ayant des indices de réfraction différents) au cours du trajet des photons, va conduire à un changement de direction des photons (Figure 21). Cette diffusion se produit aussi bien à l'excitation qu'à l'émission, entraînant une dégradation de la résolution, et est particulièrement marquée dans la partie rouge du spectre.

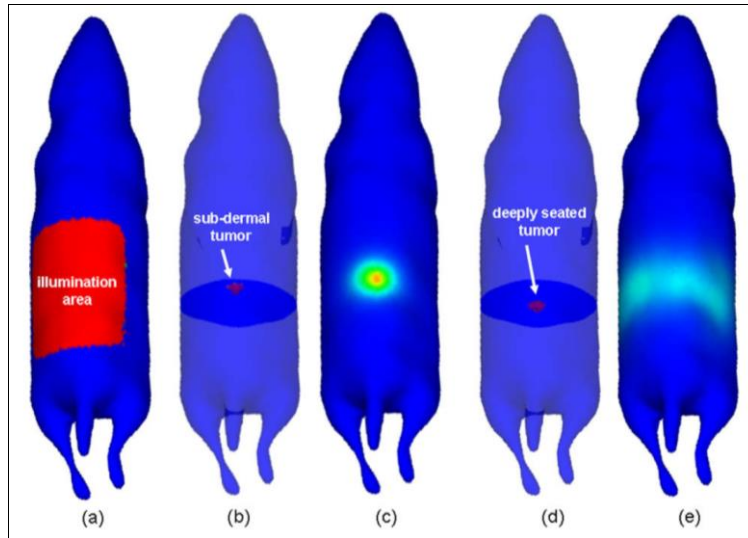


Figure 21 : Phénomène de diffusion de la lumière en fonction de la profondeur du tissu marqué par une sonde fluorescente. (a) Surface d'illumination ; (b) Tumeur superficielle ; (c) Signal ponctuel ; (d) Tumeur profonde ; (e) Signal diffus. Si la tumeur marquée est en surface, on obtiendra un signal très localisé. Si la tumeur est en profondeur, on obtiendra un signal assez diffus. (d'après [199]).

Le rendement quantique :

Le rendement quantique de fluorescence correspond au nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés. Cette caractéristique de chaque fluorochrome doit être prise en compte en fonction du type de détecteur utilisé et de la profondeur du tissu d'intérêt. La sensibilité de détection sera d'autant plus grande que le rendement quantique du fluorochrome sera élevé.

Quenching de fluorescence :

Un point important à considérer en imagerie de fluorescence est le phénomène de « quenching ». Celui-ci correspond à un retour non-radiatif de l'état intermédiaire S_1 à l'état fondamental S_0 des électrons excités. Ce phénomène est rencontré lorsque le fluorochrome est en présence d'autres molécules avec lesquelles des délocalisations électroniques peuvent intervenir, diminuant ainsi son pouvoir fluorescent. On peut également rencontrer ce phénomène lorsque le fluorochrome est en concentration trop importante (interaction des électrons des couches externes entre eux).

Le cas des sondes de fluorescence activables :

Le quenching peut être utilisé spécifiquement pour la construction de sondes activables, qui seront quenchées sans propriétés de fluorescence. Une fois en présence d'une enzyme spécifique, la sonde va être scindée en 2, permettant alors les délocalisations

électroniques nécessaires au phénomène de fluorescence (Figure 22).

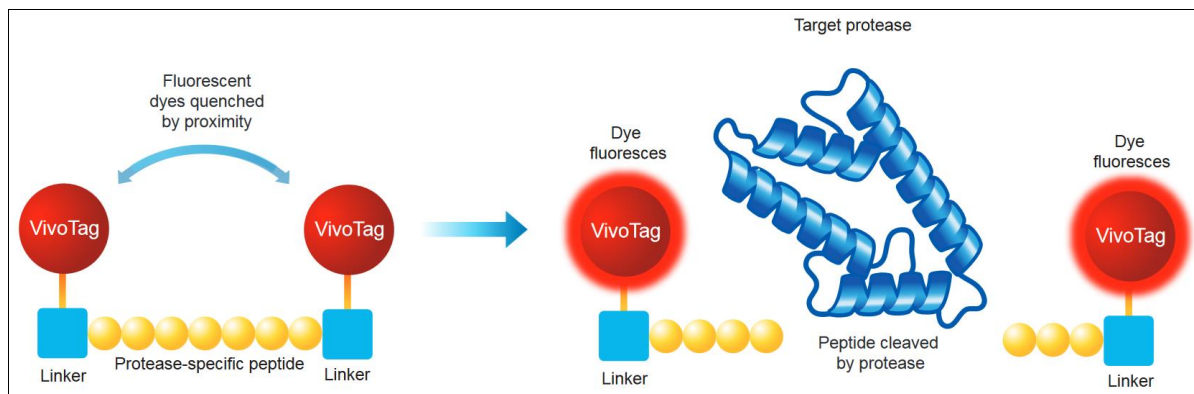


Figure 22 : Principe de fonctionnement d'une sonde fluorescente activable (d'après [201]).

On peut par exemple citer la sonde MMPsense[®]680 (Perkin Elmer) qui s'active en présence de métalloprotéinase matricielle, la sonde ProSense[®]680 (Perkin Elmer) qui s'active en présence de cathepsines, ou encore la sonde ReninSense[®]680 (Perkin Elmer) qui s'active après clivage par la rénine. Nous verrons l'utilisation du ProSense[®]680 au chapitre 2.2.5.

Auto-fluorescence :

L'autofluorescence correspond aux propriétés de fluorescence des fluorochromes naturellement présents au sein de l'organisme. En imagerie préclinique, la nourriture des animaux est à l'origine d'une autofluorescence très importante et doit être absolument considérée lors de protocoles d'imagerie *in vivo* dans le proche infrarouge (comme par exemple donner une nourriture sans chlorophylle : remplacer l'alfafa par du soja).

Procédure d'imagerie :

Une procédure d'imagerie par fluorescence inclut les étapes suivantes :

- Sélection de la sonde de fluorescence à utiliser (ou la protéine fluorescente)
- Identification des longueurs d'ondes adaptées à la sonde de fluorescence pour la lumière excitatrice et le filtre d'émission
- Injection de la sonde de fluorescence (sauf si évaluation de l'expression d'une protéine fluorescente)
- Illumination par la source de lumière, associée à l'émission d'une lumière d'énergie plus faible ayant une λ plus importante
- Détection de la lumière qui re-traverse les tissus (pour être collectée) au niveau du capteur ^[10]

Il est important de laisser un certain temps entre l'injection de la sonde de fluorescence et les acquisitions d'images afin de limiter le bruit de fond de la sonde circulant encore dans l'animal. Le bruit de fond ici, correspond à l'autofluorescence des tissus, mais également au signal de la sonde de fluorescence qui a pu s'accumuler dans les organes d'élimination (comme le foie, ou les reins). Une fois que le signal provenant de la fixation non spécifique de la sonde est diminué (aussi bien celui provenant du foie ou des reins, que le signal provenant de la circulation de la sonde dans le sang), la mise en évidence du signal spécifique de la sonde est plus aisée.

La NIRF fait partie des techniques d'imagerie pour lesquelles il y a eu d'importants développements ces dernières années. Un des plus gros défis de la NIRF est de surmonter la diffusion et l'absorption de la lumière, qui ont un impact important sur la quantification des données. L'absorption de la lumière par l'Hb principalement, réduit le signal de fluorescence d'un facteur 10 par centimètre de tissus traversés [202]. Les organes contenant une forte quantité d'Hb, tels que le foie et la rate, possèdent en effet la moins bonne conduction lumineuse. En revanche, la peau et les muscles transmettent très bien la lumière.

Parmi les fluorochromes les plus utilisés en imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge, nous retrouvons l'AlexaFluor®680, l'AlexaFluor®700, l'AlexaFluor®750, la cyanine5.5, la cyanine7, l'ICG, l'IR-Dye800®, l'IR-Dye700® ou encore le Dy-700® (Figure 23).

	λ excitation (nm)	λ émission (nm)
AlexaFluor680	679	702
AlexaFluor700	702	723
AlexaFluor750	749	775
Cy5.5	675	694
Cy7	743	767
Dy700	702	723
Dy752	748	772
Dy780	782	800
Dy800	777	791
ICG	780	812
IR-Dye700	689	700
IR-Dye750	756	776
IR-Dye800	767	791

Figure 23 : Longueurs d'onde d'excitation et d'émission des principaux fluorochromes utilisés dans le proche infrarouge.

En choisissant des sondes de fluorescence ayant des λ d'émission comprises entre 650 et 900nm (fluorescence dans le proche infrarouge), l'absorption de la lumière par l'Hb, la

mélanine, les lipides et l'eau est moindre. Ces sondes peuvent donc être imagées à des profondeurs plus importantes et avec une meilleure sensibilité, car l'autofluorescence tissulaire est plus faible également [203,204] (Figure 24).

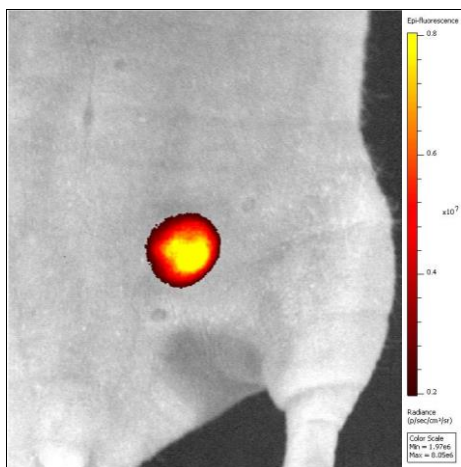


Figure 24 : Image obtenue en NIRF d'une tumeur mammaire chez la souris après injection IV d'une sonde fluorescente ciblant les intégrines. (CIPA2016).

L'imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge souffre de limites, telles que la profondeur de pénétration des photons due à l'absorption et à la diffusion, ainsi que l'autofluorescence tissulaire qui diminue la sensibilité de cette technique.

Ses avantages sont son coût relativement faible (même si plus cher que la bioluminescence (BLI)), et le fait qu'elle ne nécessite pas l'administration d'un substrat (comme pour la BLI), qu'elle permet d'évaluer des agents d'imagerie avant de les adapter à d'autres modalités d'imagerie plus onéreuses, et qu'elle permet d'obtenir des images multi-spectrales. En effet cette modalité permet de réaliser des corrections par analyse spectrale ou « spectral unmixing » afin de s'affranchir de l'autofluorescence tissulaire et d'améliorer le rapport signal sur bruit [199]. Le « spectral unmixing » correspond à l'analyse à différentes longueurs d'ondes du sujet exploré. Pratiquement, plusieurs acquisitions à différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont réalisées. Un calcul informatique est ensuite appliqué à la série d'images, afin de pouvoir retrancher le signal ne correspondant pas au fluorochrome d'intérêt, et ainsi retrancher l'autofluorescence du sujet, ou d'exploiter simultanément plusieurs sondes marquées par des fluorochromes différents (cf. Annexe 3).

1.2.4.2. Applications

En ce qui concerne l'imagerie de l'hypoxie par NIRF, elle est basée sur le ciblage de l'un des biomarqueurs de l'hypoxie : CA-IX. Nous pouvons citer la sonde HypoxiSense®680

(Perkin Elmer®) qui permet une imagerie de l'un des biomarqueurs de l'hypoxie : l'anhydrase carbonique IX [205,206]. On peut aussi mentionner des travaux sur des nanobodies ciblant la CA-IX dans des modèles de tumeurs mammaires [207]. Il existe également l'Hypoxifluor, qui est en cours de développement via l'imagerie de CA-IX [208]. Ces tests réalisés sur des tumeurs pulmonaires greffées en sous-cutanées visaient également à montrer que cette sonde peut être utilisée pour de la chirurgie guidée par fluorescence. Un certain nombre d'équipes essaient de développer des sondes fluorescentes ciblant spécifiquement les régions hypoxiques [209-211]. Nous pouvons par exemple mentionner des composés fluorescents 2-Nitroimidazolés qui ont été évalués sur des tumeurs sous-cutanées [211,213].

1.2.4.3. Autres applications de l'imagerie de fluorescence

En pratique clinique, la NIRF reste pour le moment peu utilisée. Certaines applications sont évaluées lors d'essais cliniques en chirurgie, pour la détection des ganglions sentinelles et l'évaluation des marges tumorales pour les résections de tumeurs. Actuellement l'utilisation la plus consensuelle porte sur sa mise en œuvre pour l'exérèse des métastases (dont certaines visibles à l'œil) dans la carcinose péritonéale du cancer du côlon et de l'ovaire. Des études sont également menées pour réaliser des examens de lymphographie.

D'autres applications précliniques de la NIRF sont dédiées à l'étude de pathologies cardiovasculaires, à la neurologie, ou encore au système reproductif [214-217]. La NIRF permet également de pouvoir imager des protéines fluorescentes qui sont exprimées de manière constitutive chez certains animaux génétiquement modifiés (Red Fluorescent Protein RFP, mCherry, tdTomato, DsRed, katushka...).

Cette technique est actuellement beaucoup développée pour des applications cliniques principalement pour faire de l'imagerie NIRF peropératoire, pour détecter des ganglions sentinelles et des métastases et pour une optimisation des limites d'exérèse des tumeurs.

1.2.5. Imagerie Ultrasonore

L'échographie est une technique d'imagerie médicale utilisant le phénomène de réflexion des ondes ultrasonores. Chez le petit animal, l'imagerie ultrasonore B-Mode, Doppler et imagerie de contraste est bien établie et largement utilisée pour des mesures anatomiques ou de perfusion dans les modèles de tumeurs humaines [218]. Les évolutions technologiques apportées ces dernières années ont permis d'obtenir des systèmes

d'échographie avec des résolutions très importantes adaptées à l'études des souris et des rats [219].

1.2.5.1. B-Mode

1.2.5.1.1. Principe

Un faisceau ultrasonore, émis par un transducteur, pénètre dans l'organisme où il subit de nombreuses atténuations. D'une part l'absorption dans les milieux homogènes et d'autre part les réflexions, réfractions et diffusions lors des changements de milieux. Les ondes réfléchies sont recueillies par le même transducteur puis numérisées.

La propagation des ondes ultrasonores (ondes de pression) est de type mécanique. Lorsque les ultrasons rencontrent un milieu, une partie de l'énergie des ondes est absorbée, l'autre est réfléchi. En effet, l'onde ultrasonore est une onde de pression se propageant dans un milieu élastique et qui ne peut se faire dans le vide. Si le délai entre l'envoi de l'impulsion et le recueil de l'écho permet de localiser précisément l'interface, le paramètre mesuré est lui moins évident à définir. En effet, ce qui caractérise un tissu donné (d'impédance définie, c'est-à-dire une résistance différente du tissu au passage de l'onde) c'est l'échogénicité, soit la quantité d'échos renvoyés par un tissu donc en quelque sorte son degré d'hétérogénéité. La faible partie de l'onde qui est réfléchi, l'écho, est enregistrée par le transducteur (système de détection), l'un des principaux éléments de l'échographe (Figure 25).

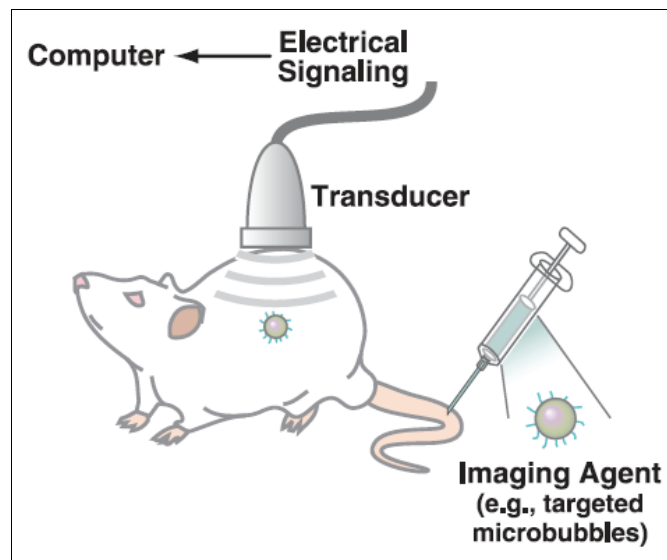


Figure 25 : Principe de l'échographie. (d'après [16]).

Les transducteurs d'échographie :

La création d'une onde sonore repose sur l'effet piézo-électrique. Un courant électrique, sous forme d'impulsions électriques hautes fréquences, est délivré à la surface d'une

céramique (Figure 26). L'épaisseur de la céramique varie lorsque la fréquence des impulsions électriques est de l'ordre de la fréquence de résonance de cette céramique. Le recueil des ondes réfléchies est réalisé pendant le temps où la sonde n'émet pas d'ultrasons.

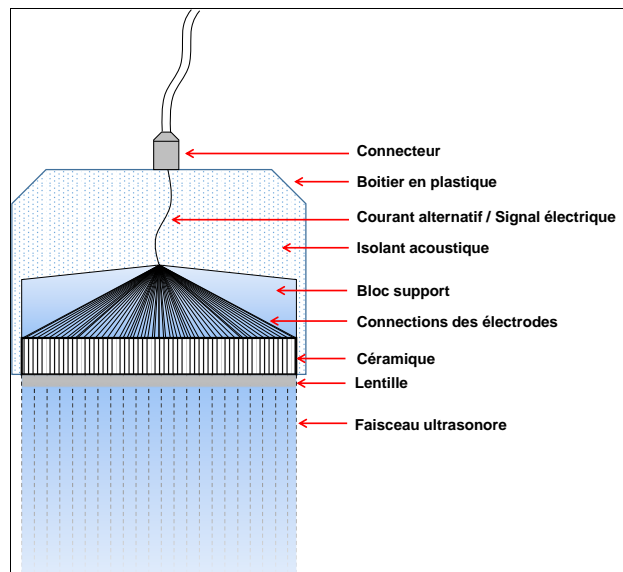


Figure 26 : Schéma détaillé d'un transducteur linéaire d'échographie (CIPA 2016).

Le transducteur est mis en contact avec l'échantillon à travers un gel aqueux de couplage qui assure l'adaptation de l'impédance acoustique. Le signal est recueilli puis analysé par un système informatique qui retransmet en direct une image sur un écran vidéo.

Les fréquences utilisées pour les transducteurs d'échographie utilisés en médecine sont de 2 à 10MHz, tandis que chez le petit animal, les fréquences peuvent aller jusqu'à 50 MHz. L'avantage d'utiliser des fréquences plus élevées permet d'avoir une résolution très importante, selon la profondeur d'imagerie possible (Figure 27). En effet, plus la fréquence est importante, moins bonne sera la pénétration des ultrasons réduisant la possibilité d'imager des tissus profonds, et inversement.

Product Name	MS 200	MS 250	MS 250S	MS 400	MS 550D	MS 550S	MS 700
Centre Frequency	15 MHz	21 MHz	21 MHz	30 MHz	40 MHz	40 MHz	50 MHz
Bandwidth	9-18 MHz	13-24 MHz	13-24 MHz	18-38 MHz	22-55 MHz	32-55 MHz	30-70 MHz
Geometric Focus	18.0 mm	15.0 mm	8.0 mm	9.0 mm	7.0 mm	6.0 mm	5.0 mm
Image Width (Max)	32.0 mm	23.0 mm	23.0 mm	15.4 mm	14.1 mm	14.1 mm	9.7 mm
Image Depth (Max)	36.0 mm	30.0 mm	20.0 mm	20.0 mm	15.0 mm	15.0 mm	12.0 mm
Image Axial Resolution *	100 µm	75 µm	75 µm	50 µm	40 µm	40 µm	30 µm
Image Lateral Resolution *	235 µm	165 µm	165 µm	110 µm	90 µm	90 µm	75 µm

Figure 27 : Exemples de caractéristiques des transducteurs d'échographie haute résolution. (FUJIFILM Visualsonics Inc.).

L'échographie B-Mode correspond à l'obtention d'images anatomiques en niveaux de gris permettant le repérage des organes et les mesures de taille et de volumes.

1.2.5.1.2. Applications

Il n'existe pas à l'heure actuelle d'applications de l'échographie à l'exploration de phénomènes hypoxiques. Dans notre travail, l'échographie n'a donc pas été mise en œuvre directement pour permettre l'imagerie de paramètres d'oxygénation, mais pour corréler l'imagerie photoacoustique (détaillée en 1.2.5.4) à une imagerie anatomique haute résolution. L'échographie permet en effet de mesurer des tailles de tumeurs, aussi bien en 2D qu'en 3D. C'est donc sur la base des images d'échographie que nous nous sommes basés pour connaître la localisation précise des signaux de photoacoustique et pour la détermination des régions d'intérêt (ROI). De plus l'échographie a été montrée comme étant plus précise dans le suivi des volumes tumoraux que la simple mesure par pied à coulisse ^[219].

L'échographie est une technique d'imagerie médicale sûre, peu chère, qui ne nécessite pas d'environnement particulier et qui est non-invasive.

1.2.5.1.3. Autres applications de l'échographie

Ses applications en médecine sont nombreuses, notamment pour l'exploration d'organes internes, pour l'exploration du système musculo-squelettique, en cardiologie, en néphrologie, en angiologie, en gynécologie, et permet le guidage de certains prélèvements.

1.2.5.2. Doppler

1.2.5.2.1. Principe

En échographie conventionnelle, lorsque l'onde sonore traverse des tissus biologiques fixes, il n'y a pas de différences entre la fréquence d'émission et la fréquence de réception.

En revanche, lorsque l'onde ultrasonore rencontre une cible en mouvement, il y a une modification de la fréquence de cette onde. La variation de cette fréquence par rapport à la fréquence d'émission est appelée fréquence Doppler. Elle peut être négative (si la cible se rapproche de la sonde) ou positive (si la cible s'éloigne de la sonde). L'effet doppler couplé à l'échographie correspond à l'émission de l'ultrason en discontinu pendant une fenêtre d'écoute temporelle fixée. La détection des globules rouges sanguins et des mouvements de ces globules rouges au sein des vaisseaux permet donc en mode Doppler, d'obtenir des informations sur la vitesse et sur le débit sanguin.

Le Power Doppler (Doppler puissance) est une variante du Doppler couleur, qui est différente au niveau du traitement du signal. Il ne tient pas compte du sens de circulation des globules rouges, mais permet d'obtenir une meilleure résolution spatiale.

1.2.5.2.2. Applications

Le Doppler permet donc une imagerie fonctionnelle de paramètres vasculaires apportant des informations supplémentaires à l'échographie, notamment sur la répartition des vaisseaux à l'intérieur des tumeurs et des paramètres de vitesse et débits sanguins. Il est également possible de visualiser la vascularisation tumorale comme le montre la Figure 28, où est représentée une ROI sur une tumeur pancréatique de souris, avec un rendu 3D du Doppler couleur correspondant.

Ce mode Doppler permet également d'obtenir des informations sur le pourcentage de vascularisation d'un organe dans un volume déterminé, mais ne fournit pas d'informations directes sur le niveau d'oxygénation d'un tissu.

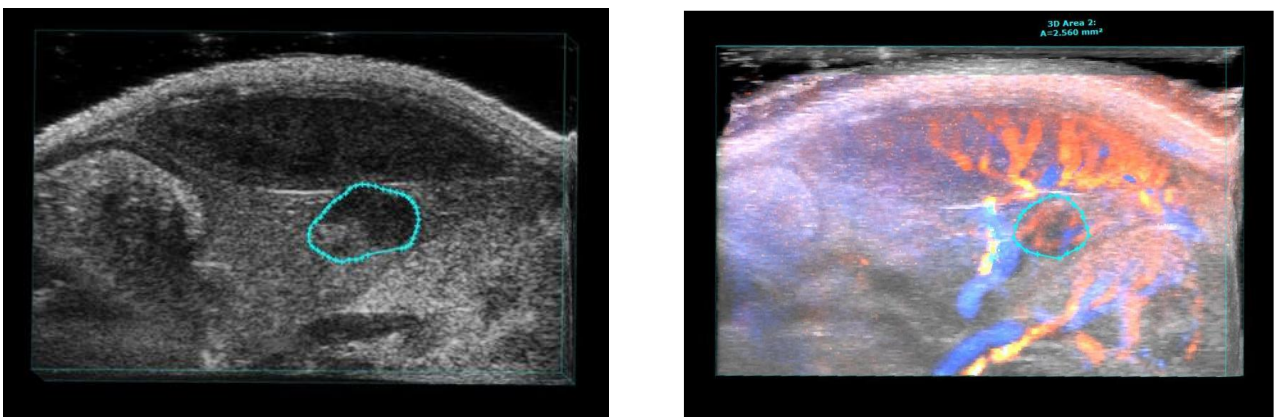


Figure 28 : Rendu Doppler couleur 3D de la vascularisation du pancréas et de la tumeur ainsi que des organes limitrophes tels que la rate et le rein (CIPA 2016).

1.2.5.2.3. Autres applications de l'échographie Doppler

L'échographie Doppler est une technique également utilisée pour l'exploration de pathologies cardiaques (cardiopathies congénitales, ischémiques, cardiomyopathies, rupture septale, insuffisance mitrale,...) et vasculaires (insuffisance artérielle et veineuse, anévrisme artériel, sténose artérielle, valvulopathies,...).

1.2.5.3. Imagerie de contraste

1.2.5.3.1. Principe

L'échographie de contraste est également appelée imagerie de contraste ultrasonore.

Le principe de l'échographie de contraste est basé sur la détection des vibrations harmoniques non linéaires de microbulles (MB). En effet, lorsque des MB sont soumises à des fréquences acoustiques, elles entrent en oscillation en générant un écho important [220]. La compression des MB étant moins importante que leur dilatation, une asymétrie va donc être créée en réponse, engendrant des composantes fréquentielles non linéaires (harmoniques).

Les agents de contraste :

Les agents de contraste ultrasonores sont des MB encapsulées. Ces MB constituées par une coque de lipides organisés en bicouches contiennent un gaz de haut poids moléculaire (hexafluoride, perfluorocarbonés...), et sont insolubles dans l'eau. De cette manière, elles persistent dans la circulation sanguine jusqu'à quelques minutes. Elles sont injectées en IV (en bolus ou en perfusion lente) et permettent d'augmenter l'échogénicité du compartiment vasculaire [221], par la génération d'un écho vibratoire provoqué par la compression / dilatation du gaz qui y est encapsulé.

Parmi les MB retrouvées en recherche préclinique, certaines sont développées par des laboratoires académiques, d'autres sont disponibles commercialement (Micromarker®, FUJIFILM Visualsonics Inc. ; Targestar®, Targeson Inc.).

Les agents de contraste ciblés :

Les MB ciblées permettent d'obtenir des informations sur l'expression de certains biomarqueurs présents au niveau de l'endothélium vasculaire. En effet, les MB étant trop grosses pour sortir de la circulation sanguine, leur seule possibilité de liaison se situe sur la paroi des vaisseaux sanguins.

Différents protocoles de quantification sont alors appliqués afin d'obtenir des paramètres d'expression du biomarqueur par rapport à des microbulles de référence qui sont porteuses d'une molécule de structure identique, mais qui n'interagira pas avec la cible (généralement un anticorps isotype, lorsque l'on réalise un ciblage par anticorps).

Contrairement aux MB classiques utilisées en clinique, il n'existe pas encore de MB ciblées approuvées en clinique. Certaines sont disponibles pour la recherche clinique, telles que les Target-Ready Micromarker® [222-225], Targestar® et Visistar® [226,227]. Ces

agents de contraste ciblés contiennent à leur surface des molécules de streptavidine liées à un polyéthylène glycol inséré dans la coque. L'agent de ciblage peut être une protéine, un anticorps ou fragment d'anticorps, ou une petite molécule qui est biotinylée pour permettre une préparation extemporanée des microbulles ciblées.

1.2.5.3.2. Applications

L'imagerie moléculaire ultrasonore utilise des MB moléculairement ciblées, permettant la caractérisation des processus physiopathologiques au niveau moléculaire [228]. Nous pouvons citer les travaux de Cai et al. [229] qui se sont intéressés à l'expression spécifique du VEGFR2 par rapport à un anticorps isotype non-spécifique dans des modèles de glioblastomes et mélanomes chez la souris [229]. Les MB peuvent également être ciblées via différents autres biomarqueurs vasculaires tels que les intégrines $\alpha V\beta 3$, VEGF, V CAM, MadCAM, glycoprotéine IIb/IIIa, endogline, ou les sélectines E ou P [219,230,231]. Des agents de contraste multimodaux basés sur l'utilisation de MB sont actuellement développés. On peut mentionner le développement de MB remplies par des fluorochromes, qui peuvent être utilisées comme agents de contraste ultrasonore, mais également comme agents d'imagerie pour la PA et la NIRF [232].

L'imagerie moléculaire ultrasonore peut ainsi être utilisée pour évaluer une réponse précoce à des traitements ou évaluer des paramètres liés à l'efficacité d'un traitement [233].

1.2.5.3.3. Autres applications de l'échographie de contraste

L'échographie de contraste sert notamment à diagnostiquer des pathologies cardiaques et à explorer des pathologies de perfusion sanguine [234-237].

On peut également noter que des équipes s'intéressent à l'échographie de contraste pour la perméabilisation de barrières biologiques et de parois cellulaires avec des MB, qui peuvent être chargées ou non en agent thérapeutique, en vue de réaliser un traitement localisé. Une fréquence ultrasonore proche de celle utilisée pour l'imagerie est appliquée juste après l'administration IV des MB, ce qui provoque la vibration intense des MB qui interagissent alors avec les parois cellulaires ou finissent par éclater en créant des projections (microjets). L'interaction des MB au contact des parois cellulaires va créer des pores membranaires transitoires, ce qui en fait une technique d'intérêt pour le traitement localisé des cellules. Ce procédé est appelé sonoporation [238]. En chargeant les MB avec des molécules thérapeutiques, ou en les incorporant à leur surface, l'effet de la sonoporation va ainsi permettre à la cellule voisine d'incorporer l'agent thérapeutique d'intérêt. Nous pouvons notamment évoquer des essais réalisés dans ce sens avec des

MB chargées en doxorubicine [239]. Ces stratégies sont prometteuses et pourraient constituer une approche intéressante pour le traitement des tumeurs en recherche clinique.

Synthèse :

Les techniques ultrasonores représentent une vraie opportunité pour la détection, la caractérisation et le suivi des tumeurs chez les animaux modèles. De plus, comme les technologies utilisées chez l'animal sont exactement les mêmes que celles utilisées chez l'Homme, les données acquises sont directement translatables en clinique.

Avec l'arrivée des agents de contraste ciblés, l'imagerie ultrasonore prend une place de plus en plus importante dans l'imagerie moléculaire, car c'est une technique peu onéreuse, pratique à utiliser et qui permet d'acquérir des données fonctionnelles et moléculaires en temps réel.

1.2.5.4. Imagerie Photoacoustique

1.2.5.4.1. Principe

L'imagerie PhotoAcoustique couple des ondes acoustiques à des ondes optiques afin de tirer parti des informations optiques révélées par la lumière et de la résolution spatiale apportée par les ondes acoustiques. La PA repose sur le couplage de la fluorescence et des ultrasons. En effet, un laser pulsé va générer des impulsions lumineuses à une longueur d'onde donnée dont l'énergie va être absorbée : en éclairant le tissu, une expansion thermo-élastique se produit conduisant à un micro-échauffement des molécules (de l'ordre de 0,05°C) qui va lui-même générer une onde de pression acoustique (Figure 29). L'effet photoacoustique a été décrit pour la première fois par Alexander Graham Bell en 1880 [240].

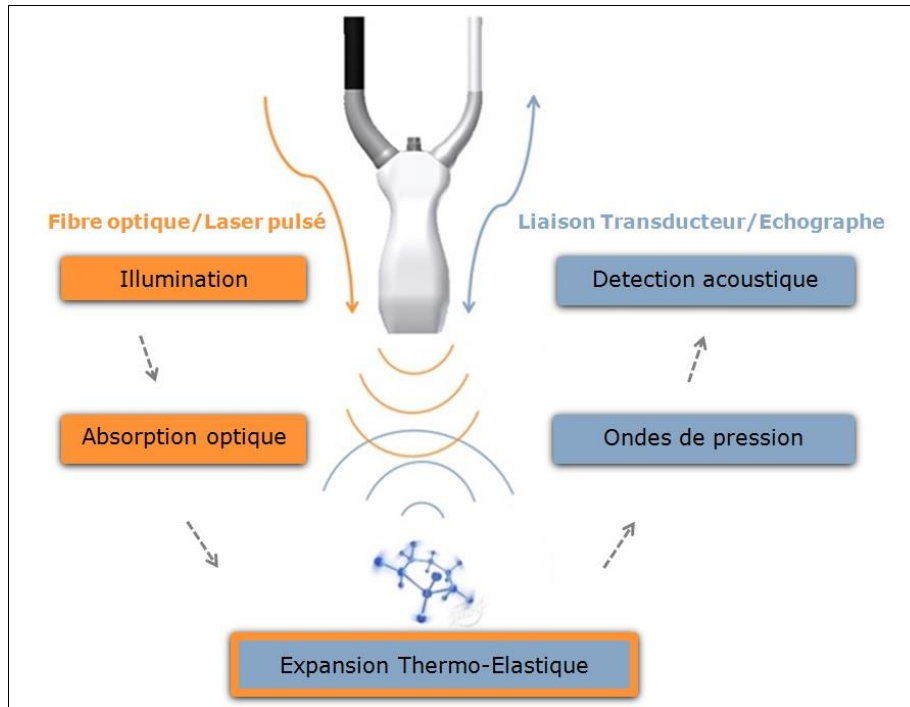


Figure 29 : Principe de l'imagerie photoacoustique. L'imagerie photoacoustique consiste à illuminer un tissu par un laser à impulsions, dont la lumière est absorbée lorsque ce tissu est traversé. Cela engendre une onde thermoélastique causée par le microéchauffement des molécules absorbant la lumière du laser. Cette onde de pression est ensuite réceptionnée par le système ultrasonore (FUJIFILM Visualsonics Inc., 2013).

L'échographie et l'imagerie PhotoAcoustique (PA) utilisent un appareillage commun et complémentaire (le transducteur) qui permet donc de fournir des données anatomiques, fonctionnelles et moléculaires en temps réel grâce à une simple acquisition ^[241] (Figure 30).

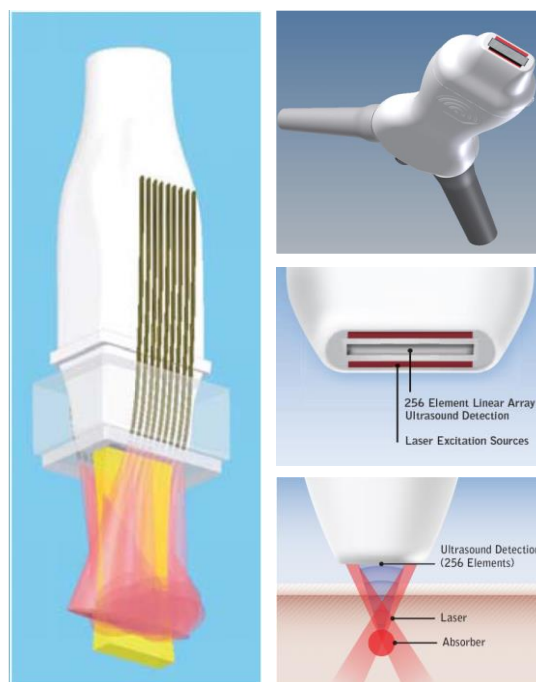


Figure 30 : Détail du transducteur bimodal d'échographie et de photoacoustique. La fibre optique provenant du système laser passe de chaque côté du transducteur, pour ensuite être focalisée au bout de la sonde grâce à deux barrettes de fibres encollées. La focalisation du faisceau de lumière se fait environ 10mm sous le transducteur 86 d'échographie. ([242], FUJIFILM Visualsonics Inc.)

Les Figures 29 et 30 présentent le transducteur commun d'échographie/photoacoustique, qui est présent dans le système Vevo[®]LAZR (FUJIFILM Visualsonics Inc.) et qui a été mis en œuvre pour ce travail de thèse. D'autres systèmes commerciaux ont un fonctionnement légèrement différent. Nous pouvons citer par exemple le système iThera-medical, qui utilise un transducteur quasi-annulaire et une illumination laser qui se fait tout autour de la couronne du transducteur. Ce système nécessite d'immerger l'animal dans un récipient d'eau, afin que la conduction des ondes sonores soit optimale ^[243]. Nous pouvons mentionner le système Endra, qui met en œuvre de multiples transducteurs répartis autour d'un réceptacle concave rempli d'eau, associé à une illumination ponctuelle ^[244]. Nous pouvons enfin évoquer le système TomoWave, qui offre un transducteur semi-annulaire couplé à une illumination laser qui se fait de manière perpendiculaire au transducteur, nécessitant également l'immersion de l'animal dans un bain d'eau ^[245]. D'autres systèmes comme celui proposé par PreXionLED utilisent la technologie LED plutôt que l'illumination par un laser, ce qui permet d'éviter les contraintes de protections inhérentes aux lasers. Pour le moment, ces systèmes souffrent d'une trop faible pénétration de la lumière à travers les tissus pour que les applications biologiques chez l'animal ou l'Homme soient pertinentes.

Cette technique récente a déjà montré sa capacité à rassembler des informations fonctionnelles et moléculaires en temps réel à des profondeurs cliniquement pertinentes et de manière non invasive et non irradiante ^[246]. En Figure 31, nous pouvons voir différentes études menées en imagerie photoacoustique préclinique et clinique, en fonction de la profondeur d'imagerie. Les explorations peuvent aller jusqu'à 7cm en dessous de la surface de la peau.

Table 1. Summary of the largest imaging depths reported for macroscopic PAI in experimental and clinical studies

Depth reached (mm)	Photoacoustic system	Subjects	Target	Imaging agent	Author
Experimental studies					
~10	PAT	Canine prostate <i>in vivo</i>	Prostate pseudo lesions with fresh canine blood	—	Wang and colleagues (112)
~20	LOIS-P (laser optoacoustic imaging system for the prostate)	Dog prostate <i>in vivo</i>	Blood rich-induced prostate lesions	—	Yaseen and colleagues (113)
~32	Photoacoustic mammoscope prototype	Phantom	Breast lesion-mimicking objects	Ecoline 700 black water color dye	Manohar and colleagues (95)
~50	Hand-held photoacoustic/ultrasound probe	Phantoms/chicken breast and rats	SLNs	Methylene blue	Kim and colleagues (186)
~52	PAT	Phantoms/chicken breast	Lesion-mimicking objects	Blood/ICG	Ku and Wang (3)
~52	Hand-held photoacoustic/ultrasound probe	Phantoms/chicken breast and rats	SLNs	Methylene blue	Kim and colleagues (7)
~60	Optoacoustic tomography	Phantoms	Breast cancer cells, HER2	Gold nanoparticles conjugated to HER2-antibody	Copland and colleagues (52)
~70	TAT and PAT	Phantoms	Breast lesion-mimicking objects	Black India ink	Pramanik and colleagues (99)
Clinical studies					
~28 ^a	PAT	Patients (<i>n</i> = 26)	Breast cancer	—	Kitai and colleagues (93)
~30	LOIS-64 (laser optoacoustic imaging system for the breast)	Patients (<i>n</i> = 27)	Breast cancer	—	Emilov and colleagues (31)
~30	Photoacoustic mammoscope	Patients (<i>n</i> = 12)	Breast cancer and cysts	—	Heijblom and colleagues (94)
~40	PAT	Healthy subject (1)	Breast vasculature	—	Kruger and colleagues (9)
~60	Photoacoustic mammoscope	Patients (<i>n</i> = 13)	Breast cancer	—	Manohar and colleagues (8)

Figure 31 : Etudes précliniques et cliniques répertoriant les profondeurs d'imagerie atteintes par la PA. (d'après [247]).

1.2.5.4.2. Applications

L'imagerie PA, en utilisant les molécules de contraste, et couplée à l'échographie permet donc de réaliser à la fois une imagerie anatomique et fonctionnelle.

Agents de contraste endogènes :

Les modifications de l'absorption optique mesurée sont fonction des propriétés optiques de nombreux chromophores endogènes tels que la mélanine et l'hémoglobine. L'application la plus utilisée est l'observation de l'oxygénation tissulaire*, basée sur la différence des profils d'absorption de l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée [248]. Cette technique permet d'obtenir une cartographie et une quantification du pourcentage de saturation de l'hémoglobine en O₂ (SO₂) [249,250], ainsi que la quantification de cette hémoglobine. Il est aussi possible de mettre en évidence des zones de nécrose, qui ne sont plus vascularisées et dans lesquelles nous n'obtiendrons aucun signal

photoacoustique (pas de retour photoacoustique car pas d'excitation lumineuse des molécules d'hémoglobine). Il est alors possible de suivre l'apparition de zones hypoxiques, puis leur transformation éventuelle en zones nécrotiques. Ces quantifications sont possibles en 2D, mais également en 3D grâce à des acquisitions faites par un moteur pas-à-pas sur lequel est monté le transducteur hybride d'échographie/photoacoustique. En effet, les systèmes d'échographie commerciaux ont été modifiés de manière à intégrer le module PA pour l'imagerie des petits animaux. La sonde conduit à la fois l'onde ultrasonore émise par l'échographe mais aussi le laser grâce à une fibre optique. L'association de ces deux systèmes permet d'obtenir une image échographique à haute résolution et une information photoacoustique à haute sensibilité, ce qui ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de l'imagerie.

***Mesures de l'oxygénation :**

Le coefficient d'absorption du sang varie en fonction de la longueur d'onde utilisée et varie également selon que l'oxygène est lié ou non à l'hémoglobine dans le sang. Le profil spectral est présenté ci-après (sang oxygéné en rouge, sang désoxygéné en bleu) (Figure 32).

Lors de l'acquisition du signal, le laser génère un faisceau lumineux à deux longueurs d'onde : 750nm et 850nm. Il s'agit du mode « OxyHemo » de l'appareil, permettant de mesurer les taux de saturation en oxygène de l'hémoglobine (%SO₂). A 850nm, les photons sont préférentiellement absorbés par l'hémoglobine oxygénée, tandis qu'à 750nm, c'est l'absorption par l'hémoglobine désoxygénée qui est privilégiée. Un algorithme est appliqué pour créer une image spectroscopique de la saturation en oxygène en temps réel ^[251].

Une fois les coefficients d'absorption déterminés, la concentration de l'hémoglobine totale (HbT) et la saturation en oxygène (SO₂) peuvent être calculées. Des ROIs sont ensuite tracées autour de la tumeur et au niveau des zones hypoxiques afin de comparer les valeurs de saturation en oxygène.

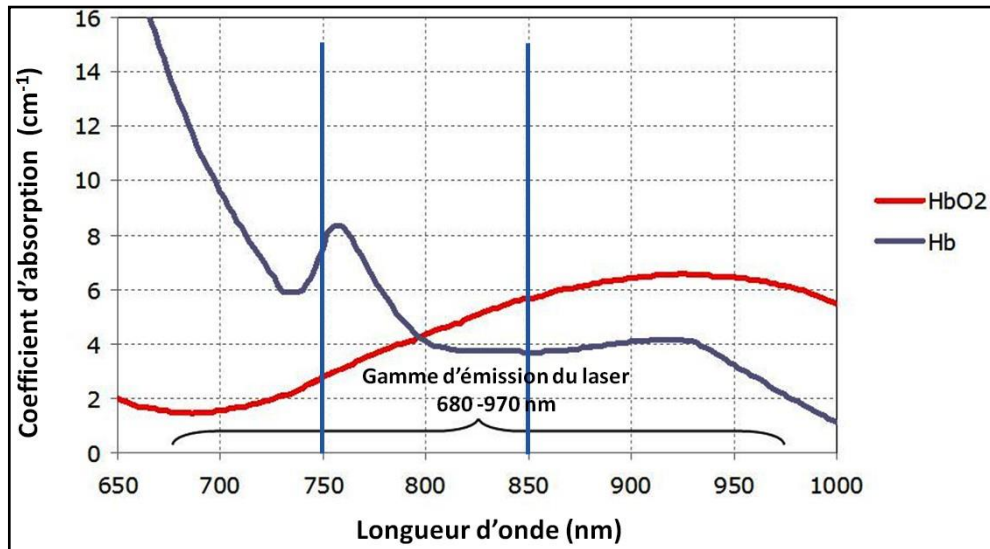


Figure 32 : Spectres d'absorption de l'hémoglobine désoxygénée (Hb) et de l'hémoglobine oxygénée (HbO₂). Le sang oxygéné possède un pic d'absorption à 850 nm tandis que le sang désoxygéné, absorbe plus fortement à 750 nm [252].

Pour calculer la quantité d'Hb totale, le logiciel se base sur les données acquises lors de la séquence d'imagerie, et nous avons alors accès au mode HemoMeaZure. Les deux modes d'imagerie de l'Hb OxyHemo et HemoMeaZure sont détaillés en Figure 33. Pour des raisons pratiques, nous avons sélectionné l'affichage de l'oxygénation en bleu et rouge, et en rouge seulement pour l'Hb totale. Sur l'image OxyHemo, les pixels colorés en rouge sont ceux pour laquelle l'oxygénation est la plus forte, tandis que pour les pixels bleus et noirs, l'oxygénation est très faible.

« Oxygenation challenge » :

Afin de pouvoir identifier les régions hypoxiques des régions normoxiques, il est envisageable de réaliser un changement de la teneur en oxygène du mélange gazeux administré à l'animal. Il est donc ainsi possible d'évaluer la capacité de la tumeur à réaliser des échanges d'oxygène lors de conditions d'apport en oxygène modifiées, et de déterminer les régions tumorales où plus aucun échange gazeux n'est possible. Dans les études qui seront présentées, les teneurs en O₂ utilisées pour les modulations ont été de 100% et 5% d'O₂. Cette modification de la teneur en O₂ administrée au sujet n'est pas exclusive de l'imagerie PA, mais peut être utilisée avec d'autres techniques comme l'IRM ou la TEP.

A noter que certaines équipes réalisent des mesures avec le « carbogen », un gaz composé de 95% O₂ et 5% CO₂, en le comparant avec des mesures avec de l'air (21% d'O₂), comme évoqué au paragraphe 1.2.3.

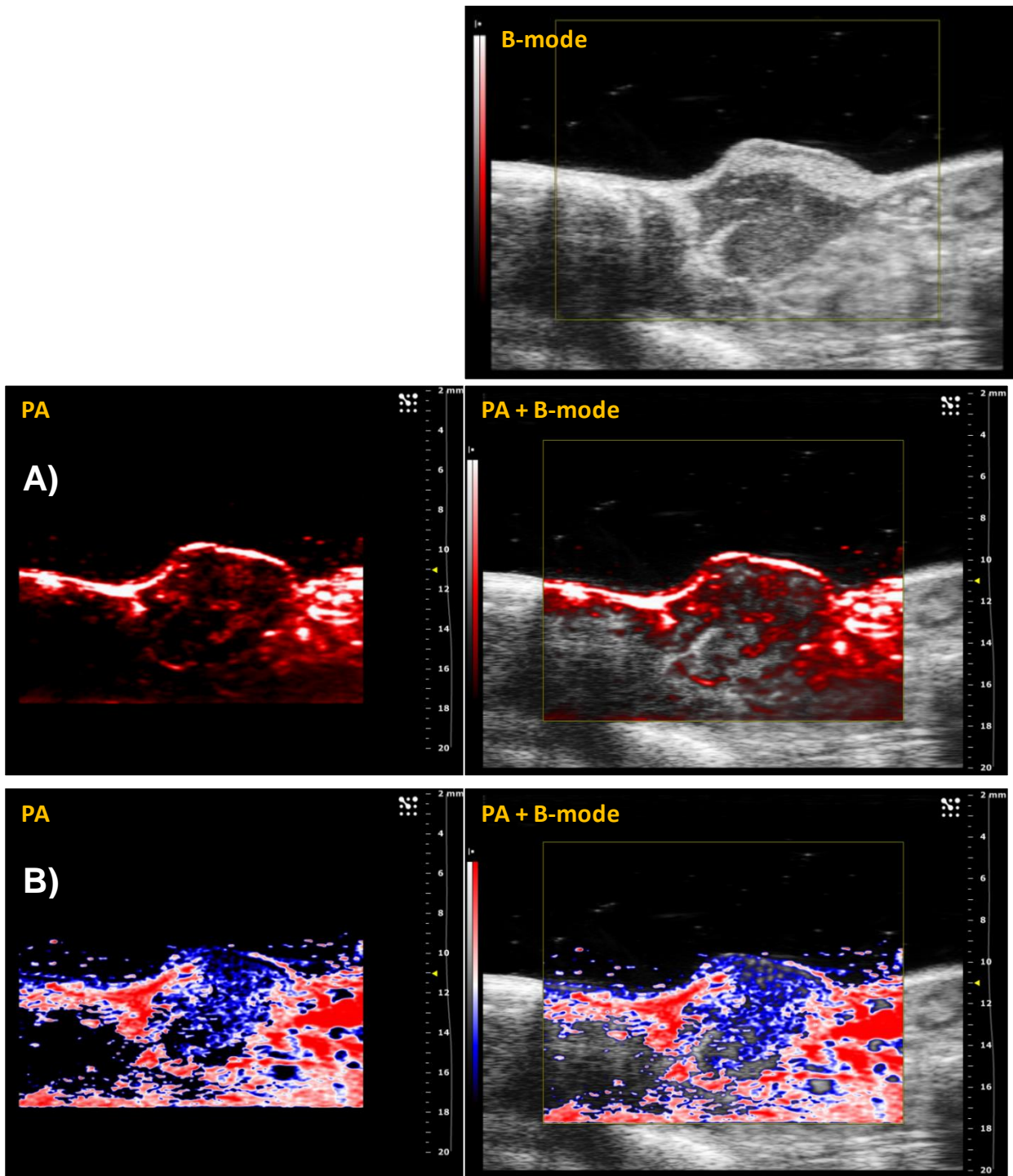


Figure 33 : Illustration des différents modes photoacoustiques disponibles associés à l'image B-Mode correspondante. A) Mode HemoMeaZure permettant l'affichage de l'hémoglobine. B) Mode OxyHemo en utilisant les longueurs d'ondes de 750 et 850nm permettant l'affichage de la SO_2 (CIPA 2016).

Un point important à considérer en imagerie PA, est la présence des molécules endogènes qui peuvent perturber la mesure de SO_2 ou encore la détection d'agents de contraste. C'est pourquoi il est possible sur certains appareils PA d'acquérir des images avec toutes les longueurs d'ondes disponibles (Mode Spectro sur le Vevo[®] LAZR), puis de retraiter les données par rapport à une librairie de spectres préenregistrés afin de faire sortir le signal d'intérêt.

Agents de contraste exogènes :

Il est également possible d'augmenter la sensibilité de l'imagerie photoacoustique en utilisant des agents de contraste exogènes comme, par exemple, des nanoparticules métalliques qui ont un fort pouvoir absorbant dans le proche infra-rouge [253], des fluorochromes seuls ou associés à des nanoparticules ou encore des colorants.

En Figure 34, nous pouvons voir les spectres d'absorption de quelques colorants et fluorochromes. Les colorants bleus tels que le bleu de méthylène ou encore le Bleu Patente V, absorbent dans des longueurs d'onde proches de 680nm. Les fluorochromes présentés absorbent plutôt entre 750 et 800nm, ce qui permet comme en fluorescence, d'éviter d'avoir un bruit de fond trop important provenant des molécules endogènes.

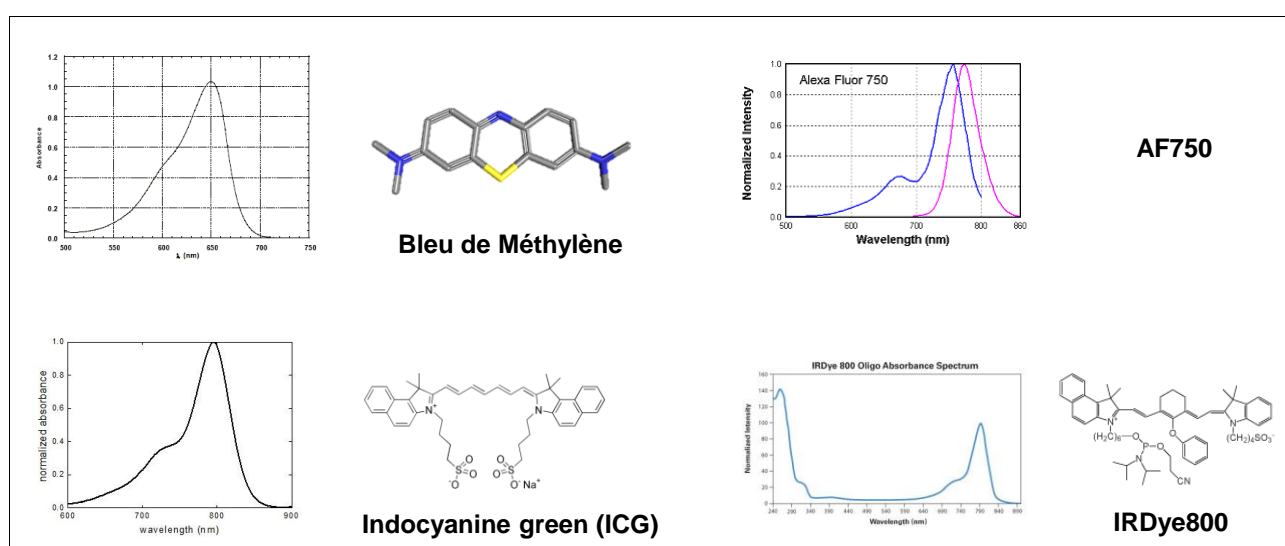


Figure 34 : Spectre d'absorption de différents colorants et fluorochromes. A) Spectre du Bleu de méthylène. B) Spectre de l'AlexaFluor®750. C) Spectre de l'ICG. D) Spectre de l'IRDye800.

En ce qui concerne les particules métalliques, on retrouve principalement des nanoparticules d'or et d'argent, qui possèdent des formes très variables et qui sont caractérisées par leur forte résonance plasmonique de surface, ce qui en fait de bons agents de contraste pour l'imagerie PA (Figure 35) [254].

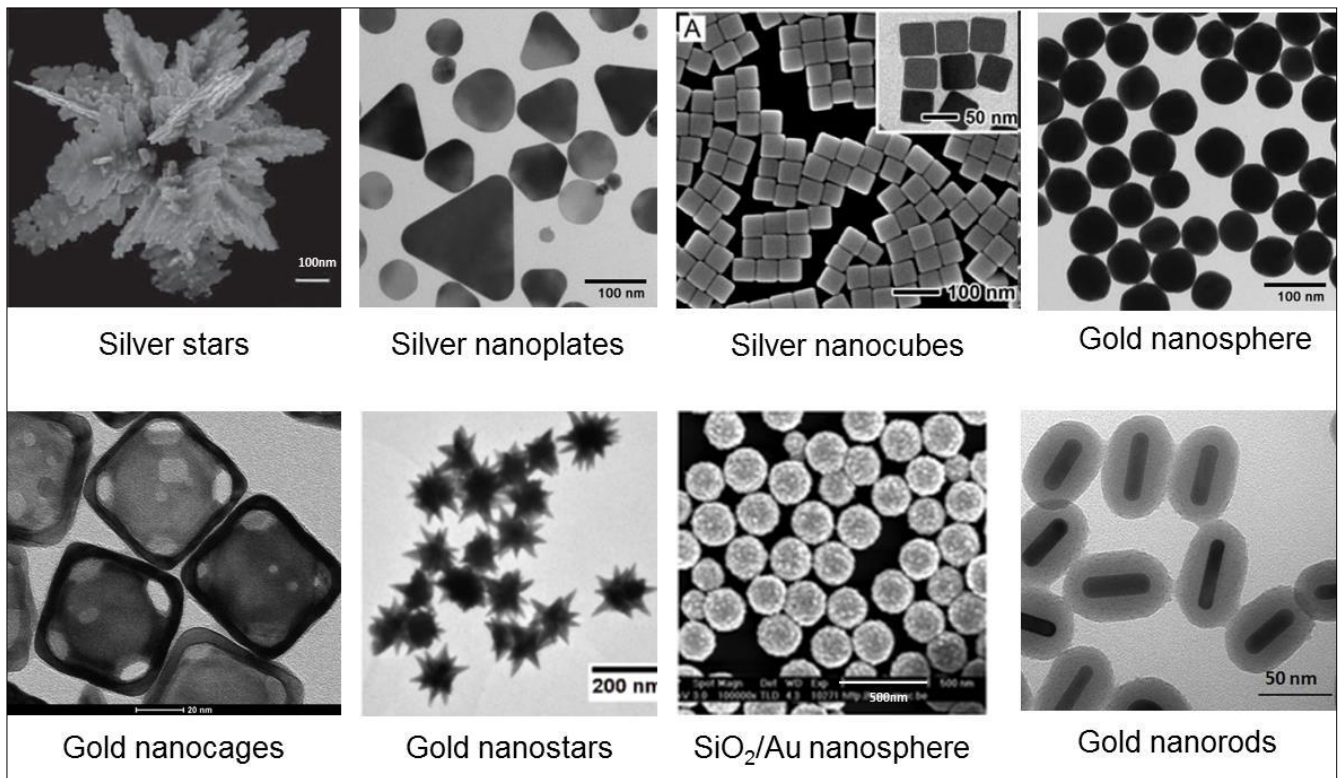


Figure 35 : Exemple de différents agents de contraste métalliques nanoparticulaires dédiés à l'imagerie photoacoustique.

Parmi les multiples autres agents de contrastes PA existant, on peut citer les nanoparticules de cellulose biodégradables [255], les nanotubes de carbone [256], les nanoparticules de cuivre [257], les gold nanorods [258-261] / nanocages / nanosphères [262] / nanostars / nanotracer [263].

Il existe également des agents de contraste bimodaux PA / Échographie de contraste. Ainsi certains auteurs ont associé microbulles et bleu de méthylène [264], microbulles et Cy5.5 [265], ou encore des microbulles avec des particules d'or [266].

A noter que, comme en imagerie de fluorescence, il est possible de réaliser des analyses de « spectral unmixing » afin d'isoler le signal spécifique provenant de l'agent de contraste par rapport au contraste endogène présent, augmentant ainsi le rapport signal/bruit (cf. Annexe 4).

Ces agents de contraste permettent notamment d'améliorer la détection et le diagnostic des cancers [251], mais le développement d'agents de contraste incontestables, au niveau de leur innocuité, de leur rapport signal sur bruit, ou encore de leur facilité à pouvoir se coupler avec des agents de ciblage reste difficile.

Par ailleurs, il existe certains agents de contraste PA qui peuvent cibler des tissus, des cellules et des molécules spécifiques grâce notamment à l'utilisation d'anticorps [251]. Beaucoup de pathologies ne manifestent pas de contraste photoacoustique endogène, il

est donc essentiel de développer des agents de contraste exogènes qui pourront cibler des tissus pathologiques [267].

Comparée au suivi de l'oxygénation tumorale réalisée par IRM BOLD, la PA possède les avantages d'être moins coûteuse et beaucoup plus rapide. Cela apporte ainsi de fortes motivations pour une translation rapide de la PA vers la clinique [268].

En ce qui concerne les évaluations en oncologie, le développement des techniques d'imagerie s'oriente vers une imagerie moléculaire quantitative. Des travaux de Rich et Seshadori ont montré que l'imagerie quantitative en PA est meilleure en termes de sensibilité de détection par rapport à l'IRM BOLD, ce qui pourrait être exploité pour évaluer de faibles changements en oxygénation pour suivre les effets de chimiothérapies ou radiothérapies. L'augmentation de cette sensibilité de détection pourrait être attribuée à une absorption optique ou une expansion thermoélastique de l'hémoglobine améliorée sur l'oxygène lié [269], comparé aux changements paramagnétiques plus subtils lorsque l'hémoglobine interagit avec l'oxygène [174].

1.2.5.4.3. Autres applications de l'imagerie photoacoustique

L'imagerie PA étant une modalité encore émergente, beaucoup d'applications potentielles ont été identifiées pour son utilisation en clinique (Figure 36). Pour le moment, la faisabilité de l'application de la PA à ces thématiques doit encore être démontrée, mais les communications et articles dans le domaine montrent que beaucoup de travaux sont faits dans ce sens.

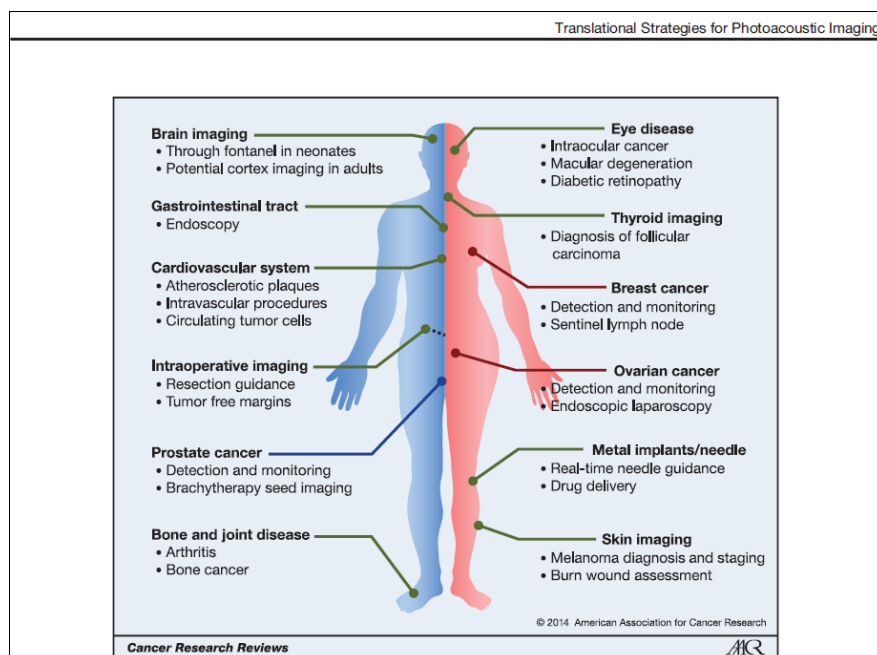


Figure 36 : Identification des champs d'application possibles de l'imagerie photoacoustique en clinique. (Cancer Research Review [247]).

On peut par exemple citer des études cliniques qui ont été menées dans but de détecter la mélanine exprimée dans les métastases de mélanomes [270], ou encore la détection de ganglions sentinelles de tumeurs mammaires [271]. D'autres équipes se sont intéressées à l'évaluation de la régénération de lésions tissulaires suite à des brûlures [272]. Les premières applications cliniques porteront vraisemblablement sur des explorations relativement superficielles dont la perfusion des greffes de lambeaux de peau et l'évaluation de l'angiopathie diabétique au niveau des membres infectés.

1.2.6. Imagerie de bioluminescence

1.2.6.1. Principe

À ce jour, une modalité d'imagerie puissante, et largement utilisée en onco-pharmacologie pour les tumeurs orthotopiques (cf. 1.4.), est la bioluminescence (BLI). Ce phénomène correspond à l'émission de lumière par un organisme vivant, résultant d'une réaction enzymatique qui permet la conversion de l'énergie chimique en énergie lumineuse (Figure 37).

La BLI n'est pas considérée comme une technique qui permet de confirmer la présence et quantifier l'hypoxie, mais l'analyse des images peut fournir des informations qui confortent les hypothèses sur la présence d'hypoxie intratumorale.

Le système bioluminescent le plus anciennement étudié et le mieux connu est celui mis en jeu par les lucioles. Dans ce cas, la luciférine est d'abord activée par de l'ATP en luciférine-AMP (Adénosine Mono-Phosphate). La luciférine-AMP est ensuite oxydée par la luciférase en présence d'oxygène (O_2) et génère de l'oxyluciférine. La molécule d'oxyluciférine étant dans un état électronique excité retourne à l'état d'équilibre avec émission de lumière et production de CO_2 et d'AMP. Cette réaction nécessite également comme cofacteur le Mg^{2+} et produit des photons avec un large spectre d'émission allant de 510 à 650nm avec un pic autour de 560 nm [273].

La bioluminescence apporte de manière non invasive des images en temps réel de l'évolution tumorale. Elle peut être considérée comme un biomarqueur quantitatif de la prolifération tumorale mais cette imagerie d'expression génique est dépendante du métabolisme au sein de la tumeur (ATP (Adénosine Tri-Phosphate) et O_2).

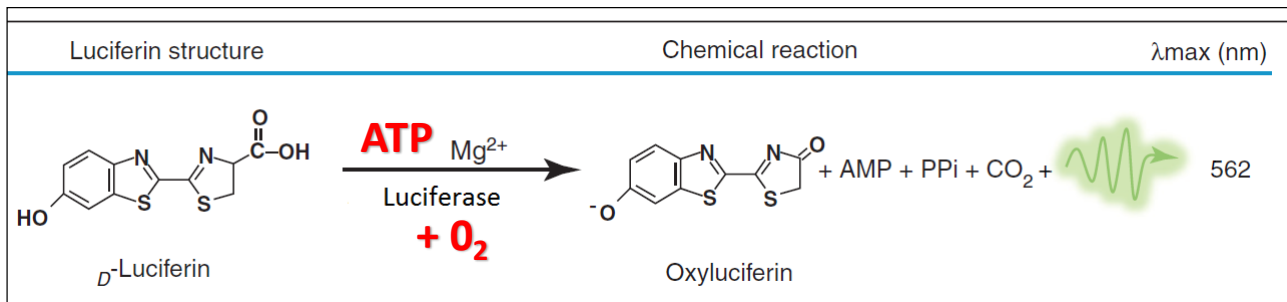


Figure 37 : Représentation schématique de la réaction de bioluminescence catalysée par la luciférase, résultant en l'émission de photons lumineux [274].

Les différentes étapes d'un protocole de bioluminescence sont :

- La production d'un système contenant le gène Luc (en général un plasmide)
- L'insertion de ce plasmide dans des cellules, bactéries ou vecteurs pour la thérapie génique
- L'injection des cellules, bactéries, ou vecteurs dans les animaux
- L'acquisition du signal avec une caméra CCD (Charge Coupled Device : dispositif à transfert de charges) ultrasensible (refroidie entre -60°C et -90°C) après l'injection par voie intra péritonéale de la luciférine et l'anesthésie de l'animal (Figure 38).

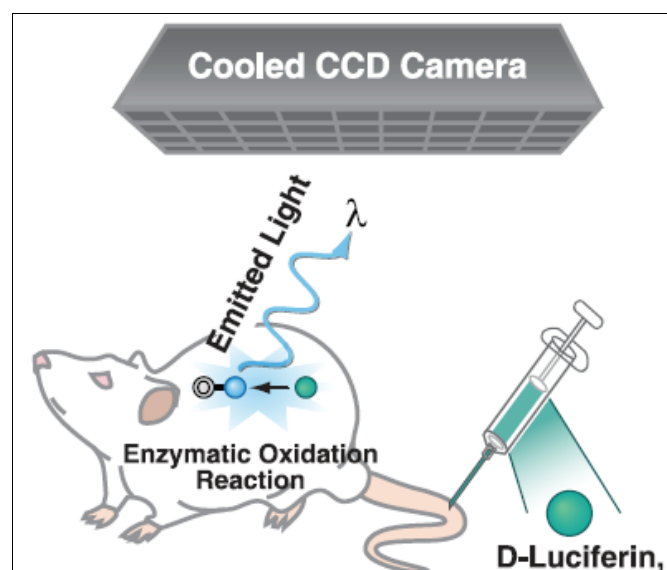


Figure 38 : Principe de l'imagerie de bioluminescence. (d'après [16]).

Obtention de cellules ou de bactéries Luc :

-Transduction lentivirale :

Cette étape consiste à créer des cellules ou des bactéries qui synthétisent de la luciférase. Pour cela, il faut insérer le gène codant pour la luciférase à l'intérieur de l'ADN de la

cellule ou de la bactérie à étudier. L'insertion se fait par transfection d'un lentivirus dans des conditions amenant une intégration stable du gène Luc (Figure 39). Cette transfection lentivirale peut ensuite nécessiter, ou non, une sélection des clones qui expriment le gène Luc.

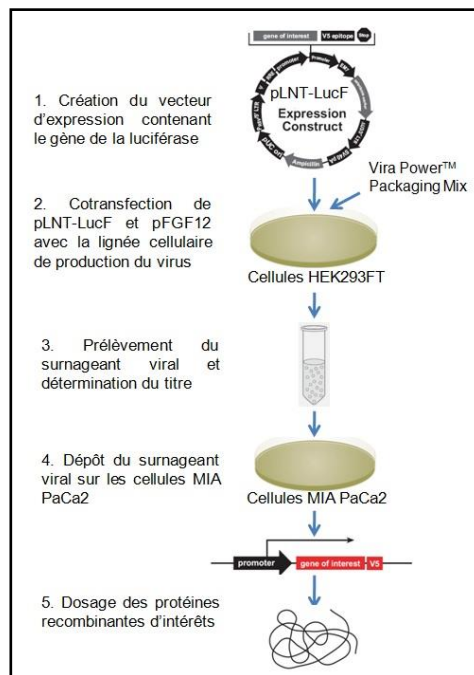


Figure 39 : Représentation d'un protocole de transfection permettant aux cellules de devenir bioluminescentes [275]

-Transfection par la lipofectamine :

La lipofectamine est utilisée pour encapsuler l'acide nucléique à insérer dans un liposome. Par fusion de membranes lipidiques entre la cellule et le liposome, l'acide nucléique est ensuite pris en charge par la cellule pour produire la luciférase.

Injection à la souris :

Les cellules transduites/transfectées sont ensuite injectées dans la souris par voie intraveineuse, en sous-cutané ou en réalisant une injection au niveau des sites orthotopiques.

La luciférine est injectée par voie intra péritonéale quelques minutes avant l'acquisition. Puis l'animal est anesthésié et positionné devant la caméra.

Acquisition du signal :

Le capteur de haute sensibilité CCD se présente sous la forme d'une matrice de détecteurs photosensibles qui correspondent à des « pixels ». Chacun de ces pixels va produire des électrons quand il va recevoir des photons émis par la réaction de

bioluminescence. Donc le nombre d'électrons produits par un pixel est proportionnel au nombre de photons reçus, avec tout de même une limite : quand un pixel reçoit trop de photons, il sature. La saturation engendre une mauvaise estimation du flux de photons car les détecteurs saturés ne peuvent plus compter de nouveaux photons incidents.

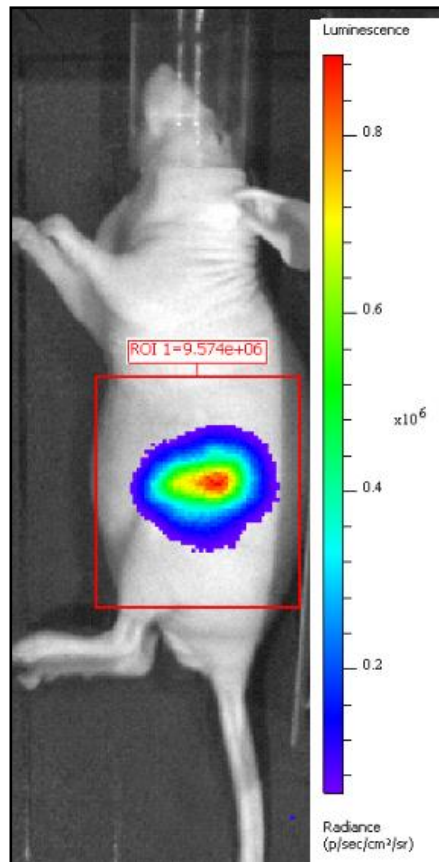


Figure 40 : Résultat d'imagerie de bioluminescence, avec quantification du signal dans une région d'intérêt (CIPA 2016).

Les signaux de bioluminescence (BLI) mesurés correspondent à l'émission totale de lumière à l'intérieur de la région d'intérêt (ROI) ($\text{photon}/\text{sec}/\text{cm}^2/\text{sr}$) (Figure 40). Le signal spécifique est calculé comme le ratio du signal de bioluminescence dans la ROI sur le signal de bioluminescence dans une région d'arrière-plan ne contenant pas de cellules ni de tumeurs. En conséquence, l'intensité de BLI est étroitement liée à l'activité, la taille, le nombre de cellules tumorales et est en corrélation avec la prolifération des cellules à condition que les tumeurs soient dans des conditions aérobies.

1.2.6.2. Applications

A l'heure actuelle, les applications de cette technique sont uniquement chez l'animal où elle est mise en œuvre principalement en cancérologie et en infectiologie. Pour les études réalisées lors de ce travail de thèse, nous avons utilisé la BLI comme un marqueur de

prolifération tumorale, ainsi qu'un marqueur indirect de l'apparition de l'hypoxie et de la nécrose. En effet, la diminution de la disponibilité de l'O₂ servant à la réaction de BLI engendre une diminution des signaux mesurés, et donc renseigne sur l'apparition du phénomène hypoxique dans ce cas particulier, lorsque les données sont comparées à des mesures de paramètres indépendants de l'hypoxie.

1.2.6.3. Autres applications de l'imagerie de bioluminescence

La BLI est également utilisée en infectiologie ou encore pour la thérapie génique et la thérapie cellulaire, chez l'animal. Elle est utilisée pour des études mécanistiques en cancérologie, inflammation, infection et toxicologie via l'utilisation de souris transgéniques dont la bioluminescence est conditionnée par l'activation d'un promoteur spécifique (VEGF, NKkB, TNF, IFN α ...). Enfin, dans la technologie de la complémentation de la luciférase permet par bioluminescence l'exploration des interactions protéines-protéines ou protéines-récepteurs.

A noter que l'imagerie de bactéries bioluminescentes est possible grâce à la modification qu'elles subissent spécifiquement pour exprimer la luciférase. Ce processus consiste à faire intégrer à la bactérie un opéron *Lux* impliquant des gènes codant la luciférase, ainsi que pour d'autres enzymes permettant la conversion d'acides gras en longues chaînes d'aldéhydes, nécessaires pour la réaction d'oxydation [276]. La réaction de bioluminescence permettant la production de photons se fait donc par oxydation de la riboflavine mononucléotide réduite, d'O₂ et d'un aldéhyde à longue chaîne, en flavine, acide gras et eau. Les opérons *Lux* utilisés dépendent de la souche de bactérie qui doit être rendue bioluminescente.

Synthèse générale :

Nous avons pu voir que de nombreuses modalités d'imagerie permettent d'évaluer le statut d'oxygénation des tumeurs. En Figure 41 est présenté un récapitulatif des différentes méthodes de détection et d'imagerie du phénomène hypoxique tumoral. Ces techniques permettent l'appréciation de paramètres différents (PO₂, SO₂), mesurés sur des tissus et molécules variés (sang, hémoglobine, tissus).

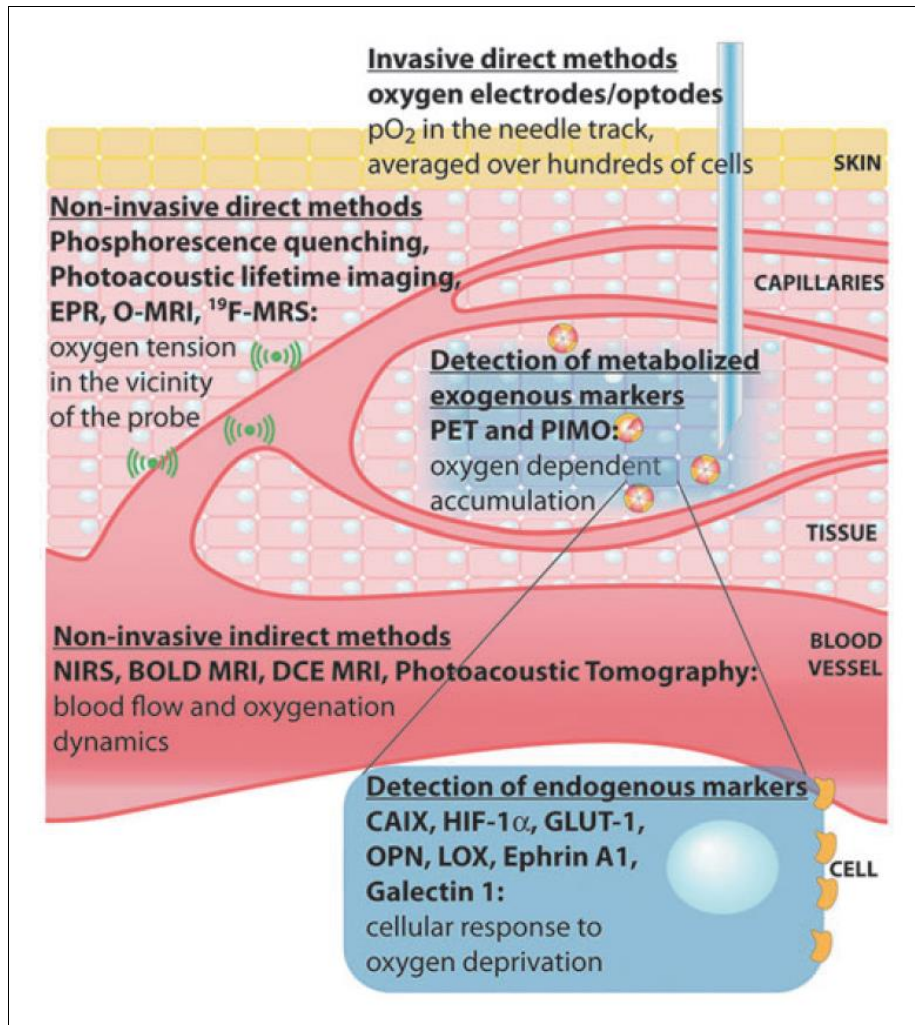


Figure 41 : Représentation des différentes techniques de mesure de l'hypoxie tumorale. (d'après [141]).

Grâce aux avancées technologiques dans le domaine, la mesure et l'imagerie de l'hypoxie sont en plein essor et permettra prochainement aux cliniciens de sélectionner les patients qui sont le plus susceptibles de répondre à certains traitements, mais également de pouvoir suivre l'évolution de la pathologie au cours d'un traitement pour modifier, le cas échéant, le type de prise en charge.

SECTION EXPERIMENTALE :

1.3. Démarches expérimentales de validation

Dans cette première partie expérimentale, nous avons voulu confronter différentes approches connues de caractérisation de l'hypoxie tumorale, sur un modèle de souris porteuses de tumeurs mammaires. Nous avons également cherché à évaluer la corrélation existant entre les différentes modalités permettant de mesurer l'oxygénation tissulaire, à savoir l'imagerie photoacoustique couplée à l'échographie (SO₂), la mesure de pression partielle en oxygène par OxyLite™ (PO₂), ainsi que l'analyse immunohistologique par microscopie de fluorescence au pimonidazole.

Le but de ce travail expérimental était donc de valider par photoacoustique la mise en évidence d'une hypoxie tumorale et de pouvoir différencier, cartographier et quantifier de manière extrêmement précise l'hypoxie et la nécrose tumorale grâce à la confrontation à des modalités qui sont considérées comme étant de référence. Une des étapes clés de ce processus préclinique pour l'onco-pharmacologie est d'utiliser un modèle pertinent tout en tenant compte de la réalité clinique. Faire abstraction de la réalité clinique conduit à un défaut de prédictibilité important et à une extrapolation hasardeuse des résultats obtenus *in vivo* à l'Homme. Cette démarche est absolument primordiale afin de confirmer la pertinence des données acquises et ainsi de confirmer le statut hypoxique de la zone tumorale.

La lignée MDA-MB-231-luc que nous avons choisi d'utiliser est un modèle d'adénocarcinome mammaire humain triple négatif. Environ 15% des cancers du sein sont triple négatif, et sont caractérisés par une absence d'expression de récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, ainsi qu'une absence d'expression de HER2. Ces cancers sont plus agressifs et présentent un risque plus élevé de métastase. Leur pronostic est donc plus défavorable. Ce modèle expérimental a été sélectionné pour refléter au maximum la situation pathologique chez l'Homme, à savoir une tumeur évoluée (diagnostic clinique souvent tardif) donc possédant une composante hypoxique et une résistance potentielle aux traitements par chimiothérapie conventionnelle. Dans ce contexte, une caractérisation fiable de l'oxygénation permettrait de prédire ou d'analyser la réponse aux thérapies, de stratifier les patients et de déterminer la thérapie la plus efficace. Elle pourrait également aider à une meilleure compréhension du développement tumoral et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

1.3.1. Mesures de la pression partielle en oxygène - OxyLite™

1.3.1.1. Matériels et Méthodes

Culture cellulaire :

Les cellules MDA-MB-231-Luc-D3H2-LN ont été obtenues auprès de Perkin Elmer® (France). Les cellules parentales (non Luc) ont été isolées en 1973 chez une patiente atteinte d'un cancer du sein. Elles ont été cultivées conformément aux instructions du fournisseur. Les cellules ont été implantées après environ 20 repiquages en plaques de 75cm², lorsqu'elles étaient à confluence.

Animaux :

Des souris saines femelles âgées de 6 semaines, de lignée Balb/C nude ont été obtenues auprès de Charles River (France). Les animaux ont été acclimatés pendant 7 jours dans le laboratoire avant le début des expérimentations. Ils ont été maintenus dans des cages en portoir ventilé (température et hygrométrie contrôlées), à raison de 5 animaux par cage, avec un accès à de l'eau et de la nourriture stérilisée par autoclave *ad libitum* et avec un cycle jour/nuit de 12h/12h pendant toute la durée de l'expérimentation. Ils ont ensuite été observés quotidiennement au niveau des signes cliniques, de stress ou de diminution d'activité physique et pesés 3 fois par semaine.

Nous avons utilisé pour cette étude un total de 16 animaux.

Modèle de tumeurs mammaires MDA-MB-231 :

Les cellules MDA-MB-231-luc ont été implantées chez la souris Balb/C nude par injection orthotopique au niveau de la glande mammaire. Les souris anesthésiées par inhalation d'isoflurane 1,5% en air (Isoflo®, AXIENCE S.A.S, Pantin, France) ont reçu un inoculum de 2x10⁶ cellules sous 100µL de PBS.

Implantation des sondes fibrées de l'OxyLite™ :

Les deux sondes OxyLite™ (Oxford Optronix) utilisées pour évaluer la PO₂ avaient un diamètre externe de 220µm et étaient positionnées simultanément à l'intérieur de la tumeur, ainsi qu'au niveau sous-cutané afin d'obtenir une mesure de référence. Les sondes OxyLite™ ont été insérées à l'aide d'une aiguille 26G sur animal anesthésié, après micro-incision préalablement réalisée au niveau cutané.

La sonde implantée au niveau sous-cutané a été glissée quelques millimètres sous la

peau de l'animal (possibilité de contrôler son insertion grâce au signal lumineux émis au bout de la fibre optique). La sonde implantée au niveau de la zone hypoxique (préalablement documentée par PA) a été glissée jusque dans la zone d'intérêt grâce à un contrôle par échographie et PA en temps réel (insertion écho-guidée) (Figure 42).

Protocole :

4 groupes d'animaux ont été inclus dans l'étude :

- Un groupe de 4 animaux pour mesurer l'oxygénation tumorale à un stade précoce de développement (J7).
- Un groupe de 4 animaux pour mesurer l'oxygénation tumorale à un stade de développement plus avancé (J14).
- Un groupe de 4 animaux pour mesurer l'oxygénation tumorale à un stade plus tardif de développement (J21).
- Enfin un groupe de 4 animaux a été prévu pour réaliser dans un premier temps, un suivi longitudinal de la croissance et de l'oxygénation tumorale (imagerie à J14, J21, J28). Dans un second temps, sur ce groupe a été appliqué le même protocole d'imagerie et de mesures que sur les autres groupes, à savoir une mesure de l'oxygénation par Vevo® LAZR et OxyLite™ à un stade tardif de développement (J28).

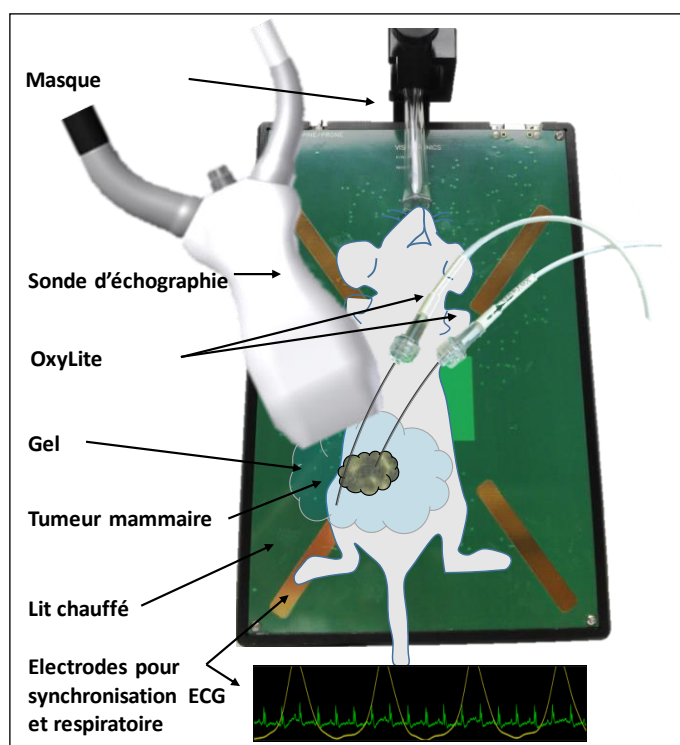


Figure 42 : Schéma représentant le positionnement des sondes OxyLite™ par rapport au transducteur d'échographie, sur animal anesthésié et installé sur le lit chauffé du système Vevo® LAZR (CIPA 2016).

Imagerie photoacoustique :

Les souris anesthésiées ont été placées sur le lit de la station d'imagerie du système Vevo[®]. Une synchronisation respiratoire automatique, basée sur la filtration des basses fréquences de l'ECG, a été activée afin d'éviter les artéfacts dus aux mouvements respiratoires lors des acquisitions. La température des animaux a été suivie grâce à l'utilisation d'une sonde rectale. Un gel aqueux translucide chauffé (Supragel[®], LCH, France) a été appliqué sur la peau des animaux afin de permettre la conduction des ultrasons et optimiser la visualisation des organes internes. Les tumeurs ont ensuite été imagées avec le système Vevo[®]™ LAZR (Figure 43) (Fujifilm VisualSonics Inc, Amsterdam, Pays Bas). Ce système d'échographie et photoacoustique est un système à très haute résolution de dernière génération, récemment implanté au CIPA. Un transducteur avec une fréquence centrale de 40MHz, une résolution de 40µm et un champ de vue de 14,1mmx15mm a été utilisé pour acquérir les données B-Mode des tumeurs de petites tailles. Un transducteur avec une fréquence centrale de 21MHz, une résolution de 75µm et un champ de vue de 23,1mmx36mm a été utilisé pour acquérir les données B-Mode des tumeurs de tailles plus importantes. Toutes les tumeurs ont été imagées avec la sonde de 21MHz pour les données Oxy-Hemo. Les acquisitions 3D permettant d'obtenir des données volumiques ont été enregistrées numériquement grâce à l'utilisation d'un moteur pas-à-pas (pas de 0,03µm minimum) contrôlé automatiquement. Les aires tumorales ont pu être tracées manuellement sur chacune des coupes acquises dans le plan transverse par le logiciel Vevo[®] Lab. Le logiciel a ensuite calculé les volumes par extrapolation des aires dessinées en fonction de la distance parcourue par le moteur. Cet instrument est calibré de sorte que les mesures de volumes sont déterminées très précisément. Au cours des acquisitions photoacoustiques sur les tumeurs, les paramètres tels que le gain, la puissance du laser, la profondeur d'imagerie et la fréquence d'acquisition des images ont été gardés constants, de telle sorte que chaque lot de données a été acquis de manière identique rendant possible leur comparaison.

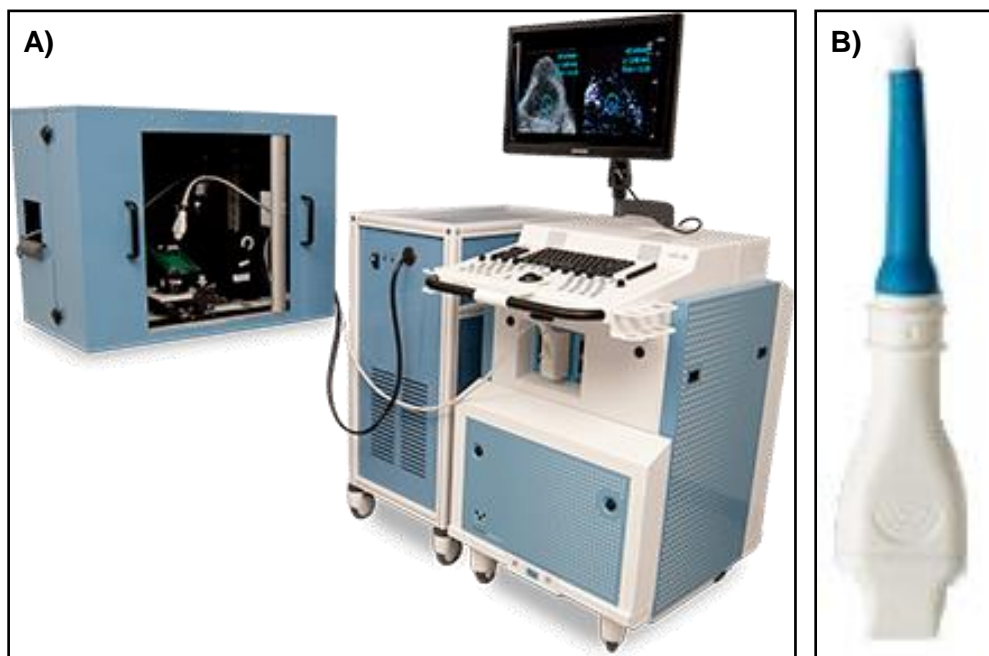


Figure 43 : Présentation du Vevo® LAZR. A) Système d'imagerie ultrasonore haute résolution couplé à l'imagerie photoacoustique VisualSonics Vevo™ LAZR et logiciel VevoLAB. **B)** Transducteur avec fréquence centrale de 40 MHz MS550D (FUJIFILM Visualsonics Inc.)

Enregistrement des données OxyLite™ :

Les données de pressions partielles en O₂ (PO₂) ont été mesurées grâce au logiciel AT-CODAS Windaq (DATAQ Instruments Inc., Akron, Etats-Unis). Ce logiciel a permis un enregistrement des PO₂ en fonction du temps. Les notifications possibles d'évènements sur la ligne de temps ont permis de recalibrer les données OxyLite™ et Vevo®.

Protocoles d'acquisitions :

Afin d'évaluer la capacité de la tumeur à réaliser des échanges d'oxygène lors de conditions d'apport en oxygène modifiées, il a été réalisé un changement de la quantité d'oxygène du mélange gazeux qui est administré à la souris pour l'anesthésie :

- 5 minutes d'acquisition avec un mélange gazeux de 100% d'O₂
- Puis 2 minutes d'acquisition avec un mélange gazeux de 5% d'O₂
- Puis 5 minutes d'acquisition avec un mélange gazeux de 100% d'O₂

Pendant ces changements de quantité d'oxygène du mélange gazeux, les mesures par Vevo® LAZR et OxyLite™ ont été réalisées et enregistrées.

Cette procédure de variation de la quantité d'oxygène du mélange gazeux qui est administré à la souris constitue un test fonctionnel permettant de confirmer le statut hypoxique de la zone tumorale. En effet, dans une zone hypoxique, la vascularisation et

les flux sanguins sont si ralentis et désordonnés, que l'apport en oxygène est trop faible. Cela a pour conséquence une très faible, voire une absence de variation de l'oxygénation tissulaire mesurée par le Vevo® LAZR et par la sonde OxyLite™ insérée dans la région hypoxique d'intérêt. En revanche, dans les zones (tumoraux ou non) encore relativement bien oxygénées, il est attendu une variation de l'oxygénation tissulaire qui sera visible aussi bien par le Vevo® LAZR que par l'OxyLite™ avec la sonde de référence située au niveau sous-cutané.

Mise à mort des animaux et prélèvements d'organes :

Une fois la procédure terminée, l'animal anesthésié par inhalation d'isoflurane (2% dans l'air) a été mis à mort par dislocation cervicale, comme préconisé pour cette espèce animale.

Chacune des tumeurs a été ensuite prélevée puis conservée 48H en formol neutre à 10%, puis stockée en éthanol 70°. Ces tumeurs ont été analysées par microscopie classique et de fluorescence après avoir été sectionnées pour l'évaluation de l'hypoxie intratumorale.

1.3.1.2. Résultats

Afin d'obtenir des images de qualité, une centrifugation du gel d'échographie a été nécessaire afin de retirer toute présence de bulles pouvant artéfacter l'imagerie PA. En effet, les bulles d'air présentes dans le gel perturbent l'acquisition du signal, mais leur artéfact est facilement identifiable de par sa forme caractéristique en arc de cercle (Figure 44).

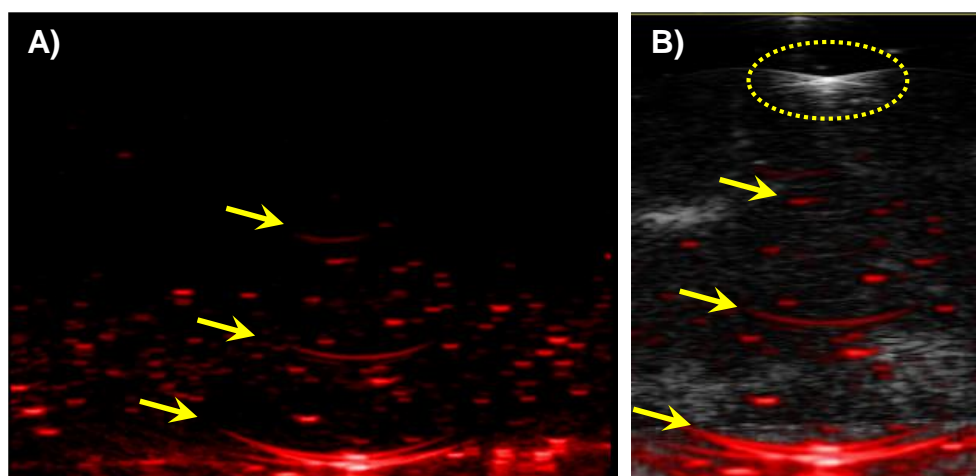


Figure 44 : Image PA d'un artéfact typique causé par la présence d'une bulle d'air. A) Signaux photoacoustiques typiques d'artéfacts en forme d'arcs de cercle identifiés par les flèches jaunes. **B)** Superposition de l'image B-Mode avec le signal photoacoustique. Nous pouvons apprécier dans la zone en pointillé jaune, la représentation d'une bulle d'air contenue dans le gel d'échographie (CIPA 2016).

Nous avons pu mesurer précisément les volumes tumoraux, ainsi que les volumes considérés comme hypoxiques à l'intérieur des tumeurs greffées chez les souris. Un exemple des paramètres mesurables par imagerie PA sur une tumeur mammaire est présenté en Figure 45 (A&B). Pour cette tumeur, les pourcentages de SO₂ de la tumeur totale sont de 33% (ROI violette), tandis que le pourcentage de la région hypoxique n'est que de 21% (ROI rouge). Comme représenté en Figure 45E, nous pouvons ainsi apprécier ces différents volumes grâce à l'affichage des maillages correspondants. Pour des mesures plus rapides, notamment pour l'estimation du volume tumoral, il est possible de se limiter à la mesure de la longueur et de la largeur des tumeurs pour avoir une estimation du volume tumoral (Figure 45F).

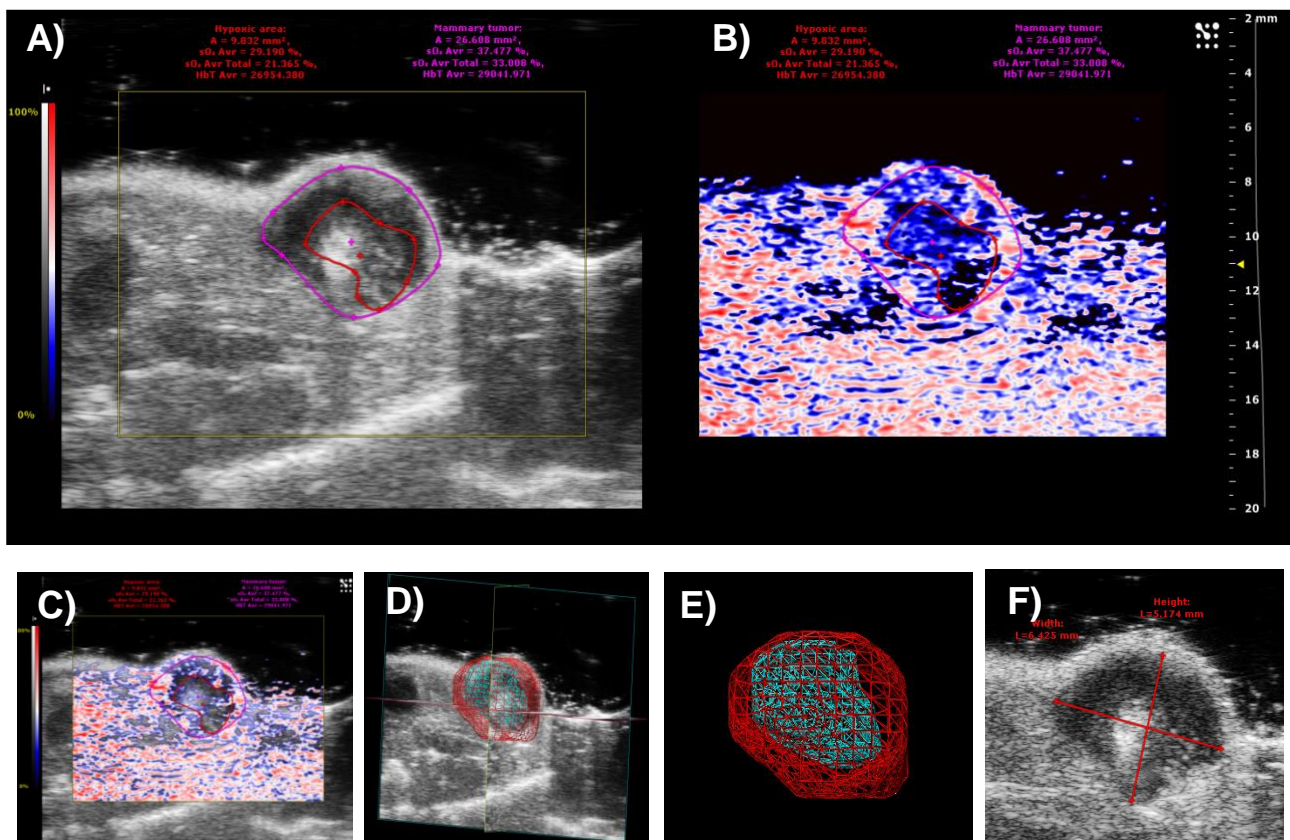


Figure 45 : Exemples de paramètres mesurables sur une tumeur mammaire chez la souris. A) & B) Délimitation de l'aire tumorale et de l'aire tumorale hypoxique sur l'image B-Mode et OxyHemo correspondante. C) Superposition de l'image B-Mode et PA. D) Rendu 3D des volumes sur l'image B-Mode. E) Détermination du volume hypoxique et du volume tumoral total. F) Mesures des longueur et largeur de la tumeur (CIPA 2016).

Afin de contrôler le positionnement de la sonde OxyLite™, une simple mesure par échographie avec un alignement parallèle du transducteur et de la fibre optique nous a permis de positionner le bout de la sonde au niveau de la région d'intérêt (Figure 46). Nous avons pu de cette manière vérifier que la sonde était bien localisée au niveau d'une zone hypoxique (ou au centre des tumeurs lorsque celles-ci sont à un stade précoce) et au niveau intra-musculaire.

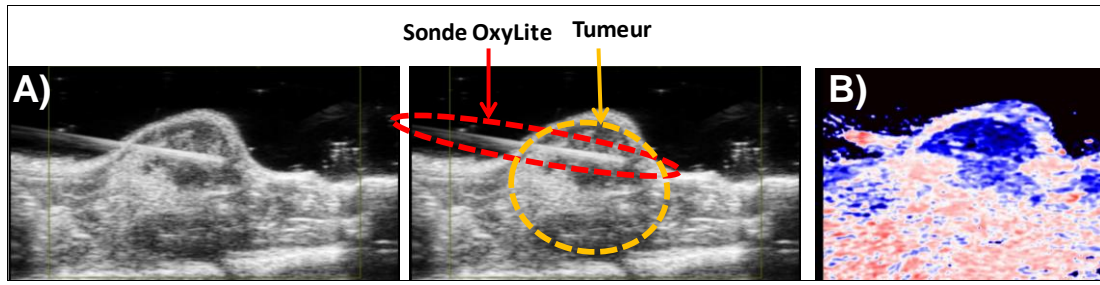


Figure 46 : Contrôle du positionnement de la sonde fibrée OxyLite™. A) Image B-Mode sur laquelle nous voyons nettement la fibre optique de la sonde OxyLite™ à l'intérieur de la tumeur. B) Image OxyHemo correspondante permettant le contrôle du statut d'oxygénation du lieu dans lequel est insérée la sonde (CIPA 2016).

Concernant la mesure différentielle de décroissance de la SO_2 , nous avons montré que le muscle et la tumeur totale répondent bien aux changements de la concentration en O_2 dans le mélange gazeux administré à la souris tandis que la zone hypoxique tumorale ne répond pas à ces changements (Figure 47). En effet, lorsque la concentration en O_2 respiré par l'animal passe de 100% à 5%, la SO_2 passe de 60,7% à 44,6% et de 33,2% à 23,7% pour le muscle et la tumeur respectivement (ROI1 & ROI2). En revanche, elle ne passe que de 4,4% à 4,3% dans la zone hypoxique tumorale (ROI3).

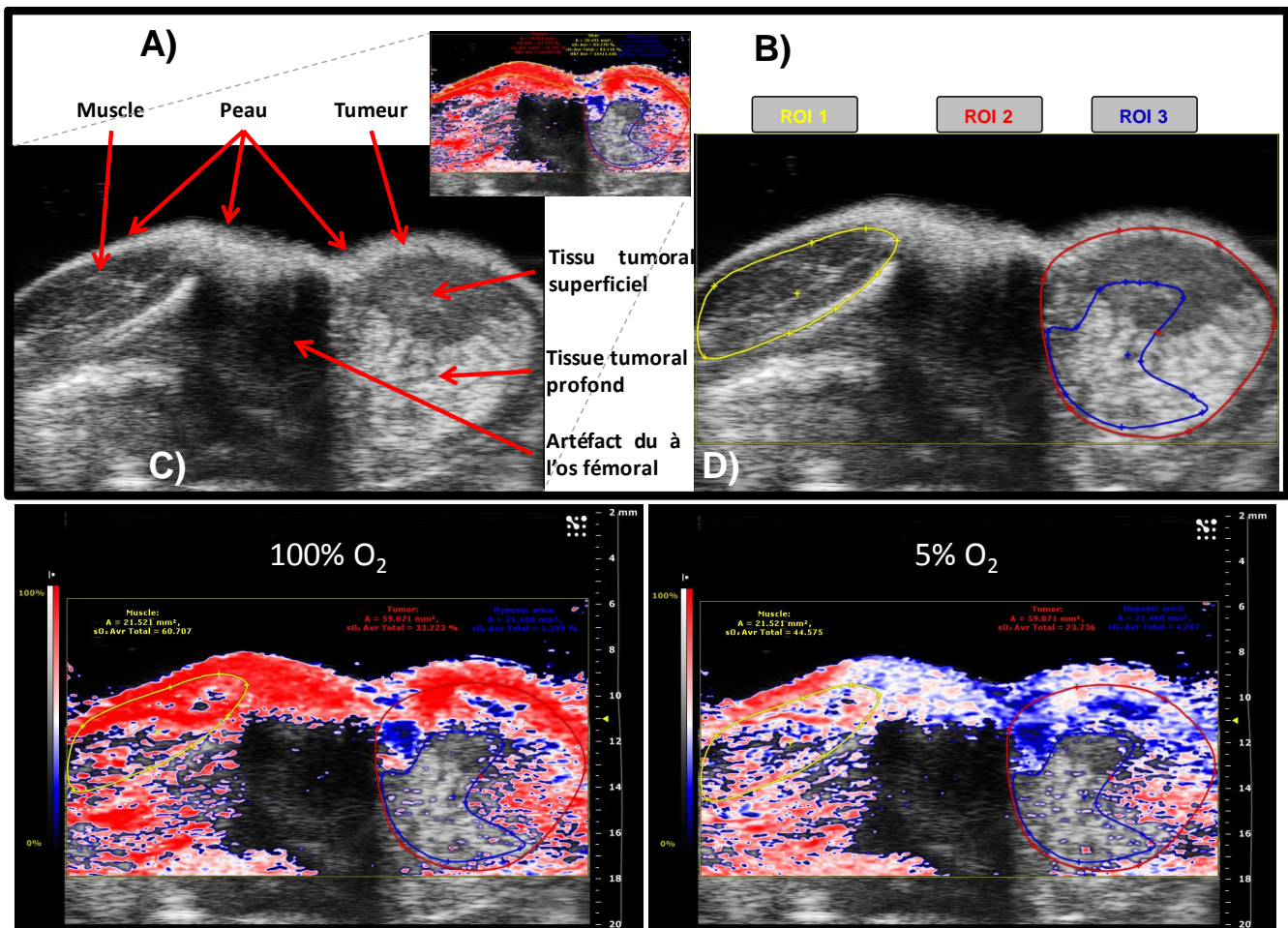


Figure 47 : Mesure de la SO_2 lors d'une variation de la quantité d'oxygène dans le mélange gazeux respiré par l'animal au niveau d'une tumeur mammaire orthotopique MDA-MB-231. A) Données anatomiques. B) Détermination des ROIs pour les mesures OxyHemo. ROI 1 : Muscle ; ROI 2 : Tumeur totale ; ROI3 : Zone hypoxique tumorale. C) Données OxyHemo correspondantes lors d'une oxygénation gazeuse à 100%. D) Données OxyHemo correspondantes lors d'une oxygénation gazeuse à 5% (CIPA 2016).

Sur les graphiques de la Figure 48, nous pouvons voir que la SO_2 et la PO_2 répondent de manière identique pour les mesures de référence au niveau musculaire. Les mesures réalisées au niveau de la zone hypoxique tumorale montrent également une bonne corrélation des données. Nous avons tout de même noté une tendance à la rechute de la PO_2 après le retour à 100% en O_2 au niveau musculaire (Figure 48B).

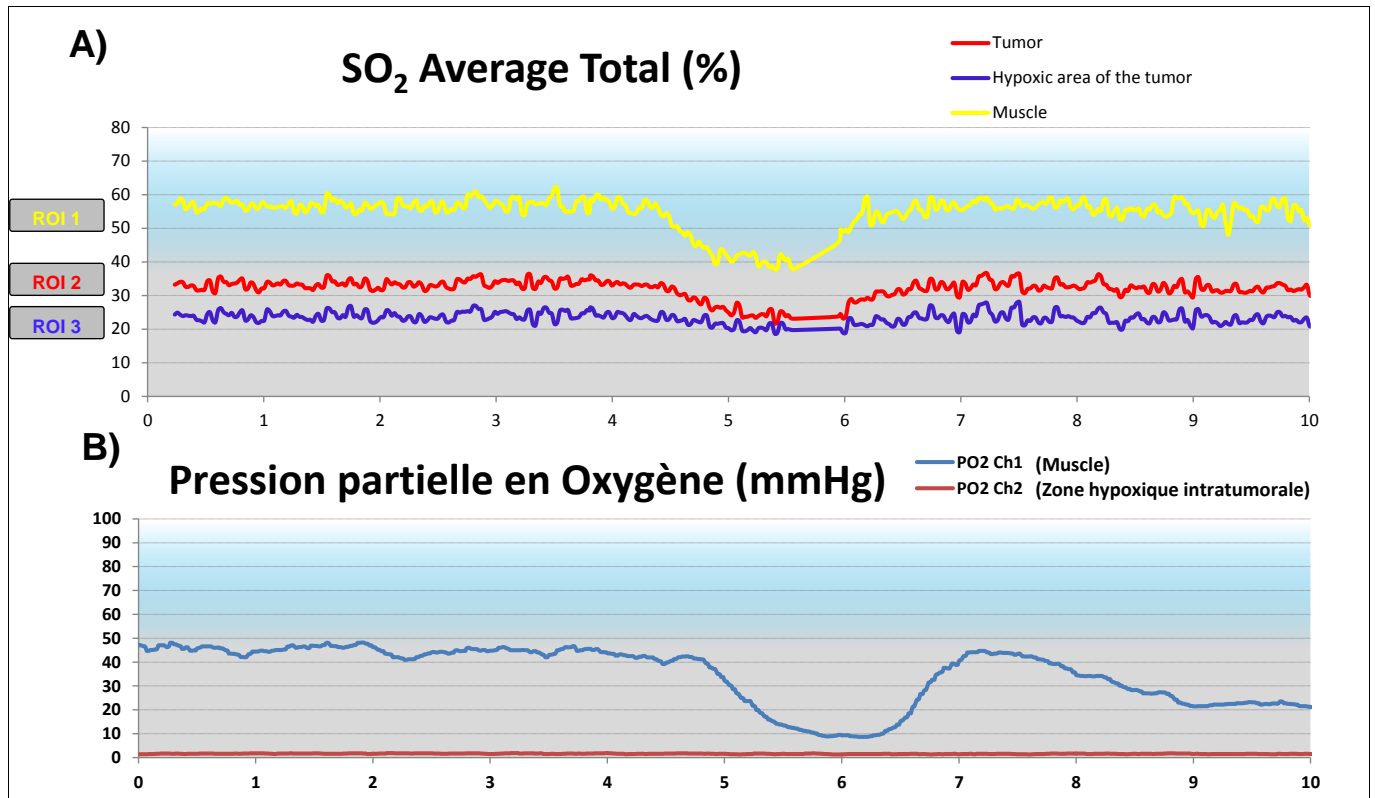


Figure 48 : Comparaison de données : SO_2 Vs PO_2 . A) Mesures de la SO_2 en fonction des 3 ROIs. B) Mesures de la PO_2 musculaire et tumorale.

Nous avons également observé que les mesures réalisées avec l'OxyLite™ variaient beaucoup entre chaque animal (données non présentées). Cette variabilité interindividuelle sont observées en termes de valeurs absolues de PO_2 , en revanche il n'y a pas de variabilité entre les mesures réalisées sur un même animal au niveau de la dynamique des changements d' O_2 entre l'OxyLite et le Vevo.

Dans le but de confronter des résultats obtenus au sein d'une même tumeur, nous avons réalisé des acquisitions en implantant une sonde dans la partie hypoxique et une sonde dans la partie encore oxygénée de la tumeur (Figure 49). Nous avons obtenu, pour cette seconde approche, des résultats similaires à ceux obtenus avec la sonde intramusculaire de référence, à savoir une absence de réponse de la zone hypoxique aux conditions d'oxygénation de l'animal. Les implantations ont également été vérifiées par imagerie PA.

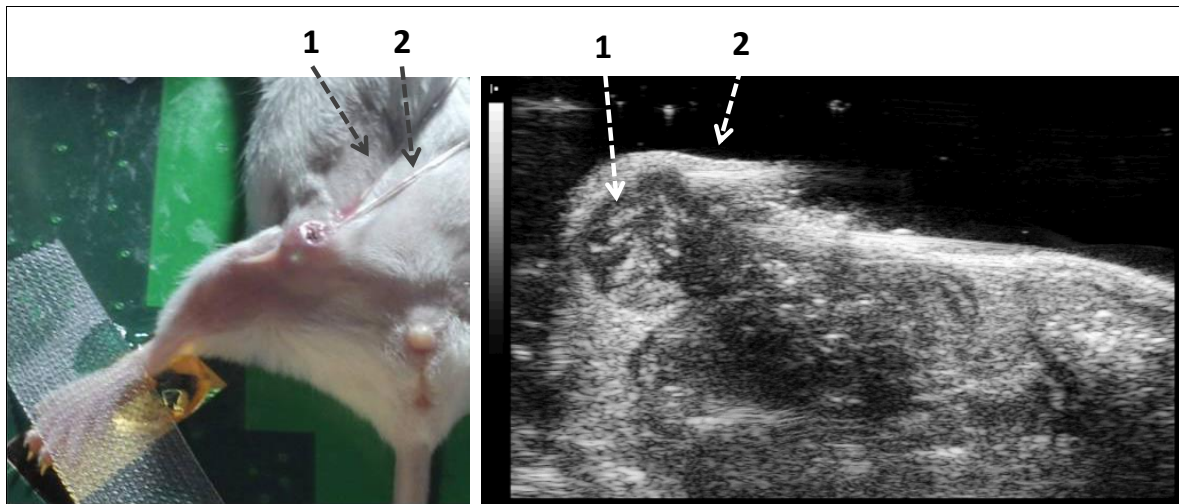


Figure 49 : Double implantation de sondes OxyLite™ au niveau tumoral. Une des sondes est implantée dans une zone hypoxique (1) l'autre sonde est implantée en périphérie, dans une zone bien oxygénée (2) (CIPA 2016).

Discussion :

Grâce à l'utilisation simultanée de l'OxyLite™ et du Vevo® LAZR®, nous avons pu valider l'utilisation de la photoacoustique pour des mesures de paramètres d'oxygénation. La mesure de la PO₂ par OxyLite™ étant considérée comme une technique de référence, cette confrontation de données d'oxygénation a permis de corréliser des données de pressions partielles en O₂ et des mesures de saturations de l'Hb en O₂.

Comme nous avons pu le voir aux paragraphes 1.1 et 1.2, les mesures dynamiques de changements d'oxygénation pour l'évaluation de l'hypoxie sont courantes, en modifiant la concentration en O₂ dans le mélange gazeux qui est administré aux animaux. Cependant, la mesure absolue du pourcentage moyen de saturation de l'oxygène chez les souris au cours des changements de concentration en O₂ était très variable, suggérant que cette mesure absolue soit un biomarqueur individuel à chaque tumeur. Les résultats obtenus indiquent également que d'autres conditions physiologiques présentes *in vivo* pourraient influencer la mesure absolue de SO₂ par PA (comme par exemple la taille tumorale, le temps d'anesthésie, mais aussi la température du gel d'échographie...)

1.3.2. Immuno-marquage des complexes protéiques réduits

1.3.2.1. Matériels et Méthodes

La caractérisation immuno-histologique de l'hypoxie par marquage au pimonidazole consiste en l'injection de pimonidazole (2-nitroimidazole) aux animaux. Le pimonidazole, en situation d'hypoxie, produit des adduits (liaison pimonidazole-protéine réduite).

Protocole :

Environ 60 minutes avant leur mise à mort, les animaux ont reçu une administration intrapéritonéale de pimonidazole (Hypoxyprobe Inc., Burlington, Etats-Unis). Chaque souris a reçu une injection unique IP de pimonidazole à la dose de 120 mg/kg, ce marqueur se fixant alors spécifiquement de manière covalente dans les zones tumorales présentant une hypoxie.

Les tumeurs ont ensuite été prélevées, fixées pendant 48H dans du formol neutre (10%), puis ont été stockées dans de l'éthanol (70%) en attendant les coupes histologiques. Ces prélèvements ont ensuite été inclus en paraffine, puis coupés successivement en fines sections de 7µm d'épaisseur, soit pour le marquage anti-pimonidazole (immuno-fluorescence, soit pour une coloration classique Hématoxyline/Eosine.

Les sections de tumeurs ont été réalisées de la manière suivante (Figure 50) :

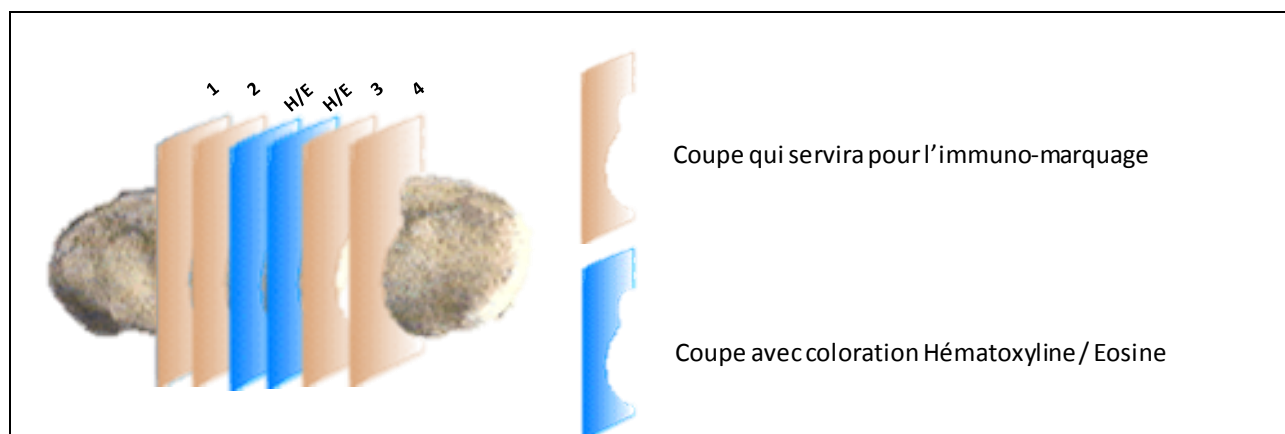


Figure 50 : Protocole de section des tumeurs pour les analyses histologiques (7 µm d'épaisseur) (CIPA 2016).

Un immuno-marquage par anticorps primaire murin anti-pimonidazole à 20µg/mL (Abcam, Cambridge, Etats-Unis) permet de marquer les zones où le pimonidazole s'est accumulé, sur les coupes de tumeurs. Ensuite, un anticorps secondaire caprin (anticorps anti-anticorps primaire) marqué au FITC (IsoThioCyanate de Fluorescéine) à 10 µg/mL (Abcam, Cambridge, Etats-Unis) permet de révéler en microscopie de fluorescence, la présence de régions hypoxiques au sein de la tumeur. Un milieu de montage contenant du 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole) (DAPI) (Fluoroshield, Abcam, Etats-Unis) a été utilisé pour mettre en évidence en fluorescence bleue la position des noyaux cellulaires (car ce sont les bases Adénine et Thymidine de l'ADN (Acide Désoxyribo Nucléique) qui fixent fortement le DAPI).

Les colorations Hématoxyline/Eosine ainsi que les coupes sur bloc de paraffine ont été

réalisées par le laboratoire Novaxia (Saint-Laurent-Nouan, France).

La procédure d'immuno-marquage fluorescent du pimonidazole est détaillée en Annexe 5.

1.3.2.2. Résultats

Dans un premier temps, nous avons comparé les données d'histologie classique avec coloration Hématoxyline/Eosine (H/E), aux données obtenues avec le Vevo[®] LAZR. La Figure 51B présente 2 ROIs dessinées correspondant chacune à une zone hypoxique à l'intérieur de la tumeur (l'une rouge, l'autre verte) en mode Oxy-Hemo (SO₂) et en mode HemoMeaZure (Hb totale), ainsi que la coupe histologique correspondante. Grâce à cette comparaison, il est possible de différencier et déterminer par photoacoustique, une zone correspondant à de la nécrose, d'une zone correspondant à des cellules vivantes, mais hypoxique. Nous pouvons effectivement observer que sur la coupe colorée à l'Hématoxyline/Eosine, la ROI qui était verte en OxyHemo correspond à une zone nécrotique (couleur rose en Hématoxyline/Eosine). En mode HemoMeaZure, cette région ne contient qu'une très faible quantité d'hémoglobine (pas de signal provenant de l'Hb mesurable). En effet, en mode OxyHemo, cette ROI verte est bien identifiée comme hypoxique. Pour la ROI rouge supérieure, aucune nécrose n'est détectable en histologie (couleur violette en Hématoxyline/Eosine), et l'hémoglobine est bien présente d'après l'image en mode HemoMeaZure, la zone étant bien caractérisée comme hypoxique en mode OxyHemo.

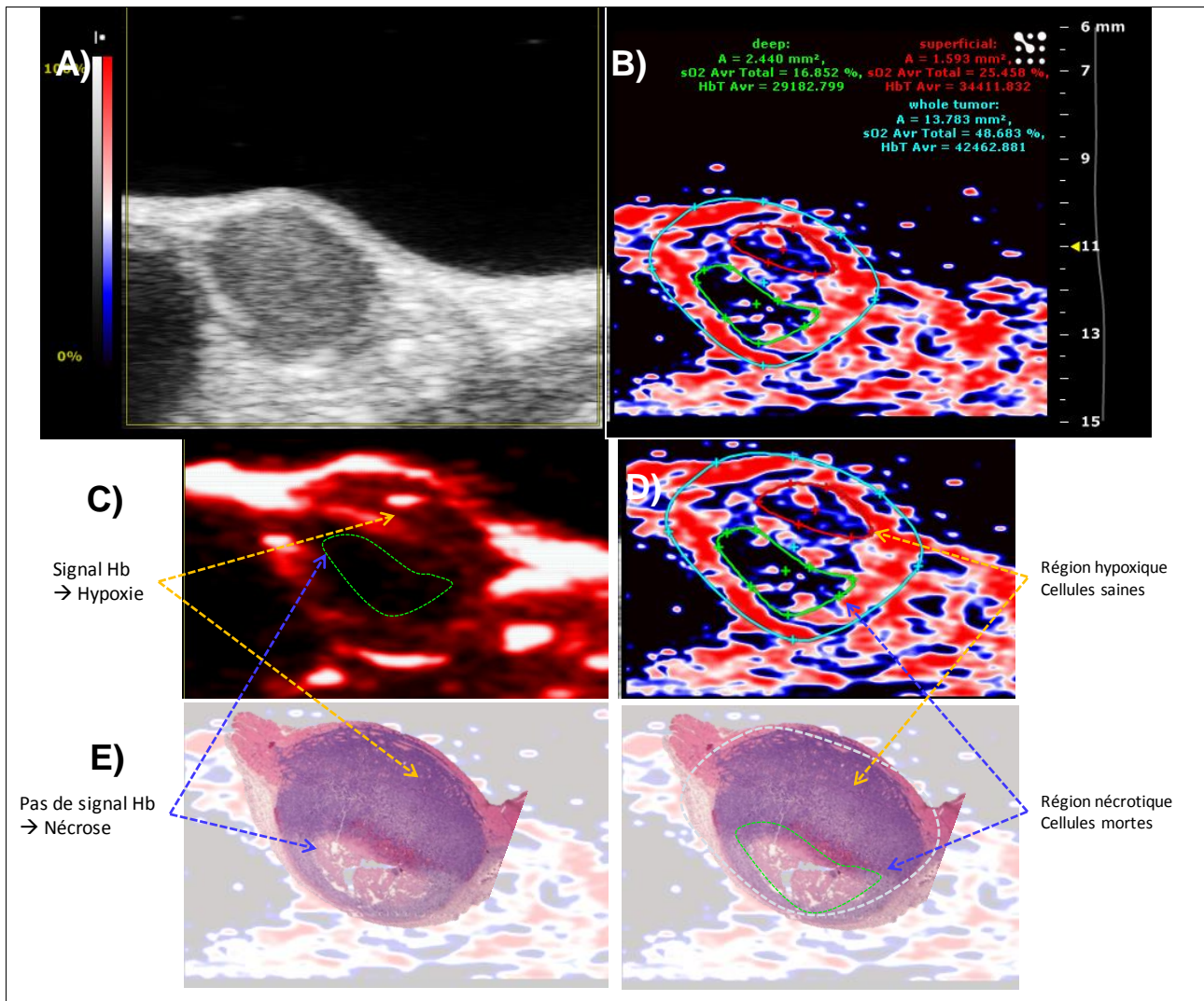


Figure 51 : Comparaison de l'histologie classique H/E avec les données photoacoustiques correspondantes. A) Image B-Mode de la tumeur mammaire. **B)** Image OxyHemo correspondante. **C)** Image HemoMeaZure montrant une zone nécrotique dépourvue d'Hb. **D)** Délimitation des zones identifiées comme hypoxiques en mode OxyHemo (nécrotiques ou non). **E)** Coupes histologiques correspondantes (CIPA 2016).

Dans un second temps, nous avons également comparé les données PA, histologiques et immuno-histologiques. Grâce à la microscopie de fluorescence, nous avons pu confirmer le statut hypoxique des régions identifiées par imagerie PA (Figure 52). Les régions vertes correspondent aux régions où le pimonidazole s'est fixé. Pour la tumeur présentée, on détecte la présence d'hypoxie importante en immuno-fluorescence (Figure 52B) ainsi qu'une bonne correspondance entre l'imagerie OxyHemo et le marquage du pimonidazole. En effet, les zones très peu saturées en O_2 correspondent bien aux zones vertes en immuno-fluorescence. Quand nous comparons la coloration H/E à l'OxyHemo, nous pouvons observer que les régions nécrotiques sont bien déterminées comme hypoxiques sur l'image PA.

En comparant la coloration H/E et l'immuno-fluorescence, nous pouvons dire que les régions nécrotiques correspondent toutes à des territoires hypoxiques. En revanche, de

nombreuses régions hypoxiques ne sont pas encore nécrotiques. Ces résultats confortent ceux obtenus par imagerie PA, à savoir qu'il est bien possible de mettre en évidence des régions hypoxiques qui ne sont pas encore nécrotiques.

Lorsque nous analysons plus globalement ces résultats, nous avons pu montrer que l'imagerie photoacoustique permet bien de mettre en évidence les régions hypoxiques, ainsi que les régions nécrotiques, grâce aux comparaisons avec les techniques histologiques.

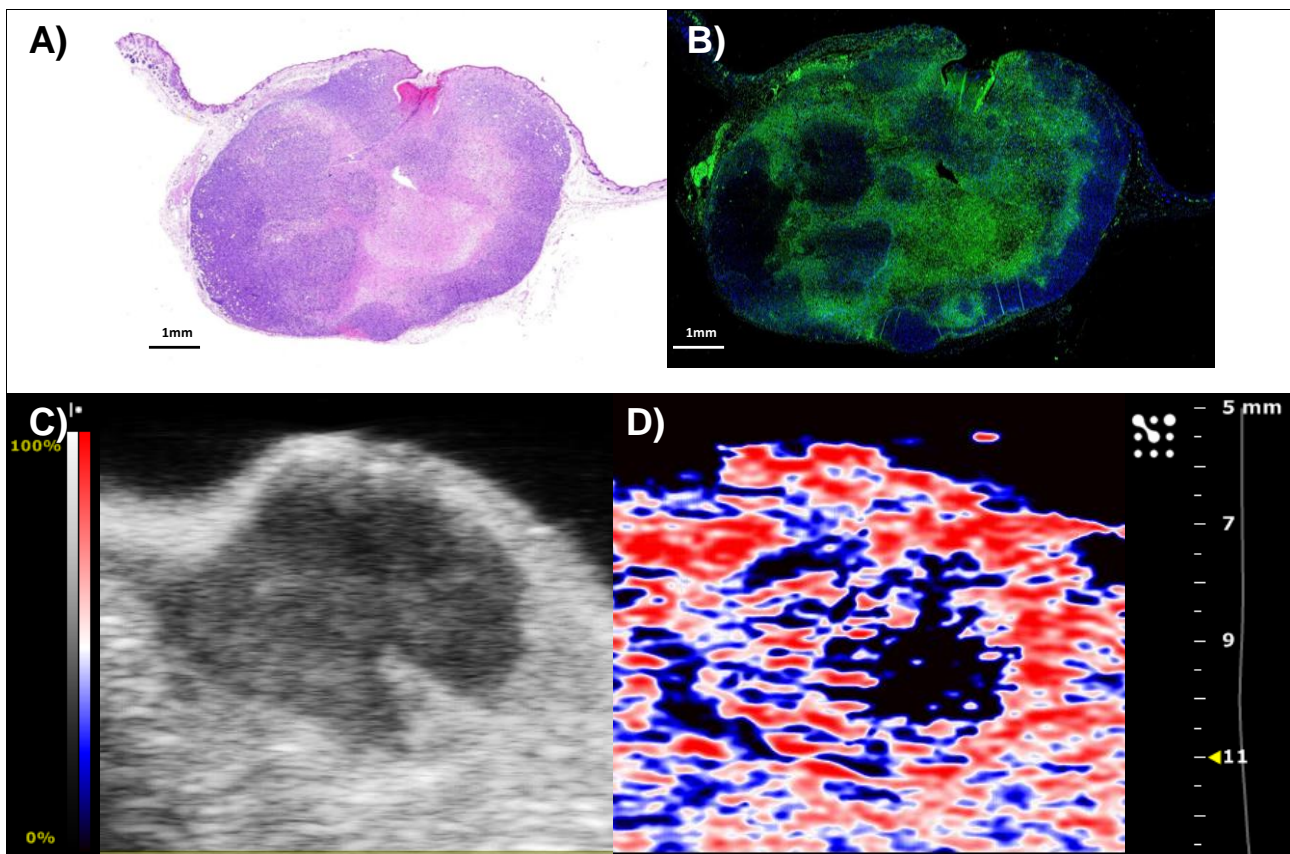


Figure 52 : Comparaisons histologiques terminales et photoacoustiques *in vivo* pour la mise en évidence d'une corrélation sur la mesure de l'hypoxie tumorale. A) Coupe H/E. B) Coupe immuno-marquée au FITC. C) & D) Imageries B-Mode et OxyHemo correspondant au plan de coupe histologique (CIPA 2016).

La comparaison de ce marquage aux résultats obtenus *in vivo* a permis de confirmer la capacité du Vevo® LAZR et de l'OxyLite™ à mettre en évidence les différences d'oxygénation des régions hypoxiques.

Discussion :

En se basant sur la méthode de référence, le marquage immuno-histologique des régions hypoxiques par le pimonidazole, nous avons pu mettre en évidence une corrélation entre

ces différentes modalités de mesure.

Les résolutions des images de microscopie et celles obtenues par PA ne sont pourtant pas comparables. Et si la résolution de la PA est plus faible, il a tout de même été possible de mettre en évidence une corrélation entre les localisations des zones hypoxiques observées. En revanche, ce manque de résolution de la PA réduit la possibilité d'identification de toutes petites zones hypoxiques *in vivo* (<75µm).

Une difficulté rencontrée aux cours de ces expériences a été de faire correspondre les plans de coupe des analyses histologiques et les acquisitions 3D réalisées avec le système PA. Même si les tumeurs ont été incluses en paraffine selon des orientations strictes, par rapport à la manière dont ont été menés les examens photoacoustiques, il a parfois été laborieux de retrouver le plan de coupe en fonction de la forme de la tumeur.

Une des améliorations possibles du logiciel Vevo[®] Lab pour ce type d'investigation pourrait être la création d'un mode dédié à la comparaison des zones nécrotiques et des zones hypoxiques sans nécrose. Une sorte de compilation du mode OxyHemo et du mode HemoMeaZure permettrait l'accès à des paramètres très intéressants sur les phénomènes d'apparition de l'hypoxie, puis leur évolution en nécrose de manière longitudinale (volumes hypoxiques, volumes nécrotiques, index d'hypoxie ou de nécrose, vitesse de transformation de l'hypoxie en nécrose...).

Un autre aspect intéressant qui peut être soulevé ici est la différence d'échogénicité observée par échographie au sein de la tumeur. Nous avons vu que dans ce modèle, certaines régions dans la tumeur semblaient avoir une échogénicité plus importante (comme par exemple le petit triangle clair en bas à droite de la tumeur, sur la Figure 52C). Nous nous attendions alors à ce que cette différence se fasse ressentir sur les images OxyHemo correspondantes, mais il n'en a pas été ainsi. De même, aucun élément n'a pu être retrouvé sur les coupes histologiques, aussi bien avec le pimonidazole qu'avec l'H/E. Donc l'échogénicité de la tumeur n'est pas liée à son statut d'oxygénation.

L'imagerie PA a été capable d'identifier des zones hypoxiques tumorales et de cartographier avec précision leur présence et leur apparition avec une résolution et une sensibilité suffisantes pour des investigations *in vivo*. Ce travail fait d'ailleurs l'objet d'une publication en cours de rédaction (cf. Annexe 1).

1.4. Application expérimentale *in vivo*

1.4.1. Limites de la bioluminescence

Un très grand nombre de modèles animaux mis en œuvre en oncologie expérimentale sont basés sur la greffe de cellules tumorales bioluminescentes. Comme nous l'avons présenté en 1.2.6, l'imagerie de bioluminescence est une technique puissante mais dépendante des conditions *in vivo*, qui souffre des limites dues à la pénétration des photons et à la dépendance de la réaction enzymatique vis-à-vis de la présence d'ATP et d'O₂. Nous nous sommes donc intéressés à la pertinence et aux limites du suivi par BLI dans 2 modèles de cancer (pancréas, poumon) mis en œuvre au laboratoire en confrontant notamment les données de BLI à celles obtenues par imagerie anatomique échographique.

1.4.1.1. Matériels et Méthodes

Culture cellulaire, animaux et modèles tumoraux :

Le modèle de tumeurs orthotopiques pancréatiques est détaillé en 1.4.3.1. Le modèle de tumeurs orthotopiques pulmonaires est détaillé en 1.4.4.2.1. Nous avons utilisé pour cette étude un total de 8 animaux.

Imagerie de bioluminescence :

Les images de bioluminescence ont été réalisées grâce au système d'acquisition IVIS Lumina II (Perkin Elmer®, Courtaboeuf, France). Chaque souris a été injectée par voie intrapéritonéale avec du sel potassique de luciférine (Promega, France) à la dose de 100 mg/kg et imagée après 5 minutes (4 minutes de diffusion péritonéale vigile + 1 minute pour le processus d'endormissement). Les animaux sous anesthésie gazeuse (inhalation d'isoflurane 1,5% en air, Isoflo, AXIENCE S.A.S, Pantin, France) ont été placés sur un lit chauffant à température contrôlée (37 ° C) à l'intérieur de la boîte noire contenant la caméra CCD refroidie à -90°C. Les paramètres de binning (regroupement des pixels permettant d'obtenir une meilleure sensibilité, cf. Annexe 6), et de durée d'acquisition ont été déterminés suivant l'activité tumorale. L'intensité du signal a été quantifiée comme le flux total (photons/seconde) à l'intérieur des ROIs dessinées manuellement autour de l'aire tumorale en utilisant le logiciel Living Image 4.4 software (Perkin Elmer®, France). L'IVIS Lumina II permet la génération d'une image pseudo-colorée représentant l'intensité de lumière collectée superposée sur une image en niveau de gris de référence.

Imagerie échographique :

Pour l'échographie, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits en paragraphe 1.3.1.1. La BLI est une imagerie de l'expression génique, et correspond à un marqueur de la prolifération tumorale, tandis que l'échographie, elle, permet une mesure de la taille et de la densité tissulaire, un indicateur de base de volumes tumoraux. Ces deux techniques sont donc parfaitement complémentaires.

1.4.1.2. Résultats

Présence d'hypoxie :

L'objectif de cette étape réalisée dans un modèle de cancer pancréatique humain chez la souris était de comparer les données de BLI avec les données d'échographie (Figure 53). Ces résultats ont montré qu'à partir de J21, une diminution des activités de bioluminescence se fait ressentir (jusqu'à disparition des signaux pour le seuillage utilisé), tandis que les volumes tumoraux mesurés par échographie 3D ne font que croître progressivement.

Ces résultats suggèrent donc la présence d'hypoxie, dès J21, limite majeure de la BLI qui conduit à une diminution et une sous-estimation des intensités des signaux de BLI.

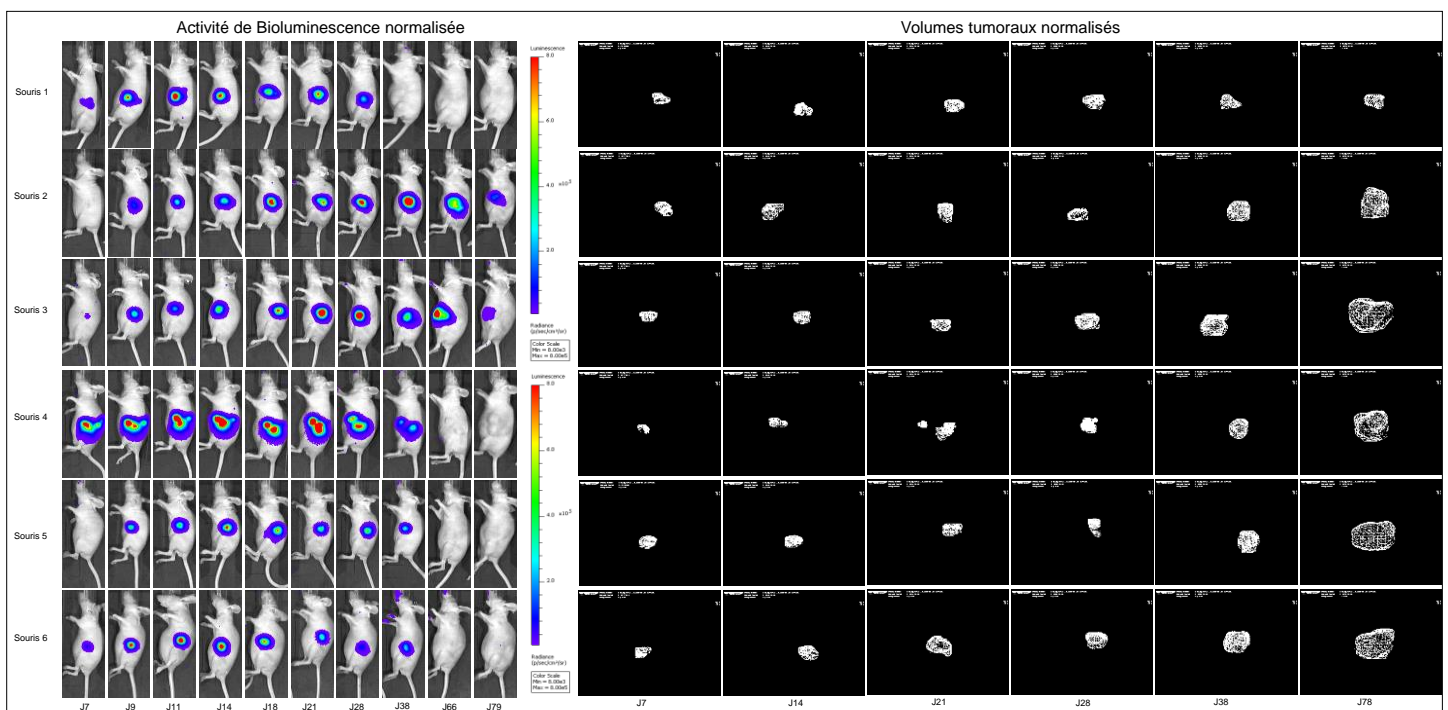


Figure 53 : Comparaison des signaux de BLI et des volumes 3D mesurés par échographie en fonction du temps sur le modèle de cancer pancréatique orthotopique Mia-PaCa2 chez la souris (CIPA 2016).

En bioluminescence, le positionnement rigoureux de l'animal est un paramètre primordial sur lequel il faut être très vigilant. En fonction du type de suivi réalisé par BLI, il faut

sélectionner un protocole d'imagerie de départ permettant l'acquisition d'images de qualité, qui permettront une quantification irréprochable tout au long de l'étude. Lorsque nous effectuons un suivi longitudinal, il est important de placer l'animal dans la même position, de manière à pouvoir comparer convenablement les signaux de BLI obtenus. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 54, une simple déviation de quelques degrés de l'axe de la colonne vertébrale de l'animal perturbe l'émission du signal de bioluminescence provenant de tumeurs orthotopiques pulmonaires. En position idéale (colonne vertébrale droite), la quantification de l'activité de BLI ($4,55 \times 10^8$ photons/seconde) est différente de celle des positions avec courbures gauches et droites ($6,62 \times 10^8$ et $1,51 \times 10^8$ photons/seconde respectivement).

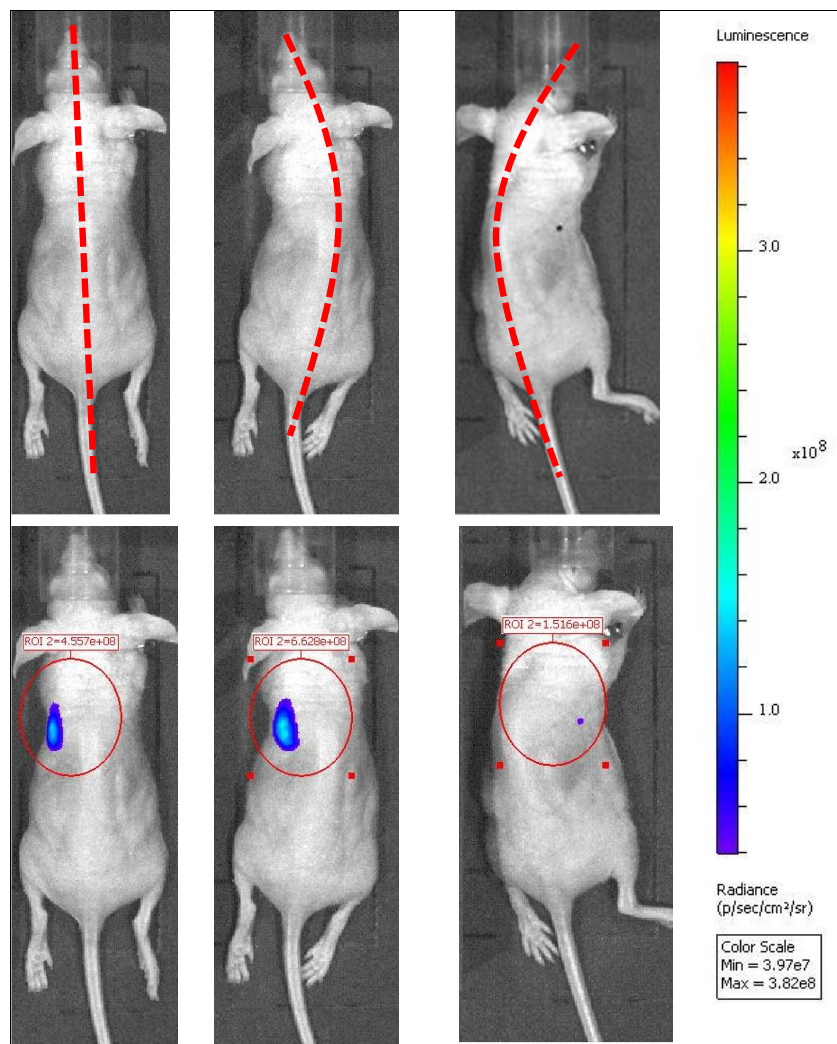


Figure 54 : Quantification de l'activité de bioluminescence en fonction du positionnement de l'animal (à concentration saturante de luciférine administrée) (CIPA 2016).

Ces résultats illustrent parfaitement bien certaines limites de l'imagerie de bioluminescence *in vivo* et les précautions qui doivent être prises quant aux données fournies par cette modalité.

Ainsi, afin d'évaluer précisément l'apparition de l'hypoxie dans les tumeurs et d'estimer le niveau de variabilité inter modèles et inter individus, nous avons donc étudié précisément ce phénomène dans un certain nombre de modèles murins d'intérêt pour la cancérologie expérimentale.

1.4.2. Etude longitudinale du développement de l'hypoxie par imagerie dans un modèle à cellules MDA-MB-231

1.4.2.1. Matériels et Méthodes

Culture cellulaire, animaux et modèle tumoral :

Le modèle de tumeurs orthotopiques mammaires MDA-MB-231 a été détaillé en 1.3.1.1. Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1. Au total, 4 animaux ont été suivis de manière longitudinale.

Protocole :

Afin de monitorer le développement de l'hypoxie de manière longitudinale, nous avons suivi par imagerie PA et par échographie, une fois par semaine, des animaux porteurs des tumeurs mammaires humaines MDA-MB-231. Les mesures ont été réalisées à J7, J14, J21 et J28 post induction des tumeurs.

Imagerie échographique et PA :

Pour l'imagerie photoacoustique et l'échographie, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits en paragraphe 1.3.1.1.

1.4.2.2. Résultats

En comparant l'évolution des volumes tumoraux, la SO_2 3D et la quantité relative d'Hb 3D, nous avons pu évaluer l'apparition de l'hypoxie tumorale.

En Figure 55, nous pouvons observer que la décroissance de la SO_2 est inversement proportionnelle à la croissance des volumes tumoraux. De la même manière, la diminution progressive de la quantité relative d'Hb révèle que la nécrose prend peu à peu place au sein des tumeurs.

En effet, nous pouvons voir que la SO_2 moyenne passe d'environ 50% à 38%. En ce qui concerne la décroissance de la quantité relative d'HbT, elle passe d'environ 90000 unités arbitraires (u.a.) à 23000u.a.

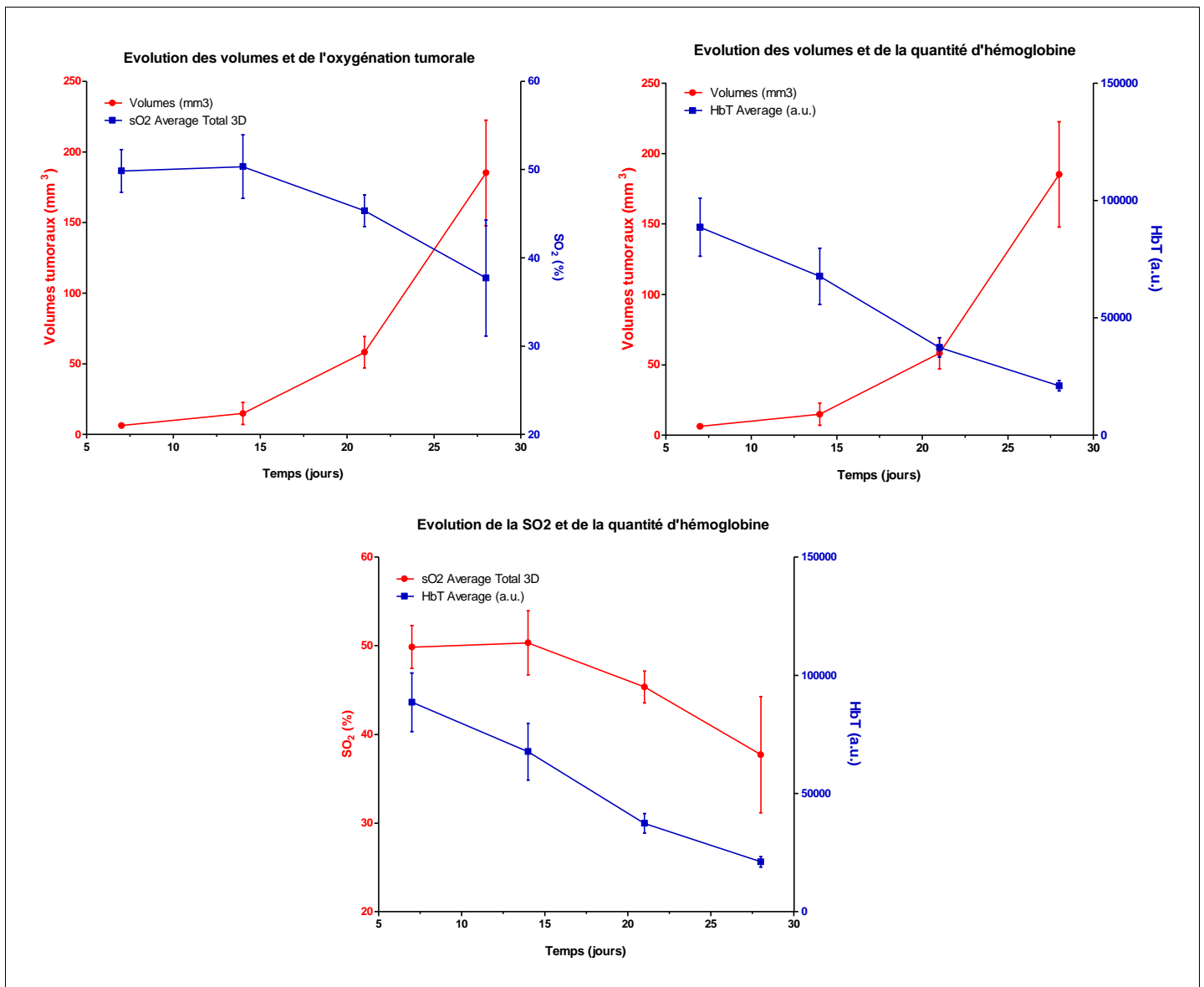


Figure 55 : Evolution des volumes tumoraux (mm³) en fonction de la SO_2 (%) et de la quantité relative d'Hb (u.a.) en 3D.

D'après ces résultats, nous pouvons considérer que l'apparition de l'hypoxie est un phénomène relativement précoce dans ce type de modèle tumoral. En effet, les perturbations de la saturation de l'Hb quantifiées montrent que dès J14 il y a une décroissance de cette SO_2 . Pour la quantité d'Hb relative mesurée, la décroissance est plus progressive et plus rapide (dès J7).

1.4.3. Suivi de petites tumeurs et de tumeurs avancées MiaPaCa2-luc

1.4.3.1. Matériels et méthodes

Culture cellulaire :

Les cellules Mia-PaCa2 parentales (non Luc) proviennent d'un adénocarcinome pancréatique d'un homme de 65 ans. La lignée cellulaire Mia-PaCa2 de cancer du pancréas a été fournie par l'American Type Culture Collection (Rockville, Etats-Unis). Ces cellules ont été choisies car elles permettent de générer des tumeurs de nature hypoxique, reflet de la situation pathologique clinique. Elles n'étaient pas bioluminescentes, mais ont été modifiées pour exprimer le gène de la luciférase (Mia PaCa-2-Luc, équipe de V. Trichet, INSERM U957 Nantes). Les cellules ont été cultivées conformément aux instructions du fournisseur.

Animaux :

Des souris saines femelles âgées de 6 semaines, de lignée Swiss nude ont été obtenues auprès de Charles River (France). Les animaux ont été hébergés selon les conditions décrites en 1.3.1.1. Nous avons utilisé pour cette étude un total de 18 animaux.

Avantages des modèles orthotopiques :

Les modèles orthotopiques présentent l'avantage d'être plus prédictifs de la réponse attendue chez l'Homme, la tumeur se développant dans le tissu d'origine de la tumeur primitive, ces modèles sont donc, avec la dissémination possible de métastases, beaucoup plus proches de la situation pathologique clinique ^[277].

En effet, le principal argument en faveur des modèles orthotopiques est leur capacité à mieux représenter la pathologie humaine notamment du point de vue de la dissémination métastatique. Les métastases sont la cause majeure de mortalité chez les sujets atteints de cancer et présentent la situation la plus difficile à gérer pour les thérapies antitumorales. Il s'agit d'un processus séquentiel dont les principales étapes comprennent le détachement de cellules cancéreuses de la tumeur primaire et l'invasion du tissu de l'hôte, leur pénétration et leur transport dans la circulation durant lequel elles interagissent avec les composants sanguins, puis leur adhésion à la paroi vasculaire de l'organe cible, leur extravasation et leur prolifération. Un cancer disséminé chez les animaux étudiés est souvent résistant aux thérapies anticancéreuses actuelles parce que la pathologie a atteint un stade trop avancé et n'est plus contrôlable. La mise en œuvre de ce type de modèles est encore délicate, la chirurgie étant complexe, le nombre d'animaux plus limité et donc

au final la significativité, s'en retrouve diminuée.

Modèle de tumeurs pancréatiques orthotopiques Mia-PaCa2 :

Ce modèle s'inspire de travaux publiés, et a été raffiné pour les besoins de l'étude [278]. Pour les implantations, les animaux ont été anesthésiés à l'isoflurane (1,5% dans l'air, Isoflo, AXIENCE S.A.S, Pantin, France). Les abdomens des souris ont été désinfectés avec une solution de povidone iodée (Bétadine[®], ASTA Medica, Belgique). Une incision de 1cm a été faite dans le quadrant supérieur gauche de l'abdomen.

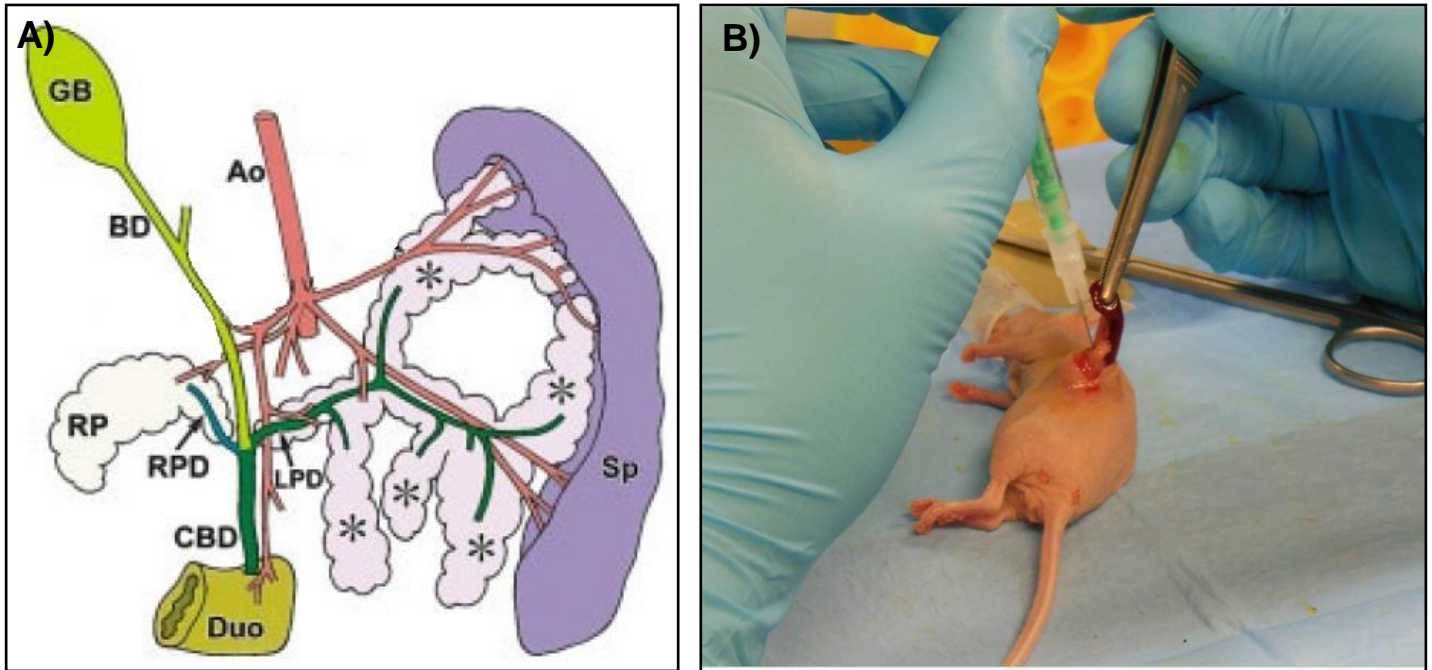


Figure 56 : Modèle de tumeurs pancréatiques orthotopiques. A) Schéma représentant les différents lobes et conduits pancréatiques de la souris : vésicule biliaire (GB); canal pancréatique gauche (LPD); lobe droit du pancréas (RP); canal pancréatique droit (RPD) [T33]. **B)** Injection des cellules dans un des lobes du pancréas (CIPA 2016).

Le bout de la queue du pancréas a été saisi avec précaution par une pince et le pancréas ainsi que la rate ont été délicatement externalisés dans une direction latérale pour être pleinement exposés. L'aiguille était insérée dans la queue du pancréas et positionnée jusque dans la région de la tête du pancréas (Figure 56B). Les 2×10^6 cellules Mia PaCa2-Luc sous $50 \mu\text{L}$ de PBS ont été lentement injectées à l'aide d'une aiguille de calibre 27 (puis ont été injectées par la suite sous $10 \mu\text{L}$ après raffinement du modèle, cf 1.4.3.2). La rate a été ensuite remise dans la position appropriée dans l'abdomen et la peau ainsi que le péritoine ont été suturés avec un fil résorbable de diamètre 5-0. La douleur des animaux a été prise en charge par un analgésique, la Tolfédine 4% (5ml/kg , $\sim 150 \mu\text{l}$ en SC) (Vetoquinol, Lure, France) avant le réveil puis une injection 14h-16h après l'opération.

La difficulté de ce modèle réside dans l'injection des cellules au niveau du pancréas de

l'animal. En effet, chez la souris, contrairement à l'Homme, le pancréas est un organe diffus (Figure 56A) et il est nécessaire de connaître sa structure anatomique afin de déterminer le site le plus propice à l'injection des cellules tumorales en évitant d'injecter dans les espaces interlobulaires. C'est ce qui explique la quasi impossibilité de pratiquer une induction minimalement invasive en faisant une injection à l'aiguille sous guidage échographique avec un micromanipulateur.

Protocole :

Les animaux ont été suivis pendant les 3 premières semaines de développement tumoral, afin de se familiariser avec la détection de ces tumeurs orthotopiques, et de pouvoir obtenir des informations sur leur statut d'oxygénation à des stades précoces.

Imagerie :

Par souci de reproductibilité lors de l'acquisition des images, un positionnement de la souris dans l'appareil et de la sonde ont été définis (Figure 57). Le plateau où reposent la souris et la sonde était incliné comme ci-après. Cette position était la plus adaptée pour visualiser par échographie le pancréas et la tumeur dans son ensemble, tout en évitant les autres organes, tels que la rate, les intestins et les reins, qui auraient pu perturber la visibilité et la quantification des volumes tumoraux (Figure 58).

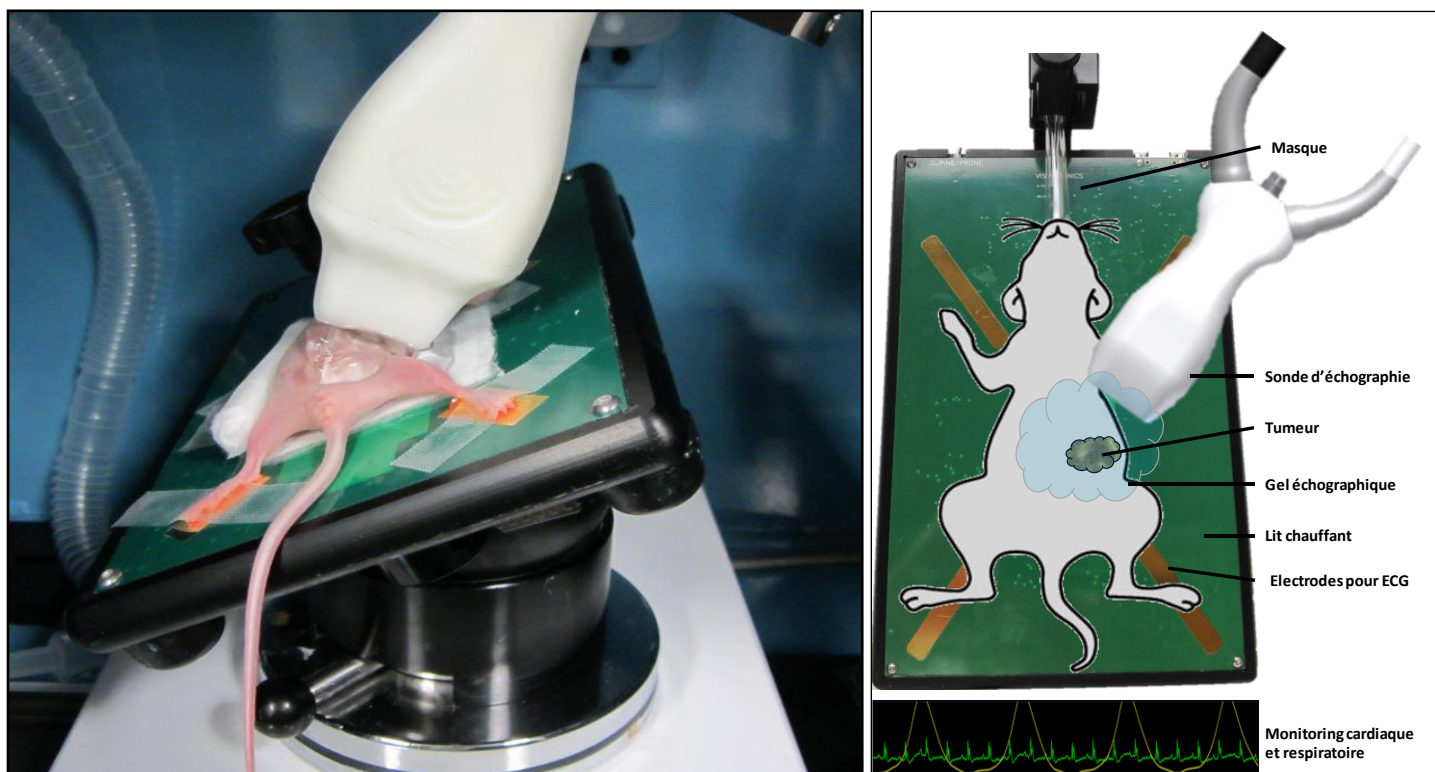


Figure 57 : Positionnement de la souris sur la plaque chauffante, reliée aux électrodes de synchronisation respiratoire et cardiaque (CIPA 2016).

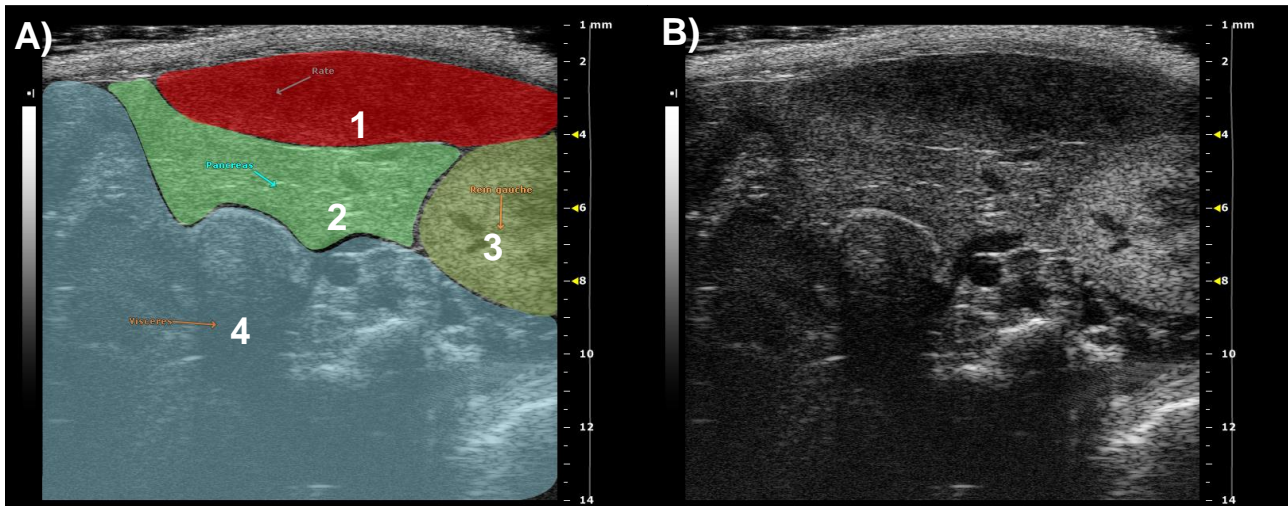


Figure 58 : Image B-Mode du pancréas sain. A) Positionnement des organes en fonction de l'incidence du transducteur choisie. 1) Rate ; 2) Pancréas ; 3) Rein ; 4) Viscères. **B)** Image échographique en B-Mode correspondante (CIPA 2016).

1.4.3.2. Résultats - Petites tumeurs MiaPaCa2-luc

Imagerie échographique :

Dans ce modèle, le taux de prise de greffe était de 100%. Le volume moyen à J20 était de 20mm³.

Amélioration du modèle pour l'exploration de l'hypoxie et des volumes tumoraux par échographie et imagerie PA :

Initialement, le modèle de tumeurs orthotopiques mis en place dans le laboratoire ne nous permettait pas de pouvoir réaliser les mesures adéquates pour des investigations basées sur des mesures d'hypoxie et d'efficacité thérapeutique. Nous avons en effet constaté que la plupart des implantations de cellules, lorsqu'elles étaient réalisées sous 50 μ L de PBS, donnaient lieu à un développement de tumeurs en plusieurs lobes (Figure 59). Sur les 6 animaux prévus pour cette étude, la totalité des souris ont présenté des tumeurs diffuses, pluri-lobées, et parfois des tumeurs multiples. Cela rendait contraignant la mesure de certains volumes. En outre, il ne correspondait pas à un modèle pertinent pour les études visant à obtenir une cartographie de la saturation de l'hémoglobine à l'intérieur de la tumeur et en particulier dans la zone centrale hypoxique. Ce modèle a donc été raffiné afin d'obtenir un développement tumoral unique permettant une mesure volumique précise ainsi que des explorations photoacoustiques facilitées. Les injections dans le pancréas ont donc été réalisées par la suite sous 10 μ L de PBS chez 6 autres animaux, évitant ainsi les fuites cellulaires à l'extérieur du pancréas (conduisant parfois à un développement de tumeurs dans la cavité péritonéale) et la dispersion cellulaire trop importante.

Les résultats obtenus suite à cette amélioration du modèle étaient bien meilleurs, du point de vue d'une exploration de l'oxygénation par PA. Chacun des animaux a développé une tumeur ponctuelle, en un seul lobe, permettant ainsi des mesures en échographie 3D et en PA reproductibles.

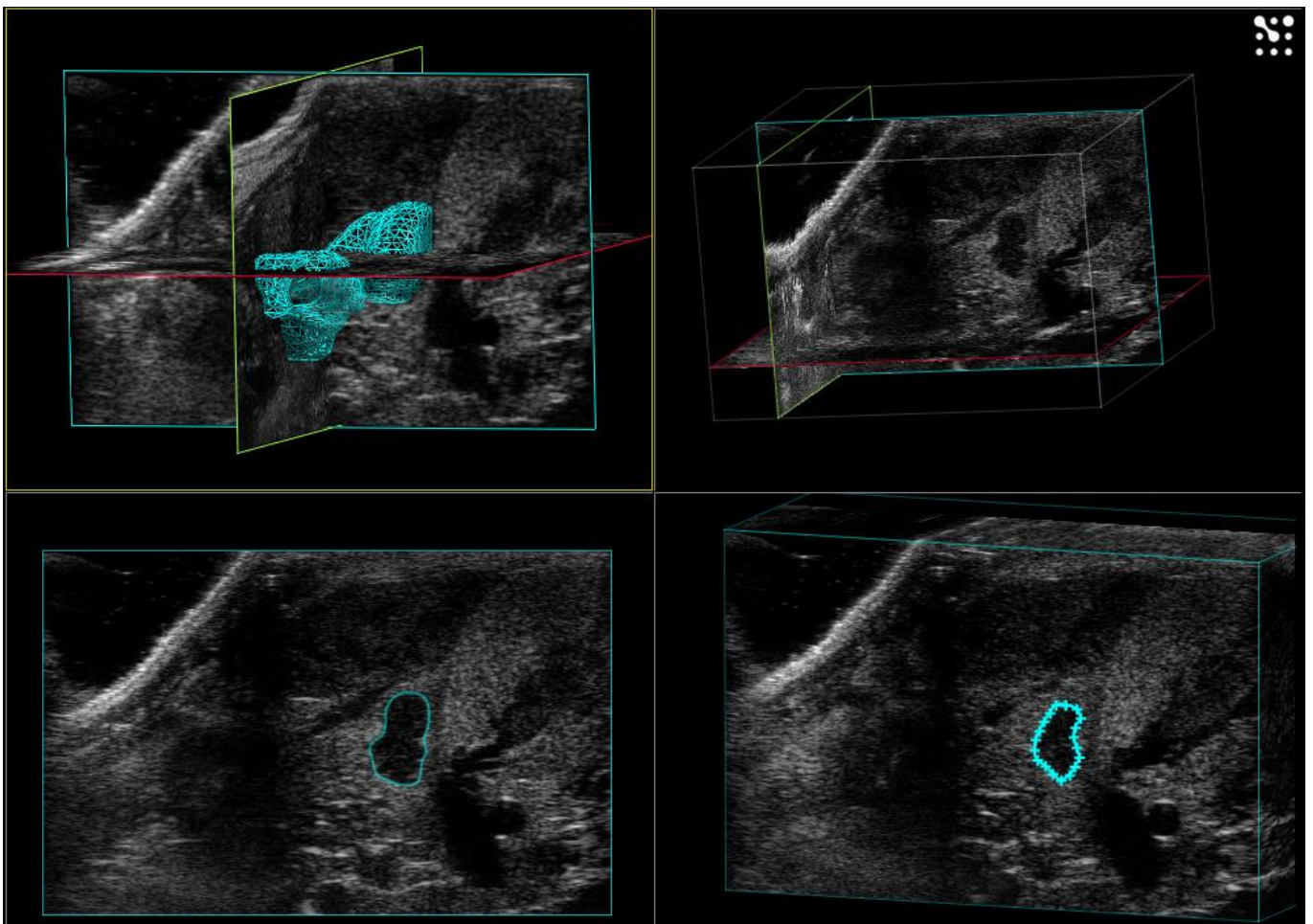


Figure 59 : Images échographiques d'une tumeur pancréatique (représentée par la délimitation bleue) se développant en plusieurs lobes diffus (CIPA 2016).

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 58B, le pancréas (identifié en vert) possède une échogénicité caractéristique, reconnaissable par des petits traits clairs horizontaux. Il est facilement localisable de par sa position, sous-jacente à la rate, et jouxtant le rein gauche (lorsqu'il est imagé avec ce positionnement de transducteur).

Lorsque la tumeur se développe, elle possède une échogénicité très différente de celle du pancréas sain, ce qui permet de pouvoir la détecter de manière certaine. En effet, la tumeur apparaît très sombre en B-Mode (Figure 60).

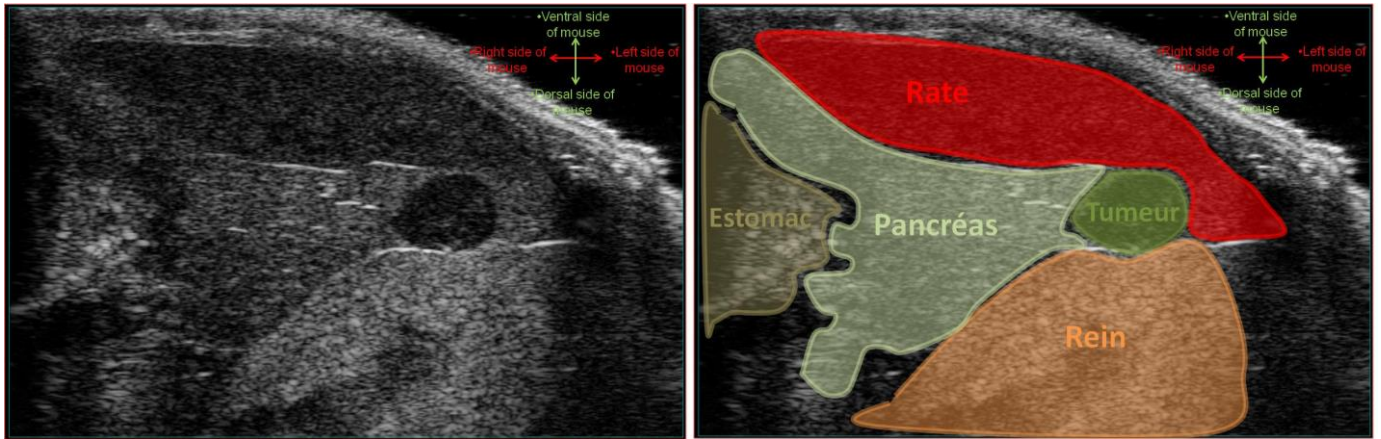


Figure 60: Image échographique montrant la tumeur se développant au sein du pancréas, ainsi que les organes jouxtant le pancréas (CIPA 2016).

L'échographie nous a permis de détecter des tumeurs de très petite taille peu de temps après leur implantation (de l'ordre de quelques mm^3). L'exemple montré en Figure 61 correspond à une tumeur de $2,5\text{mm}^3$. Le diagnostic différentiel de ces petites tumeurs par rapport à un vaisseau sanguin qui parcourrait le pancréas peut être réalisé grâce au Doppler (car ces petites tumeurs peuvent avoir une forme ronde qui rappelle l'échogénicité et la forme des vaisseaux sanguins).

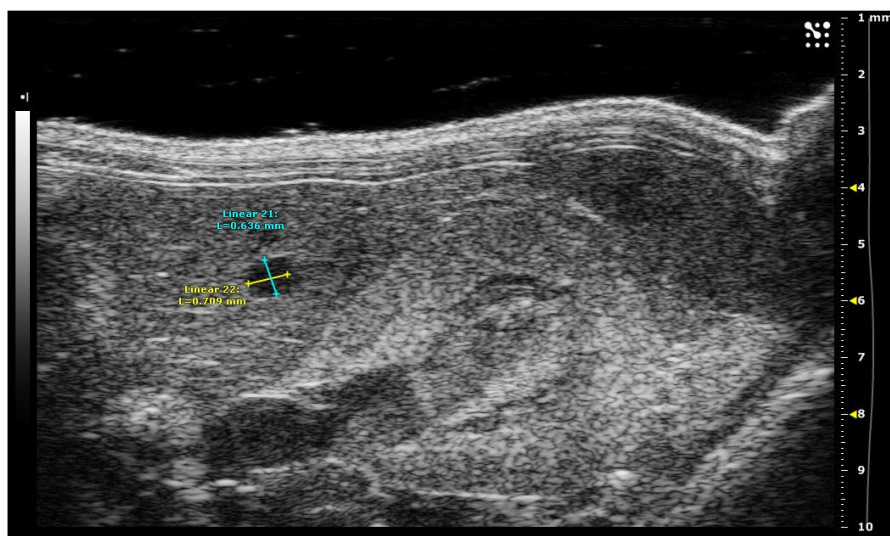


Figure 61: Exemple d'une tumeur pancréatique orthotopique à un stade très précoce (CIPA 2016).

Imagerie photoacoustique :

Les résultats obtenus sur les petites tumeurs pancréatiques ont permis de montrer que l'apparition de l'hypoxie est précoce. Comme montré sur cet exemple en Figure 62, pour une tumeur de $22,2\text{mm}^3$, la zone hypoxique (ROI bleue) prend déjà une part importante de la tumeur totale. Pourtant l'aire de cette tumeur sur ce plan de coupe n'est que de $13,1\text{mm}^2$, et l'aire hypoxique de $5,6\text{mm}^2$.

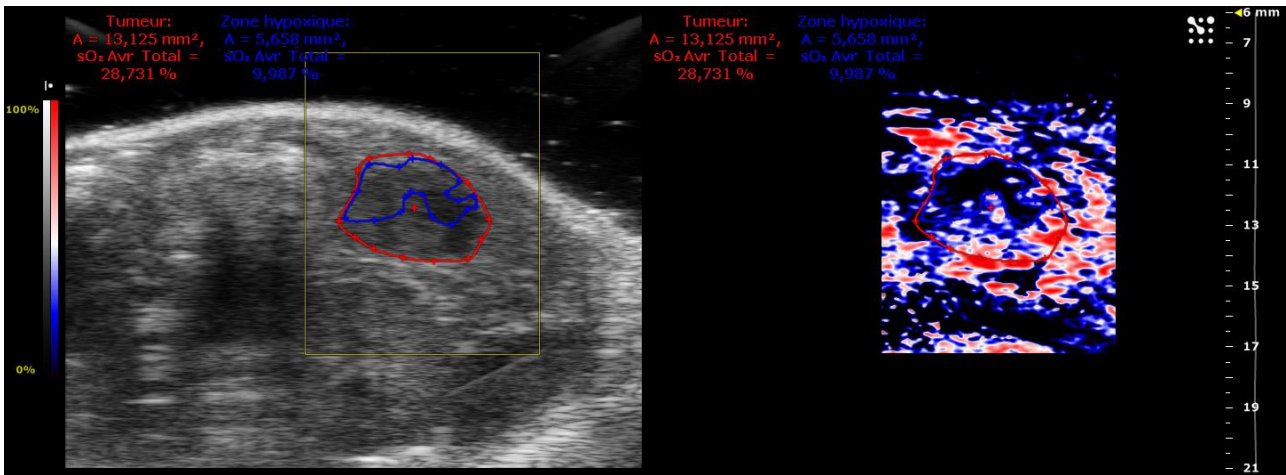


Figure 62 : Image photoacoustique d'une petite tumeur pancréatique (22,2mm³) associée à l'image B-Mode correspondante. La ROI bleue correspond à la zone hypoxique. La ROI rouge correspond à la tumeur totale (CIPA 2016).

1.4.3.3. Résultats - Tumeurs avancées MiaPaCa2-luc

Sur cette autre étude, le taux de prise de greffe a été de 100%. Le volume moyen des tumeurs mesuré à J52 était de 395mm³.

Sur des tumeurs de tailles plus importantes, il a également été possible de mettre en évidence la présence de plages d'hypoxie. Pour la tumeur illustrée en Figure 63 (d'environ 200mm³), nous pouvons voir que le cœur tumoral (ROI verte) est très hypoxique par rapport au reste de la tumeur (SO₂ de 10,9% contre 39,5% pour la tumeur totale).

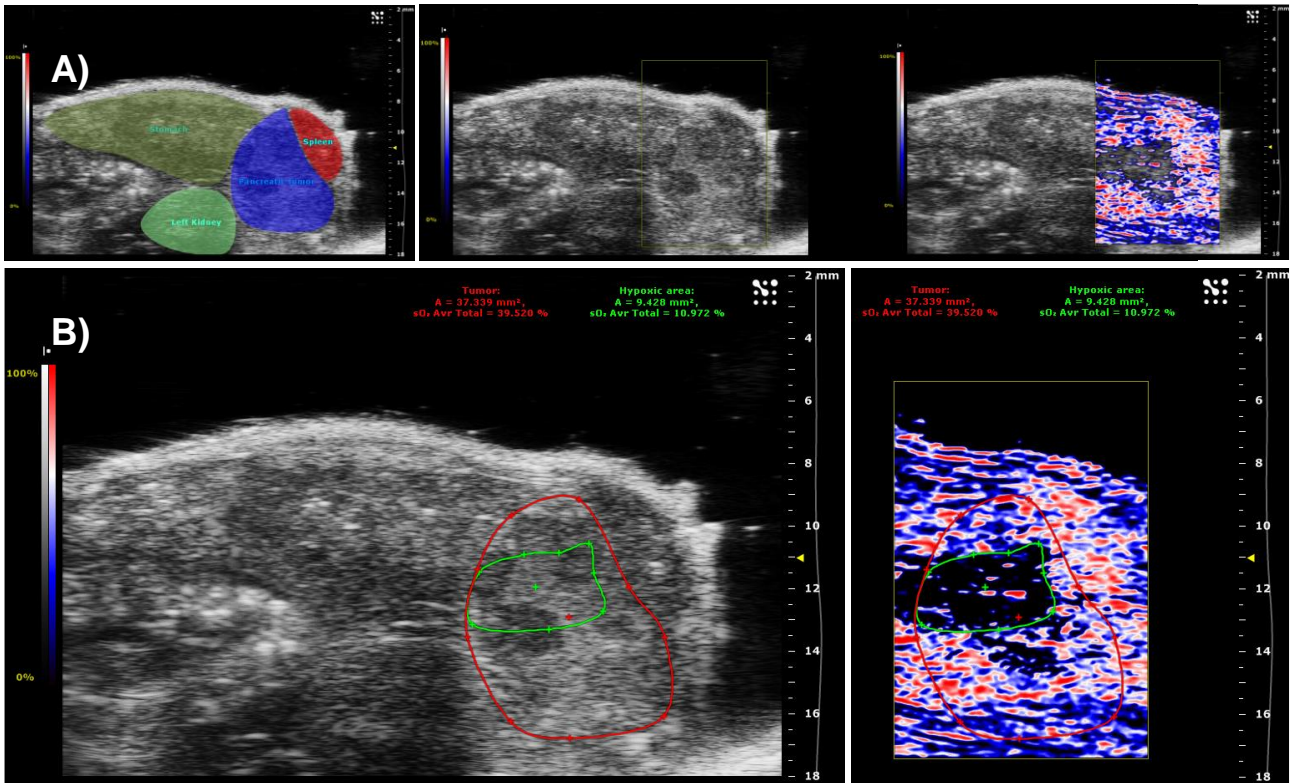


Figure 63 : Images échographiques et photoacoustiques d'une tumeur pancréatique. A) Positionnement de la tumeur pancréatique par rapport aux organes. **B)** Image B-Mode et photoacoustique Oxy-Hemo correspondante. La ROI verte correspond à la zone hypoxique tumorale, la ROI rouge correspondant à la tumeur totale (CIPA 2016).

Nous avons également noté que la SO_2 de la tumeur totale diminue avec le temps. En comparant les données OxyHemo et HemoMeaZure, nous avons observé que les zones hypoxiques correspondent à des zones où peu d'hémoglobine est présente. Il ne reste qu'une toute petite zone encore oxygénée pour cette tumeur (Figure 64).

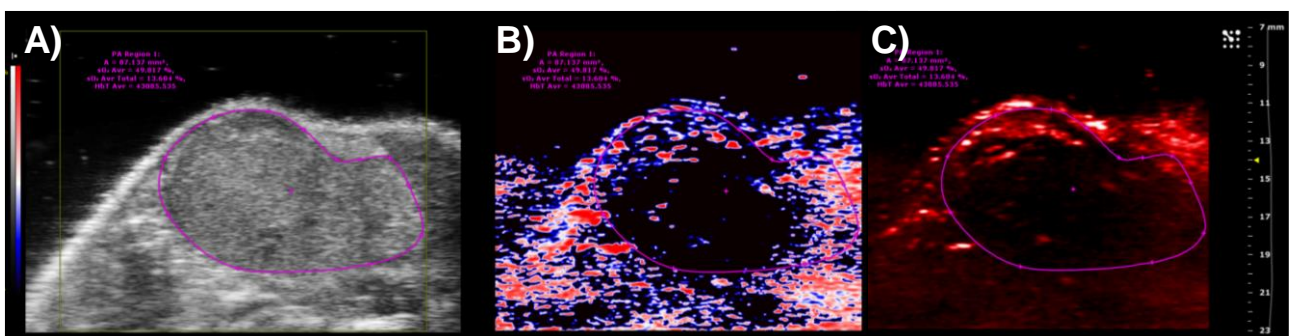


Figure 64 : Images échographiques et photoacoustiques d'une tumeur pancréatique. A) & B) Image B-Mode et photoacoustique Oxy-Hemo correspondante d'une tumeur pancréatique très hypoxique. **C)** Image HemoMeaZure correspondant à cette tumeur hypoxique (CIPA 2016).

Lorsque les tumeurs deviennent trop imposantes, (taille supérieure à 1cm^3) il n'est pratiquement plus possible de détecter de signal photoacoustique au sein des tumeurs du fait de l'hypoxie trop importante associée à ce modèle.

1.4.4. Suivi de tumeurs pulmonaires NCI-H460-luc

Ce travail avait pour but de mettre en place une nouvelle méthode de mesure de volumes tumoraux pulmonaires non invasive, mais également non radioactive et non irradiante. Cette technique d'intérêt ici est l'imagerie échographique. Il a été pour cela nécessaire de valider cette nouvelle méthode de mesure de tumeurs orthotopiques pulmonaires par échographie, grâce à des comparaisons avec d'autres modalités d'imagerie de référence.

Etant basée sur l'émission et la réception d'ultrasons, l'échographie est la seule modalité d'imagerie dont l'innocuité est parfaitement reconnue (non irradiante, non ionisante, sans champs magnétiques). Ces ultrasons ne se propagent que dans des milieux solides ou liquides, mais ne peuvent se propager dans l'air (poumons par exemple). Le modèle tumoral que nous avons mis en place permet une mesure précise par échographie du volume pulmonaire, tout en s'affranchissant des artéfacts dus à l'air présent dans le parenchyme pulmonaire (la localisation maîtrisée du développement tumoral dans la partie basse du lobe pulmonaire permet une mesure par ultrasons, ce qui n'est pas possible si la tumeur se développe au centre du parenchyme pulmonaire).

Dans ce contexte, ce projet visait à valider l'imagerie échographique à haute résolution en comparant les résultats obtenus à un certain nombre d'autres modalités d'imagerie. Effectivement, les cellules tumorales que nous avons utilisées sont des cellules bioluminescentes, ce qui nous a permis de visualiser la prolifération tumorale de la manière la plus sensible, et le cas échéant, de pouvoir valider avec une technique de référence (bioluminescence), notre approche par échographie, mais également par photoacoustique et scanner à rayons X (aussi bien *in vivo*, que *ex vivo*, par analyse des prélèvements réalisés chez les animaux en fin de procédure).

Ces essais sont nécessaires avant d'envisager de proposer une éventuelle utilisation en routine de cette technique à la communauté scientifique pour l'imagerie du petit animal en cancérologie.

1.4.4.1. Limites des techniques conventionnelles pour l'imagerie pulmonaire

Les modalités d'imagerie mises en œuvre au CIPA pour suivre l'évolution des tumeurs pulmonaires chez le petit animal sont la tomodensitométrie X et la bioluminescence. La mise en œuvre du scanner se fait sous réserve d'une utilisation raisonnée, afin d'éviter la potentialisation de l'effet des thérapies (augmentation de l'effet des thérapies par association de l'effet des rayons X). L'objectif est donc de privilégier une dosimétrie minimale (<40mGy), mais cela conduit parfois à des approximations pour la détermination

du volume des grosses tumeurs. En effet, le contraste faible avec les tissus sous-jacents et le choix de ne pas utiliser des agents de contraste pour éviter des interactions susceptibles d'influencer la dynamique de croissance des tumeurs en onco-pharmacologie, font qu'il est difficile de mesurer des volumes tumoraux importants de manière précise. Bien qu'étant une technique quantitative exploitée en routine par de nombreuses équipes de recherche, la bioluminescente reste une imagerie de la prolifération tumorale dépendante des conditions *in situ*, à savoir la présence d'ATP et d'O₂. Son utilisation avec des modèles tumoraux caractérisés par une hypoxie doit donc être réalisée avec précaution et devient non pertinente lorsque l'hypoxie apparaît.

1.4.4.2. Apport de l'imagerie photoacoustique et de l'échographie 3D dans un contexte d'approche multimodale :

Contexte :

Parce que le cancer du poumon reste la première cause de mortalité par cancer, il est nécessaire de développer des protocoles précliniques et des modèles de cancers pertinents plus précis et prédictifs. Les modèles orthotopiques de cancer présentent l'avantage d'être plus prédictifs dans la pertinence clinique, notamment vis-à-vis de la capacité des tumeurs primaires à développer des métastases spontanées, mais également dans la réponse thérapeutique. La mise en œuvre et l'exploitation de tels modèles nous a permis d'améliorer nos connaissances sur la biologie de ce type de cancer afin de mieux interpréter les résultats précliniques *in vivo*, plus particulièrement sur les potentiels effets thérapeutiques d'agents anti-cancéreux. Les études prenant en compte des paramètres plus représentatifs des situations pathologiques cliniques, l'hypoxie par exemple, sont d'un intérêt majeur pour renforcer et consolider l'innovation pour les nouveaux traitements anti-cancéreux ^[141,279,280].

Un paramètre important en oncologie est la mesure du volume tumoral avant, mais aussi pendant les traitements ^[219]. Dans un contexte clinique, les mesures de tumeurs pulmonaires sont principalement réalisées par TDM-X ^[281]. En oncologie préclinique, les objectifs de l'imagerie sont d'améliorer la précision de la détermination des volumes, sans effets d'irradiation ou d'interférence avec la réponse antitumorale.

Grâce aux développements technologiques réalisés sur les sources de rayons X et les détecteurs, la TDM-X dédiée à l'imagerie du petit animal apporte une résolution submillimétrique, rendant cet outil efficace pour la caractérisation des volumes tumoraux. Cependant, la dose de radiations délivrées aux tumeurs reste une limite importante,

notamment lorsqu'une étude nécessite des examens répétés ^[282]. D'anciens travaux réalisés aux CIPA ont permis de mettre en évidence un effet significatif des examens TDM sur la croissance tumorale pour des doses supérieures à 40mGy. En comparant un groupe recevant 1 examen TDM toutes les deux semaines versus un autre groupe recevant 1 examen TDM par semaine, sur un modèle de carcinome pulmonaire orthotopique bioluminescent, ils ont observé un ralentissement de la croissance tumorale pour le groupe recevant le plus grand nombre d'examen. En effet, de plus en plus d'équipes s'intéressent de près aux doses de rayonnements que reçoivent les animaux lorsqu'ils sont sujets à des examens par TDM-X ^[283], que ce soit pour une imagerie de repérage ou une imagerie à proprement parler.

L'imagerie de bioluminescence a apporté une révolution en recherche préclinique en oncologie, mais cette méthode fournit des informations quantitatives sur la prolifération tumorale sans mesures volumiques possibles. De plus, la BLI étant une imagerie dépendante du métabolisme, elle n'est plus fiable lorsque les tumeurs deviennent hypoxiques ^[284].

Dans la pratique clinique, l'échographie de certains territoires pulmonaires et médiastinaux gagne en popularité parmi les médecins et est devenue un outil précieux pour la prise en charge de la maladie en phase critique (œdème aigu pulmonaire, pneumothorax...) ^[285,286]. Cependant, concernant l'oncologie pulmonaire humaine, il n'y a pas d'explorations possibles par échographie, excepté pour l'endoscopie invasive des nodules cancéreux et des ganglions lymphatiques ^[287,288]. La limite majeure de l'endoscopie et de l'exploration par ultrasons est la détection de ces nodules si la proximité de ceux-ci avec la sonde est insuffisante. Cette limite d'accessibilité est due à l'absence de propagation des ondes ultrasonores à travers le parenchyme pulmonaire à cause de la présence d'air.

Au contraire, l'échographie préclinique haute résolution chez la souris et l'imagerie PA sont des modalités prometteuses pour évaluer la progression tumorale et l'hypoxie. Néanmoins, étant donné les contraintes spécifiques de l'échographie, une implantation des tumeurs dans la région postérieure superficielle des poumons est nécessaire.

Le modèle de carcinome pulmonaire non à petites cellules NCI-H460 que nous avons choisi de raffiner, est basé sur des travaux de Gagnadoux et al. ^[289], conduisant à la croissance d'un nodule intrapulmonaire unique localisé à l'aplomb de la surface postérieure du diaphragme. Nous recommandons ici d'affiner un tel protocole d'oncopharmacologie dans une approche translationnelle tout en surmontant les limites de l'échographie permettant une exploration pulmonaire. Dans cette étude longitudinale, nous

avons mesuré les volumes des tumeurs pulmonaires et leur statut hypoxique chez la souris par échographie 3D et photoacoustique. Afin de déterminer les limites et la robustesse de l'échographie dans notre modèle pulmonaire, nous avons tout d'abord comparé nos mesures réalisées dans le modèle sous cutané (conditions plus favorables et plus classiques pour l'échographie que le poumon rempli d'air). De plus, nous avons comparé nos données à différentes modalités d'imagerie dans le but de valider cette nouvelle approche.

1.4.4.2.1. Matériels et méthodes

Culture cellulaire :

Les cellules NCI-H460-luc ont été obtenues chez Perkin Elmer® (France). Les cellules parentales (non Luc) ont été isolées en 1982 à partir du liquide pleural chez un patient atteint d'un cancer du poumon à larges cellules. Elles ont été cultivées conformément aux instructions du fournisseur. Les cellules ont été implantées après environ 20 repiquages en plaques de 75cm², lorsqu'elles étaient à confluence.

Animaux :

Des souris saines femelles âgées de 6 semaines, de lignée Swiss nude ont été obtenues auprès de Charles River (France). Les animaux ont été hébergés selon les conditions décrites en 1.3.1.1. Nous avons utilisé pour cette étude un total de 22 animaux.

Procédure d'induction orthotopique des tumeurs NCI-H460 :

Pour le dépôt intrabronchique des cellules tumorales, l'introduction d'un cathéter dans la trachée à l'aide d'un laryngoscope nécessite obligatoirement une anesthésie (mélange de 10mg/kg Xylazine et de 100mg/kg Kétamine) et permet de limiter la douleur et le stress pour l'animal. Le cathéter, d'un diamètre très fin ($\varnothing=0,69\text{mm}$) n'est introduit que quelques secondes dans la trachée et les bronches. Une fois la position du cathéter contrôlée par radiographie planaire (Faxitron MX20, Faxitron X-ray corp, Etats-Unis), et le dépôt cellulaire réalisé (5×10^5 cellules sous 25 μL PBS), le cathéter est retiré. Les animaux sont ensuite positionnés sur des blocs chauffants jusqu'à leur réveil. Notre expérience montre que durant une période de 30 minutes post administration certaines souris ont pu présenter des difficultés respiratoires (fréquence respiratoire irrégulière). Après le dépôt cellulaire, afin de soulager la gêne pulmonaire éventuellement occasionnée, nous avons placé les souris fragiles sous oxygène pur pendant 5 à 10 minutes pour une récupération rapide et optimale de la fonction respiratoire. L'administration d'un anti-inflammatoire ou

d'un analgésique à cet instant n'aurait pas amélioré la fonction respiratoire. En cas de persistance d'éventuels symptômes, les souris auraient été mises à mort. L'expérience passée du CIPA montre que cette procédure ne conduit à aucun décès des souris.

Deux charges tumorales ont été injectées aux souris pour ce protocole ($1,25 \times 10^5$ ou $2,5 \times 10^5$ cellules).

Procédure d'induction sous-cutanée des tumeurs NCI-H460 pour la validation de la méthode de mesure :

Les cellules NCI-H460 sont injectées dans l'espace sous-cutané du flanc dorsal des souris (10^6 cellules sous 200 μ L de PBS, aiguille 27G, seringue 0,5ml).

Schémas expérimentaux communs aux modèles sous-cutanés et orthotopiques :

Afin de pouvoir comparer les différentes techniques de mesure du volume tumoral et d'apprécier les paramètres de prolifération tumorale, d'oxygénation et de perfusion, nous avons réalisé :

- Une imagerie échographique une fois par semaine* pour réaliser la mesure longitudinale du volume tumoral, ainsi qu'une imagerie de contraste ultrasonore le dernier jour de l'étude pour l'appréciation des paramètres de perfusion ainsi que pour l'évaluation de l'expression du VEGFR2.
- Une imagerie de bioluminescence une fois par semaine* pour mesurer la prolifération tumorale.
- Une mesure par imagerie photoacoustique, réalisée à la suite de la dernière imagerie échographique, pour évaluer le statut d'oxygénation des tumeurs.
- Une imagerie par scanner à rayons X, juste avant la mise à mort de l'animal, pour réaliser une mesure du volume tumoral.

*Les imageries de bioluminescence et échographiques étaient réalisées le même jour, avec un intervalle de 6 heures environ entre les deux imageries pour chacun des animaux.

Protocoles d'imagerie :

Pour l'imagerie de bioluminescence, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.4.1.1.

Pour l'imagerie échographique et photoacoustique, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.3.1.1.

Le statut perfusionnel et l'expression du VEGFR2 ont été explorés par imagerie de contraste échographique après injection IV (dans la veine caudale) de microbulles Vevo Micromarker® et Target Ready Micromarker® (FUJIFILM Visualsonics Inc., Amsterdam, Pays-Bas) couplées soit à un anticorps anti-VEGFR2 de souris, soit à un anticorps isotype contrôle (eBioscience, Etats-Unis).

Sur le système Vevo®, Les différences dans les signaux acoustiques provenant des MB circulantes et adhérees sont quantifiées comme un « differential Targeted Enhancement » (dTE), c'est-à-dire un différentiel entre le signal des MB libres + MB adhérees versus les MB libres seulement (Figure 65).

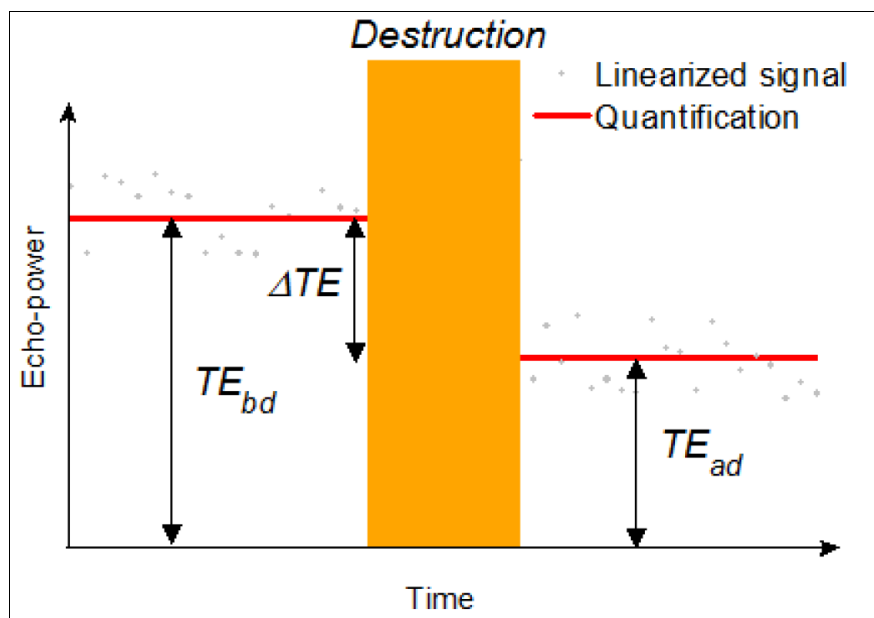


Figure 65 : Méthode de mesure du « Differential Targeted Enhancement ». Le TE_{bd} correspond au signal des microbulles liées et libres avant la séquence de destruction. Le TE_{ad} correspond au signal des microbulles libres seulement après la séquence de destruction. Le ΔTE correspond au dTE. (FUJIFILM Visualsonics Inc., 2012).

Les procédures d'imagerie ont été réalisées selon des séquences de destruction / reperfusion des MB (application d'une fréquence ultrasonore plus élevée destinée à faire éclater les MB dans le champ image). Les données ont ensuite été analysées avec le logiciel VevoCQ. Un paramètre clé, qui devait être respecté pour la précision des acquisitions 3D, était le positionnement du transducteur d'échographie (Figure 66A). Le faisceau d'ultrasons devait être dirigé en direction de la tumeur pulmonaire avec le

meilleur angle possible afin de détecter la tumeur en entier au cours de l'acquisition. Malgré la présence d'artéfacts et d'ombres dues aux côtes, lorsque l'angle est légèrement changé, il est possible de trouver un positionnement efficace garantissant une détection optimale. La taille minimale de tumeur qui peut être détectée est d'environ 1mm de diamètre. Les transducteurs avec fréquences centrales de 21 et 40 MHz furent utilisés pour l'imagerie en B-Mode des grosses et petites tumeurs respectivement. L'imagerie PA a été réalisée avec la sonde de 21 MHz.

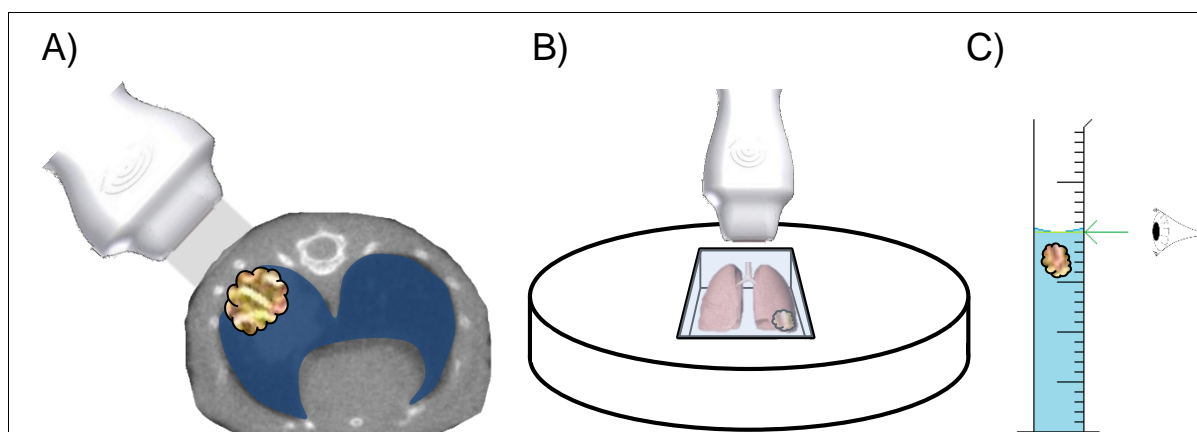


Figure 66 : Méthodes de mesures des volumes tumoraux. A) Incidence du transducteur d'échographie permettant de détecter la tumeur pulmonaire implantée spécifiquement dans la partie postérieure, accolée à la plèvre. **B)** Positionnement des poumons prélevés présentant une tumeur dans le système rempli de gel prévu à cet effet. **C)** Méthode de mesure volumétrique dans l'éprouvette graduée. Mesure du poids du volume retiré après immersion de la tumeur pour revenir au volume initial (CIPA 2016).

Pour l'imagerie TDM-X, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (2% dans l'air) puis placées dans le scanner à rayons X eXplore CT-120 (Trifoil Imaging, Etats-Unis), connecté au système d'anesthésie. L'examen par scanner à rayons X est relativement rapide (~20 minutes par acquisition). Cet examen a été réalisé suite à une injection IV d'agent de contraste eXIA 160 (100µL d'un mélange eXIA/PBS), du fait du manque de contraste entre la tumeur et les tissus adjacents. L'eXIA 160 (Binitio Biomedical, Inc., Ottawa, Canada) est un agent de contraste dédié à l'imagerie du petit animal qui est très bien toléré par les animaux. A J50, les imageries par scanner à rayons X ont été réalisées sans réveil de l'animal. L'animal a reçu une injection d'agent de contraste X, puis a été anesthésié par inhalation d'isoflurane (2% dans l'air) et mis à mort juste après la fin de l'acquisition, encore sous anesthésie, par dislocation cervicale comme préconisé pour cette espèce animale.

Mesures volumétriques :

Les tumeurs ont été disséquées délicatement puis immergées dans des cylindres gradués

remplis d'eau. Les volumes tumoraux ont été déterminés à partir du poids de l'eau retirée du cylindre pour obtenir un ménisque concave ajusté à la graduation principale utilisée comme référence (Figure 66C). Ces mesures ont été réalisées en triplicats.

Sacrifice et prélèvement des organes :

Les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale sous anesthésie, et les tumeurs ont été prélevées chez chaque animal pour des mesures *ex vivo* immédiates. Dans le but d'évaluer la précision des mesures *in vivo*, les tumeurs ont été prélevées à la fin de l'étude (Jour 28) puis mesurées par échographie 3D. Le récipient dédié rempli de gel d'échographie a permis d'éviter tout mouvement indésirable des tissus prélevés du au passage de la sonde d'échographie au-dessus du gel au cours des acquisitions 3D (Figure 66B).

Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad, Etats-Unis). Les graphiques des corrélations et les coefficients R^2 ont été obtenus après régression linéaire.

1.4.4.2.2. Résultats

Validation des techniques pour les mesures de volumes tumoraux sous-cutanés :

Pour évaluer la précision intrinsèque de chacune des modalités mises en œuvre pour les mesures de volume tumoral, le modèle de tumeurs sous-cutanées nous a permis d'éviter les contributions perturbatrices telles que les mouvements respiratoires et les problèmes connus associés à l'examen pulmonaire échographique. La comparaison des résultats a été faite sur des tumeurs mesurant de 15 à 700mm³. L'analyse de la corrélation entre les mesures échographiques réalisées *in vivo* versus *ex vivo* ($R^2=0,94$), versus TDM-X ($R^2=0,93$), versus le poids tumoral ($R^2=0,98$) ou les mesures volumétriques ($R^2=0,96$), a clairement validé la capacité des protocoles d'échographie et de TDM-X (Figure 67).

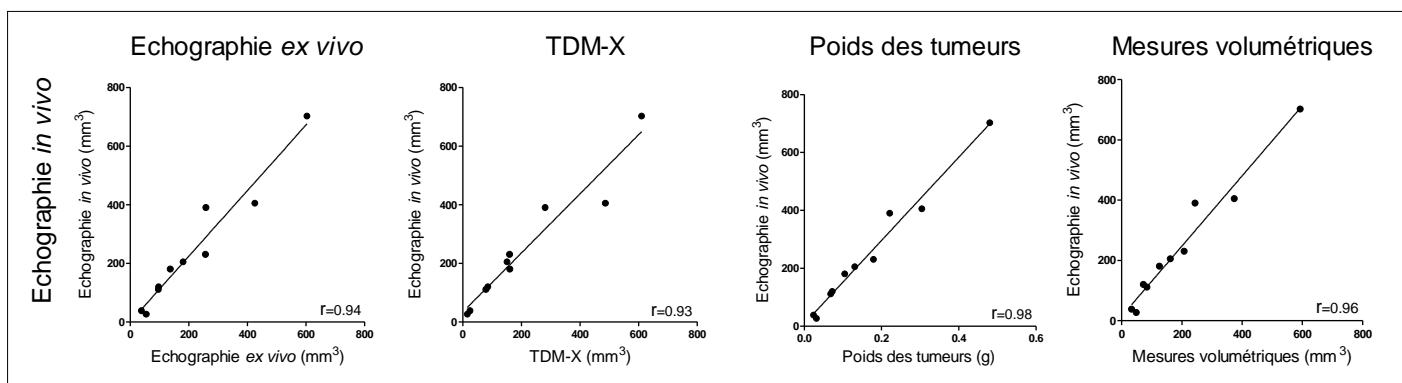


Figure 67 : Régression non linéaire des points de donnée collectés à partir des tumeurs sous-cutanées (n=10 animaux). Les coefficients de corrélation R^2 sont donnés en bas à droite de chaque graphique. Comparaison des volumes tumoraux sous-cutanés mesurés par échographie *in vivo* aux mesures réalisées par échographie *ex vivo*, TDM-X, aux mesures volumétriques et aux poids des tumeurs.

Contrôle de l'implantation des cellules tumorales :

Pour les tumeurs sous-cutanées, chacun des 10 animaux xénotreffés a été inclus pour les évaluations de volume tumoral par les différentes méthodes. Pour les tumeurs orthotopiques, la confirmation de la prise tumorale a été confirmée 7 jours après les xénotreffes par BLI (Figure 68D), soit dans le poumon gauche, soit dans le poumon droit. En se basant sur les intensités de BLI, 12 animaux possédant des activités tumorales comprises entre $7,45 \times 10^5$ et $8,55 \times 10^7$ Photons/seconde ont été sélectionnés pour l'étude.

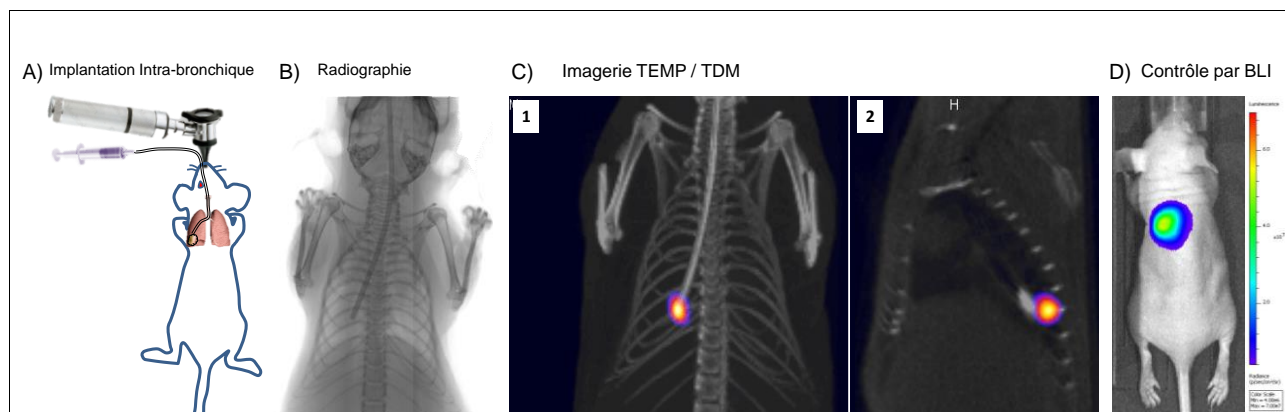


Figure 68 : Contrôle de la prise de greffe intra-bronchique. **A)** Schéma représentant la voie d'inoculation intra bronchique. Le cathéter est inséré via la trachée jusqu'au fond des bronches de sorte que la tumeur pulmonaire se développe au niveau d'un lobe inférieur du poumon, proche de la surface du diaphragme. **B)** Le contrôle *in vivo* du positionnement du cathéter par radiographie planaire est effectué pour éviter l'implantation des cellules au mauvais endroit. **C1)** Contrôle de la précision du dépôt de cellules marquées au ^{99m}Tc par TEMP/TDM. **C2)** Coupe sagittale montrant la localisation précise du dépôt au niveau pulmonaire postérieur. **D)** Prolifération tumorale confirmée par BLI à J7 (CIPA 2016).

Evaluation des volumes tumoraux pulmonaires par échographie *in vivo* :

Comme pour l'échographie pulmonaire humaine, nous avons observé des artéfacts

provenant de la ligne pleurale dus à son échogénicité. Telle que pointée par les flèches blanches (Figure 69A&B), la ligne pleurale apparaît claire, s'expliquant par le fait qu'elle correspond à une réflexion augmentée à l'interface entre la plèvre et le poumon sain. Nous avons également noté des lignes immobiles hyperéchogènes régulièrement espacées, nommées A-Lines, qui sont des artéfacts de répétition de la ligne pleurale. La cassure dans la ligne pleurale et les A-Lines permet d'identifier de manière certaine la présence de la tumeur, même à des stades précoces de développement (Figure 69B). Un artéfact typique observé au-dessous de la tumeur, comme une ombre claire correspondant au point de rencontre entre la tumeur et le parenchyme pulmonaire sain, nous a permis d'identifier précisément les marges tumorales (Figure 69C). Cette augmentation de signal sous-jacente est expliquée par la différence de vitesse ultrasonore entre la tumeur et le parenchyme.

Le positionnement du transducteur avec un angle approprié a rendu possible l'enregistrement successif des images planaires avec le moteur pas-à-pas pour les acquisitions 3D. Les volumes mesurés ont ensuite été affichés en grilles rouges (Figure 69C).

Lorsque nous avons comparé les signaux de BLI mesurés chez les deux différents groupes aux volumes mesurés en échographie, nous avons observé des motifs d'évolution très différents (Figure 69D). Dans le premier groupe ($1,25 \times 10^5$ cellules), la BLI a augmenté progressivement jusqu'au jour 21, puis a stagné tandis que les volumes déterminés ont augmenté jusqu'à la fin de l'étude. Dans le second groupe ($2,5 \times 10^5$ cellules), la constante augmentation des volumes déterminés par échographie était différente de l'évolution des signaux de BLI montrant une diminution des signaux entre les jours 14 et 21, puis une stagnation. Le suivi par échographie *in vivo* a permis de mesurer précisément les volumes tumoraux, mettant en évidence une différence significative entre les courbes de croissances des deux charges tumorales initiales.

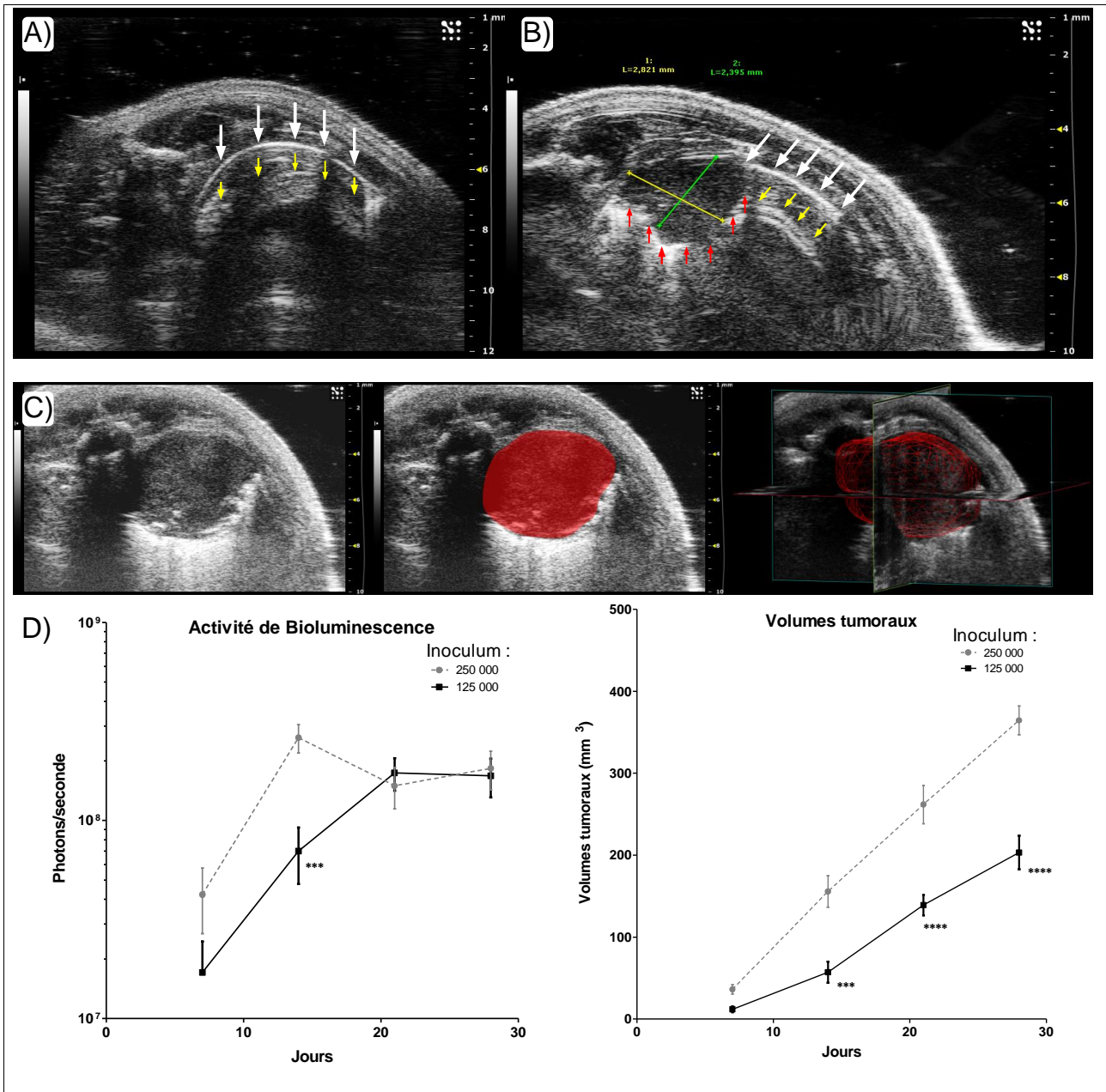


Figure 69 : Échographie sur poumon sain et poumon porteur de tumeur. A) Acquisition échographique B-Mode en 2D sur poumon sain. Les flèches blanches verticales montrent la ligne pleurale. Les flèches jaunes montrent les A-lines, représentant l'écho de répétition de la ligne pleurale. **B)** Acquisition échographique B-Mode en 2D sur un poumon porteur de tumeur NCI-H460 (2,8x2,4mm). Les flèches rouges pointent les marges de la tumeur, mises en évidence par un artéfact clair sous forme d'une ombre. Nous pouvons également retrouver les flèches blanches et jaunes qui pointent la ligne pleurale ainsi que les A-lines respectivement. **C)** De l'image 2D à la représentation 3D. L'aire rouge correspond au volume obtenu en traçant les marges sur chaque image B-Mode provenant des acquisitions 3D. **D)** Evaluation de la charge tumorale par BLI (gauche) et échographie (droite), les données étant présentées comme les moyennes \pm SEM et analysées statistiquement. Des analyses de la variance à 2 facteurs suivie d'un post test de Bonferroni ont été utilisées. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$. Gauche : Intensité des signaux BLI mesurés longitudinalement *in vivo* suite à l'inoculation de $1,5 \times 10^5$ ou $2,5 \times 10^5$ cellules (photons/seconde). Droite : Volumes tumoraux mesurés *in vivo* par échographie, comparant les deux charges tumorales différentes (mm^3). (n=5 animaux par groupes) (***) $p < 0,001$; ****) $p < 0,0001$) (CIPA 2016).

Comparaison des techniques de mesure de volumes tumoraux dans les poumons :

A la fin de l'étude (jour 28), une imagerie par TDM-X a été réalisée dans le but de comparer les données obtenues aux images échographiques. Les volumes 3D reconstitués des poumons sains et des tumeurs ont été traités informatiquement (Figure 70). Les isosurfaces des poumons sains ont été obtenus par segmentation automatique tandis que les volumes ont nécessité une délimitation manuelle sur les coupes 2D.

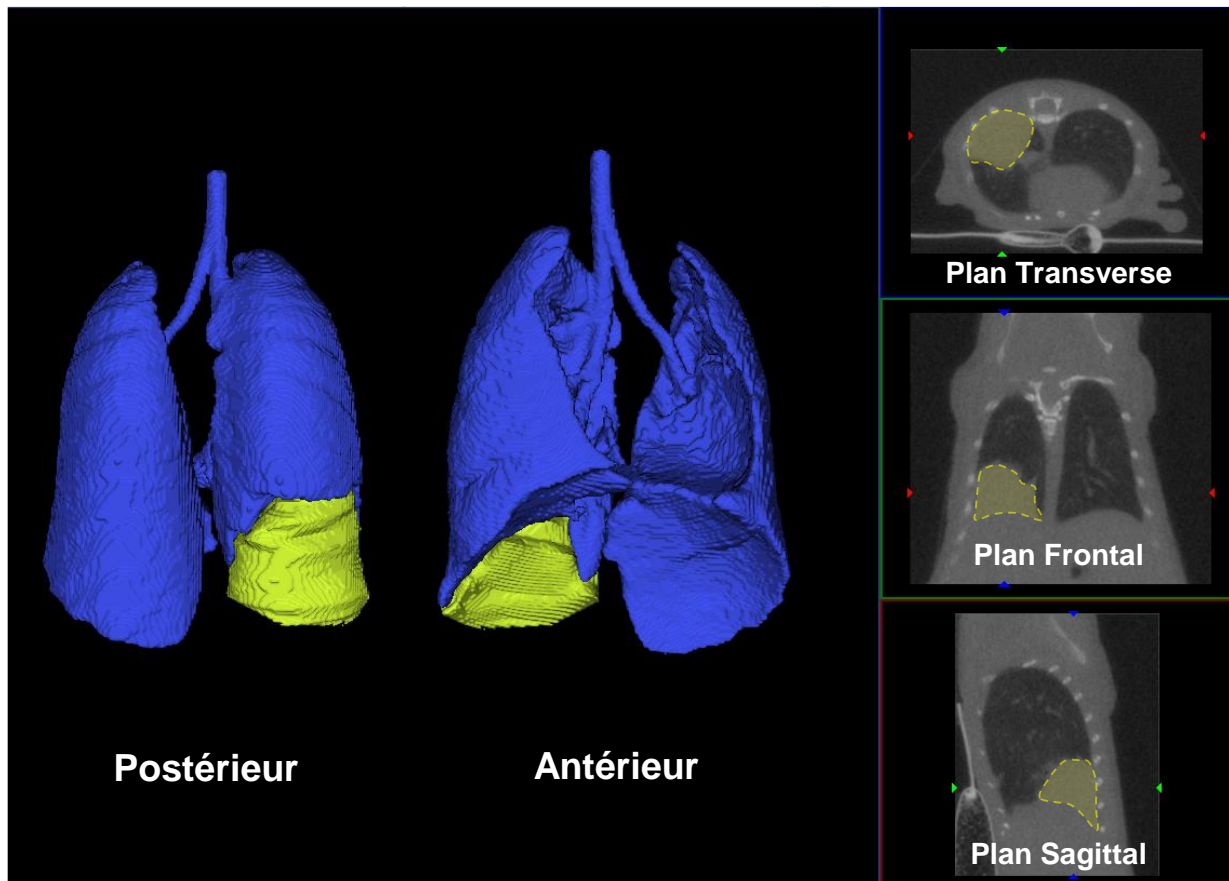


Figure 70 : Evaluation des volumes tumoraux par TomoDensitoMétrie-X. Rendu en 3D des reconstructions provenant des acquisitions de TDM-X en vue antérieure et postérieure, après délimitation manuelle des tumeurs à partir des plans transverses, frontaux et sagittaux. Le parenchyme pulmonaire sain est en bleu tandis que la tumeur est mise en évidence en jaune (CIPA 2016).

L'analyse de la corrélation des données obtenues par chacune des méthodes sur les tumeurs orthotopiques est reportée en Figure 71. Nous avons comparé des tumeurs de différentes tailles, après imagerie échographique et TDM-X *in vivo* et *ex vivo*, mesures volumétriques et mesures des poids des tumeurs. Les mesures par TDM-X ont donné une estimation précise des volumes tumoraux comparés aux mesures échographiques *ex vivo* ($R^2=0,87$), aux poids tumoraux ($R^2=0,98$) et aux mesures volumétriques ($R^2=0,80$).

Pour les mesures *in vivo*, les résultats montrent une corrélation des volumes évalués par échographie et TDM-X *in vivo*, et des poids tumoraux ($R^2=0,75$). Ces résultats ne reflètent

pas une surestimation des volumes tumoraux mesurés par échographie et TDM-x comparés aux poids des tumeurs. Une telle corrélation est également observée avec l'échographie *ex vivo* et les mesures volumétriques ($R^2=0,72$ et $R^2=0,65$ respectivement).

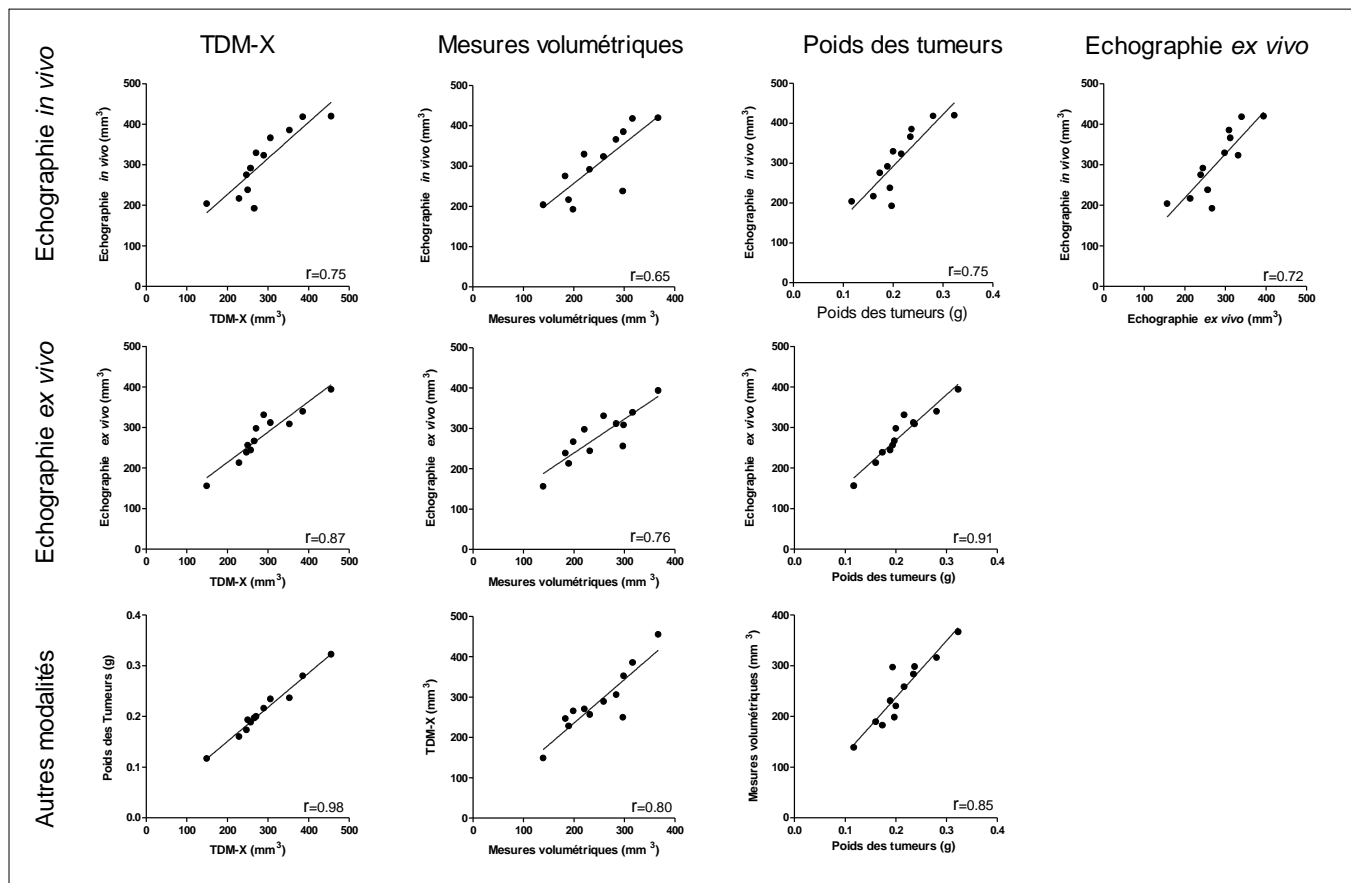


Figure 71 : Analyse de la corrélation entre différentes modalités pour la mesure du volume tumoral. Régression non-linéaire de points de donnée collectés à partir de tumeurs orthotopiques pulmonaires (n=12 animaux). Les coefficients de corrélation R^2 sont donnés en bas à droite de chaque graphique. Ces graphiques comparent la corrélation entre l'échographie 3D *in vivo* et *ex vivo*, la TDM-X *in vivo*, le poids des tumeurs ainsi que les mesures volumétriques *ex vivo*.

Imagerie de contraste ultrasonore, Power Doppler et photoacoustique :

Comme il a été possible de réaliser l'imagerie B-Mode *in vivo*, nous nous sommes également intéressés à la capacité de l'échographie à mesurer différents paramètres échographiques et photoacoustiques. Nous avons ainsi remarqué que les investigations ultrasonores ont permis de visualiser le statut perfusionnel après injection de MB non-ciblées (Figure 72A). Nous avons observé un signal clairement augmenté grâce aux MB démontrant une perfusion efficace sur cette tumeur. L'imagerie de contraste ultrasonore était plus efficace et plus sensible pour la mise en évidence des paramètres de vascularisation que le Power-Doppler. Le Power-Doppler (sans injection d'agent de contraste nécessaire) n'a permis que d'observer les plus gros vaisseaux. A cause de la petite taille des autres vaisseaux, et la contribution des paramètres tels que les faibles

vitesses de flux sanguins, les battements cardiaques et la respiration, la visualisation des petits flux sanguins est difficile, même en associant l'utilisation de la synchronisation cardiaque et respiratoire (données non présentées).

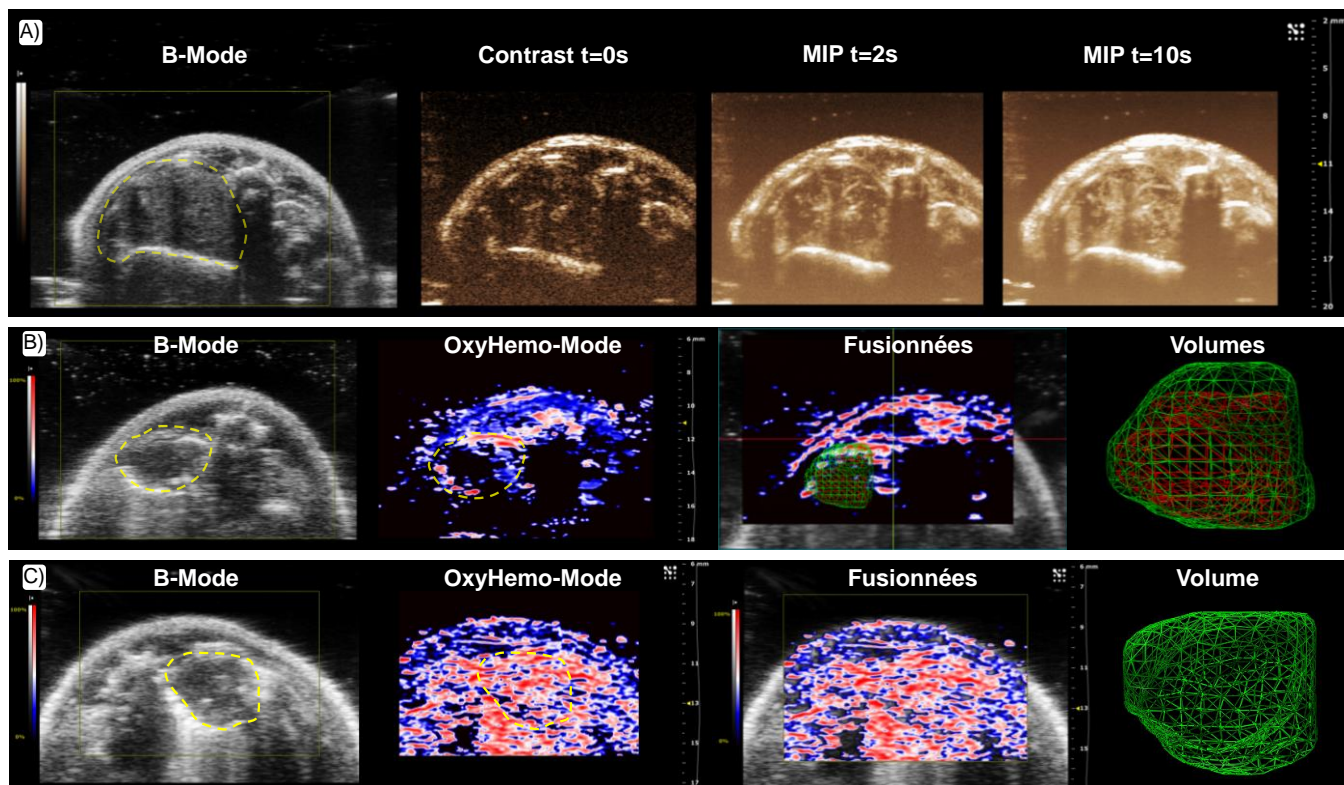


Figure 72 : Imagerie de contraste ultrasonore et imagerie photoacoustique de l'hypoxie sur des tumeurs pulmonaires orthotopiques chez la souris. A) Images B-Mode de tumeurs pulmonaires associée à l'imagerie de contraste correspondante après injection IV de Vevo® Micromarker (MIP = Maximum Intensity Projection). **B)** Images B-Mode d'une tumeur pulmonaire hypoxique avec imagerie photoacoustique associée. Concernant les volumes, la grille rouge correspond au volume hypoxique, le vert correspondant au volume de la tumeur totale. **C)** Image B-Mode d'une tumeur pulmonaire bien oxygénée avec imagerie photoacoustique OxyHemo correspondante. Les images ne montrent pas de présence d'un cœur hypoxique (CIPA 2016).

Concernant l'imagerie PA, nous avons obtenu des informations sur le statut d'oxygénation des tumeurs permettant de révéler la présence de zones hypoxiques intratumorales de manière non-invasive (Figure 72B). Nous avons remarqué la présence de zones oxygénées à la périphérie des tumeurs, comparées aux cœurs hypoxiques. Les acquisitions 3D ont permis de quantifier l'hypoxie et les volumes pour les deux ROIs présentées ($V_{\text{tumeur}}=29,4\text{mm}^3$, $\text{SO}_2_{\text{tumeur}}=11,4\%$; $V_{\text{hypoxie}}=10,2\text{mm}^3$, $\text{SO}_2_{\text{hypoxie}}=0,4\%$, les quantifications données étant des valeurs uniques de la tumeur présentée) (Figure 72B). Il est important de noter que certains animaux, avec des volumes tumoraux comparables, présentaient des tumeurs bien oxygénées ($V_{\text{tumeur}}=47,3\text{mm}^3$, $\text{SO}_2_{\text{tumeur}}=51,7\%$, ces quantifications étant des valeurs uniques mesurées sur la tumeur présentée) (Figure 72C).

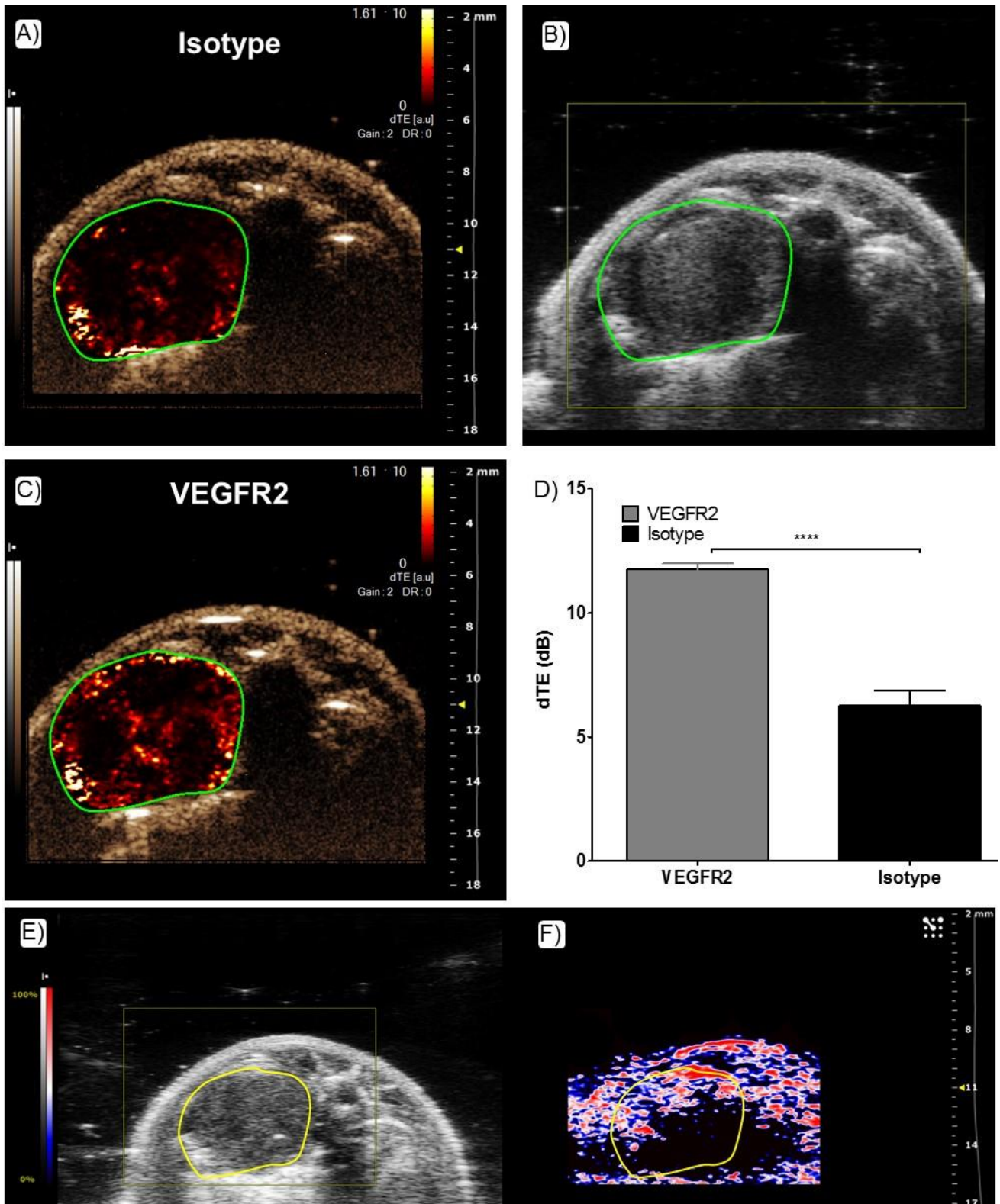


Figure 73 : Imagerie moléculaire du VEGFR2 par échographie de contraste ciblé. A) & C) Images paramétriques de la distribution spatiale des microbulles (agents de contraste ultrasonore). **A)** Signal provenant des microbulles conjuguées à l'Ac isotype contrôle. **B)** Image B-Mode correspondante de la tumeur. **C)** Signal provenant des microbulles conjuguées à l'Ac anti-VEGFR2 (Target Ready Vevo® Micromarker). **D)** Différentiel targetted enhancement des microbulles VEGFR2 et de l'isotype contrôle (le dTE correspond à la différence de signal échographique entre les bulles ciblées et les bulles libres, cf 1.4.4.2.1 et Figure 65). L'analyse statistique a été réalisée avec un test t de Student non-apparié (n=4 animaux par groupes). (****p<0,0001). **F)** Imagerie PA correspondante montrant que les régions exprimant majoritairement le VEGFR2 sont des régions qui sont hypoxiques (CIPA 2016).

L'imagerie de contraste ultrasonore nous a permis d'évaluer l'expression du VEGFR2 dans les tumeurs pulmonaires. Le logiciel VevoCQ a permis de calculer des valeurs de differential Targeted Enhancement (dTE) pour chaque ROI, cette analyse ayant également été réalisée pour les MB conjuguées à l'anticorps isotype contrôle. A partir des images paramétriques, la distribution spatiale de l'agent de contraste lié est nettement visible (Figure 73C). La comparaison entre les dTE des MB liées à l'anticorps anti-VEGFR2 et à l'anticorps isotype contrôle est significative (Figure 73A,C,D). De plus, les régions hypoxiques déterminées par PA correspondent à la distribution spatiale du VEGFR2 (Figure 73F).

Limites de l'imagerie multi-modalité :

Les images TDM-X acquises suite à l'administration de l'agent de contraste X ont permis de délimiter distinctement les tumeurs par rapport aux tissus environnants (plus spécialement le foie) (Figure 74A). Au contraire, la TDM-X réalisée sans agents de contraste sur ce modèle orthotopique de tumeurs pulmonaires était plus difficile à analyser, particulièrement pour les grosses tumeurs, conduisant à une détermination plus approximative du volume tumoral (Figure 74B).

La Figure 74C correspond à l'évolution des signaux de BLI chez le même animal au cours du temps. Ces résultats montrent que ces signaux provenant de la tumeur pulmonaire sont perturbés au cours de la croissance tumorale. En effet, nous avons observé une augmentation de la bioluminescence jusqu'au jour 21, puis une diminution de celle-ci tandis que les volumes tumoraux continuaient d'augmenter.

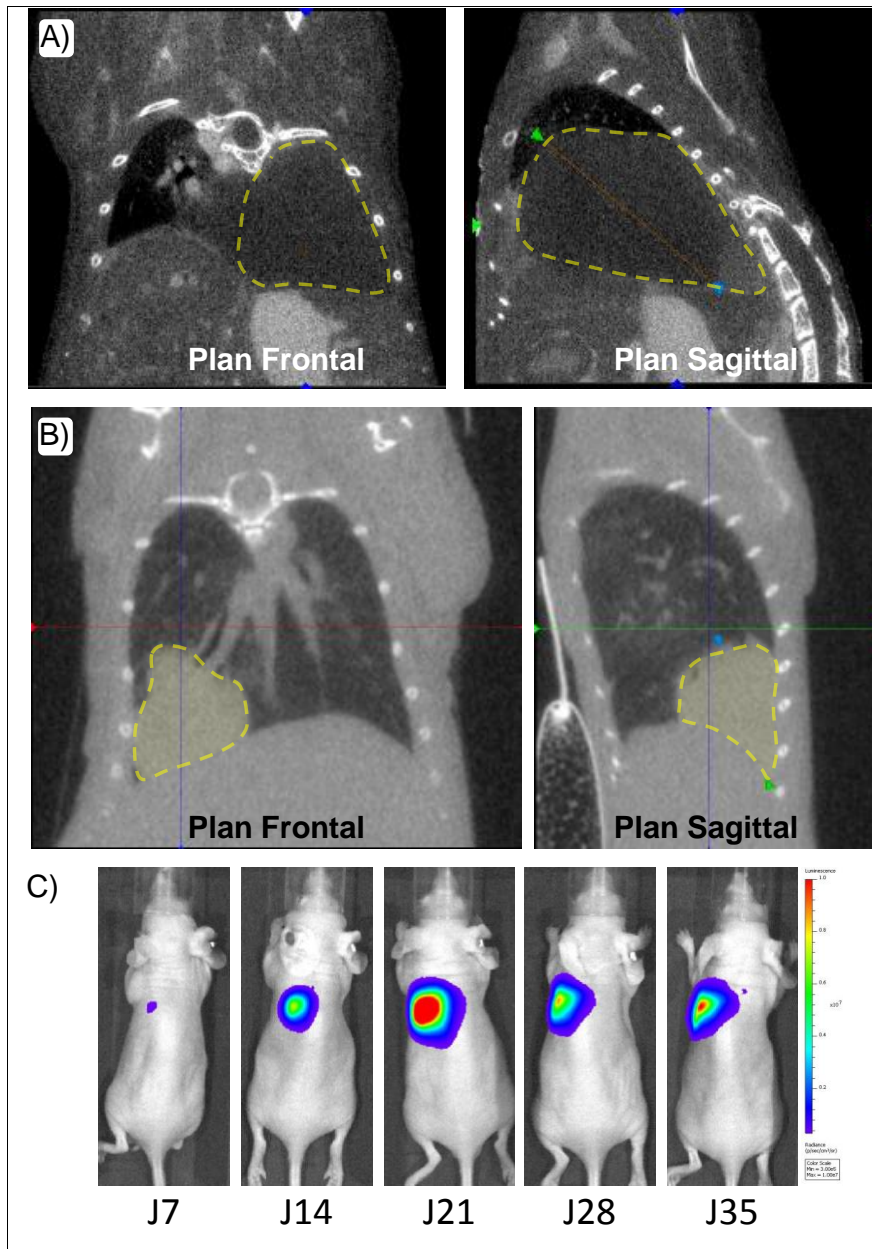


Figure 74 : TDM-X et signaux de bioluminescence de souris porteuses de tumeurs orthotopiques pulmonaires. A) TDM-X en 2D d'une souris porteuse de tumeur pulmonaire, après injection IV avec 100 μ L d'un mélange contenant de l'eXIA 160, un agent de contraste vasculaire iodé. La délimitation des tumeurs est visible sur les deux plans avec la ligne pointillée jaune. **B)** TDM-X obtenue sans injection d'agent de contraste. La délimitation des tumeurs est visible sur les deux plans avec la ligne pointillée jaune. **C)** Suivi longitudinal d'une souris avec tumeur pulmonaire orthotopique entre J7 et J35 (Photons/sec/cm²/steradian), après inoculation de 1,25x10⁵ cellules tumorales (CIPA 2016).

Discussion :

L'utilisation de modèles précliniques nous permet de suivre des paramètres biologiques ou encore la croissance tumorale, et de tester l'efficacité de composés thérapeutiques. Les expérimentations décrites ici ont prouvé leur utilité en proposant aux chercheurs une nouvelle technique compétitive d'évaluation de la croissance tumorale pulmonaire orthotopique par échographie *in vivo*, permettant ainsi des investigations non-invasives et

non-ionisantes. Chacune des modalités d'imagerie mises en œuvre au cours de cette étude possède ses avantages et inconvénients.

La TDM-X est pertinente pour faire une imagerie du système respiratoire grâce à la faible atténuation des rayons X par l'air présent dans les poumons ^[290]. Concernant la détection de tumeurs, la TDM-X a démontré son utilité pour la détection de tumeurs localisées au niveau de l'apex et de la région hilare (face médiastinale de chaque poumon). En revanche, elle est moins efficace pour les tumeurs localisées au niveau de la surface du diaphragme ^[291], car le manque de contraste avec le tissu sous-jacent rend difficile la mesure de tumeurs plus volumineuses et nécessite une connaissance approfondie de l'imagerie TDM-X et de l'anatomie de l'animal. L'utilisation d'agents de contraste vasculaires, tels que l'eXIA, était indispensable pour réaliser des mesures précises de volumes, même si les tumeurs étaient petites et grossissaient à la périphérie des poumons. Malheureusement, l'utilisation répétée d'agents de contraste n'est pas recommandée en onco-pharmacologie, à cause de leur effet potentiel sur la croissance tumorale et sur les traitements. La limite principale de la TDM-X est la dose de radiation délivrée aux tumeurs. En effet, pour ce modèle radio-sensible, l'impact d'exams d'imagerie répétés (1 par semaine versus 1 toute les 2 semaines, avec une TDM-X pulmonaire conventionnelle délivrant $38,9 \pm 3,9$ Gy) sur la croissance tumorale est significative. L'influence des doses sur la prolifération tumorale, et le fort risque de potentialisation de l'effet antitumoral d'un traitement peut affecter la pertinence des données d'évaluation de l'efficacité d'agents antitumoraux ^[282,292,293].

La BLI, bien qu'elle soit une technique quantitative exploitée en routine pour l'évaluation de la prolifération tumorale, est strictement dépendante des conditions métaboliques, à savoir la présence d'ATP et d'O₂. Comme présenté en Figure 74C, la charge tumorale initiale chez ces souris était relativement faible ($1,25 \times 10^5$ cellules), néanmoins conduisant à la formation d'un cœur hypoxique et à la décroissance spontanée du signal de BLI. Ces conditions hypoxiques sont un point critique à considérer afin d'assurer la pertinence des données obtenues ^[273,284,294]. La BLI et l'échographie étant non-invasive, les mesures ont été réalisées de manière longitudinale chez le même animal. Les résultats ont confirmé que la quantification de l'activité de BLI provenant des tumeurs pulmonaires est délicate, et les données obtenues doivent être analysées avec précaution. Pourtant cette technique reste une ressource d'imagerie robuste pour les stades précoces, permettant le contrôle de la prise de greffe et l'allocation des animaux en groupes homogènes (animaux répartis de manière homogène dans les groupes, afin qu'il y ait une moyenne et un écart type des signaux de BLI du même ordre de grandeur).

Parmi les autres modalités d'imagerie, l'échographie est non-invasive, non-ionisante, ne nécessite pas l'utilisation d'agents de contraste et offre ainsi l'avantage d'être rapide, peu chère et avec un impact minimal sur les processus étudiés. De plus, cette méthode n'est pas sujette aux perturbations dues à l'apparition de l'hypoxie. Etant donné que la forme des tumeurs pulmonaires orthotopiques n'est pas ellipsoïdale, des acquisitions 3D étaient nécessaires pour une estimation précise des volumes. Combinée à l'échographie haute résolution, l'imagerie PA est également une imagerie en temps réel non-invasive et quantitative pour l'étude de l'hypoxie et de l'hétérogénéité tumorale. La cartographie de la SO₂ peut être réalisée grâce à la différence d'absorption optique existant entre l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée [252]. En oncologie, de nombreux paramètres doivent être suivis et évalués sur les tumeurs, par conséquent, cette multimodalité associant échographie et PA est tout à fait pertinente pour monitorer la croissance tumorale et l'efficacité de composés thérapeutiques. Toutefois, à cause des limites dues à la propagation des ultrasons à travers le parenchyme pulmonaire, la translation vers des investigations cliniques ne peut pas être envisagée.

Grâce à l'imagerie moléculaire ultrasonore, il a été possible d'évaluer l'expression et la distribution spatiale du VEGFR2. Les différences dans les échos acoustiques entre les MB libres et celles liées à la cible moléculaire sont le point clé pour faciliter leur discrimination [295,296]. Cela ouvre des perspectives intéressantes pour la caractérisation des changements au niveau moléculaire [228] ainsi que pour l'évaluation de thérapies ciblées [218], plus particulièrement pour les stratégies antiangiogéniques basées sur des traitements anti-VEGFR2 [218,296,297].

En conclusion, nous avons décrit pour la première fois une stratégie d'imagerie échographique et photoacoustique pour le suivi des tumeurs orthotopiques pulmonaires et l'évaluation de biomarqueurs clés tels que l'hypoxie et l'expression de VEGFR2 *in vivo*. Ce travail a d'ailleurs fait l'objet d'une publication dans PloSone (Annexe 7) [298]. L'hypoxie est un paramètre majeur impliqué dans la résistance des tumeurs pulmonaires aux traitements par radiothérapies et chimiothérapies. Pour la médecine personnalisée, l'hypoxie peut être évaluée par des traceurs PET marqués au ¹⁸Fluor (comme vu précédemment) [299,300], et certaines chimiothérapies dédiées au traitement des tumeurs hypoxiques ont déjà été amenées en essais cliniques de phase III [301,302]. Cette ressource d'imagerie validée à haut débit serait d'un grand intérêt pour le suivi de tumeurs hypoxiques et pour l'évaluation de thérapies. Cette stratégie évite tout risque de perturbation de la progression tumorale comparé aux autres techniques d'imagerie comme la TDM-X.

En prenant en compte sa capacité à fournir une imagerie moléculaire haute résolution, il est possible d'imaginer d'autres applications potentielles de la PA pour évaluer la micro-biodistribution intratumorale d'agents thérapeutiques tels que les Ac monoclonaux ^[303].

Partie 2

Développement et application d'une plateforme d'imagerie multi- modalités dédiée à l'onco- pharmacologie expérimentale

2. DÉVELOPPEMENT ET APPLICATION D'UNE PLATEFORME INTÉGRÉE D'IMAGERIE MULTI-MODALITÉS DÉDIÉE À L'ONCO-PHARMACOLOGIE EXPÉRIMENTALE

2.1. Opérationnalité de la plateforme

Contexte :

L'imagerie joue un rôle clé dans la recherche translationnelle, particulièrement pour la détection précoce des cancers [304, 228]. La première génération de stratégies d'imagerie dédiées à l'évaluation de modèles expérimentaux en oncologie chez la souris provient directement de l'imagerie médicale. Ces modalités comprennent la TDM-X, la TEP, la TEMP, le BLI et l'IRM. Cependant, concernant l'utilisation de la TDM-X et des techniques radioactives, malgré des ruptures technologiques majeures ayant conduit à améliorer à la fois la sensibilité et la résolution des images, les doses de rayonnements délivrées par gramme de tissu restent très significativement supérieures à celles observées chez l'homme. L'irradiation répétée des animaux (et des tumeurs) doit donc être prise en compte lors des sessions d'imagerie, particulièrement lorsqu'elles sont réalisées longitudinalement.

Les modalités d'imagerie de dernière génération telle que la NIRF et la PA sont de nos jours de plus en plus considérées car les informations fournies par celles-ci sont tout autant pertinentes, ne nécessitant pas d'environnement de radioprotection particulier, tout en restant absolument inertes vis-à-vis de la croissance tumorale. La mise en œuvre de ces modalités récentes est plus adaptée et conduit à revisiter la recherche translationnelle en tenant compte de quelques limites susceptibles de conduire à des données moins pertinentes.

L'imagerie multimodale est aussi bien avantageuse pour l'imagerie préclinique que clinique, car elle est mise en œuvre afin d'améliorer l'identification et le développement de nouveaux candidats médicaments, grâce à la détection précise de l'efficacité de composés chez l'animal avec une haute sensibilité et une haute résolution. De plus, l'imagerie multimodale accélère le développement de nouveaux marqueurs d'imagerie et améliore notre connaissance sur les processus pathologiques cancéreux car chaque technique peut apporter des données complémentaires et compenser les limites des autres [305].

Dans cette partie, nous proposons une stratégie d'imagerie quadrimodale, associant l'imagerie biophotonique (BLI et NIRF), l'échographie et la PA sur une plateforme

embarquée (Figure 75). Cette combinaison n'a pas encore été décrite dans la littérature jusqu'à maintenant. Cette plateforme prototype consiste en une caméra CMOS (Figure 75B), permettant l'imagerie BLI et NIRF, insérée à l'intérieur de l'enceinte commerciale du système Vevo® LAZR, qui lui permet de réaliser les acquisitions d'échographie et de PA. Les données obtenues grâce à cette plateforme intégrée apporteront des données complémentaires à partir de chacune des modalités en une procédure en deux étapes ne nécessitant qu'une seule anesthésie. De nombreux paramètres d'imagerie pourront être mesurés sans avoir à transférer l'animal d'un système à un autre, comme c'est le cas dans certaines études en multimodalités. Du fait de l'utilisation de modèles orthotopiques de cancers humains pour développer des médicaments et de la localisation des tumeurs profondes, cette plateforme nécessite des techniques d'imagerie anatomique (permettant la localisation précise des tumeurs ainsi que des mesures dimensionnelles au sein de l'organisme hôte) pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique [306].

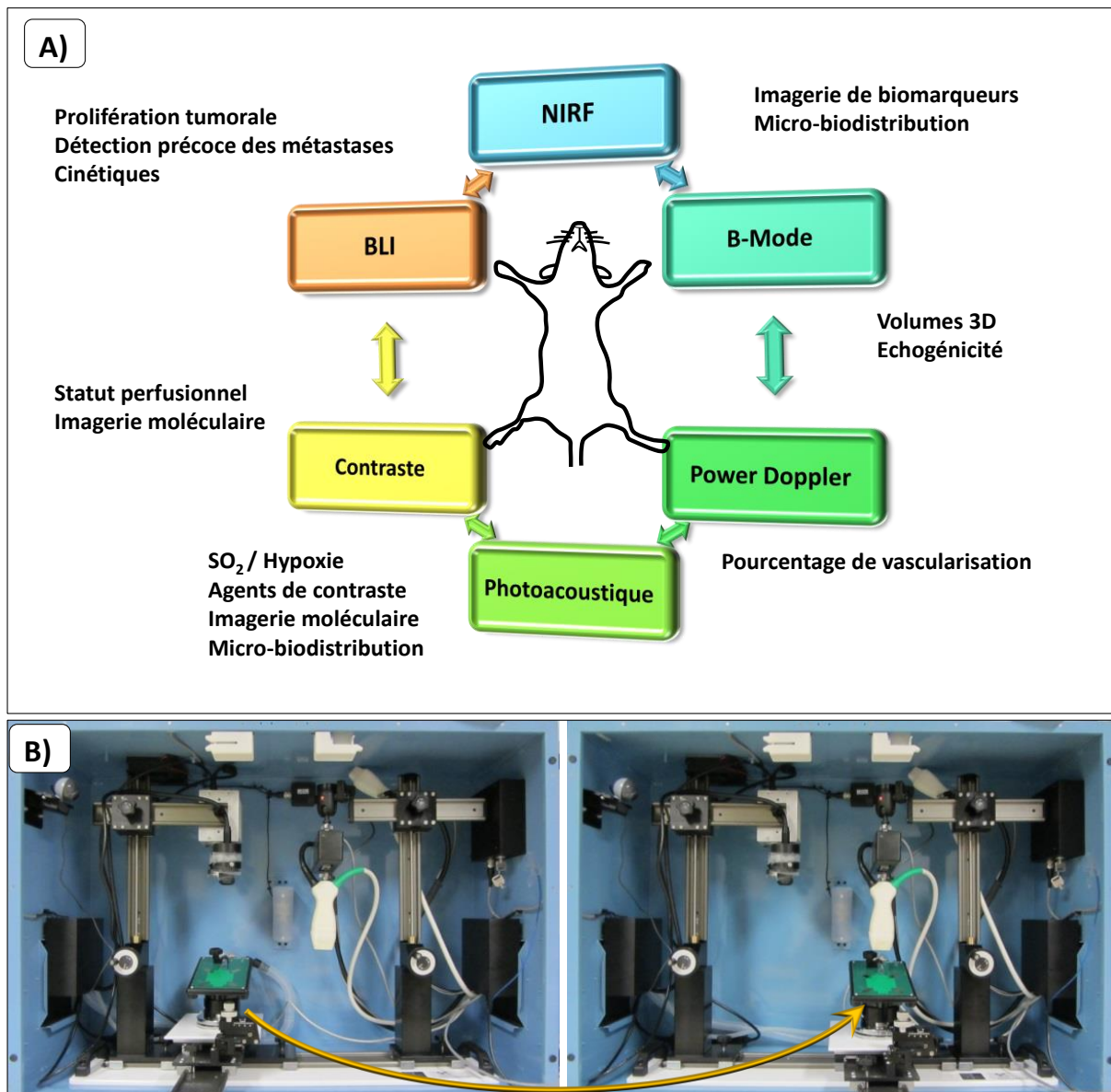


Figure 75 : Organisation de la plateforme intégrée d'imagerie multimodale. A) Rationnel pour la sélection des modalités d'imagerie pour chaque protocole dédié. **B)** Première étape pour la configuration BLI et NIRF, avec la caméra, puis seconde étape pour la configuration échographie et photoacoustique, grâce au transducteur (CIPA 2016).

La BLI possède l'avantage d'être hautement sensible sans perturbations dues au bruit de fond. L'imagerie de fluorescence présente, elle, l'avantage d'être hautement spécifique lorsque l'on utilise des fluorochromes ciblés [307].

L'échographie est une modalité d'imagerie à haut rendement, adaptable et facile de mise en œuvre pour l'étude anatomique des organes et des pathologies [293, 308].

L'imagerie de contraste ultrasonore gagne en popularité aussi bien en pratique clinique que préclinique. L'utilisation d'agents de contraste dédiés à l'imagerie de contraste ultrasonore (MB) permet de détecter des flux sanguins très faibles avec une haute sensibilité.

L'imagerie PA est une modalité d'imagerie fonctionnelle et moléculaire très sensible qui permet de mesurer de nombreux paramètres biologiques complémentaires aux explorations possibles par BLI, NIRF et échographie.

Il n'est pas envisageable pour le moment d'utiliser cette ressource en clinique, car il n'est pas possible de mettre en œuvre la BLI, ni l'imagerie des foyers profonds en NIRF chez l'homme. Cette plateforme est entièrement dédiée à l'imagerie du petit animal en oncopharmacologie, sans pouvoir considérer une translation intégrale de la démarche chez l'homme, pour lequel, la mise en œuvre de l'IRM, TEMP et TEP sont incontournables à l'heure actuelle. Néanmoins, sur la base de la conception de cette plateforme, à l'exclusion de la BLI, il paraît tout à fait réaliste d'envisager une solution dédiée pour la recherche clinique sur les tumeurs cutanées ou superficielles qui permettrait l'exploitation de toutes les autres modalités d'imagerie intégrées.

2.1.1. Matériels et Méthodes

L'objectif de ce travail était de valider la mise en œuvre de la caméra CMOS pour l'imagerie de bioluminescence et pour l'imagerie de fluorescence par le ciblage des tumeurs grâce à l'injection d'un anticorps marqué. Enfin, l'autre objectif était de valider la possibilité de confronter de l'imagerie optique et ultrasonore dans une approche multimodale.

Culture cellulaire, animaux et modèle tumoral :

Le modèle de tumeurs orthotopiques mammaires MDA-MB-231 a été détaillé en 1.3.1.1. Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1. Nous avons utilisé pour cette étude un total de 16 animaux.

2.1.1.1. Imagerie de fluorescence et de bioluminescence

La caméra que nous avons sélectionnée pour les acquisitions de BLI et de NIRF au sein de la plateforme intégrée est une caméra miniaturisée ORCA Flash 4.0 LT (Hamamatsu photonics) utilisant un capteur CMOS. Le champ de vue est suffisamment large pour permettre une imagerie du corps entier de la souris. La taille du capteur est de 2048x2048 pixels, pour une résolution maximale de 70µm environ (avec l'objectif utilisé). Les images de référence en niveau de gris pour le recalage des signaux ont été obtenues sous lumière blanche. La vitesse de lecture de cette caméra est de 30 images/secondes pour la résolution temporelle la plus élevée.

Grâce à cette nouvelle génération de dispositifs CMOS, les acquisitions de BLI peuvent être réalisées en seulement 10 secondes d'intégration, permettant ainsi des acquisitions dynamiques successives pour les études de cinétiques principalement chez les animaux présentant des métastases (ce qui permet d'observer le décalage de temps dans l'apparition du signal de BLI, et ainsi donner des informations sur la diffusion de la luciférine au niveau des métastases).

Les acquisitions de NIRF ont elles, été réalisées avec des intégrations de 2 secondes conduisant à une identification et un contourage précis des foyers tumoraux.

Pour la NIRF, grâce au porte-filtre fixé sur l'objectif de la caméra nous avons utilisé des filtres d'émission et d'excitation interchangeables dédiés à chaque fluorochrome utilisé. Pour les fluorochromes à 680nm nous avons utilisé des filtres (Laser Components, Meudon, France) caractérisés par Excitation : $640\pm 50\text{nm}$; Emission : $740\pm 80\text{nm}$. Pour les fluorochromes à 680nm nous avons utilisé des filtres provenant de chez Laser Components (Meudon, France) caractérisés par Excitation : $748\pm 37\text{nm}$; Emission : $843\pm 33\text{nm}$. La source de lumière excitatrice est une lampe Solos Endoscopy GS9250 ELS-2 Xenon Arc (Solos Endoscopy Inc., Boston, Etats-Unis). Cette source de lumière a été utilisée aussi bien pour les acquisitions de référence que pour les acquisitions de fluorescence (l'image de référence étant acquise sous lumière blanche et l'image de fluorescence étant acquise sous lumière blanche filtrée). Afin d'évaluer simultanément l'expression de biomarqueurs spécifiques émettant à des longueurs d'ondes différentes par NIRF, nous avons appliqué une approche multi-longueurs d'onde en utilisant les différents filtres d'excitation et d'émission. Nous avons ensuite réalisé lorsque cela était nécessaire une procédure de « spectral unmixing » pour différencier les signaux propres à chaque fluorochrome.

La caméra est munie d'un objectif avec porte filtres, permettant ainsi l'évaluation de fluorochromes avec des spectres d'émission différents. La source de lumière filtrée est positionnée tout autour de la caméra, ce dispositif étant attaché au bras de la station d'imagerie du système Vevo® LAZR (Figure 76).

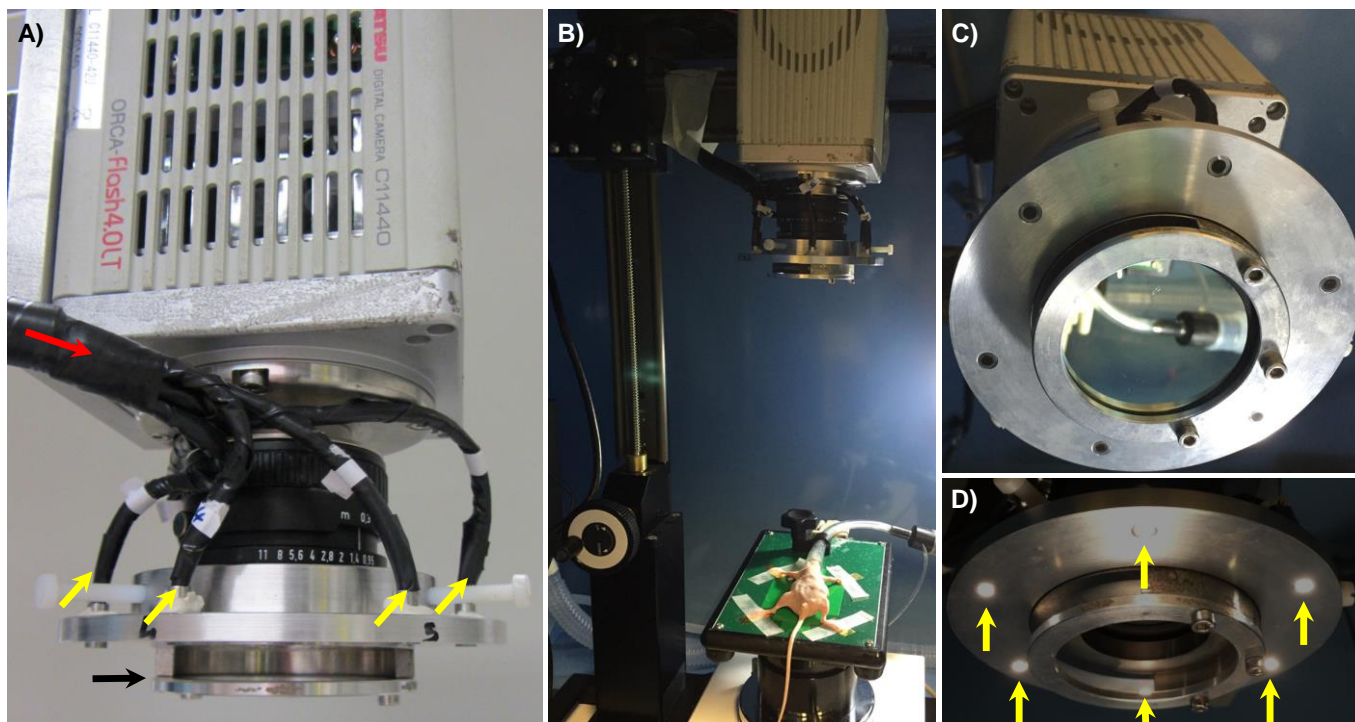


Figure 76 : Dispositif d'illumination permettant l'imagerie de fluorescence. A) Positionnement du système d'illumination circulaire autour de l'objectif de la caméra. La flèche rouge désigne l'arrivée de la fibre optique. Les flèches jaunes désignent les divisions de la fibre optique principale disposées en 6 points autour de l'objectif. La flèche noire désigne le porte filtre. B) Positionnement du système au-dessus de l'animal à l'intérieur de l'enceinte. C) & D) Disposition de l'extrémité des fibres optiques conduisant la lumière filtrée (CIPA 2016).

Quantification de l'imagerie de bioluminescence avec la caméra ORCA :

Calcul du bruit de fond :

Le bruit de fond s'obtient en acquérant un grand nombre d'images qui ont été enregistrées avec 10 secondes d'intégration (le même temps utilisé pour obtenir les signaux de BLI). Ces acquisitions sont réalisées dans le noir absolu.

Chaque image acquise est ensuite traitée pour enlever la contribution du rayonnement cosmique. Ces « cosmiques » sont des pixels aberrants de haute intensité, résultants de la détection par le capteur de particules très énergétiques provenant de l'espace. Les cosmiques contribuent à rajouter à l'image un bruit de fond supplémentaire, mais avec des pixels de fortes activités qui vont fausser les déterminations d'activités lors des examens. Le traitement des images consiste à comparer les images 2 à 2 pour remplacer les cosmiques par une valeur moyenne du bruit de fond.

Puis les images corrigées des cosmiques sont sommées puis re-divisées par le nombre d'acquisitions considérées pour l'enregistrement du bruit de fond. On obtient donc une image de bruit de fond optimisée sur le plan statistique.

Acquisition de l'image de BLI :

On considère 2 images de 5 secondes pour chaque acquisition, puis on les compare 2 à 2 pour supprimer les cosmiques. Cela consiste à additionner les deux images de 5 secondes et d'affecter à chaque pixel correspondant aux cosmiques, la valeur moyenne des pixels qui l'entourent (matrice de 9 pixels dont le pixel central se voit affecter la valeur moyenne des 8 pixels qui l'entourent).

On retire ensuite le bruit de fond précédemment déterminé.

Sur la Figure 77A, nous pouvons voir les signaux correspondants à une acquisition de BLI, puis après soustraction des cosmiques et du bruit de fond, nous obtenons le signal ne correspondant qu'aux photons de bioluminescence (Figure 77B).

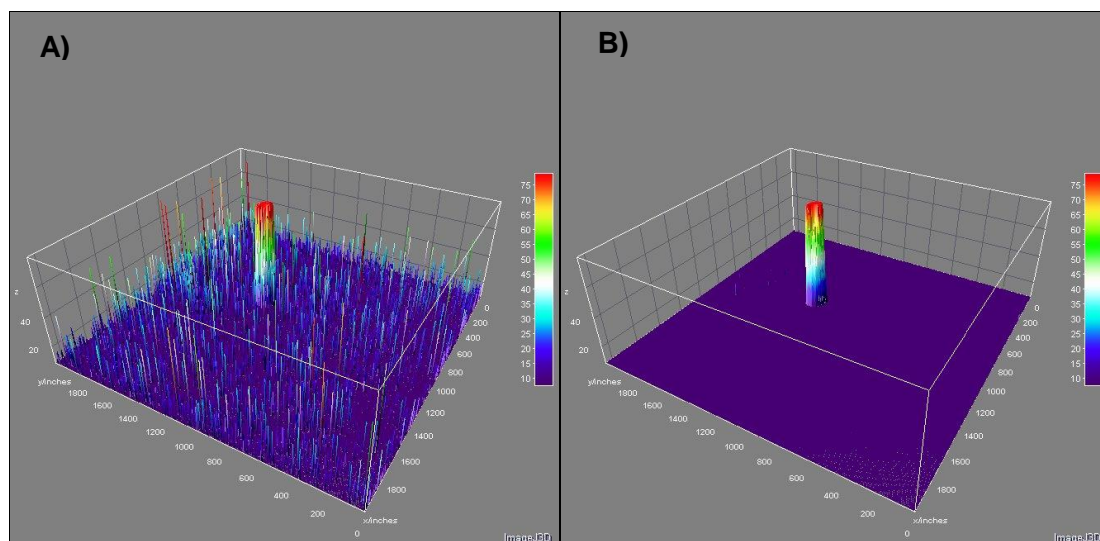


Figure 77 : Suppression du bruit de fond et des cosmiques sur une acquisition de bioluminescence. A) Signal BLI original. B) Signal BLI après suppression du bruit de fond et des cosmiques (CIPA 2016).

La quantification en coups (nombre de photons de BLI détectés) se fait dans la ROI qui est tracée. Une standardisation de la quantification par rapport à une source de lumière calibrée permet *a posteriori* d'obtenir une quantification en photons/seconde.

Quantification de l'imagerie de fluorescence :

La quantification des signaux de fluorescence avec la caméra ORCA nécessite un processus de correction complexe associant la correction de la lumière incidente

excitatrice par rapport au signal total détecté et la distance entre le sujet et le détecteur. Cette quantification est actuellement en cours de développement.

Anticorps marqué :

Pour les images de fluorescence infrarouge, les animaux ont reçu une injection IV d'Ac marqué par l'ICG-NHS (Intrace Medical), l'AF750-NHS (kit SAIVI, Invitrogen) ou l'IR-Dye800-NHS (LI-COR), 24 heures avant les protocoles d'acquisition. Pour le marquage par les fluorochromes, une solution de cetuximab à 5mg/mL (Laboratoires Roche) était utilisée, la concentration post-marquage étant ajustée à 1mg/mL. Les animaux recevaient 50 μ L de solution marquée, QSP 150 μ L avec PBS. Le cetuximab est un anticorps monoclonal qui cible le récepteur du facteur de croissance épidermique humain (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). L'EGFR est un récepteur impliqué dans plusieurs voies de signalisation cellulaire pro-carcinogènes. Ces trois fluorochromes, ayant des propriétés fluorescentes différentes (ICG λ_{ex} :780nm ; λ_{em} :812nm / AF750 λ_{ex} :749nm ; λ_{em} :755nm / IR-Dye800 λ_{ex} :767nm ; λ_{em} :791nm), ont été mis en œuvre afin de comparer leur détectabilité par NIRF, et évaluer leur potentiel pour l'imagerie PA en tant qu'agents de contraste.

Dans le but de comparer la pertinence des résultats obtenus avec la BLI et la NIRF, nous avons également utilisé l'IVIS Lumina II (Perkin Elmer[®], France), permettant la génération d'une image pseudo-colorée représentant l'intensité de lumière collectée superposée sur une image en niveau de gris de référence. Les paramètres de binning et de durée d'acquisition ont été déterminés suivant l'activité tumorale. L'intensité du signal a été quantifiée comme le flux total (photons/secondes) à l'intérieur des ROIs dessinées manuellement autour de l'aire tumorale en utilisant le logiciel Living Image 4.4 software (Perkin Elmer[®], France).

Les souris anesthésiées, par inhalation d'isoflurane 1,5% en air (Isoflo[®], AXIENCE S.A.S, Pantin, France), ont été placées sur la plaque thermostatée, soit du système Vevo[®] LAZR, soit du système Perkin Elmer[®] en décubitus ventral. Les pattes des animaux étaient reliées aux électrodes de la plaque du système Vevo[®] afin de monitorer l'ECG et la respiration des animaux au cours des acquisitions qui étaient réalisées portes fermées. Chaque animal a reçu une injection IP de luciférine à 100mg/kg (Promega, France).

2.1.1.2. Mesures ultrasonores

Imagerie échographique :

La procédure d'imagerie échographique a été détaillée précédemment en 1.3.1.1.

Imagerie de contraste ciblé :

La procédure d'imagerie de contraste ciblé a été détaillée précédemment en 1.4.4.2.1.

Imagerie Photoacoustique :

Dans le but de différencier les signaux des sondes injectées (contenant de l'ICG, de l'IR-Dye800 et de l'AF750) des signaux endogènes, une analyse multispectrale a été réalisée. Cette analyse spectrale correspond à une analyse pixel à pixel basée sur des algorithmes pseudo-inversés permettant de mettre en évidence, à partir du signal de base, le signal du composant (extraction du signal réel du composant par rapport au signal total incluant le bruit de fond) en le comparant à une librairie de spectres photoacoustiques préalablement enregistrés. Pour les mesures d'oxygénation, le mode dédié « OxyHemo » permet de mesurer la SO_2 des tumeurs en 2D et en 3D, documentant ainsi les valeurs moyennes de SO_2 et les volumes hypoxiques.

Superposition des données ultrasonores et optiques obtenues :

La superposition des données ultrasonores et biophotoniques a été réalisée avec un logiciel d'analyse d'image avancé (Photoshop CS6, San Jose, Etats-Unis). Les données obtenues ont été fusionnées numériquement de telle sorte que la taille de chaque image planaire de BLI et NIRF corresponde à la taille des images acquises en échographie et PA. Les rendus 3D vus du dessus, provenant des acquisitions échographiques et photoacoustiques ont été fusionnés avec les images biophotoniques planaires rendant ainsi possible la comparaison des données. La procédure d'alignement était simplifiée par la connaissance des longueurs parcourues par le transducteur lors des scans 3D et la connaissance de la taille des images BLI et NIRF.

2.1.2. Résultats

La Figure 78 présente des exemples d'images obtenues à partir de chacune des modalités disponibles grâce à la plateforme intégrée sur un modèle de tumeurs mammaires orthotopiques (MDA-MB-231). La BLI a permis de mesurer la prolifération tumorale, mais également la détection précoce de métastases. Les signaux de NIRF ont

été suivis afin de mesurer l'expression de biomarqueurs spécifiques ainsi que leur micro-biodistribution. Avec les mesures d'échographie en B-Mode, nous avons obtenu des résultats sur l'échogénicité des tissus et nous avons pu mesurer précisément les volumes tumoraux. Grâce au Power Doppler, nous avons suivi le pourcentage de vascularisation des tumeurs. L'imagerie PA a permis la détection d'agents de contraste et la mesure de SO₂ à l'intérieur des tumeurs. Enfin, l'échographie de contraste nous a renseignés sur le statut perfusionnel des tumeurs.

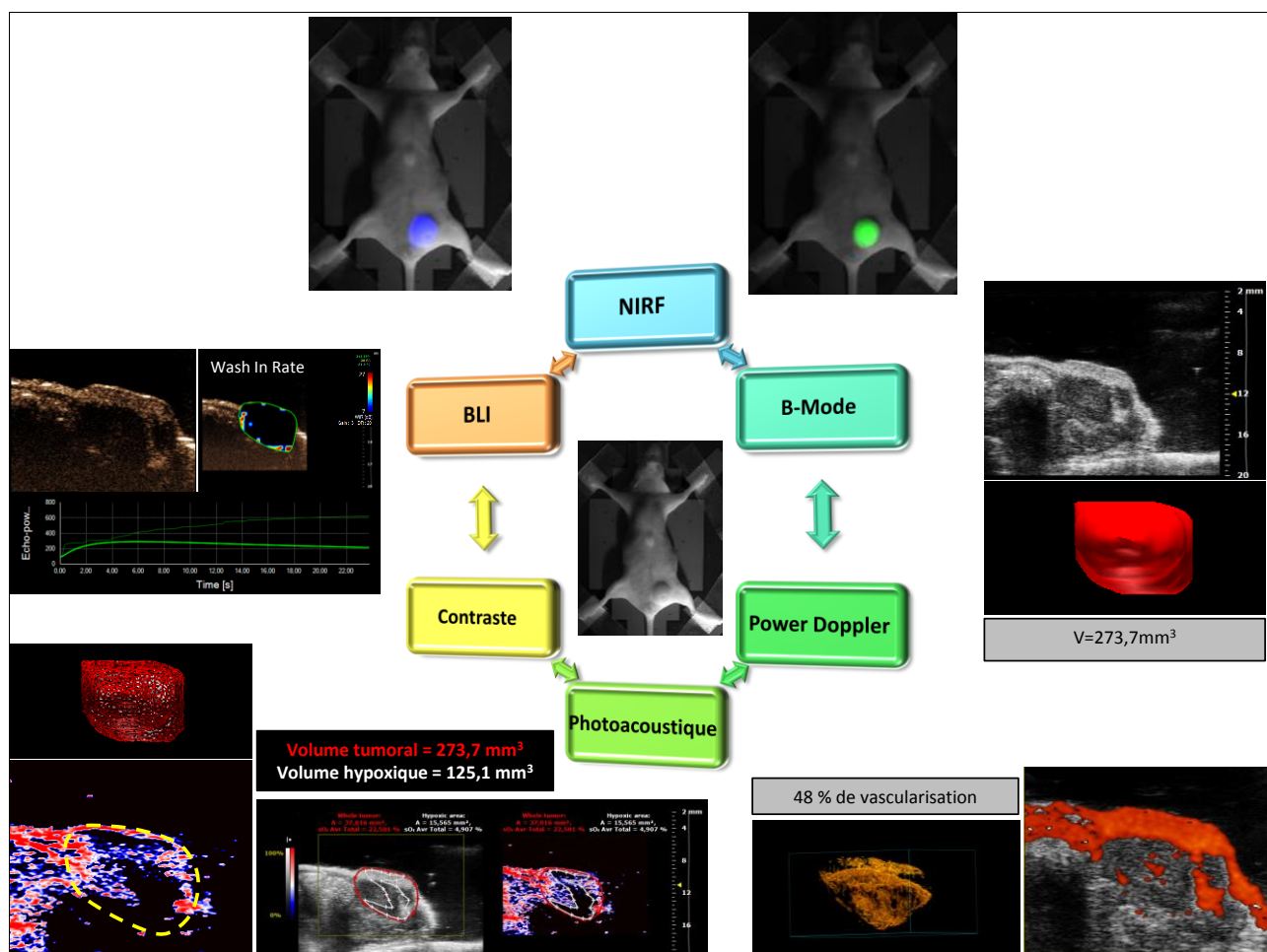


Figure 78 : Mise en œuvre de la plateforme intégrée. Voici un exemple typique des explorations pouvant être réalisées chez le même animal avec chacune des modalités intégrées dans cette plateforme multimodale (CIPA 2016).

2.1.2.1. Imagerie de fluorescence et marquages fluorescents

Nous avons validé la détection du cetuximab marqué par de l'ICG, de l'AF750 et de l'ID-Dye800 en réalisant des acquisitions avec la caméra CMOS. La quantité de cetuximab marqué injectée aux animaux est restée constante entre les différents protocoles. Des groupes de 5 animaux ont été formés pour l'étude des marquages fluorescents.

2.1.2.1.1. Marquage Cetuximab- IR-Dye800

Le marquage cetuximab-IR-Dye800 a permis de mettre en évidence la tumeur, de manière très spécifique et sensible, sans bruit de fond non spécifique (Figure 79A).

2.1.2.1.2. Marquage Cetuximab-AF750

Le marquage cetuximab-AF750 a également permis de mettre en évidence la tumeur, de manière très spécifique et sensible, sans bruit de fond non spécifique (Figure 79B).

2.1.2.1.3. Marquage Cetuximab-ICG

Le marquage cetuximab-ICG, a permis de mettre en évidence la tumeur. En revanche, la stabilité du marquage est plus courte dans le temps que les autres marquages fluorescents testés, et nous avons remarqué que le bruit de fond est plus important qu'avec les deux autres fluorochromes lorsque la solution marquée est utilisée plus de 15 jours après sa préparation (Figure 79C). En effet, nous pouvons voir qu'il y a un signal non négligeable au niveau du foie, ainsi qu'au niveau viscéral pour certains animaux (l'élimination de l'ICG se faisant principalement par voie intestinale et biliaire après filtration hépatique).

2.1.2.2. Imagerie de bioluminescence

Les acquisitions de bioluminescence réalisées sur les tumeurs ont permis de montrer qu'il existe une co-localisation entre la prolifération tumorale (BLI) et l'expression d'EGFR (NIRF). Comme nous pouvons le constater en Figure 79, les signaux BLI et NIRF mesurés sur un animal correspondent en termes de localisation.

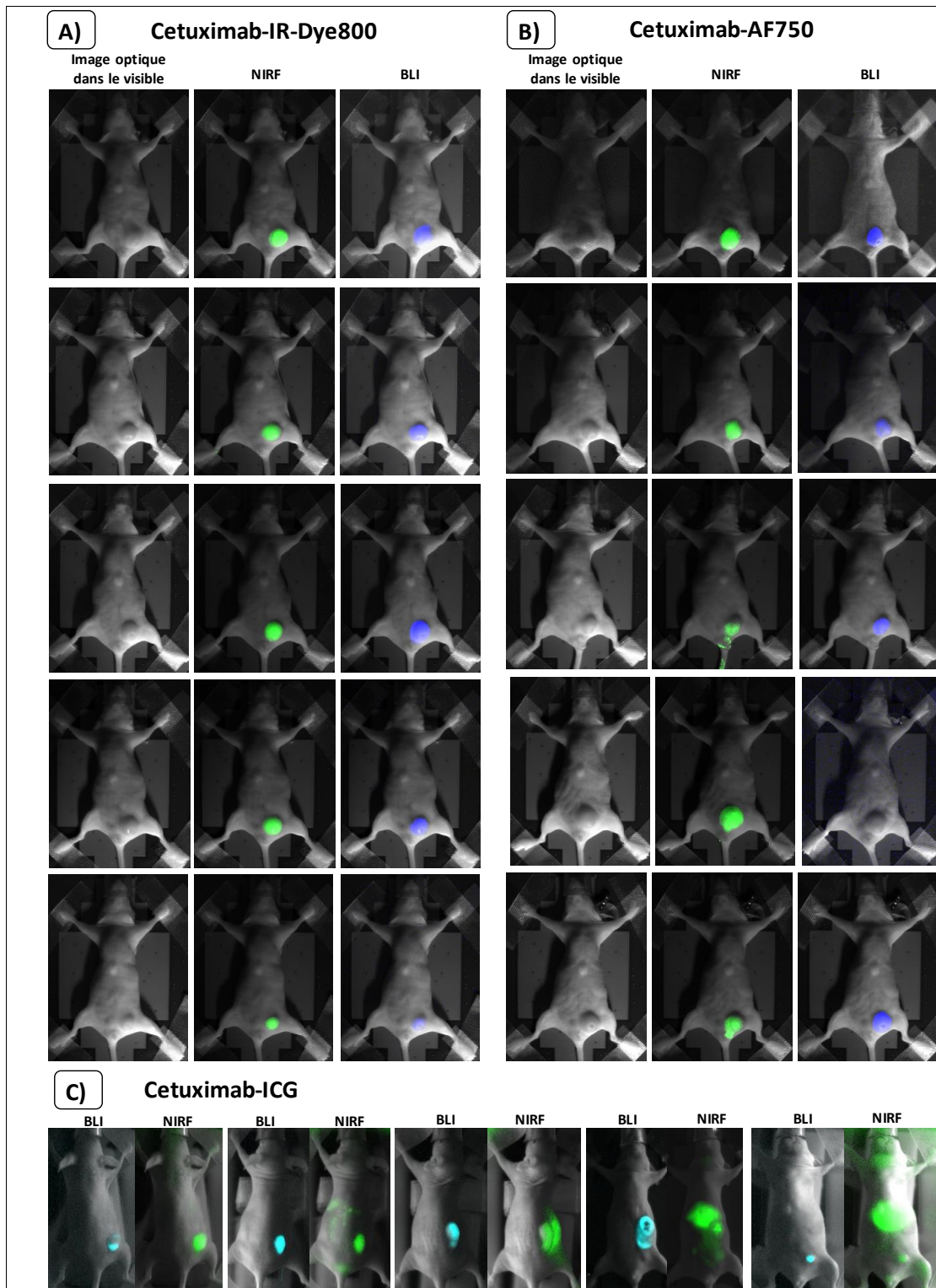


Figure 79 : Evaluation du marquage du cetuximab en fluorescence. A) Validation du marquage du cetuximab avec de l'IRDye800 chez la souris porteuse de tumeur MDA-MB-231. La BLI et la NIRF ont été réalisées par la caméra ORCA avec une image en niveau de gris de référence. **B)** Validation du marquage du cetuximab par l'AlexaFluor®750 chez la souris porteuse de tumeur MDA-MB-231. **C)** Validation du marquage du cetuximab par l'ICG (CIPA2016).

2.1.2.3. Mesures ultrasonores

En Figure 80A, nous avons comparé les données BLI et NIRF en 2D aux acquisitions d'échographie et de PA. La haute sensibilité de la caméra nous a permis de détecter les signaux BLI et d'enregistrer des cinétiques de bioluminescence post-administration de

luciférine (Figure 80E). La détection des signaux de NIRF provenant du cetuximab (ciblant l'EGFR) marqué par de l'IR-Dye800 était sensible et spécifique.

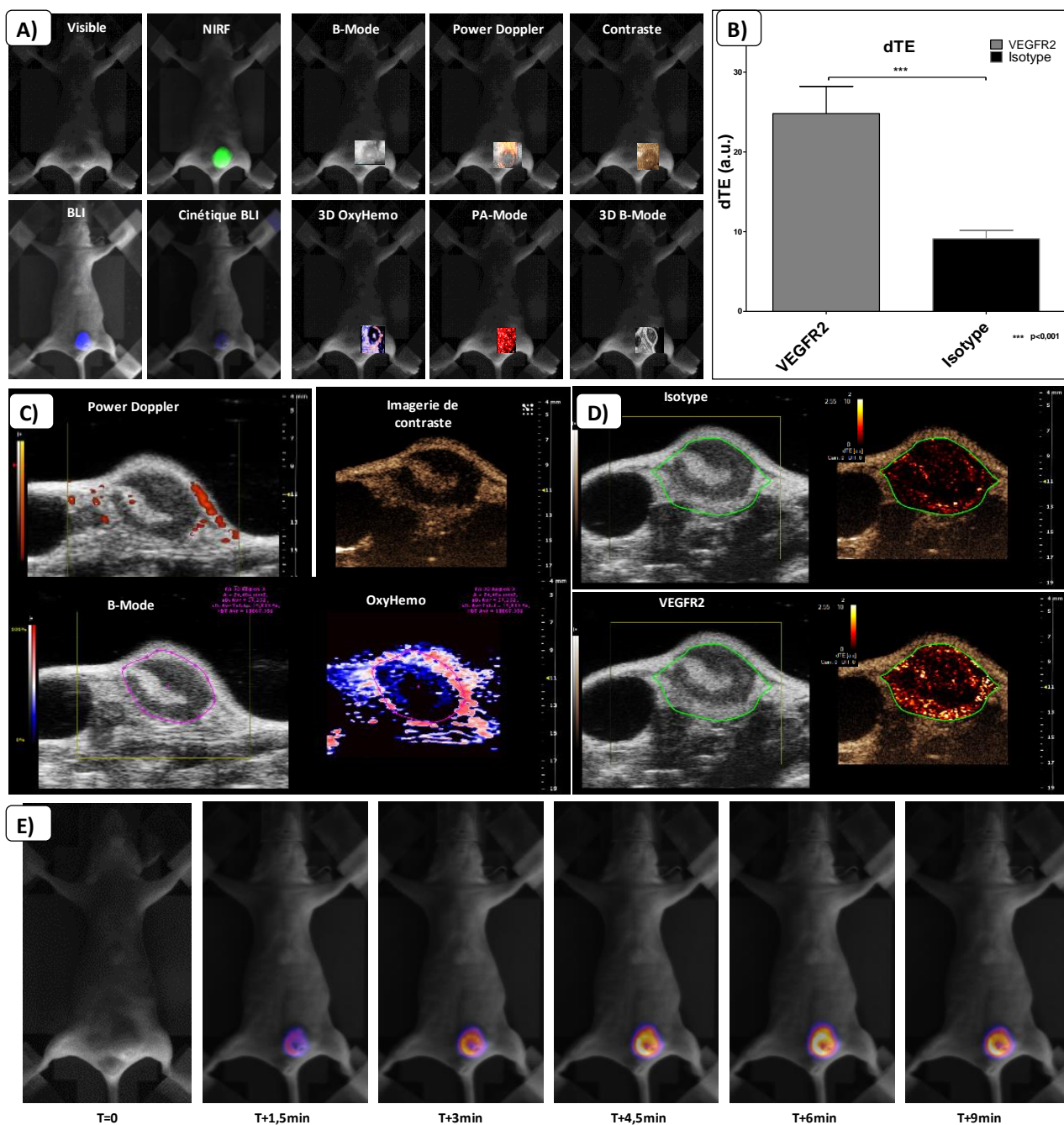


Figure 80 : Comparaison de modalités : De la biophotonique à l'échographie et à la photoacoustique. **A)** Les acquisitions de biophotonique 2D (BLI, Cinétique de BLI et NIRF), sont comparées aux acquisitions 3D du système Vevo[®]. Ici sont présentés les rendus 3D vus du dessus obtenus à partir des acquisitions 3D du moteur pas-à-pas. Les acquisitions du B-Mode, du Power Doppler, de contraste, d'OxyHemo et de PA peuvent facilement être superposées sur les images de référence en niveaux de gris de la caméra. **B)** Evaluation du differential Targeted Enhancement (dTE), après destruction des microbulles aussi bien ciblées que non-ciblées. Un dTE important signifie que la fixation des microbulles est meilleure, donc signifie qu'il y a une expression importante de VEGFR2. L'analyse statistique a été réalisée avec un test t de Student non-apparié (n=10 animaux par groupes). (***)p<0,001). **C)** Exemples de comparaisons qui peuvent être réalisées sur la même coupe provenant de la même tumeur *in vivo*. Dans ce lot d'images, nous retrouvons le Power Doppler, l'imagerie de contraste ultrasonore, et la photoacoustique OxyHemo. **D)** Imagerie paramétrique correspondante montrant l'expression du VEGFR2 comparé aux microbulles ciblées par Ac isotype contrôle. **E)** Cinétique de bioluminescence (CIPA 2016).

Grâce aux rendus 3D obtenus par échographie et PA, nous avons pu comparer les données superficielles et profondes, après recalage des données. A partir des acquisitions 3D, il est effectivement possible d'afficher les coupes dans un plan transversal, mais également dans les plans frontaux et sagittaux (comparaison ici des acquisitions 2D de BLI et de NIRF avec les plans horizontaux).

L'expression du VEGFR2 à l'intérieur des tumeurs a été mise en évidence suite à l'injection de MB ciblées. Nous avons observé une différence significative du dTE entre les MB ciblant le VEGFR2 et les MB ciblées par un anticorps isotype contrôle (Figure 80B). Sur la Figure 80D, il est possible d'apprécier l'expression du VEGFR2 dans ces tumeurs, comparée à la fixation non spécifique des MB ciblées par l'Ac isotype. De plus, nous avons confronté l'expression du VEGFR2 aux données de Power Doppler et d'oxygénation (Figure 80C). Nous avons observé que l'expression du VEGFR2 correspond aux régions faiblement vascularisées (Power Doppler) et hypoxiques (PA OxyHemo).

La figure 81 présente un autre exemple de confrontation possible des données obtenues grâce à cette plateforme intégrée. Nous y retrouvons des acquisitions Doppler, OxyHemo, Contraste non-ciblé associées à l'image paramétrique de la perfusion, ainsi que l'image de référence B-Mode. Sur cet exemple, les zones tumorales perfusées concordent bien avec les gros vaisseaux visibles sur le Power Doppler, et également avec les zones bien oxygénées en PA OxyHemo.

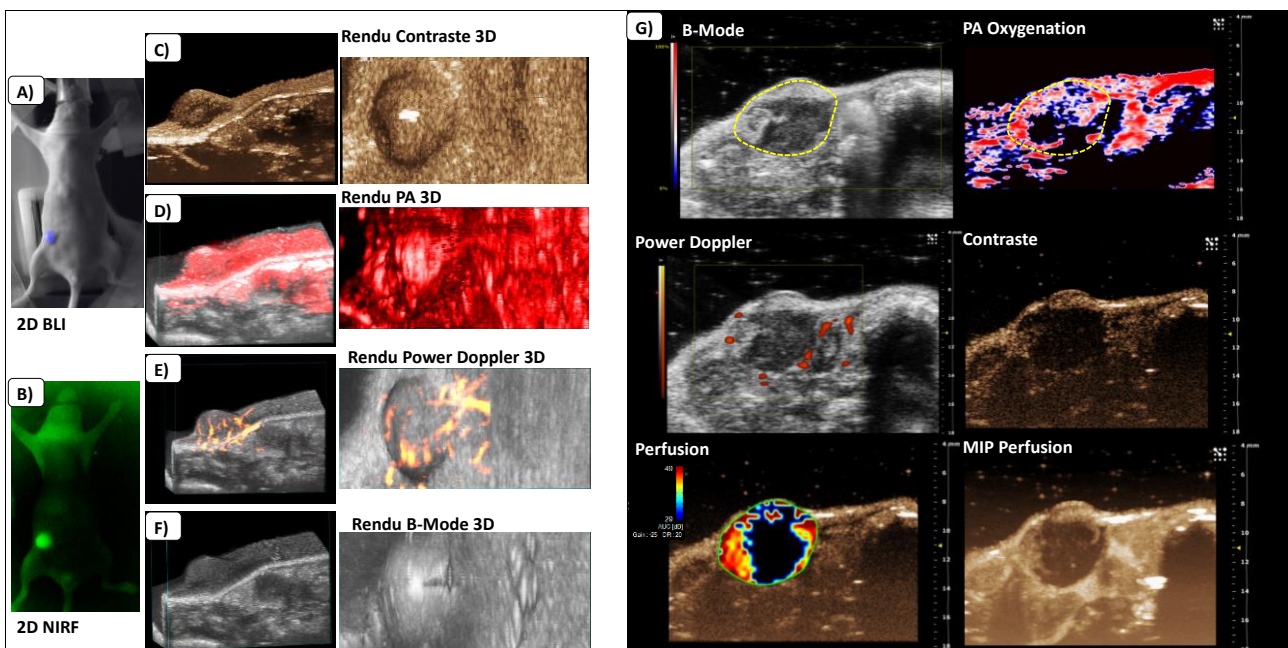


Figure 81 : Evaluation de différents paramètres physiopathologiques chez la souris. A) Bioluminescence 2D. **B)** Imagerie de fluorescence. **C), D), E) & F)** Comparaison des rendus 3D du système Vevo®. **G)** Images échographiques et photoacoustiques correspondantes pour chaque acquisition des modalités mises en œuvre sur cette incidence de la tumeur (CIPA 2016).

2.2. Exploitation des stratégies d'imagerie en oncologie expérimentale

2.2.1. Constructions moléculaires à base de MonoMéthyl Auristatine E

Le seul modèle d'étude oncologique qui reste pertinent vis-à-vis de l'Homme, et de sa tumeur reste l'Homme lui-même. En considérant les questions éthiques évidentes, l'évaluation des nouvelles thérapies et la compréhension des mécanismes biologiques doivent être obtenues à partir des modèles animaux. Ces essais sur animaux correspondent à l'étape de preuve de concept pour les molécules qui seront testées ensuite en essais cliniques de phase I et II. Ces travaux ont été réalisés en partenariat avec l'Institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers (IC2MP) (Pr. S. PAPOT), UMR CNRS7285, Université de Poitiers.

Cette partie expérimentale s'inscrit dans l'approche par imagerie multimodale des études de preuves de concept de nouvelles chimiothérapies, pour la démonstration de leur efficacité, une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action, mais aussi dans la définition des choix stratégiques qui visent à accélérer leur passage en clinique.

2.2.1.1. La MonoMethyl Auristatine E

La Monomethyl Auristatine E (MMAE) est une molécule de la famille des dolostatines ^[309] qui sont des pseudopeptides naturels extraits d'un mollusque marin appelé lièvre de mer (*Dolabella auricularia*) (Figure 82). La famille des dolostatines possède des propriétés antinéoplasiques, bactéricides ou encore antifongiques ^[310-312]. Dans la famille des dolostatines, nous retrouvons les dolostatines 10 et 15 qui ont été identifiées comme des inhibiteurs de polymérisation de la tubuline ^[313]. La MMAE a été évaluée sur différentes lignées tumorales humaines, comme certaines hémopathies malignes, le mélanome, des cancers du poumon, de l'estomac, de la prostate, des ovaires, du pancréas, du sein, du côlon ou encore des reins. Les résultats obtenus ont indiqué qu'aucune de ces lignées n'étaient résistantes à la MMAE et que cette molécule était 200 fois plus puissante que la vinblastine, et 100 à 1000 fois plus puissante que la doxorubicine ^[314]. Néanmoins, la toxicité de la MMAE est telle qu'il n'est pas envisageable de l'utiliser seule chez l'Homme. Il est donc nécessaire de coupler la MMAE de manière covalente à un vecteur (rendant ainsi inactive la MMAE, lorsque injectée sous sa forme liée) afin que la MMAE ne redevienne libre et active qu' au niveau tumoral ou dans le proche environnement tumoral.

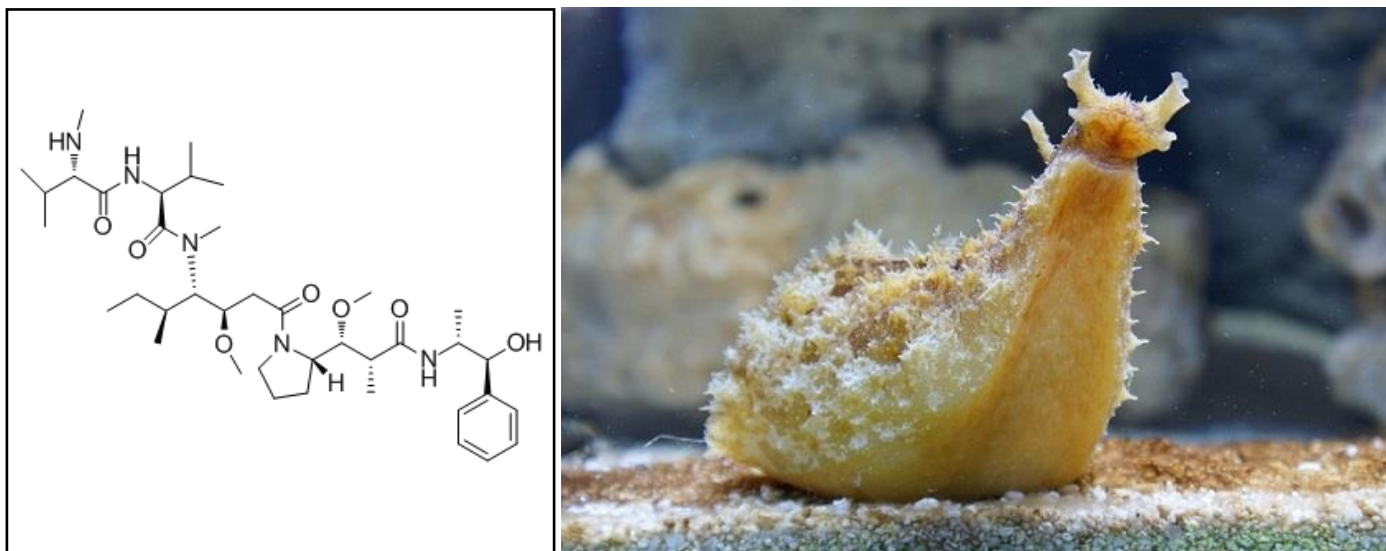


Figure 82 : Représentation de la molécule de MonoMéthyl Auristatine E. Photographie de *Dolabella auricularia* [315].

2.2.1.2. Notion de prodrogues thérapeutiques

Les prodrogues (ou promédicaments) sont des dérivés bio-réversibles d'agents pharmacologiquement actifs qui doivent subir un clivage enzymatique et/ou une transformation chimique *in vivo* pour libérer le médicament parent sous sa forme active, qui peut ensuite exercer son effet pharmacologique. Dans les études qui vont suivre, la mise en œuvre de l'imagerie *in vivo* dans des modèles de cancer vise à évaluer l'efficacité antitumorale de la molécule d'intérêt identifiée « Prodrogue 1 » et préciser le potentiel de libération dans le microenvironnement tumoral du principe actif. Dans cet objectif, des molécules apparentées, identifiées « Prodrogue 2 et Prodrogue 3 » ont été mises en œuvre.

2.2.1.2.1. Prodrogue 1

La molécule d'intérêt (ou Prodrogue 1) est un agent anticancéreux vectorisé dérivé de la MonoMéthyl Auristatine E, un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline, et possède une ancre maléïmide qui lui servira à lier directement l'albumine plasmatique *in vivo* (Figure 83). Cette molécule, produite par l'équipe du Professeur Sébastien PAPOT, va ainsi permettre d'exploiter la perméabilité accrue des vaisseaux impliqués dans la néoangiogenèse.

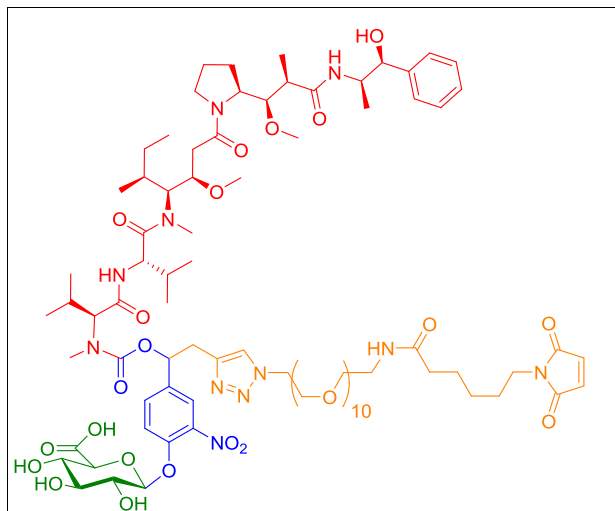


Figure 83 : Structure chimique de la Prodrogue 1 (d'après [319]).

En effet, les vaisseaux sanguins issus de cette angiogenèse présentent une structure différente des vaisseaux issus de l'angiogenèse normale avec notamment des porosités qui vont permettre l'accumulation des protéines plasmatiques comme l'albumine. Ce phénomène, connu sous le nom d'effet EPR pour « Enhanced Permeability and Retention », peut être utilisé pour améliorer le transport d'agents cytotoxiques au niveau de la zone tumorale. En créant des agents anticancéreux capables de s'associer à l'albumine, cette dernière va permettre d'augmenter la concentration des molécules actives au niveau de la zone tumorale par une accumulation à la périphérie des vaisseaux sanguins tumoraux. Le second verrou moléculaire compris dans la molécule est dû à la présence d'un glucuronide qui inactive l'agent anticancéreux. L'activation du vecteur se fait par reconnaissance de cette gâchette glucuronylée par des enzymes spécifiques du microenvironnement tumoral (β -glucuronidase). Cette reconnaissance entraînera une réaction de décomposition intramoléculaire du vecteur qui aboutit à la libération de l'agent cytotoxique (MMAE) (Figure 84) [316-318].

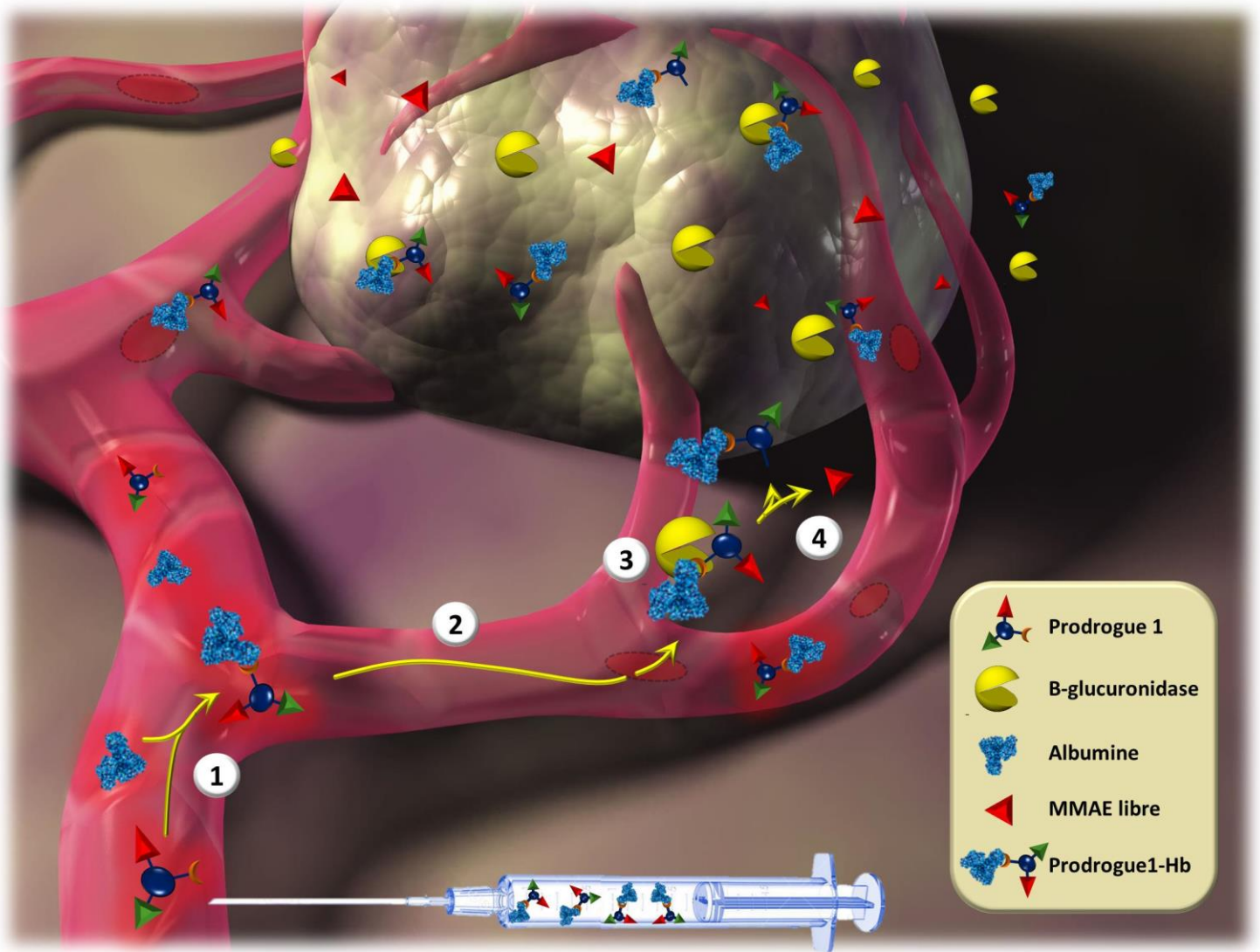


Figure 84 : Mécanisme de libération de la prodrogue 1. Etape 1 : Couplage *in vivo* à l'albumine plasmatique (liaison covalente) après administration IV. **Etape 2 :** Dissémination sanguine jusqu'à la tumeur via l'albumine. **Etape 3 :** Clivage par la β -glucuronidase présente dans le microenvironnement tumoral. **Etape 4 :** libération de la MMAE sous sa forme active (CIPA 2016).

2.2.1.2.2. Prodrogue 2

La prodrogue 2 est un équivalent structural de la Prodrogue 1, mais qui n'a pas la capacité de se lier de manière covalente à l'albumine (Figure 85). Le transport de cette molécule via l'albumine se fait de manière passive. Le mécanisme de libération reste identique, à savoir une libération de la MMAE sous sa forme active après clivage du glucuronide par la β -glucuronidase présente dans le microenvironnement tumoral.

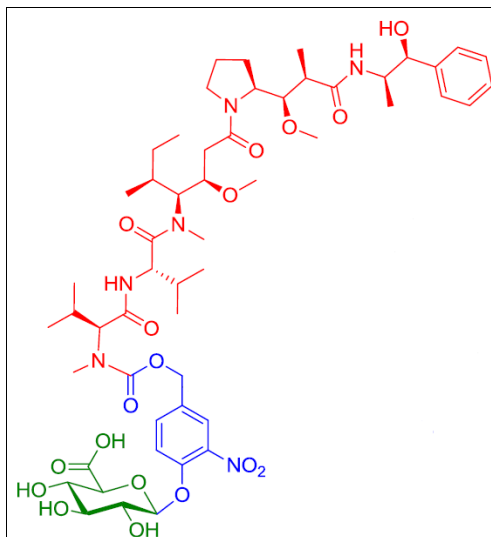


Figure 85 : Structure chimique de la prodrogue 2 (d'après [320]).

2.2.1.2.3. Prodrogue 3

La Prodrogue 3 qui est un « cheval de Troie » moléculaire a d'abord été étudié *in vitro* et *in vivo* par l'équipe de S. Papot, dans des modèles de leucémies humaines chez la souris immunodéprimée, en se basant sur des molécules antitumorales de référence. La chimiothérapie utilisée était la doxorubicine (inhibiteur de topoisomérases), avec un couplage à l'acide folique comme ligand de ciblage. Le vecteur ainsi formé a démontré un effet cytotoxique *in vitro* et sur des tumeurs sous-cutanées *in vivo*. Sur la base de ces résultats encourageants, les chimistes ont souhaité tester l'effet de ce « Cheval de Troie » moléculaire *in vivo*, dans un nouveau modèle de cancer.

La Prodrogue 3 présente un nouveau système de distribution d'un principe actif, qui combine la sélectivité d'un ligand de bas poids moléculaire ayant une affinité tumorale et un déclencheur enzymatique, en une seule entité.

L'IC2MP a récemment développé un système pour cibler les tumeurs par la MMAE, en utilisant la vitamine B9 (acide folique). Dans cette approche, la molécule active est transportée dans l'organisme sous une forme non toxique avec un vecteur capable de reconnaître une tumeur spécifiquement.

Pour éviter de perdre l'activité de l'agent antitumoral avant qu'il n'atteigne sa cible, il est nécessaire de contrôler la libération de cet agent dans la cellule tumorale. Créé avec quatre unités séparées comprenant un agent anticancéreux, un ligand de l'acide folique, un déclencheur enzymatique, articulé autour d'un segment de liaison, le système de ciblage est programmé pour : détecter le récepteur membranaire de la vitamine B9

exprimé à la surface des cellules malignes, pénétrer de manière sélective comme un « Cheval de Troie » moléculaire, puis déclencher la libération d'espèces actives grâce à l'action d'une enzyme, la β -galactosidase (Figure 86&87).

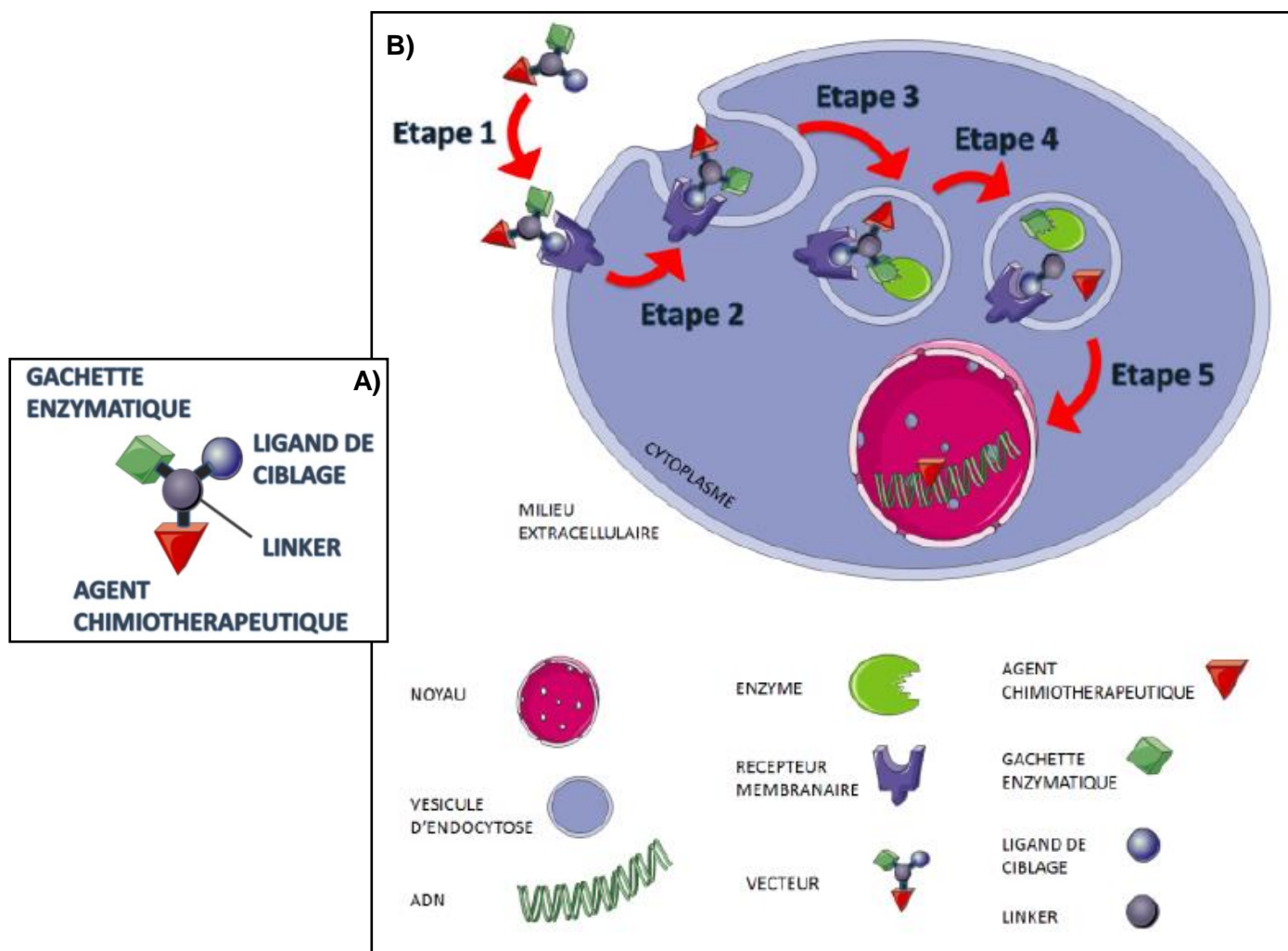


Figure 86 : Mécanisme de libération de la prodrogue 3. **A)** Représentation schématique du vecteur : en bleu le ligand de ciblage, en vert la gâchette enzymatique et en rouge l'agent chimiothérapeutique. **B)** Principe du ciblage tumoral. Etape 1 : interaction ligand de ciblage/récepteur. Etape 2 et 3 : endocytose. Etape 4 : libération de la drogue par réaction d'une enzyme intracellulaire avec la gâchette enzymatique. Etape 5 : translocation de la drogue activée dans le noyau pour bloquer l'activité de l'ADN (IC2MP 2013).

Ainsi, le couplage de la MMAE ne peut affecter les cellules saines. Une fois la tumeur détectée, un processus de libération de la MMAE est déclenché pour régénérer sélectivement son activité biologique dans la tumeur. Le récepteur à l'acide folique (FR) est un marqueur de surface cellulaire surexprimé dans plusieurs types de cancer ^[321]. En revanche, ces FR sont présents en quantité basse ou indétectable dans la plupart des tissus normaux ^[319]. Cette caractéristique unique des cellules malignes a été exploitée

avec l'aide des médicaments folates-conjugués pour cibler des agents cytotoxiques puissants au site de la tumeur. La β -galactosidase intracellulaire a été choisie comme l'enzyme déclenchant cette libération compte tenu de son niveau indétectable dans le milieu extracellulaire. L'activité catalytique de la β -galactosidase, en effet, permet à un grand nombre de systèmes ciblés de libérer une quantité suffisante d'agent anticancéreux pour éliminer également les cellules tumorales voisines [316].

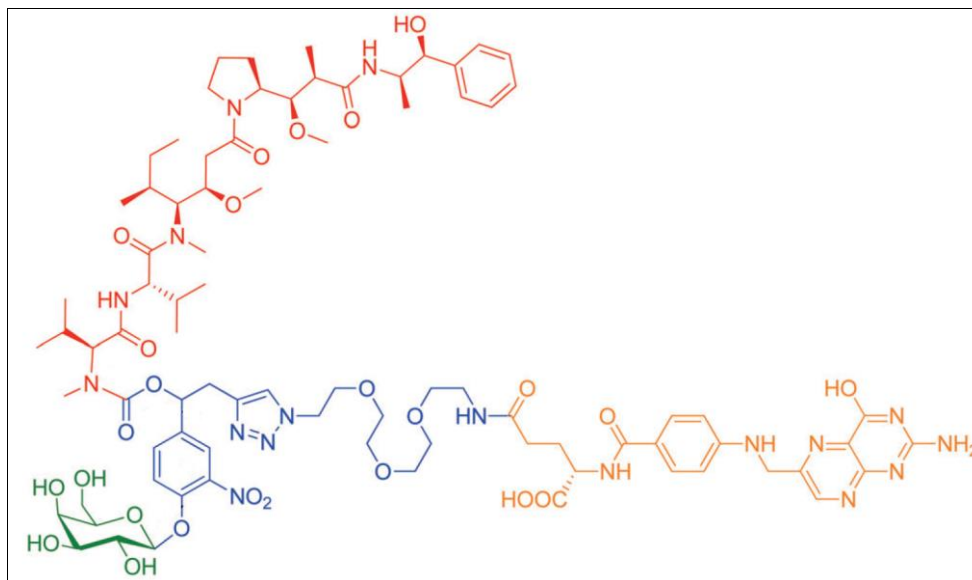


Figure 87 : Structure chimique de la prodrogue 3 (d'après [319]).

2.2.2. Comparaison de l'activité des différentes constructions moléculaires d'un nouveau concept de chimiothérapies

Le modèle KB que nous avons choisi d'utiliser est issu d'un carcinome épidermoïde humain. Ce modèle a déjà été utilisé par l'équipe du professeur S. Papot, afin d'évaluer l'efficacité de la Prodrogue 3, une construction moléculaire visant à libérer la MMAE à l'intérieur des cellules après ciblage du récepteur de l'acide folique et action de la β -galactosidase lysosomale [316]. Il nous permet donc de disposer de données antérieures servant de références. Le but de ce protocole était de comparer l'activité de différentes constructions moléculaires libérant de la MMAE en mesurant les volumes tumoraux par échographie. Cette étude avait également pour but de doser la présence de MMAE au niveau tumoral par une méthode de spectrométrie de masse, afin de sélectionner la Prodrogue la plus prometteuse du point de vue mécanistique.

2.2.2.1. Imagerie de l'activité des différentes formes moléculaires

2.2.2.1.1. Matériel et Méthodes

Culture cellulaire :

Les cellules KB ont été obtenues auprès de l'ATCC (Etats-Unis). Les cellules parentales (non Luc) ont été isolées en 1955 chez un patient atteint d'un carcinome épidermoïde de la bouche. Elles ont été cultivées conformément aux instructions du fournisseur. Cette lignée a été transfectée afin d'exprimer la luciférase (Equipe de J. Clarhaut, Poitiers).

Animaux :

Des souris saines femelles âgées de 6 semaines, de lignée Balb/C nude ont été obtenues auprès de Charles River (France). Les animaux ont été hébergés selon les conditions décrites en 1.3.1.1. Pour ce protocole, 5 groupes de 8 animaux ont été constitués : un groupe traité par la Prodrogue 1 à 2mg/kg, un groupe traité par la Prodrogue 2 à 1,18mg/kg, un groupe traité par la Prodrogue 3 à 1,9mg/kg, un groupe traité par la MMAE libre à 0,5mg/kg et un groupe témoin (mélange constitué de DMSO et PBS (5% / 95%)).

Procédure d'induction des tumeurs :

Le modèle de carcinome épithélial KB humain, est couramment utilisé aussi bien par les laboratoires académiques qu'industriels. Il s'agit d'un modèle reproductible de tumeurs caractéristique de la tête et du cou.

Les cellules KB ont été injectées en sous-cutanée, au niveau du dos des souris (10^6 cellules / 150 μ L d'un mélange PBS/Matrigel (50%/50%)) (Corning laboratory, Etats-Unis), aiguille 27G, seringue 0,5ml) sur animal anesthésié à l'isoflurane (2% dans l'air).

L'avantage d'utiliser un modèle tumoral sous-cutané est de pouvoir réaliser les xénogreffes de manière reproductible, et de faciliter leur suivi par imagerie échographique *in vivo*.

Constitution des groupes :

Afin de constituer des groupes les plus homogènes possibles, les souris ont été réparties uniformément en fonction des volumes tumoraux mesurés par échographie le premier jour du traitement, afin de réduire la variabilité interindividuelle.

Protocole :

Les souris ont reçu le premier traitement 14 jours après les implantations tumorales. Les injections IV ont été effectuées une fois par semaine pendant 5 semaines avec des doses de 2 mg/kg de Prodrogue 1, de 1,18mg/kg de Prodrogue 2, de 1,19mg/kg de Prodrogue 3, de 0,5mg/kg de MMAE libre et d'un mélange constitué de DMSO et PBS (5% / 95%) pour

le groupe véhicule.

Afin de pouvoir comparer les activités des différents composés et les quantités de MMAE libérées au niveau des tumeurs, les posologies ont été déterminées afin d'administrer les Prodrogues à une dose relativement faible : 0,77mg/kg en équivalent MMAE. Ainsi, tous les traitements par les prodrogues qui ont des masses moléculaires différentes sont donc comparables, car la même quantité de MMAE est injectée aux animaux.

Imagerie :

Pour l'imagerie de bioluminescence, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.4.1.1.

Pour l'imagerie échographique, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.3.1.1.

Afin de pouvoir évaluer l'efficacité des traitements, nous avons réalisé :

- Une imagerie échographique 2 fois par semaine pour réaliser la mesure longitudinale du volume tumoral.

Sacrifice et prélèvement des organes :

Les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale sous anesthésie, et les tumeurs ont été prélevées chez chaque animal pour des mesures *ex vivo* réalisées *a posteriori* par l'équipe de S. Papot.

Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad, San Diego, Etats-Unis). Une ANOVA à deux facteurs, suivie par un post-test de Bonferroni a été utilisée pour les données longitudinales. Les différences ont été considérées significatives lorsque $p < 0,05$.

2.2.2.1.2. Résultats

Nous avons observé un ralentissement de la croissance tumorale pour le groupe ayant reçu la Prodrogue 1 par rapport aux autres groupes. Par contre, nous n'avons pas observé de diminution des volumes tumoraux pour ce groupe.

Nous n'avons pas non plus noté de différences dans la cinétique de croissance tumorale des autres groupes. Les volumes tumoraux n'ont fait que croître tout au long de l'étude (Figure 88).

Ainsi, les résultats montrent des différences significatives dans les volumes tumoraux mesurés entre les groupes traités par la Prodrogue 1 par rapport aux groupes traités par les Prodrogues 2 & 3, la MMAE libre et le véhicule ($p < 0,0001$ à J35).

Concernant le suivi du poids des souris, il n'a pas été montré de différences significatives de poids dans les 5 groupes (Figure 89). En outre, aucune des souris ayant reçu la molécule de MMAE n'a montré de perte de poids supérieure à 20% au cours de l'étude. Nous pouvons donc estimer que le traitement n'a pas été toxique. Effectivement, toutes les souris ont supporté le traitement sans montrer de signes particuliers de détresse et de souffrance, et il n'y a eu aucun décès tout au long du suivi.

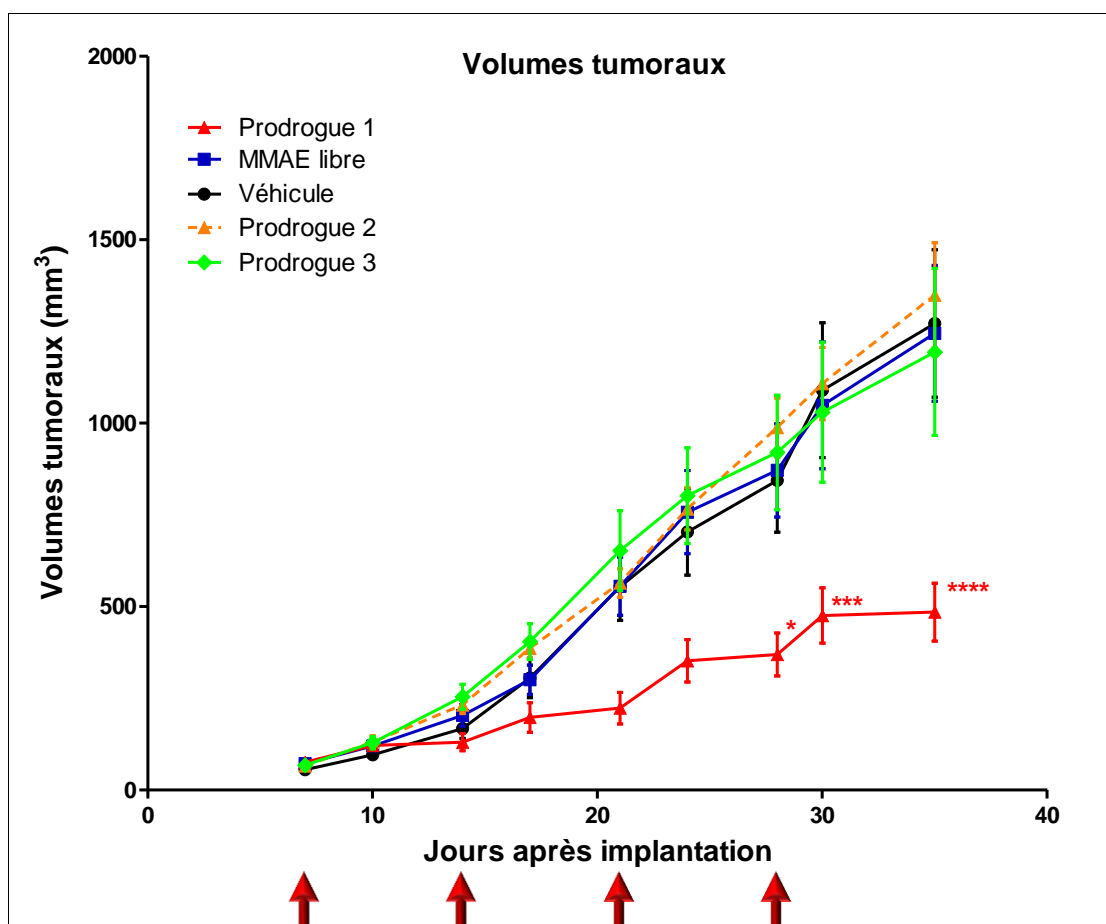


Figure 88 : Evolution du volume des tumeurs KB au cours du temps. Les flèches rouges représentent les traitements par Prodrogue 1 : 2mg/kg, Prodrogue 2 : 1,18mg/kg, Prodrogue 3 : 1,9mg/kg, MMAE libre : 0,5mg/kg et par le Véhicule. (n=8 animaux par groupes).

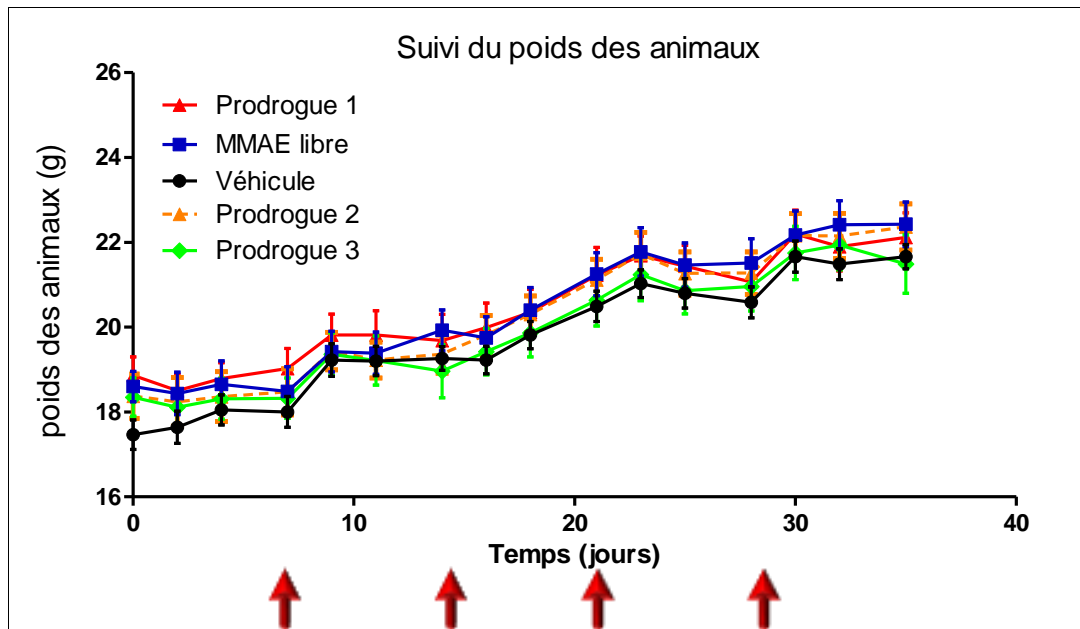


Figure 89 : Suivi des poids des animaux au cours des traitements.

L'étude de la survie n'a pas montré de différences significatives entre les groupes traités (Figure 90). Suite à l'apparition de zones nécrotiques sur les tumeurs chez certains animaux, ces derniers ont dû être mis à mort lorsque les points limites ont été atteints (points limites qui ne correspondait pas forcément à la taille de la tumeur).

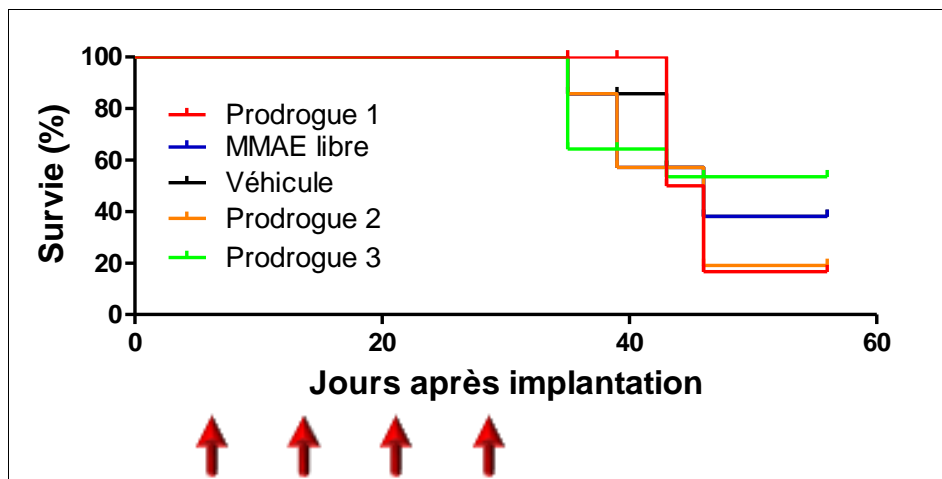


Figure 90 : Courbe de survie des animaux porteurs de tumeurs KB au cours des traitements.

La Figure 91 représente l'évolution des volumes tumoraux entre J7 et J35, pour les différents groupes. On observe une tendance nette de réduction de la vitesse de croissance tumorale pour le groupe traité par la Prodrogue 1, comparé aux autres groupes.

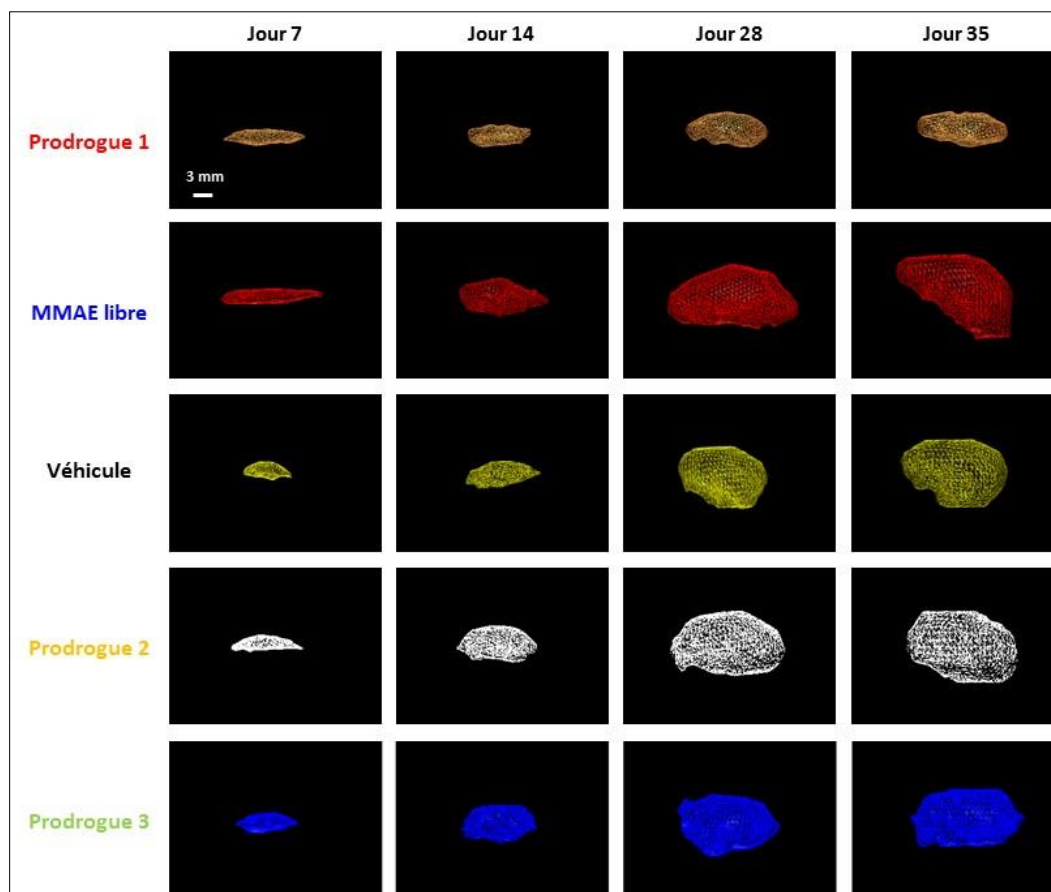


Figure 91 : Représentation de l'évolution du volume des tumeurs KB mesurée par échographie 3D au cours du temps (CIPA 2016).

Dans cette étude, nous avons également constitué des lots « satellites », qui n'ont reçu que 2 traitements, puis qui ont été mis à mort. Les tumeurs prélevées ont été récupérées, puis congelées dans de l'azote liquide. Elles ont ensuite été broyées et digérées par de la trypsine, pour une analyse par spectrométrie de masse (HPLC suivie d'une HRMS) visant à doser la quantité de MMAE présente à l'intérieur des tumeurs soit réalisée. Ces travaux ont été réalisés à l'IC2MP de Poitiers par P. Poinot.

Les résultats de cette analyse sont présentés en Figure 92 et ont permis de confirmer que la Prodrogue 1 est bien le composé qui permet de libérer la plus grande quantité de MMAE au site tumoral. Les différences avec les autres groupes traités sont significatives. De plus, on observe que la Prodrogue 2, qui ne se lie pas à l'albumine, permet une libération de MMAE intratumorale plus importante que le cheval de Troie (Prodrogue 3). Ces résultats d'analyse par spectrométrie sont bien corrélés avec les résultats d'efficacité des différentes prodrogues.

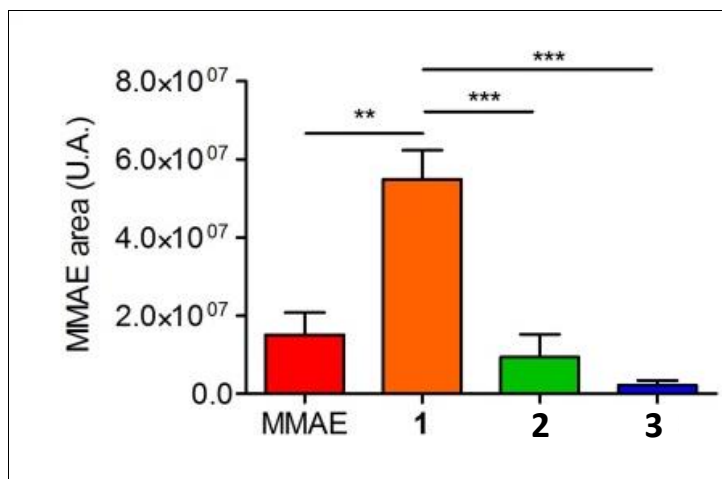


Figure 92 : Quantités relatives de MMAE mesurées par spectrométrie de masse à J21 dans les tumeurs KB chez les souris traitées par 2 injections (J7 et J14) de MMAE libre, de Prodrogue 1, de Prodrogue 2 et de Prodrogue 3 (0,77mg/kg/injection d'équivalent MMAE) (IC2MP-E5 2016).

2.2.2.2. Imagerie multimodale

Nous avons évalué différents paramètres tumoraux, anatomiques et fonctionnels, au cours du traitement par la prodrogue d'intérêt (Prodrogue 1), démontrant ainsi l'avantage d'une approche d'imagerie multimodale.

2.2.2.2.1. Matériel et Méthodes

Culture cellulaire, animaux et modèle tumoral :

Le modèle de tumeurs sous-cutanées KB a été détaillé en 2.2.2.1.1. Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1.

Constitution des groupes :

Afin de constituer des groupes les plus homogènes possibles, les souris ont été réparties uniformément en fonction des volumes tumoraux mesurés par échographie le premier jour du traitement, afin de réduire la variabilité interindividuelle.

Protocole :

Pour ce protocole, 2 groupes de 4 animaux ont été constitués : un groupe traité par la Prodrogue 1 à 2mg/kg et un groupe véhicule (mélange constitué de DMSO et PBS (5% / 95%)). Les souris ont reçu le premier traitement 13 jours après les implantations tumorales. Les injections IV ont été effectuées une fois par semaine pendant 4 semaines.

Imagerie :

Pour l'imagerie de bioluminescence, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.4.1.1.

Afin de pouvoir évaluer l'efficacité des traitements, nous avons réalisé :

- Une imagerie par échographie 1 fois par semaine.
- Une imagerie photoacoustique OxyHemo 1 fois par semaine.
- Une imagerie de bioluminescence 1 fois par semaine.
- Une imagerie d'échographie de contraste non-ciblé le dernier jour de l'étude (J32).

Quantification de l'imagerie de contraste non ciblée :

Il est possible de quantifier de nombreux paramètres grâce à l'imagerie de contraste. Pour cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à 2 paramètres, qui sont le « Wash-in Rate » (WiR) et le « Peak Enhancement » (PE). Le WiR correspond à la pente de la tangente à la courbe correspondante au signal échographique mesuré lors du processus d'arrivée des microbulles dans la ROI, donnant une information sur la vitesse d'arrivée des microbulles au niveau tumoral (Figure 93). Le PE correspond à la hauteur du pic de signal échographique maximal observé après l'injection des microbulles, reflétant la quantité maximale de microbulles qui étaient présentes au niveau tumoral à l'instant t (Figure 93).

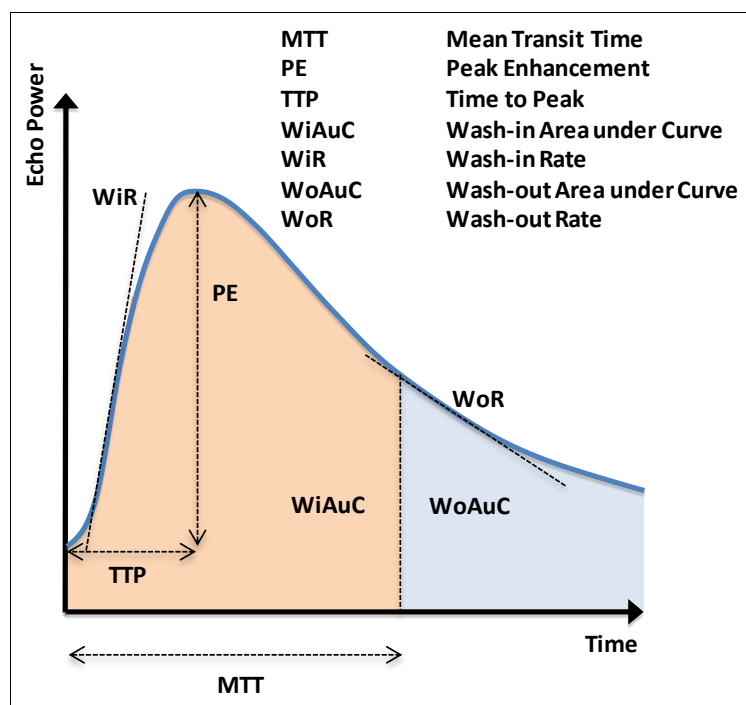


Figure 93 : Détail des principaux paramètres mesurables en échographie de contraste non ciblé (d'après [322]).

Mise à mort des animaux :

Les animaux sous anesthésie ont été mis à mort par dislocation cervicale (comme recommandé par les procédures éthiques) et les tumeurs ont été prélevées pour des analyses *ex vivo* réalisées *a posteriori* par l'équipe de S. Papot.

Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad, San Diego, Etats-Unis). Une ANOVA à deux facteurs, suivie par un post-test de Bonferroni a été utilisée pour les données longitudinales. Les différences ont été considérées significatives lorsque $p < 0,05$. Un test de student non-apparié a été utilisé pour les comparaisons de données ponctuelles. Les différences ont été considérées significatives lorsque $p < 0,05$.

2.2.2.2. Résultats

Evaluation de paramètres tumoraux au cours du traitement (modèle KB)

Dans ce modèle de tumeurs sous-cutanées de tumeurs de la tête et du cou, sélectionné à cause de son fort potentiel hypoxique, nous avons constaté des différences significatives dans les croissances tumorales du groupe traité par la Prodrogue 1 comparé au groupe témoin (Figure 94A). Concernant les signaux de BLI du groupe témoin, nous avons observé des diminutions d'intensité du signal très importantes dues à l'hypoxie (Figure 94B), tandis que les tumeurs grossissaient toujours. Nous avons également évalué l'oxygénation de ces tumeurs au cours du traitement par PA, de manière longitudinale. Nous avons remarqué que l'oxygénation des tumeurs du groupe traité était maintenue de manière significative ($p < 0,05$) comparée à une décroissance considérable de la SO_2 pour les tumeurs du groupe témoin. Dans le but de confirmer nos résultats de PA, nous avons réalisé une imagerie de contraste non-ciblé par échographie (Figure 94D). Pour les deux paramètres mesurés, le WiR et le PE, nous avons confirmé une différence significative du statut perfusionnel entre ces deux groupes ($p < 0,05$). En Figure 94G, nous pouvons observer les MIP (Maximum Intensity Projection) des imageries de contraste 30 secondes après injection IV des MB. Le manque de vascularisation pour le groupe témoin semblerait être à l'origine de l'hypoxie de ces tumeurs. Au contraire, nous avons montré une vascularisation maintenue pour les tumeurs du groupe traité. En Figure 94F est présenté un comparatif de l'oxygénation entre deux tumeurs représentatives de chacun des deux groupes, montrant l'apparition de zones hypoxiques bien plus importantes pour les tumeurs du groupe témoin associées à une décroissance de la SO_2 en 3D (de 42% à 12%

pour un stade plus tardif pour la tumeur présentée). En comparaison, l'hypoxie pour le groupe traité est certes présente, mais bien moins développée avec une décroissance de la SO₂ en 3D moins spectaculaire (de 30% à 22% pour un stade plus tardif).

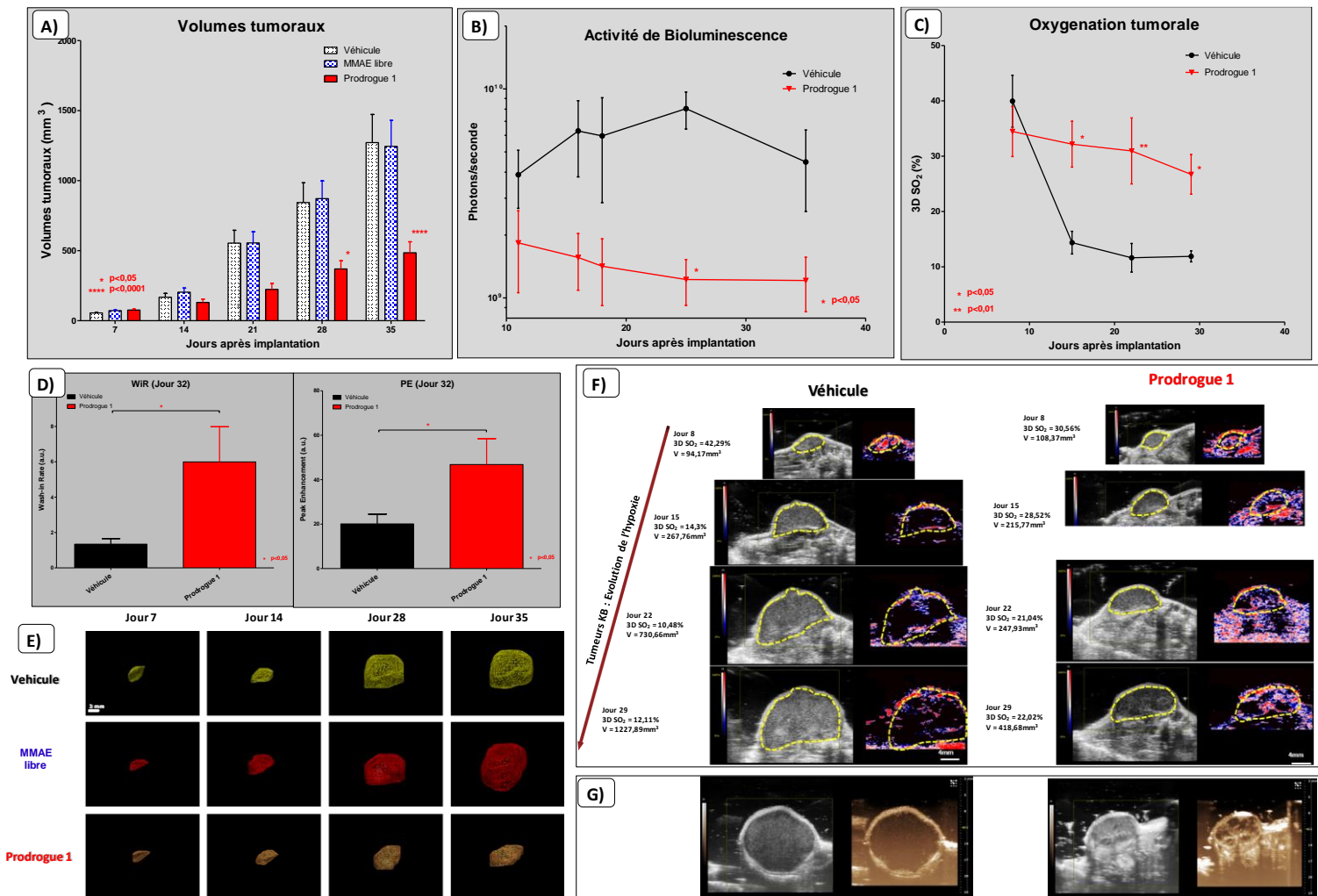


Figure 94 : Imagerie multimodale sur le modèle de tumeurs sous-cutanée tête et cou KB. **A)** Quantification et comparaison des volumes tumoraux du groupe traité par la Prodrogue 1 par rapport aux groupes traités par la MMAE libre et le groupe Véhicule. **B)** Quantification et comparaison des signaux de bioluminescence du groupe traité par la Prodrogue 1 par rapport au groupe Véhicule. **C)** Quantification et comparaison de la SO₂ tumorale 3D du groupe traité par la Prodrogue 1 comparé au groupe Véhicule. Les résultats représentent les moyennes \pm ESM (n=4 animaux par groupes). Les résultats ont été analysés par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test de Bonferroni. Les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$). **D)** Quantification et comparaison du Wash in Rate (WiR) et du Peak Enhancement (PE) du groupe traité par la Prodrogue 1 comparé au groupe Véhicule. L'analyse statistique a été réalisée avec un test t de Student non-apparié (n=4 animaux par groupes) (** $p < 0,05$). **E)** Représentation de l'évolution des volumes tumoraux mesurés par échographie 3D. **F)** Images photoacoustiques représentatives de l'apparition de l'hypoxie en fonction du volume tumoral pour le groupe Véhicule et traité par la prodrogue 1. **G)** Maximum Intensity Projection (MIP) des imageries de contraste non-ciblées correspondantes, 30 secondes après l'injection IV des microbulles à J32 (CIPA 2016).

2.2.3. Détermination de la dose maximale tolérée - DMT

Avant de réaliser les tests d'efficacité *in vivo* sur des animaux porteurs de tumeurs, il a été

tout d'abord nécessaire de déterminer la Dose Maximale Tolérée (DMT) de la MMAE libre, de la Prodrogue 1 sur souris saines et sur souris porteuses de tumeurs. Le mécanisme de libération de la Prodrogue 1 étant lié à la présence d'une enzyme présente dans le proche environnement tumoral, il était nécessaire d'évaluer la DMT de ce composé sur souris saines mais également dans un modèle de souris porteuses de tumeurs (pour qui le potentiel de libération de MMAE sous sa forme active doit être bien plus important que sur la souris non pathologique, et donc avec un risque de toxicité augmenté).

2.2.3.1. MMAE libre

La détermination de la DMT de la MMAE sous sa forme libre a été réalisée chez la souris Balb/c Nude saine. L'utilisation de ces animaux a été nécessaire afin de déterminer à quelle posologie de MMAE les souris devaient être traitées.

L'observation clinique attentive est essentielle, notamment dans les minutes qui suivent l'administration du produit, afin de détecter une toxicité aiguë, mais également de façon quotidienne. L'aspect général (qualité de la peau, état de l'abdomen, signes de douleurs) a été observé. La présence d'œdème, d'une perte de poids, d'une coloration anormale des muqueuses ont été surveillés. Le comportement de l'animal, à savoir la posture, la locomotion, l'éveil, l'hyper/hyporéactivité, la paralysie, les convulsions et les tremblements, ont également été surveillés, de même que la respiration, les urines et fèces (aspect, couleur, pelage péri-anal) et la tolérance locale au site d'injection.

La bonne connaissance de l'état clinique normal de la souche de souris utilisée nous a permis d'observer précisément et d'interpréter rigoureusement les signes cliniques de toxicité.

Si les souris en étaient venues à présenter des signes de souffrance, les animaux auraient été mis à mort.

Protocole :

D'après des données de la littérature, nous avons sélectionné 4 doses de MMAE libre à tester, allant de 0,25 à 1mg/kg. Chacun des groupes était constitué de 2 souris. Les animaux ont reçu chacun une administration unique IV de MMAE libre à t0.

Résultats :

Les deux animaux des groupes traités à 0,75 et 1 mg/kg ont dus être mis à mort pour cause de mauvais état général (Figure 95). En revanche, les animaux traités à 0,25 et 0,5

mg/kg ont bien supporté les traitements après avoir subi une légère perte de poids transitoire (Figure 96).

Nous avons donc décidé de traiter les animaux faisant partie des groupes contrôles positifs avec une posologie de 0,5mg/kg.

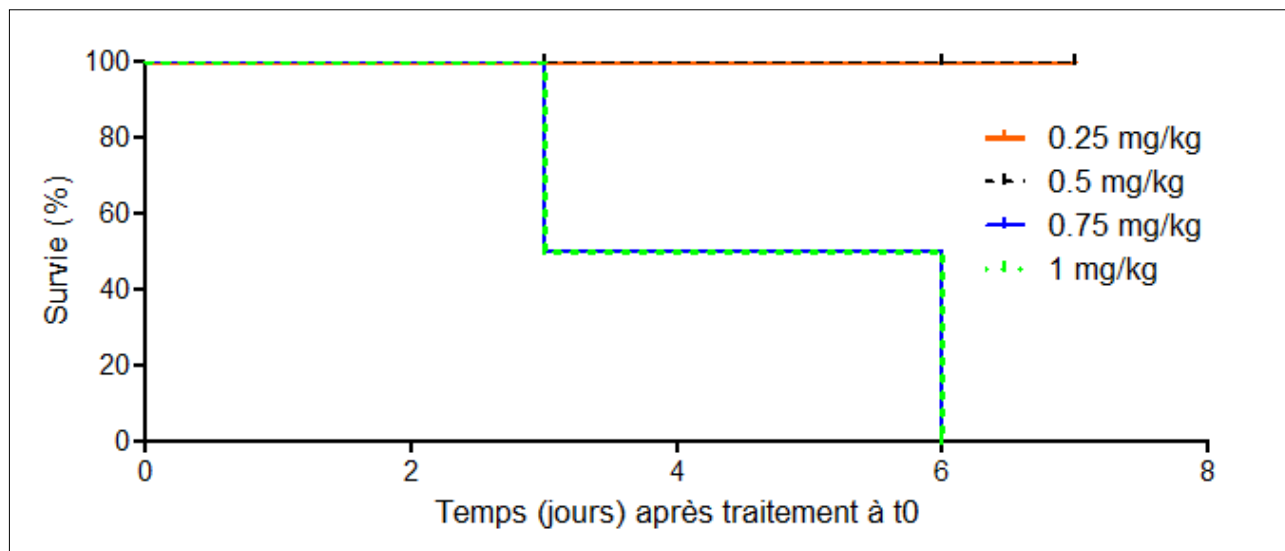


Figure 95 : Courbe de survie des animaux au cours de la DMT de la MMAE libre. Les groupes d'animaux ont été traités avec 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 mg/kg de MMAE libre.

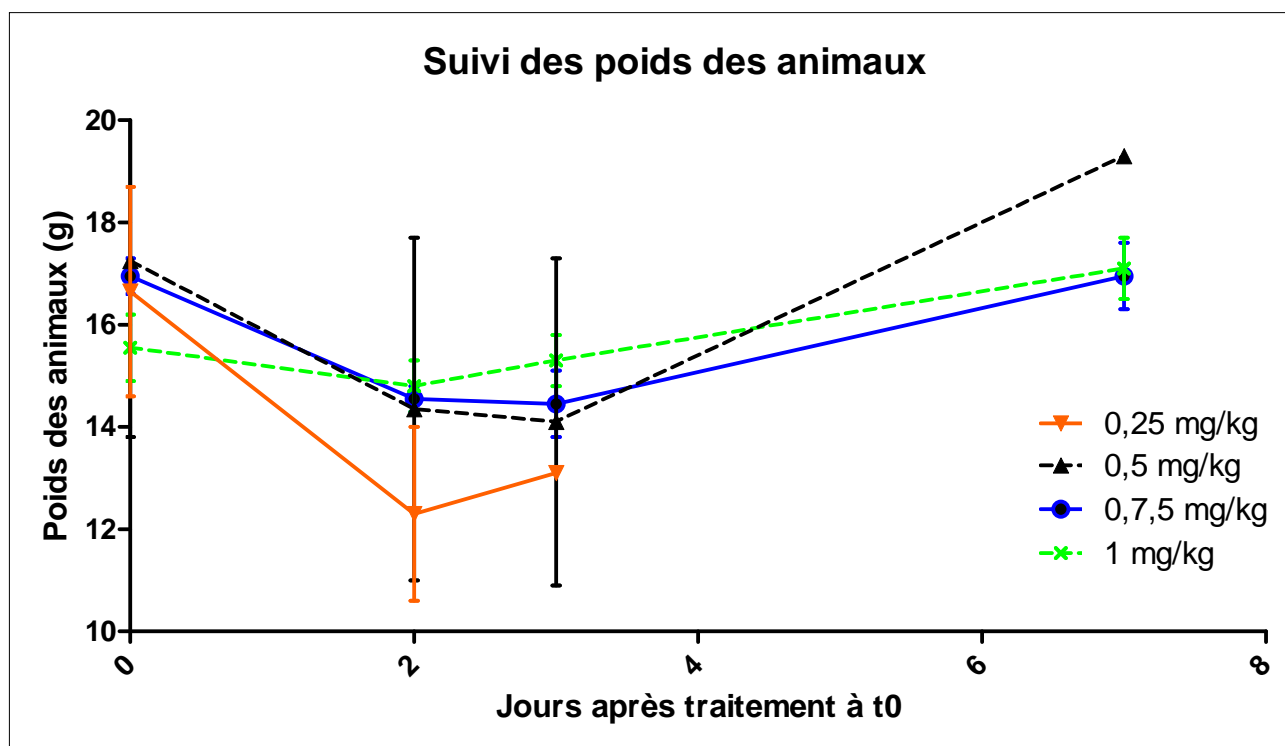


Figure 96 : Suivi des poids des animaux au cours de la DMT de la MMAE libre.

2.2.3.2. Prodrogue 1 - Souris saines

La détermination de DMT de la Prodrogue 1 a d'abord été réalisée chez la souris Swiss Nude saine.

Protocole :

Nous avons déterminé 10 doses de Prodrogue 1 à tester, allant de 0,2 à 10mg/kg. Chacun des groupes était constitué de 2 souris. Les animaux ont reçu chacun une administration unique IV de Prodrogue 1.

Résultats :

Les deux animaux du groupe traité à 10 mg/kg ont dû être mis à mort (Figure 97). Les animaux ayant reçu la dose de 7,5mg/kg ont perdu du poids sur la fin de l'étude et leur état clinique était dégradé (Figure 98). En revanche, les animaux traités à 0,2 à 5 mg/kg ont bien supporté les traitements.

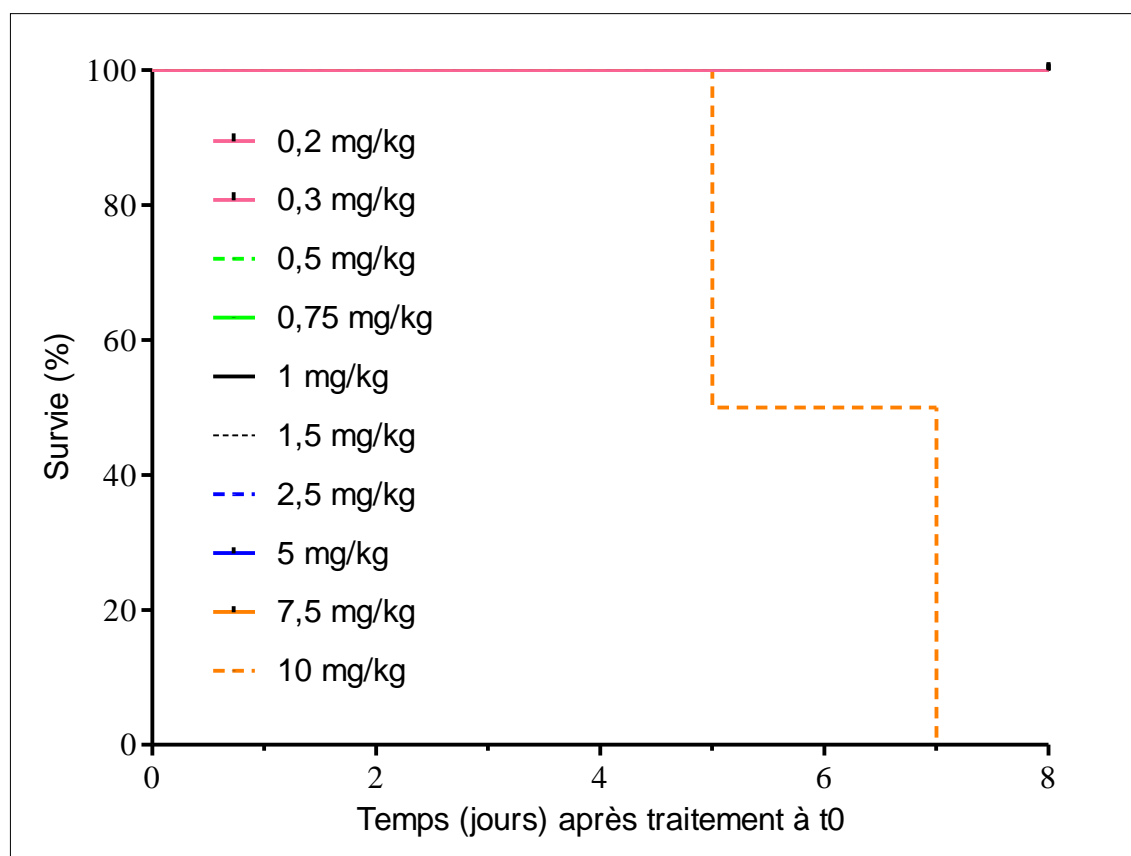


Figure 97 : Courbe de survie des animaux au cours de la DMT de la Prodrogue 1. Les groupes d'animaux ont été traités avec 0,2 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 mg/kg de Prodrogue 1.

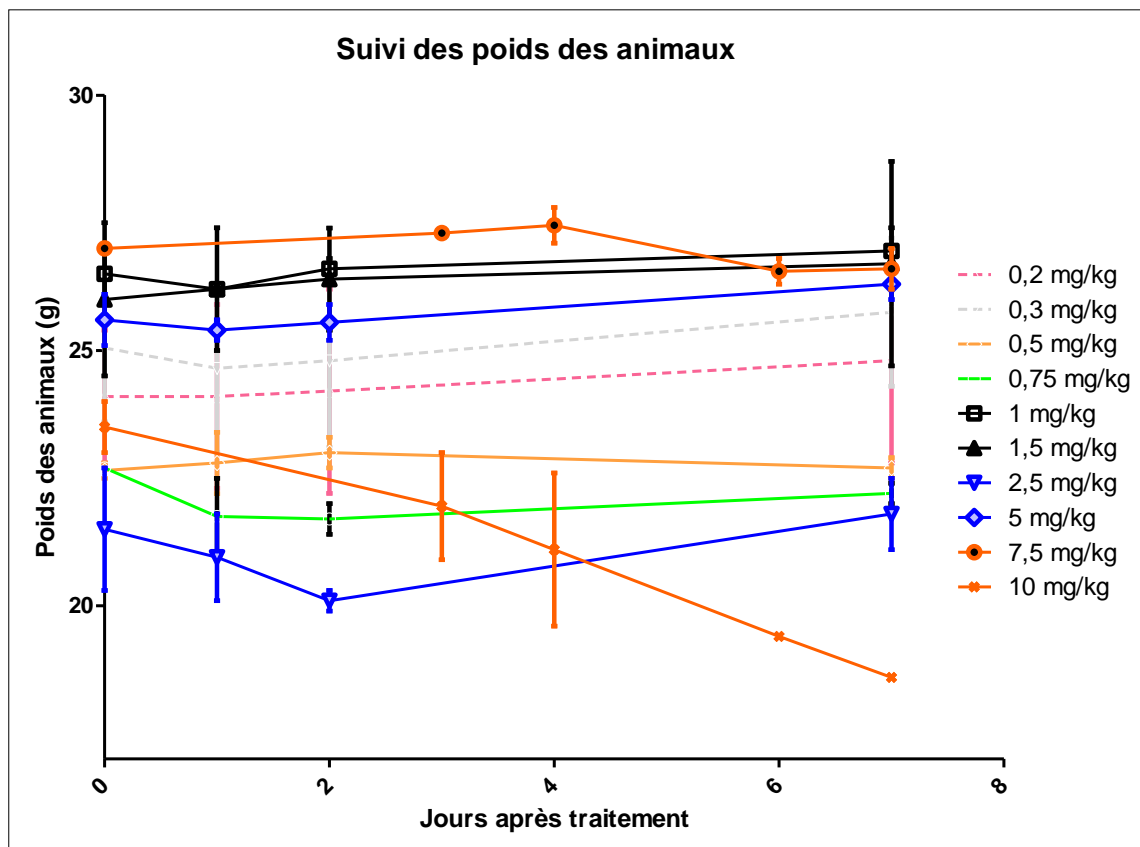


Figure 98 : Suivi des poids des animaux au cours de la DMT de la prodrogue 1.

2.2.3.3. Prodrogue 1 - Souris porteuses de tumeurs

La détermination de DMT de la Prodrogue 1 a ensuite été réalisée chez la souris Swiss Nude porteuse de tumeurs orthotopiques Mia-PaCa2. En effet, il a été nécessaire de valider la DMT sur des souris porteuses de tumeurs. L'expression de β -glucuronidase étant potentiellement bien plus importante chez un animal porteur de tumeur, il a fallu vérifier que la toxicité du composé n'était pas exacerbée à cause d'une libération plus importante de MMAE libre au niveau local et systémique et donc une toxicité générale plus importante.

Protocole :

En fonction des résultats de DMT obtenus sur la souris saine, nous avons déterminé 2 doses de Prodrogue 1 à tester.

Nous avons ainsi constitué 2 groupes de 2 souris afin de tester la DMT. Les doses sélectionnées étaient de 2,5 et 5mg/kg. Les animaux ont reçu 3 injections IV de Prodrogue 1 à J0, J7 et J14.

Résultats :

Un des 2 animaux du groupe traité à 5 mg/kg a dû être mis à mort (Figure 99). L'autre animal a subi une perte de poids non négligeable (Figure 100). En revanche, les animaux traités à 2,5mg/kg ont bien supporté les traitements. Ces résultats confirment qu'en présence d'une tumeur, la Prodrogue 1 s'avère plus toxique.

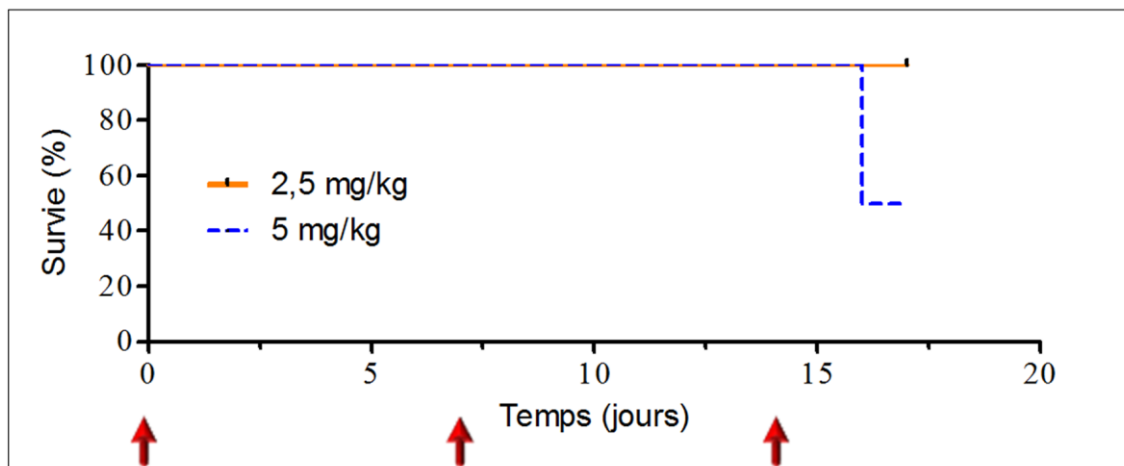


Figure 99 : Courbe de survie des animaux porteurs de tumeurs pancréatiques au cours de la DMT de la Prodrogue 1. Les groupes d'animaux ont été traités avec 2,5 ou 5 mg/kg de Prodrogue 1 à J0, J7 et J14.

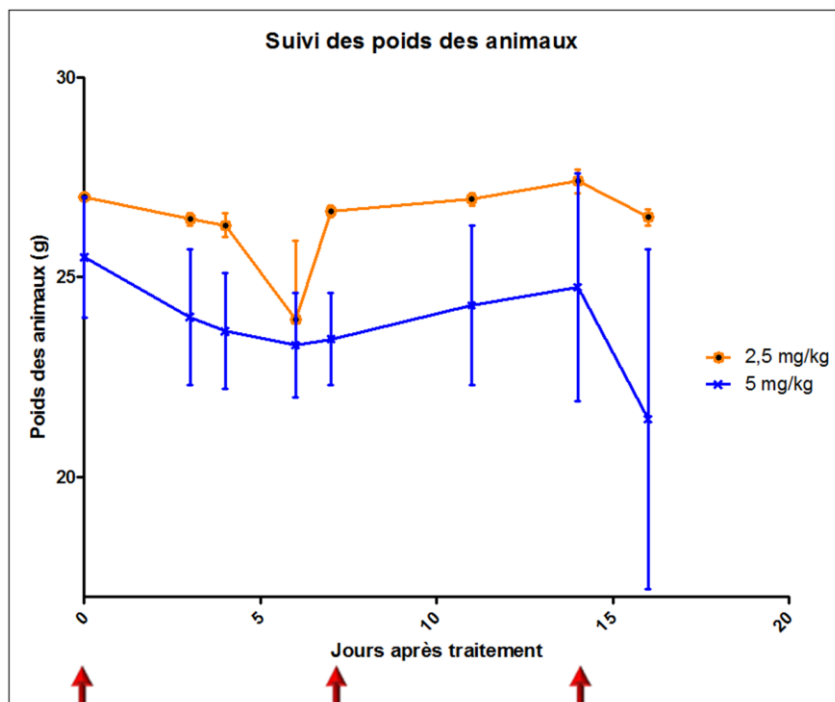


Figure 100 : Suivi des poids des animaux au cours de la DMT de la prodrogue 1.

Au cours de cette étude de DMT, nous avons mesuré les volumes tumoraux par échographie chez les souris avant et après les 3 traitements, et nous avons constaté que les volumes tumoraux étaient réduits de façon spectaculaire. Les souris ayant reçu des

doses de 5 mg/kg ont perdu 80% de leur volume tumoral initial, alors que les souris qui ont reçu une dose de 2,5 mg/kg ont perdu respectivement 70% et 20% du volume de la tumeur (Figure 101). Cependant, avec la dose de 5 mg/kg, une souris a dû être euthanasiée à cause d'une perte importante de poids en raison de la toxicité de la chimiothérapie. Par conséquent, les doses choisies pour les études d'efficacité ont ensuite été de 4 mg/kg et 2 mg/kg.

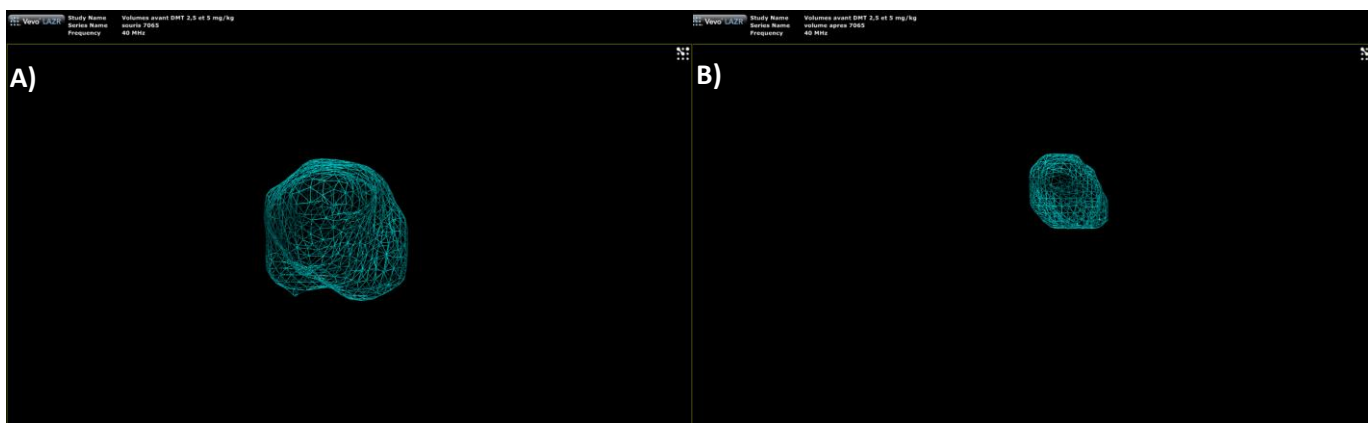


Figure 101 : Représentation de l'évolution du volume des tumeurs MiaPaCa2 mesurée par échographie 3D au cours du temps. A) Représentation en 3D d'une tumeur pancréatique avant le traitement par Prodrogue 1 ($V_{\text{initial}}=368.1\text{mm}^3$). **B)** Tumeur pancréatique chez la même souris après 3 injections de 5 mg/kg de prodrogue 1, acquises au cours de la validation de DMT ($V_{\text{final}}=56,4\text{mm}^3$) (CIPA 2016).

2.2.4. Etudes d'efficacité de la Prodrogue 1

L'objectif de ces travaux était de mettre en œuvre une approche par imagerie multimodale afin d'évaluer l'efficacité de la Prodrogue 1 [320,323] dans 3 modèles expérimentaux de cancer pour lesquels le besoin de nouvelles thérapeutiques est important. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux effets thérapeutiques du composé sur des modèles de tumeurs superficielles et plus profondes. Nous avons ensuite utilisé la plateforme intégrée d'imagerie multimodale dans le but d'apporter des informations essentielles sur de nombreux paramètres spécifiques de croissance tumorale.

2.2.4.1. Modèle de tumeurs pancréatiques humaines à un stade précoce

2.2.4.1.1. Matériel et Méthodes

Culture cellulaire, animaux et modèle tumoral :

Le modèle de tumeurs orthotopiques pancréatiques Mia-PaCa2 a été détaillé en 1.4.3.1. Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1. Nous avons constitué pour cette étude 4 groupes de 6 animaux chacun.

Constitution des groupes :

Afin de constituer des groupes les plus homogènes possibles, les souris ont été réparties uniformément en fonction des volumes tumoraux mesurés par échographie le premier jour du traitement, afin de réduire la variabilité interindividuelle.

Protocole :

Les souris ont reçu le premier traitement 7 jours après les greffes tumorales. Les injections IV ont été effectuées une fois par semaine pendant 3 semaines avec des doses de 2 mg/kg pour la Prodrogue 1, de 0,3mg/kg pour la MMAE libre et d'un mélange constitué de DMSO et PBS (5% / 95%) pour le groupe véhicule. Pour les traitements effectués par la Prodrogue 1 à 4mg/kg, les animaux ont reçu les injections IV une fois par semaine pendant 2 semaines.

Imagerie :

Pour l'imagerie de bioluminescence, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.4.1.1.

Pour l'imagerie échographique, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.3.1.1.

Afin de pouvoir évaluer l'efficacité des traitements, nous avons réalisé :

- Une imagerie échographique 3D, 3 fois par semaine*, pour réaliser la mesure longitudinale du volume tumoral.
- Une imagerie de bioluminescence 3 fois par semaine* pour mesurer la prolifération tumorale.

*Les imageries de bioluminescence et échographiques ont été effectuées le même jour, avec un intervalle de 6 heures environ entre les deux imageries pour chacun des animaux.

Sacrifice et prélèvement des organes :

Les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale sous anesthésie, et les tumeurs ont été prélevées chez chaque animal pour des mesures *ex vivo* réalisées *a posteriori* par l'équipe de S. Papot.

Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad, San Diego, Etats-Unis). Une ANOVA (ANalysis Of Variance) à deux facteurs, suivie par un post-test de Bonferroni a été utilisée pour les données longitudinales. Les différences ont été considérées significatives lorsque $p < 0,05$.

2.2.4.1.2. Résultats

Imagerie de l'efficacité :

Nous avons observé une diminution considérable des volumes tumoraux pour les deux groupes traités par 2 et 4 mg/kg de Prodrogue 1 comparativement aux groupes témoins. Concernant le groupe traité à 4mg/kg, nous avons observé une disparition tumorale complète pour 2 animaux sur 6.

Nous avons également noté une légère stagnation des volumes tumoraux chez le groupe traité par la MMAE libre, mais les tumeurs ont ensuite échappé au traitement et les volumes ont continué d'augmenter. En revanche, pour le groupe qui a reçu le véhicule, les volumes tumoraux n'ont fait que croître tout au long de l'étude (Figure 102).

Pour la première partie de l'étude, les résultats montrent bien des différences significatives dans les volumes tumoraux mesurés entre les groupes traités par la Prodrogue 1 et MMAE libre par rapport au groupe véhicule ($p < 0,0001$ à J28).

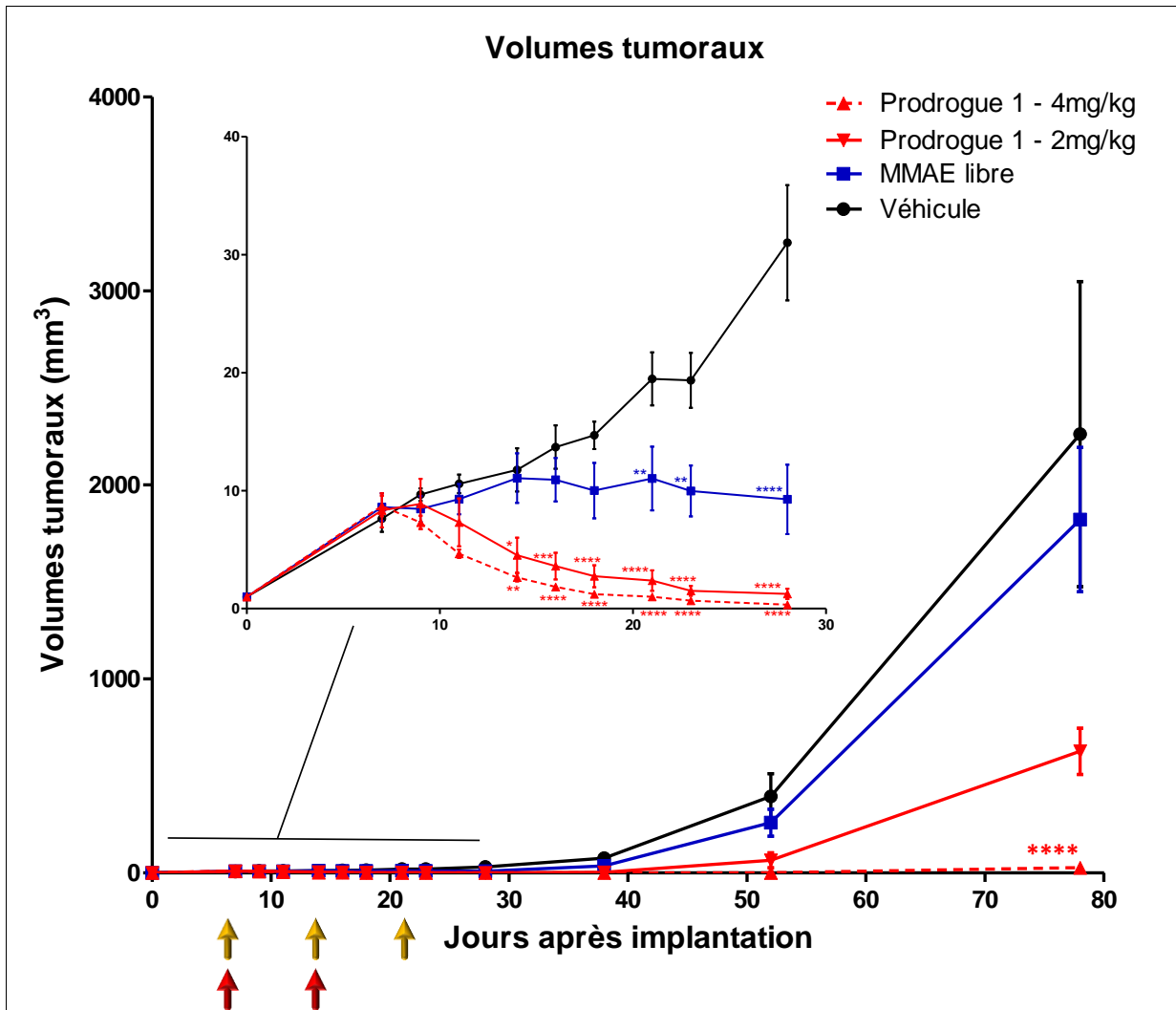


Figure 102 : Evolution du volume des tumeurs MiaPaCa2 au cours du temps. Les flèches jaunes représentent les traitements par Prodrogue 1 - 2mg/kg, MMAE libre et Véhicule. Les flèches rouges représentent les traitements par Prodrogue 1 - 4mg/kg. (n=6 animaux par groupes) (*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001).

Comme présenté en Figure 103, la répartition des volumes tumoraux à J78 montre bien la différence d'efficacité de la Prodrogue 1 par rapport à la MMAE libre et le groupe véhicule. En outre, nous observons que la répartition des volumes tumoraux chez les groupes traités par la Prodrogue 1 est très groupée.

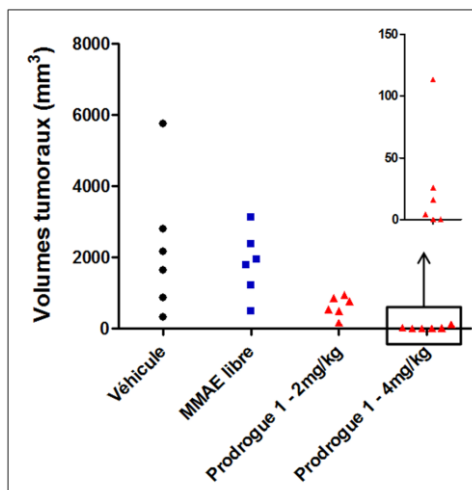


Figure 103 : Répartition des volumes tumoraux en fonction des traitements à J78 (n=6 animaux par groupe).

La Figure 104 représente l'évolution des volumes tumoraux entre J7 et J38, pour les différents groupes. Pour les groupes témoin et traité par la MMAE seule, il y a un développement tumoral rapide, avec des tumeurs ayant parfois doublé, voire triplé de volume. Par contre, pour les groupes traités à 2 et 4 g/kg, il est pratiquement devenu impossible de retrouver les tumeurs au sein du pancréas, tant la diminution de volume a été importante. A la fin de cette étude, soit 71 jours après la dernière administration du traitement, il n'a pas été observé de récurrence de croissance tumorale chez environ 30% des souris traitées à 4 mg/kg, ce qui tend à montrer que la chimiothérapie aurait éradiqué totalement la tumeur. En revanche, nous avons pu observer une tendance à la reprise du développement tumoral pour 60% des autres souris chez lesquelles la régression tumorale n'avait été que partielle.

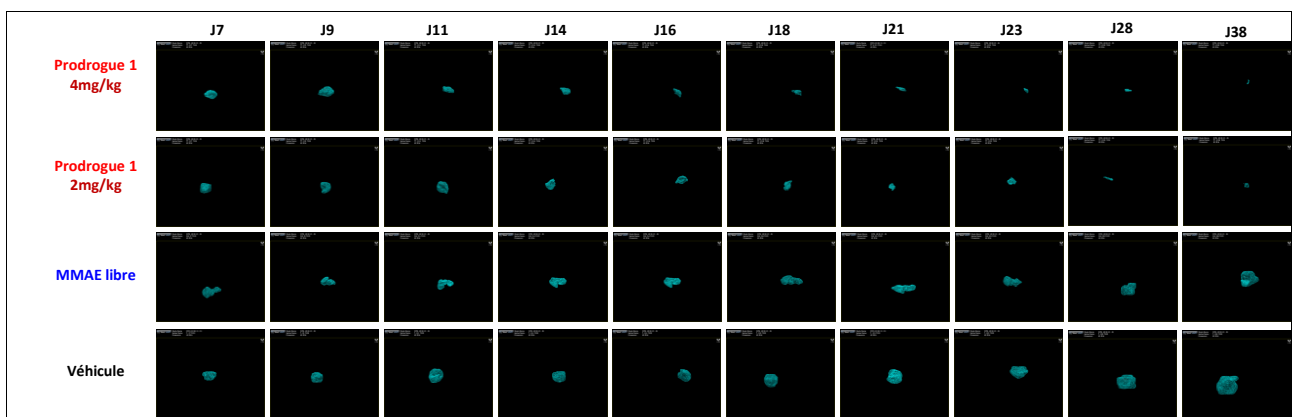


Figure 104 : Représentation de l'évolution du volume des tumeurs MiaPaCa2 mesuré par échographie 3D au cours du temps (CIPA 2016).

Concernant le suivi du poids des souris, il n'a pas été montré de différences significatives de poids dans les 4 groupes (Figure 105). Cependant, nous pouvons observer qu'aucune des souris ayant reçu la molécule de MMAE n'a montré de perte de poids supérieure à 20% au cours de l'étude. Nous pouvons donc légitimement supposer que le traitement n'a pas été toxique. Effectivement, toutes les souris ont supporté le traitement sans montrer de signes particuliers de détresse et de souffrance, et il n'y a eu aucun décès tout au long du suivi.

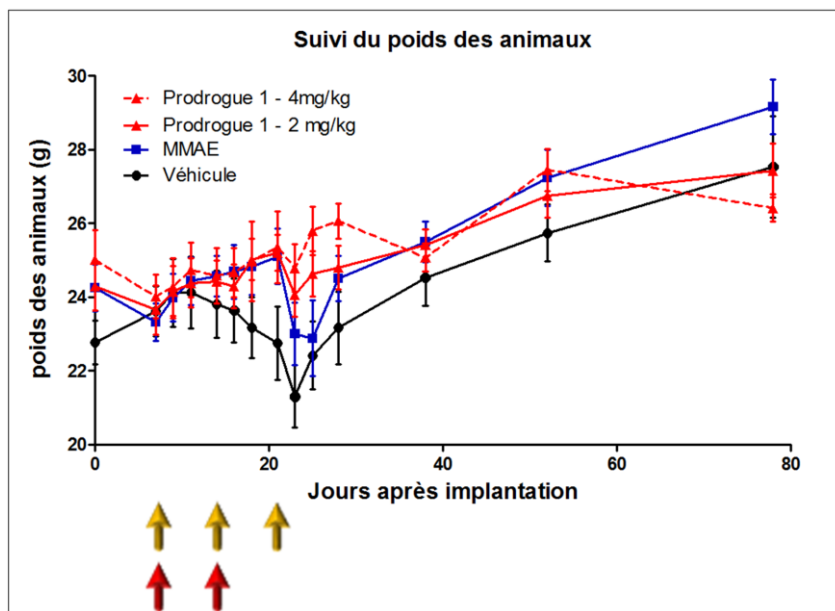


Figure 105 : Suivi des poids des animaux au cours des traitements.

Imagerie multimodale :

Dans ce modèle, nous avons observé des perturbations des signaux BLI plus importantes dues à la présence d'hypoxie. Les résultats d'échographie 3D ont montré une décroissance des volumes tumoraux chez le groupe traité par la Prodrogue 1 (Figure 106A). De plus, la Figure 106C montre que la décroissance des signaux de BLI correspond à la diminution des volumes tumoraux. En revanche, l'évolution des signaux de BLI ne correspondaient pas à celle des mesures en échographie, à savoir une diminution de la bioluminescence associée à une croissance des volumes tumoraux pour les groupes contrôles (Figure 106B&D). Nous avons remarqué ces perturbations dès le jour 20 pour les groupes contrôles. Les écarts types pour les BLI étaient eux aussi importants, démontrant la grande variabilité des mesures BLI par rapport aux mesures échographiques. Pour ce modèle, nous avons également mesuré et caractérisé l'apparition de l'hypoxie au cours du temps par PA, démontrant la présence de régions hypoxiques au niveau du centre des tumeurs à un stade plutôt précoce (Figure 106E). Ces régions hypoxiques devenaient de plus en plus importantes au cours du temps, par rapport aux volumes tumoraux. Une procédure d'immuno-histologie au pimonidazole a également permis de valider la présence d'hypoxie au niveau du cœur tumoral (Figure 106F).

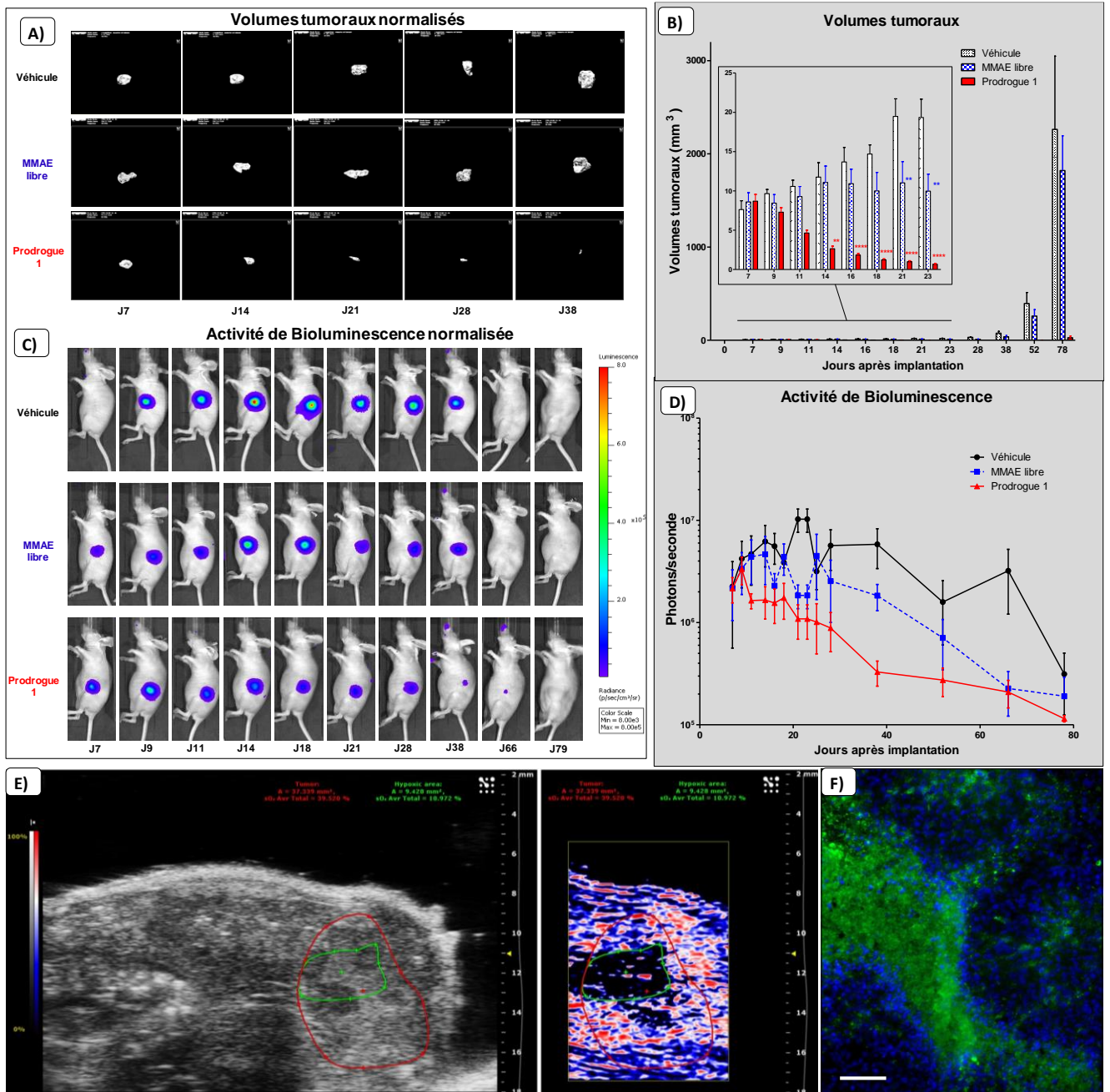


Figure 106 : Imagerie multimodale sur le modèle de tumeurs orthotopiques pancréatiques MiaPaCa2. A) Représentation de l'évolution des volumes tumoraux mesurés par échographie 3D. **B)** Quantification et comparaison des volumes tumoraux du groupe traité par la Prodrogue 1 comparé au groupe traité par la MMAE libre et le groupe Véhicule. Les résultats représentent les moyennes \pm ESM (n=6 animaux par groupes). **C)** Signaux de bioluminescence représentatifs correspondants. **D)** Quantification et comparaison des signaux de bioluminescence du groupe traité par la Prodrogue 1 comparé aux groupes traités par la MMAE libre et le Véhicule. Les résultats ont été analysés par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test de Bonferroni. Les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$. (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$). **E)** Image photoacoustique représentative de l'hypoxie apparaissant au cœur de la tumeur. **F)** Immuno-histologie du pimonidazole sur une coupe tumorale. La coloration verte représente les adduits de pimonidazole (FITC), la coloration bleue correspondant aux noyaux cellulaires (DAPI) (CIPA 2016).

Ces résultats de preuve de concept ont été obtenus sur des tumeurs ayant un volume de départ relativement faible (de l'ordre d'une dizaine de mm^3). Ce volume n'étant pas représentatif de la situation clinique, les investigations suivantes ont eu pour but d'évaluer

l'efficacité de cette thérapie sur des tumeurs à un stade plus avancé, où la composante hypoxique serait un frein majeur à une efficacité optimale. Cette étude de prédictibilité dans une démarche de recherche a donc été conçue pour refléter au maximum la situation pathologique clinique, à savoir une tumeur volumineuse (découverte tardive) donc possédant une composante hypoxique et une résistance aux traitements par chimiothérapie conventionnelle.

2.2.4.2. Modèle de tumeurs pancréatiques humaines à un stade avancé

Le pronostic si sombre du cancer du pancréas est dû au fait que les tumeurs sont majoritairement décelées à des stades très tardifs, avec des volumes tumoraux importants. Cette découverte tardive des tumeurs ne permet pas de réaliser un traitement et une prise en charge optimale, car elles sont devenues résistantes aux chimiothérapies et à la radiothérapie. Les tumeurs développées et volumineuses voient leurs caractéristiques changer, à savoir une apparition d'hypoxie tumorale. Cette hypoxie tumorale, est en majorité due à la perturbation dans la vascularisation de la tumeur, et de ce fait, l'oxygène n'y est apporté qu'en très faible quantité et les chimiothérapies ne sont pas délivrées de manière optimale dans la totalité du volume tumoral.

C'est pourquoi il est primordial de pouvoir évaluer l'effet de la Prodrogue 1 sur des tumeurs ayant un volume conséquent, où l'hypoxie tumorale et les perturbations de la vascularisation y sont importantes.

Effectivement, les « guidelines » internationaux concernant les tumeurs orthotopiques autorisent le développement tumoral chez l'animal tant qu'aucune perturbation physiologique (perte de poids rapide >20%, respiration difficile, splénomégalie, paralysie du train arrière, distorsion abdominale significative, incontinence ou diarrhée pendant une période >24H, perturbation de la locomotion, perturbation comportementale, charge tumorale supérieure à 10% du poids de l'animal, diamètre tumoral moyen excédant 1,5cm) ne sont observées. De plus notre connaissance du modèle nous permet d'affirmer que des tumeurs de 2500 à 3500mm³ n'engendrent pas de perturbations comme évoquées ci-dessus (la charge tumorale pour des tumeurs de cette taille étant inférieure à 10% du poids de l'animal). Ce sont ces considérations qui nous ont conduit à mener cette deuxième série d'évaluation de traitement des tumeurs de stade avancé.

L'imagerie échographique nous a ainsi permis de suivre régulièrement les volumes tumoraux afin de débiter les traitements au moment le plus opportun (dès que les tumeurs des animaux constituant le groupe atteignaient un volume compris entre 2500 et

3500mm³).

De plus cette procédure expérimentale n'a pas été une étude de routine, mais une validation ponctuelle de l'efficacité d'un composé, dans des conditions reflétant au maximum la situation pathologique clinique. Le suivi des animaux a été plus poussé et tout signe de détresse et de douleur a été évalué avec le plus grand soin, quotidiennement.

2.2.4.2.1. Matériel et méthodes

Culture cellulaire, animaux et modèle tumoral :

Le modèle de tumeurs orthotopiques pancréatiques Mia-PaCa2 a été détaillé en 1.4.3.1. Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1. Pour ce protocole, seulement 2 groupes de 6 animaux ont été constitués : un groupe traité par la Prodrogue 1 à 4mg/kg et un groupe véhicule (mélange constitué de DMSO et PBS (5% / 95%)).

Constitution des groupes :

Afin de constituer des groupes les plus homogènes possibles, les souris ont été réparties uniformément en fonction des volumes tumoraux mesurés par échographie le premier jour du traitement, afin de réduire la variabilité interindividuelle.

Protocole :

Les souris ont reçu le premier traitement après que les tumeurs eurent atteint une taille suffisamment importante pour que l'hypoxie soit très développée (statuts caractérisés par imagerie photoacoustique en mode OxyHemo). Les injections IV ont été effectuées une fois par semaine pendant 9 semaines avec des doses de 4 mg/kg de Prodrogue 1, et d'un mélange constitué de DMSO et PBS (5% / 95%) pour le groupe témoin.

Imagerie :

Pour l'imagerie de bioluminescence, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.4.1.1.

Pour l'imagerie échographique, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.3.1.1.

Afin d'évaluer l'efficacité des traitements, nous avons réalisé :

- Une imagerie échographique 1 fois par semaine pour réaliser la mesure longitudinale du volume tumoral.

Sacrifice et prélèvement des organes :

Les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale sous anesthésie, et les tumeurs ont été prélevées chez chaque animal pour des mesures *ex vivo* réalisées *a posteriori* par l'équipe de S. Papot.

Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad, San Diego, Etats-Unis). Une ANOVA à deux facteurs, suivie par un post-test de Bonferroni a été utilisée pour les données longitudinales. Les différences ont été considérées significatives lorsque $p < 0,05$.

2.2.4.2.2. Résultats

Imagerie de l'efficacité :

Concernant l'efficacité antitumorale de la Prodrogue 1, comparativement au groupe témoin, nous avons observé une diminution spectaculaire des volumes tumoraux mesurés par échographie 3D pour le groupe traité par la Prodrogue 1 à 4 mg/kg. Les diminutions de volumes tumoraux associées ont été de 92 à 100% (Figure 107). Nous avons notamment observé une disparition tumorale complète pour 1 animal sur 5.

Concernant le groupe témoin, les animaux ont rapidement atteint les critères de points limites mis en place pour cette étude particulière, et l'effectif complet a dû être sacrifié 21 jours après le début des traitements.

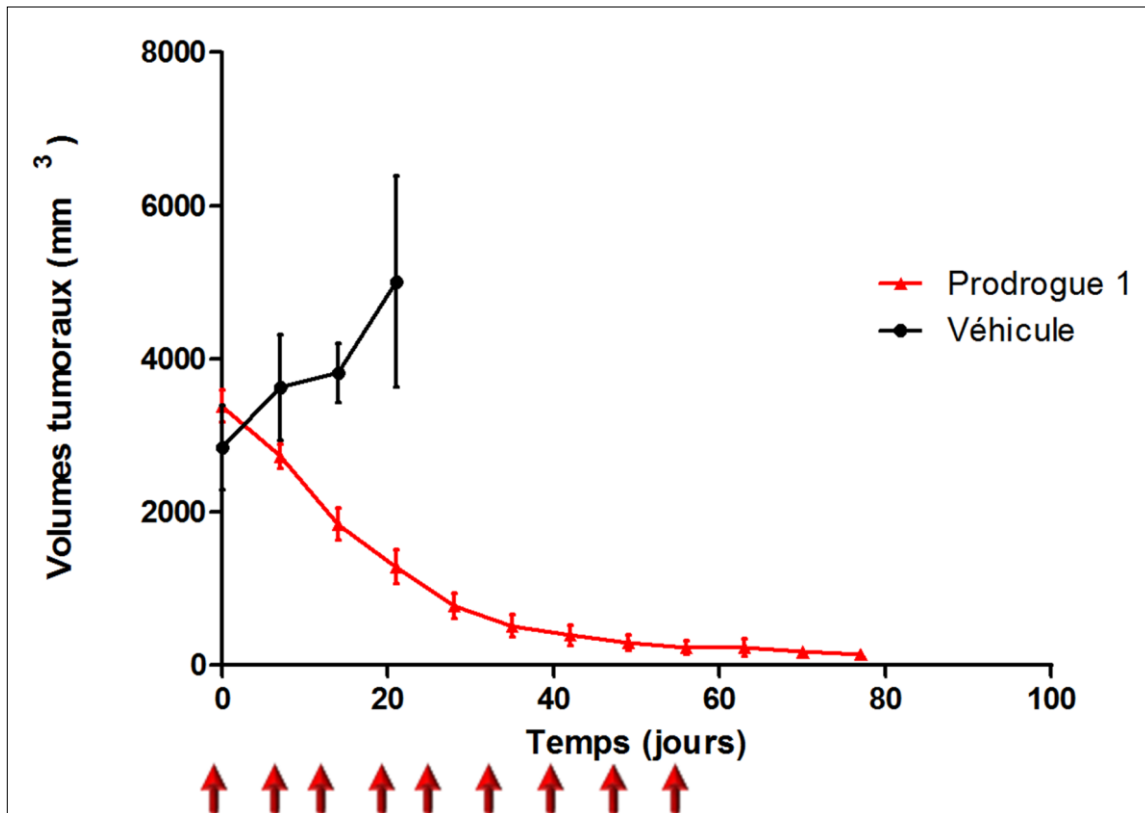


Figure 107 : Evolution du volume des tumeurs MiaPaCa2 au cours du temps. Les flèches rouges représentent les traitements par Prodrogue 1 - 4mg/kg et par le Véhicule. (n=6 animaux par groupes).

En Figure 108, nous observons la réduction de volume tumoral mesuré par échographie 3D, chez deux animaux représentatifs du groupe traité par la Prodrogue 1.

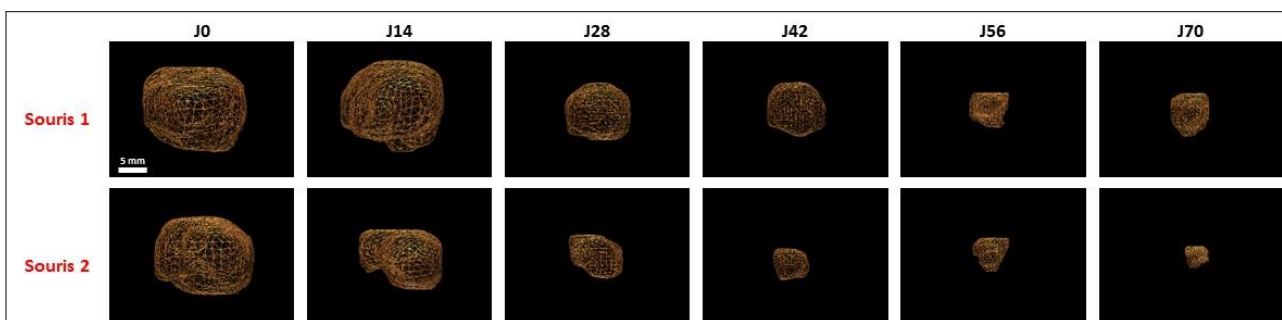


Figure 108 : Représentation de l'évolution du volume des tumeurs MiaPaCa2 mesurée par échographie 3D au cours du temps (CIPA 2016).

L'étude de la survie a montré une différence significative ($p < 0,01$) entre le groupe traité et le groupe témoin (Figure 109).

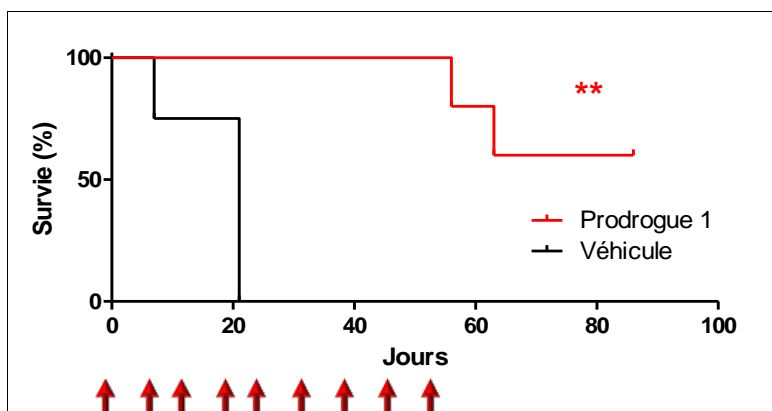


Figure 109 : Courbe de survie des animaux porteurs de tumeurs pancréatiques au cours des traitements. Les groupes d'animaux ont été traités avec la Prodrogue 1 - 4mg/kg ou par le Véhicule. ($p < 0,01$).

2.2.4.3. Modèle de tumeurs mammaires humaines

Le but de ce protocole d'étude d'efficacité de nouveaux composés thérapeutiques était d'évaluer l'impact de la Prodrogue 1 sur la croissance tumorale d'un modèle de cancer triple négatif de cancer du sein.

2.2.4.3.1. Matériel et méthodes

Culture cellulaire, animaux et modèle tumoral :

Le modèle de tumeurs orthotopiques mammaires MDA-MB-231 a été détaillé en 1.3.1.1. Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1. Pour ce protocole, 3 groupes de 6 animaux ont été constitués : un groupe traité par la Prodrogue 1 à 4mg/kg, un groupe traité par la MMAE libre à 0,5mg/kg et un groupe véhicule (mélange constitué de DMSO et PBS (5% / 95%)).

Constitution des groupes :

Afin de constituer des groupes les plus homogènes possibles, les souris ont été réparties uniformément en fonction des volumes tumoraux mesurés par échographie le premier jour du traitement, afin de réduire la variabilité interindividuelle.

Protocole :

Les souris ont reçu le premier traitement 14 jours après les implantations tumorales. Les injections IV ont été effectuées une fois par semaine pendant 5 semaines avec des doses de 4 mg/kg de Prodrogue 1, de 0,5mg/kg de MMAE libre et d'un mélange constitué de DMSO et PBS (5% / 95%) pour le groupe contrôle.

Imagerie :

Pour l'imagerie de bioluminescence, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.4.1.1.

Pour l'imagerie échographique, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.3.1.1. De plus, dans un contexte de recherche translationnelle, l'utilisation de l'échographie se justifie car il s'agit d'un des examens utilisés en complément de la mammographie pour le diagnostic différentiel des cancers du sein.

Afin de pouvoir évaluer l'efficacité des traitements, nous avons réalisé :

- Une imagerie échographique 3 fois par semaine* pour réaliser la mesure longitudinale du volume tumoral.
- Une imagerie de bioluminescence 3 fois par semaine* pour mesurer la prolifération tumorale.

*Les imageries de bioluminescence et échographiques ont été effectuées le même jour, avec un intervalle de 6 heures environ entre les deux imageries pour chacun des animaux.

Sacrifice et prélèvement des organes :

Les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale sous anesthésie, et les tumeurs ont été prélevées chez chaque animal pour des mesures *ex vivo* réalisées *a posteriori* par l'équipe de S. Papot.

Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad, San Diego, Etats-Unis). Une ANOVA à deux facteurs, suivie par un post-test de Bonferroni a été utilisée pour les données longitudinales. Les différences ont été considérées significatives lorsque $p < 0,05$.

2.2.4.3.2. Résultats

Imagerie de l'efficacité :

Concernant l'efficacité antitumorale de la Prodrogue 1 dans ce modèle de cancer mammaire, comparée aux groupes témoins, nous avons observé une diminution des

volumes tumoraux mesurés par échographie 3D pour le groupe traité par 4 mg/kg de Prodrogue 1 avec une disparition tumorale pour 3 animaux sur 6.

Une augmentation continue des volumes tumoraux a été observée chez le groupe traité par la MMAE libre et chez le groupe témoin (Figure 110).

Ces résultats montrent des différences significatives dans les volumes tumoraux mesurés entre les groupes traités par la Prodrogue 1 et MMAE libre par rapport au groupe contrôle ($p < 0,0001$ à J50).

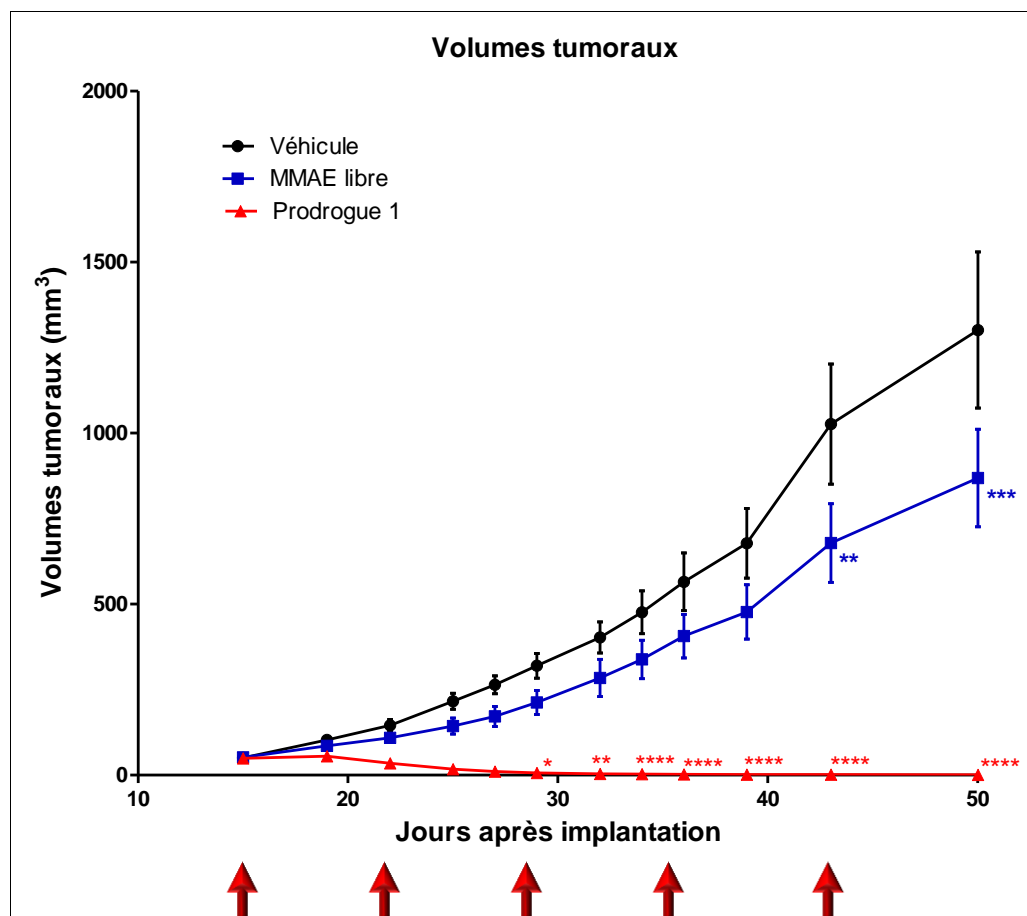


Figure 110 : Evolution du volume des tumeurs MDA-MB-231 au cours du temps. Les flèches rouges représentent les traitements par Prodrogue 1 - 4mg/kg et par le Véhicule. (n=6 animaux par groupes). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Comme présenté en Figure 111, la répartition des volumes tumoraux à J48 montre bien la différence d'efficacité de la Prodrogue 1 par rapport à la MMAE libre et le groupe contrôle. En outre, les volumes tumoraux chez les groupes traités par la Prodrogue 1 sont très proches puisqu'ils sont compris entre 0 et 3,2 mm³.

le traitement sans montrer de signes particuliers de détresse et de souffrance, et il n'y a eu aucun décès tout au long du suivi.

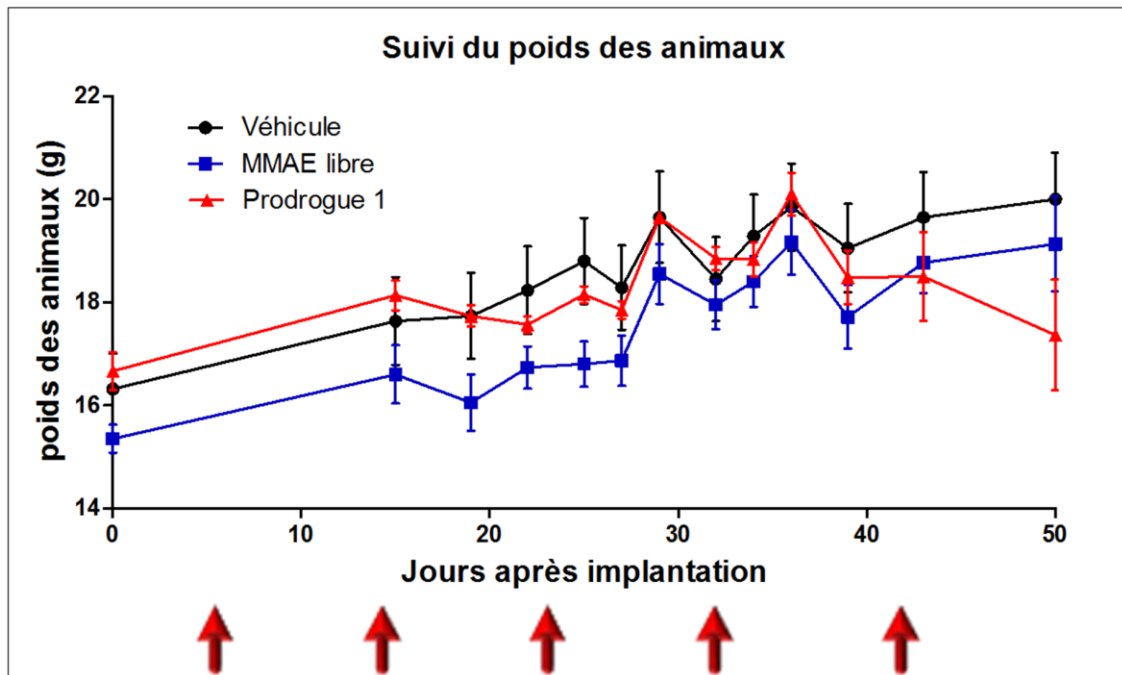


Figure 113 : Suivi des poids des animaux au cours des traitements.

Imagerie multimodale :

L'imagerie échographique 3D, nous a permis d'observer des diminutions de volumes tumoraux dans le groupe traité par la prodrogue 1 (Figure 114A). De plus, sur la Figure 114C, nous pouvons voir la correspondance des décroissances des signaux de BLI avec les décroissances des volumes tumoraux. Cependant, les signaux de BLI mesurés pour les groupes contrôles étaient perturbés (Figure 114D). Les écarts types des données de bioluminescence comparés à ceux calculés pour les données échographiques reflètent l'imprécision de la BLI dans ce modèle de cancer particulier. Nous avons noté un processus en deux phases (augmentation + diminution puis à nouveau augmentation + diminution) associé à une prolifération tumorale périphérique. Comme le montrent les images, les régions périphériques bien oxygénées/vascularisées des tumeurs présentent un fort signal BLI comparé aux régions centrales. Nous avons examiné l'apparition de l'hypoxie au cours du temps chez ces tumeurs par PA, démontrant l'apparition de régions hypoxiques au cœur des tumeurs associée à une diminution de la SO_2 en 3D (de 48% pour cette petite tumeur représentative montrée, à 36% pour un stade plus tardif) (Figure 114E).

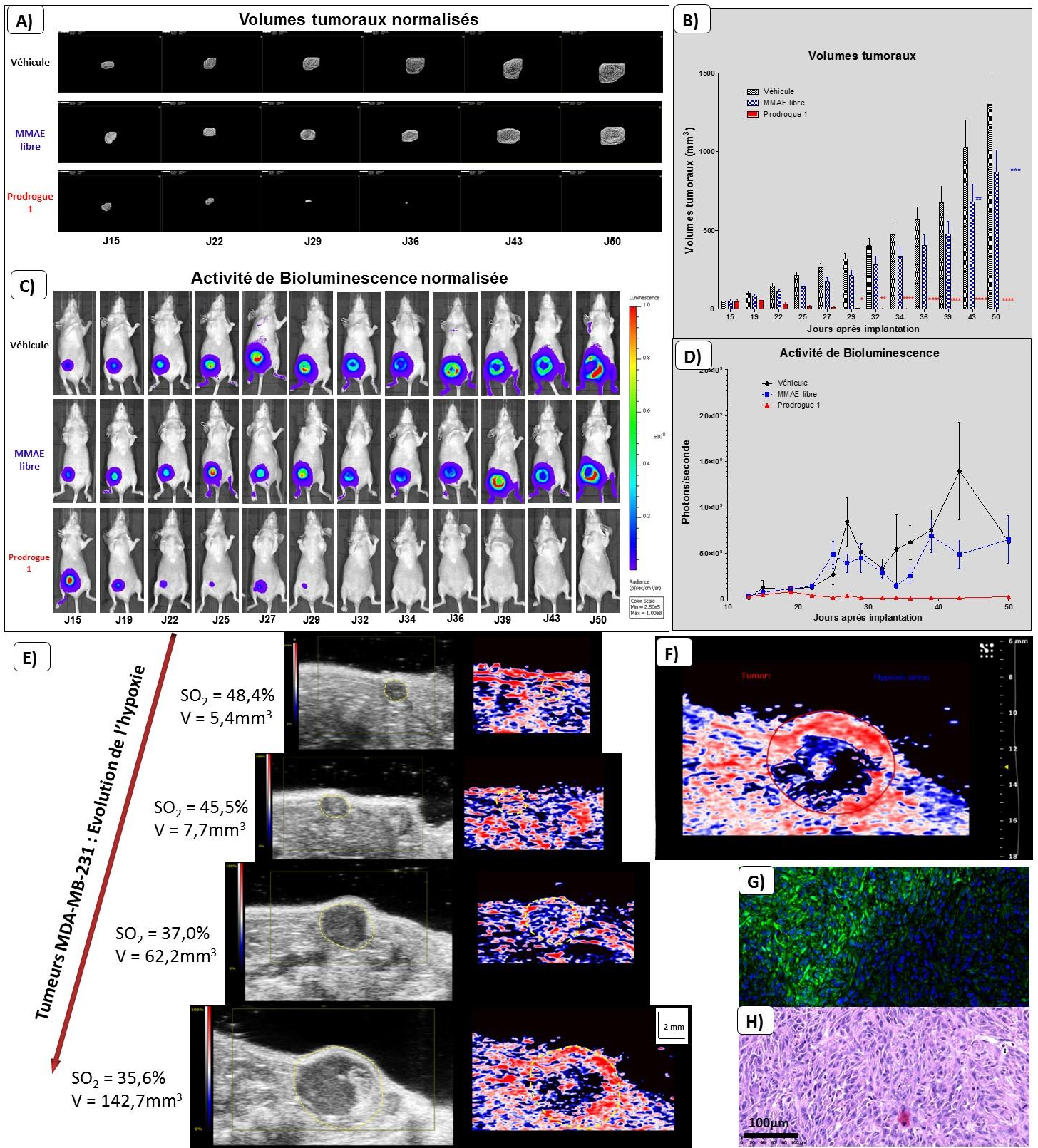


Figure 114 : Imagerie multimodale sur le modèle de tumeurs orthotopiques mammaires MDA-MB-231. A) Représentation de l'évolution des volumes tumoraux mesurés par échographie 3D. **B)** Quantification et comparaison des volumes tumoraux du groupe traité par la Prodrogue 1 comparé au groupe traité par la MMAE libre et le groupe Véhicule. Les résultats représentent les moyennes \pm ESM (n=6 animaux par groupes). **C)** Signaux de bioluminescence représentatifs correspondants. **D)** Quantification et comparaison des signaux de bioluminescence du groupe traité par la Prodrogue 1 comparé aux groupes traités par la MMAE libre et le Véhicule. Les résultats ont été analysés par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test de Bonferroni. Les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). **E) & F)** Images photoacoustiques représentatives de l'apparition de l'hypoxie en fonction du volume tumoral (de 5,4mm³ à 142,7mm³). **G)** Immuno-fluorescence du pimonidazole sur une coupe tumorale. La coloration verte représente les adduits de pimonidazole (FITC), la coloration bleue correspond aux noyaux cellulaires (DAPI). **H)** Coloration Hématoxyline/Eosine correspondante (CIPA2016).

Nous avons ensuite pu déterminer les volumes tumoraux hypoxiques par rapport aux volumes tumoraux totaux (Moyenne $V_{\text{tumoraux hypoxiques}}=24,5\text{mm}^3$ et moyenne $V_{\text{tumoraux entiers}}=71\text{mm}^3$ à J7 ; moyenne $V_{\text{tumoraux hypoxiques}}=145\text{mm}^3$ et moyenne $V_{\text{tumoraux entiers}}=296\text{mm}^3$ à J29). Dans le but de valider nos mesures de l'hypoxie, nous avons ensuite mis en œuvre la procédure d'immuno-fluorescence au pimonidazole couplée à une procédure d'histologie HES classique, qui a montré l'apparition d'un cœur hypoxique au centre des tumeurs avant l'apparition de la nécrose (Figure 114G&H).

2.2.4.4. Modèle de tumeurs pulmonaires

Dans le monde, le cancer du poumon est le cancer le plus fréquent aussi bien en termes d'incidence que de mortalité (1,35 million de nouveaux cas par an et 1,18 million de décès), avec les taux les plus élevés en Europe et en Amérique du Nord ^[324]. Les cancers du poumon représentent la première cause de mortalité par cancer en France et dans le monde. Pas moins de 30 000 décès par an sont imputables en France au cancer bronchique ^[325]. Chez la femme, il est en progression constante : son incidence a triplé ces 20 dernières années. Le pronostic de ces cancers est sombre, avec une moyenne de 15 % de survie à 5 ans. Malgré les nombreux progrès réalisés au cours des dernières années dans le domaine de la prévention, la détection précoce et le traitement du cancer, cette maladie reste un problème majeur de santé publique. Les chimiothérapies conventionnelles exploitent les propriétés cytotoxiques d'agents anticancéreux non sélectifs. Ils agissent principalement sur les cellules tumorales mais parfois sur les cellules saines, provoquant des effets secondaires responsables de l'arrêt des traitements chez les patients. Depuis quelques années, des stratégies de chimiothérapies ciblées ont émergé afin de véhiculer un agent anticancéreux vers son site d'action sous la forme d'un médicament non-toxique, puis de régénérer son activité toxique exclusivement au niveau de la tumeur. C'est donc dans ce contexte que nous avons souhaité évaluer le potentiel thérapeutique des composés développés par l'équipe de S. Papot.

2.2.4.4.1. Matériel et Méthodes

Culture cellulaire, animaux et modèle tumoral :

Le modèle de tumeurs orthotopiques pulmonaires NCI-H460 a été détaillé en 1.4.4.2.1 Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1. Pour ce protocole, 4 groupes de 6 animaux ont été constitués : un groupe traité par la Prodrogue 1 à 4mg/kg, un groupe traité par la Prodrogue 2 à 2,36mg/kg, un groupe traité par la MMAE libre à 0,5mg/kg et un groupe témoin (mélange constitué de DMSO et PBS (5% / 95%)).

Constitution des groupes :

Afin de constituer des groupes les plus homogènes possibles, les souris ont été réparties uniformément en fonction des volumes tumoraux mesurés par TDM-X le premier jour du traitement, afin de réduire la variabilité interindividuelle.

Protocole :

Les souris ont reçu le premier traitement 13 jours après les implantations tumorales. Les injections IV ont été effectuées une fois par semaine pendant 5 semaines.

Imagerie :

Pour l'imagerie de bioluminescence, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.4.1.1.

Pour l'imagerie par TDM-X, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 1.4.4.2.1.

Afin de pouvoir évaluer l'efficacité des traitements, nous avons réalisé :

- Une imagerie par TDM-X le premier jour des traitements, à J32 et le dernier jour de l'étude (J48).
- Une imagerie de bioluminescence 2 fois par semaine, ainsi que le dernier jour de l'étude.

Sacrifice et prélèvement des organes :

Les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale sous anesthésie, et les tumeurs ont été prélevées chez chaque animal pour des mesures *ex vivo* réalisées *a posteriori* par l'équipe de S. Papot.

Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad, San Diego, Etats-Unis). Une ANOVA à deux facteurs, suivie par un post-test de Bonferroni a été utilisée pour les données longitudinales. Les différences ont été considérées significatives lorsque $p < 0,05$.

2.2.4.4.2. Résultats

L'imagerie par TDM-X n'a pas permis de mesurer avec précision les volumes tumoraux, en traçant manuellement les ROIs sur les coupes. La taille importante des tumeurs qui se

développaient au contact du diaphragme et du foie, associée à un manque de contraste entre les tumeurs et ces tissus sous-jacents, a rendu impossible une mesure précise des volumes par délimitation des contours sur les images de TDM-X.

En utilisant la formule de calcul de volume $V=4/3\pi[(H/2)+(L/2)+(I/2)]$ (détaillée en 2.3), nous pouvons voir une tendance à la diminution de la vitesse de croissance tumorale du groupe traité par la Prodrogue 1, par rapport aux autres groupes (Figure 115). Ces résultats ne sont pourtant pas significatifs.

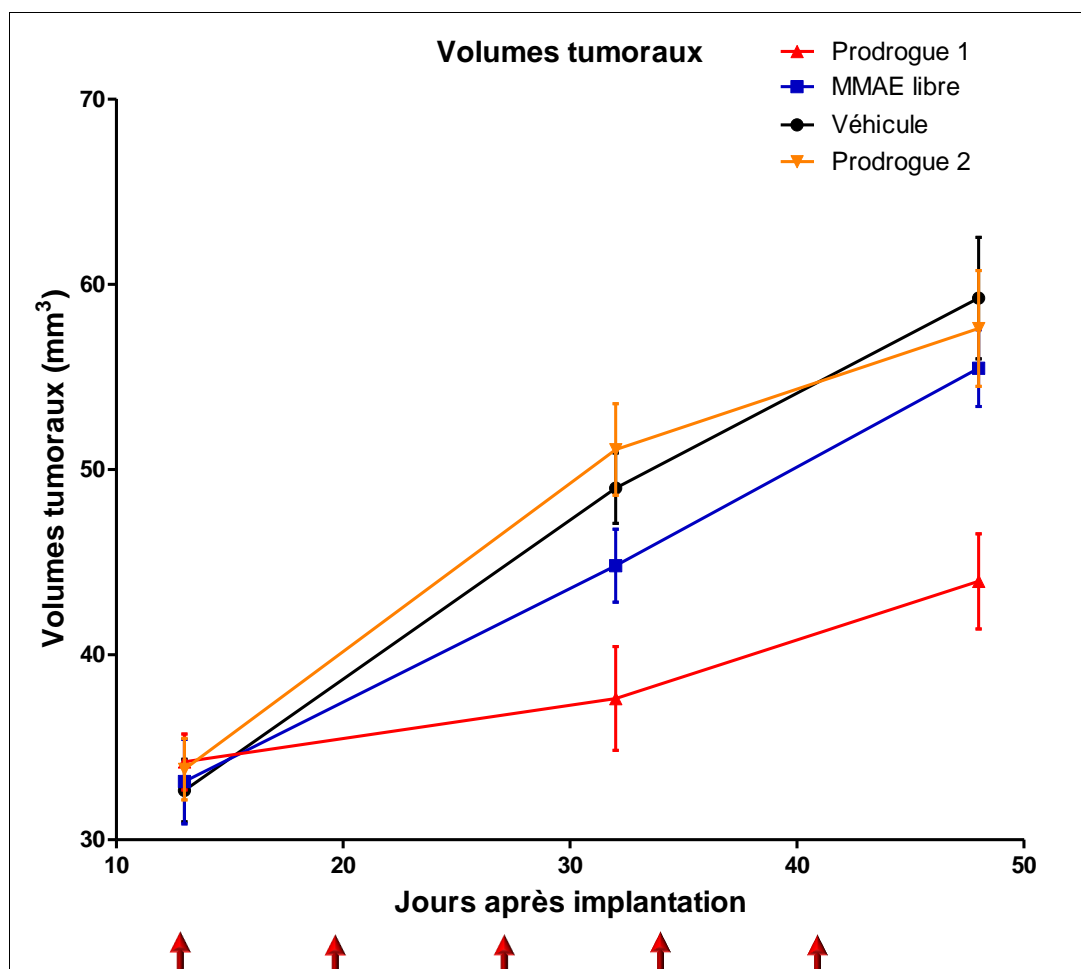


Figure 115 : Evolution du volume des tumeurs NCI-H460 au cours du temps. Les flèches rouges représentent les traitements par Prodrogue 1 - 4mg/kg, Prodrogue 2 - 2,36mg/kg, MMAE libre 0,5mg/kg et par le Véhicule. (n=6 animaux par groupes).

En bioluminescence, les résultats de suivi au cours du temps n'ont pas permis de mettre en évidence un effet des Prodrogues par rapport aux groupes MMAE libre et contrôle (Figure 116).

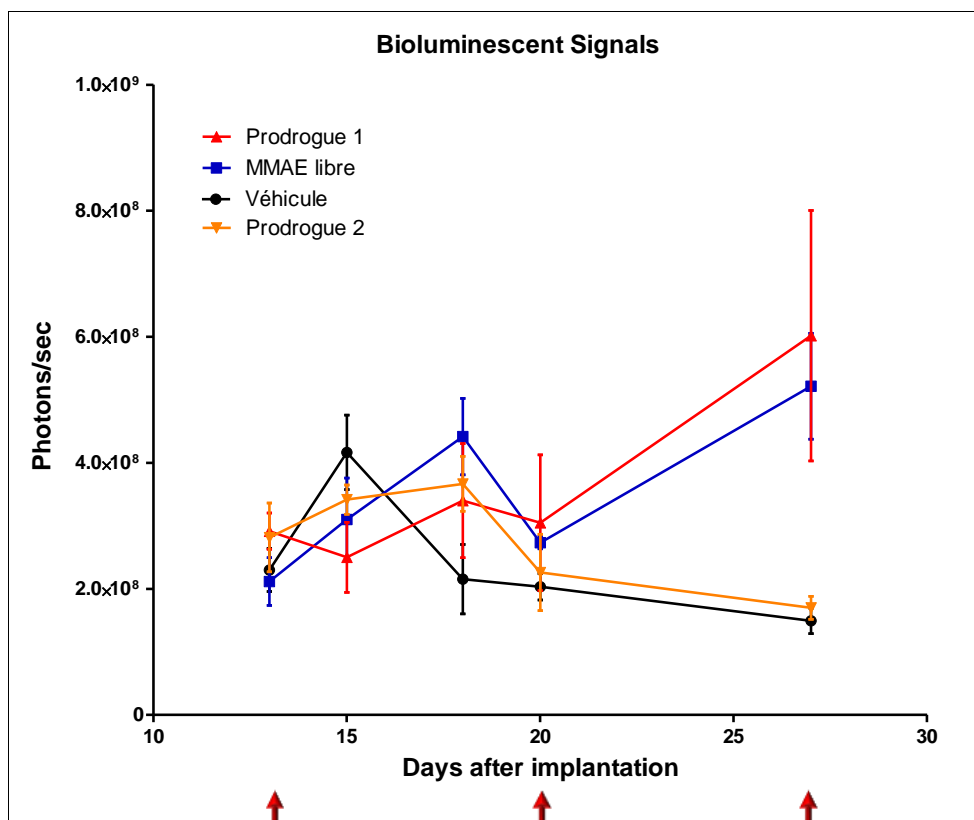


Figure 116 : Evolution de la prolifération tumorale NCI-H460 mesurée par BLI au cours du temps. (n=6 animaux par groupes).

Les résultats de bioluminescence à J48 ont par contre permis de montrer un effet protecteur de la Prodrogue 1 sur le développement de métastases spontanées à partir des tumeurs primaires. En effet, aucune métastase n'a pu être décelée sur les faces antérieures et postérieures des animaux en imagerie de bioluminescence (Figure 117).

D'autre part, tous les animaux traités par la Prodrogue 1 et par la MMAE libre ont survécu tout au long de l'étude. Concernant les animaux traités par la Prodrogue 2 et le groupe contrôle, certains animaux ont dû être mis à mort après avoir atteint le point limite éthique défini préalablement.

Concernant le suivi du poids des souris, il n'a pas été montré de différences significatives de poids dans les 4 groupes (Figure 118). Par ailleurs aucune des souris ayant reçu la molécule de MMAE n'a montré de perte de poids supérieure à 20% au cours de l'étude. Nous pouvons donc estimer que le traitement n'a pas été toxique.

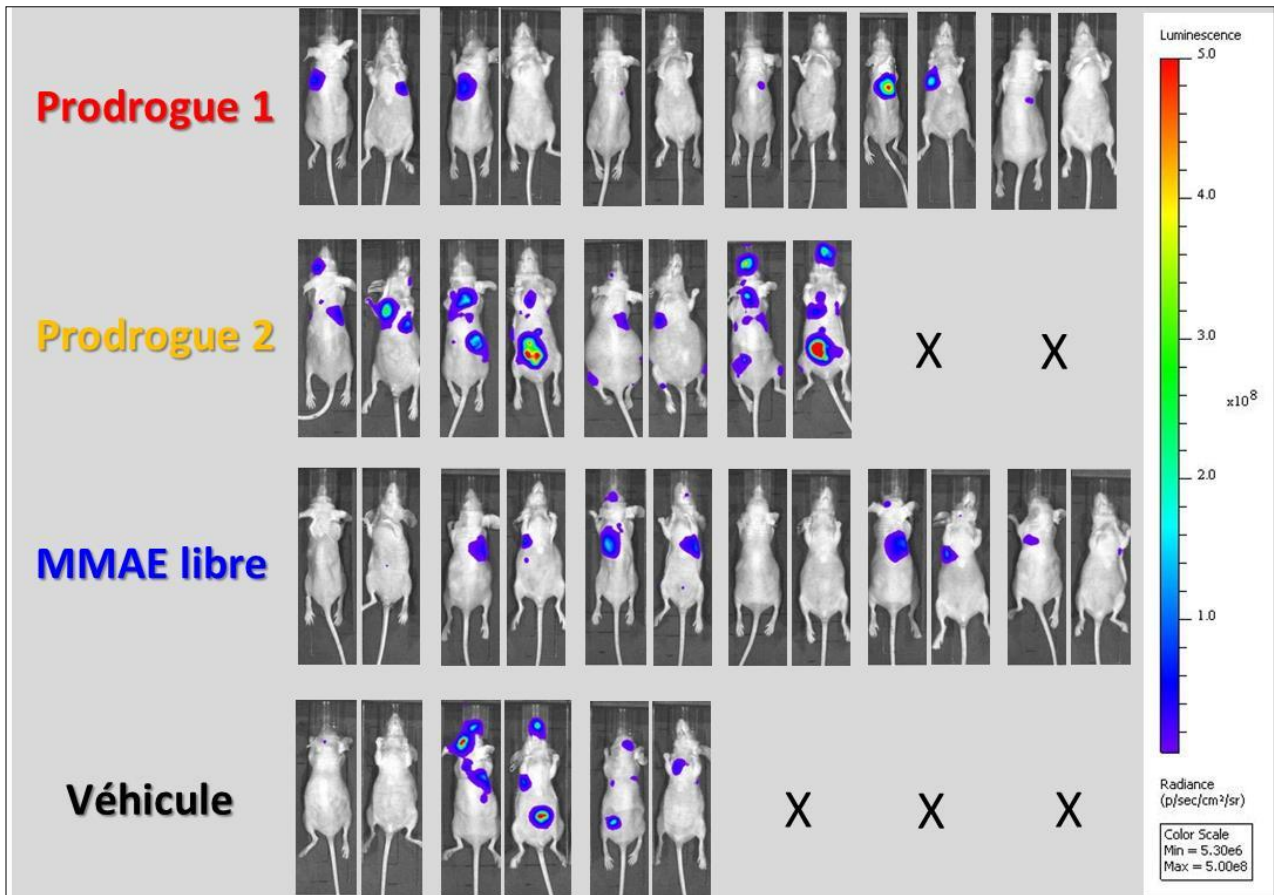


Figure 117 : Evolution de la prolifération tumorale des tumeurs NCI-H460 mesurée par imagerie de bioluminescence le dernier jour de l'étude (J48) (CIPA 2016).

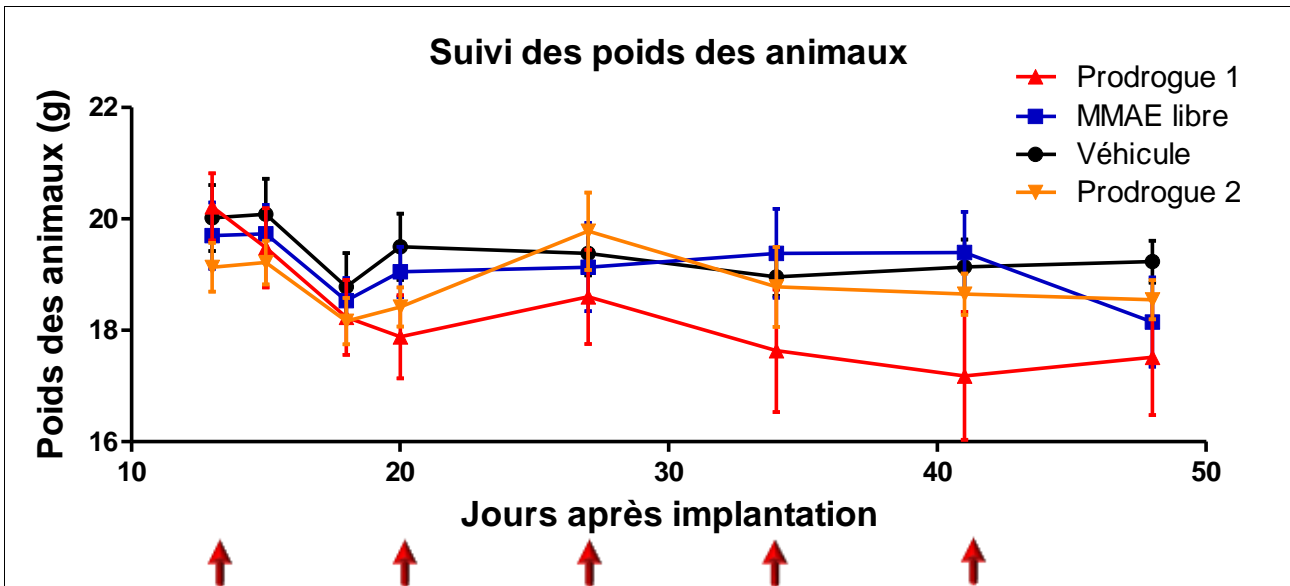


Figure 118 : Suivi des poids des animaux au cours des traitements.

2.2.5. Evaluation du risque de toxicité de la prodrogue sur un modèle d'inflammation

Le composé testé possède un système de libération de la MMAE dépendant d'une enzyme, la β -glucuronidase. D'après la littérature, nous savons que cette enzyme est sécrétée par les cellules tumorales dans le proche environnement des tumeurs, mais elle est également libérée lors d'une situation inflammatoire. Lors d'une inflammation, il y a un recrutement des neutrophiles et des macrophages au niveau du site de l'inflammation. Ce sont ces neutrophiles et macrophages qui libèrent de la β -glucuronidase [326].

Le but de cette étude est donc de s'assurer que lors d'une situation inflammatoire chronique, la libération de MMAE par les β -glucuronidases est suffisamment faible pour que la MMAE libérée n'atteigne pas un niveau toxique pour le sujet traité. Nous savons que la MMAE libérée grâce aux β -glucuronidases présentes dans le microenvironnement tumoral l'est en quantité importante et permet de faire régresser les tumeurs.

Si la MMAE n'est libérée qu'en très faible quantité ailleurs qu'au site tumoral lorsque le sujet présente un syndrome inflammatoire, il pourrait être recruté comme patient potentiel de la Prodrogue 1. En revanche, si la MMAE est libérée en trop grande quantité et est toxique pour le sujet présentant un syndrome inflammatoire, ces patients potentiels ne pourraient être inclus dans un protocole d'essai clinique par exemple.

Il était donc absolument nécessaire de réaliser ce test d'évaluation d'un risque potentiel afin d'éviter de possibles effets secondaires lors de futurs essais cliniques.

Ces résultats pourraient conditionner l'avancée de ce composé dans des phases cliniques. Une toxicité avérée du composé, aux doses utilisées pour les essais thérapeutiques, lors de situation d'inflammation chronique, pourrait conditionner la sélection des patients traités par ce composé. Une absence de toxicité, aux doses utilisées pour les essais thérapeutiques, serait un avantage majeur pour envisager un transfert chez l'Homme. L'utilisation d'un modèle d'inflammation aiguë doit permettre d'obtenir des informations incontournables avant de transposer ce traitement anticancéreux en recherche clinique.

2.2.5.1. Matériel et Méthodes

Le modèle que nous avons choisi d'utiliser est un modèle d'inflammation très représentatif de pathologies inflammatoires humaines aiguës qui impliquent un organe vital. Il s'agit du modèle d'inflammation pulmonaire aiguë par instillation intratrachéale de LPS

(LipoPolySaccharide).

Modèle d'inflammation pulmonaire au LPS :

Ce modèle consiste en l'administration intratrachéale de LPS (LipoPolySaccharide) d'E. Coli, induisant une inflammation pulmonaire aigüe, persistante pendant au moins 96 H. Ce modèle est connu pour entraîner une accumulation de macrophages au niveau de la région pulmonaire inflammée. Il est donc particulièrement bien adapté à cette étude ^[327].

Animaux, hébergement :

Des souris saines femelles âgées de 6 semaines, de lignée Balb/C by ont été obtenues auprès de Charles River (France). Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1. Nous avons utilisé pour cette étude un total de 48 animaux.

Protocole :

Pour réaliser cette évaluation, il a tout d'abord été nécessaire de valider nos conditions expérimentales en sélectionnant la dose de LPS à instiller aux animaux, puis en déterminant par fluorescence le moment où le syndrome inflammatoire était le plus intense.

Un test de DMT a été également réalisé sur les animaux afin d'évaluer la tolérance vis-à-vis de la Prodrogue 1.

Etude préliminaire visant à déterminer la dose de LPS à utiliser pour les instillations :

Nous avons testé 3 doses différentes de LPS à instiller. 3 groupes de 2 animaux ont été formés afin de tester des doses de 50, 100 et 500µg de LPS sous 50 µL de PBS (LPS O55:B5 (Sigma) purifié par chromatographie échangeuse d'ion).

Pour les instillations, l'introduction d'un cathéter a été réalisée dans la trachée des animaux à l'aide d'un laryngoscope, sous anesthésie par isoflurane (1,5% dans l'air). Le cathéter, d'un diamètre très fin ($\varnothing=0,69\text{mm}$) n'était introduit que quelques secondes dans la trachée. Une fois la position du cathéter contrôlée par radiographie planaire (Faxitron MX20, Faxitron X-ray corp, Etats-Unis), et le dépôt de LPS réalisé, le cathéter était retiré. Les animaux ont ensuite été positionnés sur des blocs chauffants jusqu'à leur réveil.

Pour l'examen d'imagerie, les animaux ont reçu une injection IV de sonde fluorescente activable ProSense®680 (Perkin Elmer®, France) 24H avant l'examen de fluorescence *ex vivo*, afin de mettre en évidence la présence d'une inflammation. Cette sonde est activée

lorsqu'elle est dégradée en raison de cathépsines présentes au site d'inflammation. Les animaux ont ensuite été mis à mort et leur poumons prélevés, car une imagerie quantitative *in vivo* en fluorescence proche infrarouge n'est pas pertinente en imagerie 2D. Les poumons excisés ont été placés dans l'imageur de fluorescence IVIS Lumina II (Perkin Elmer®).

Détermination de la cinétique de la réaction inflammatoire :

Pour connaître le moment le plus opportun pour administrer la Prodrogue 1, c'est-à-dire au moment du pic inflammatoire, nous avons étudié les signaux de fluorescence *ex vivo* 24, 48 et 72 H post administration de LPS.

Pour cela, 3 groupes de 2 animaux ont été formés. Les animaux ont reçu une dose de 100µg de LPS sous 50µL de PBS.

Les animaux ont été injectés par voie IV avec la sonde fluorescente activable ProSense®680 (Perkin Elmer®, France) 24H avant l'examen de fluorescence *ex vivo*, afin de mettre en évidence la présence d'une inflammation.

Validation de la dose et de la cinétique pour ce modèle d'inflammation :

Nous avons constitué 2 groupes de 3 animaux, le premier ayant reçu LPS (100µg) + ProSense®680 et le second seulement du ProSense®680, avec une mise à mort et un examen *ex vivo* extemporané 24H post administration de LPS.

Etude proprement dite avec administration de la Prodrogue 1 :

Nous avons constitué 10 groupes de 3 animaux (5 doses différentes de Prodrogue 1 testées, sur des animaux présentant ou non une inflammation). Tous les animaux ont reçu une injection de Prodrogue 1, mais seulement un des 2 groupes présentait un statut inflammatoire. Les posologies de Prodrogues 1 testées ont été de 1, 2, 4, 8 et 12mg/kg.

Les traitements par la Prodrogue 1 ont été administrés de manière unique, par injection intraveineuse.

Tout au long de l'étude, le poids ainsi que le comportement général ont été suivis comme un indicateur de l'état de santé des animaux. La tolérance du composé a été évaluée par l'observation de ces paramètres. Une grille d'évaluation par scoring a été utilisée pour déterminer les points limites.

2.2.5.2. Résultats

Nous avons constaté macroscopiquement la présence d'une inflammation lors d'une administration de LPS avec l'apparition de taches hématiques sur les deux faces des poumons (Figure 119B). Sur l'image NIRF correspondante, nous pouvons voir un signal jaune très intense au niveau des sites inflammatoires (Figure 119A).

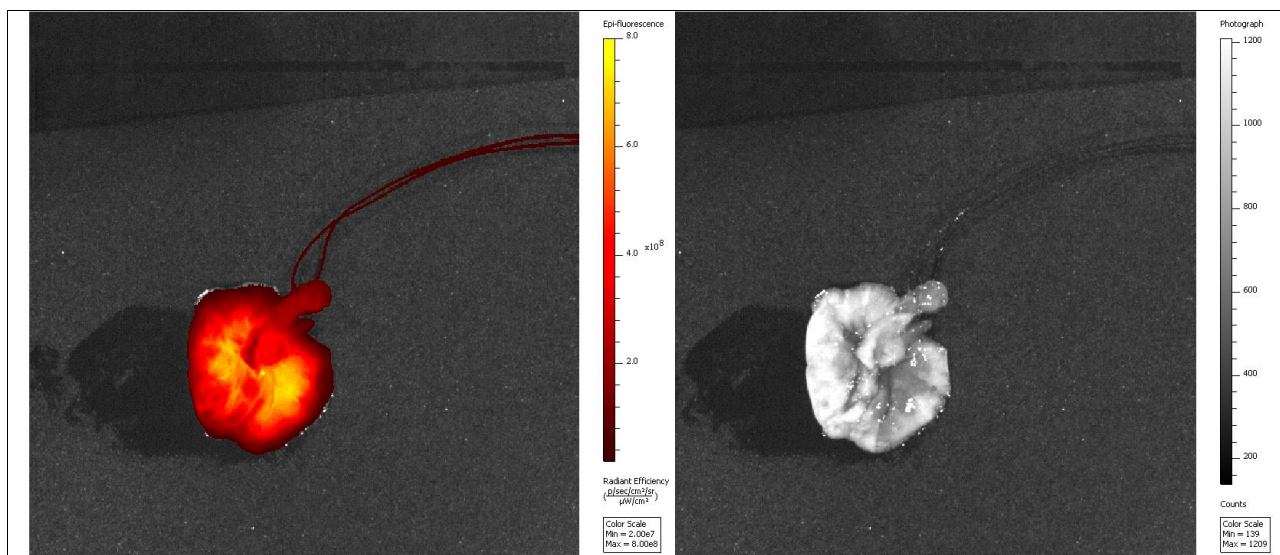


Figure 119 : Imagerie de fluorescence d'un poumon inflammé après instillation intratrachéale de LPS. A) Imagerie de fluorescence de la sonde ProSense®680 activée au niveau des zones inflammées. B) Image du poumon correspondante en lumière visible montrant des taches plus foncées au niveau de la zone d'inflammation (CIPA 2016).

Dose de LPS à utiliser pour les instillations :

Les résultats obtenus ont montré qu'une dose de 100µg de LPS instillé est suffisante pour obtenir un syndrome inflammatoire satisfaisant. Sur les poumons des animaux qui ont été instillés par les 3 doses différentes, la différence de quantité de signal quantifiée pour les 3 doses n'était pas très importante puisque les quantifications allaient de $1,45 \times 10^{10}$ à $1,9 \times 10^{10}$ Radiant Efficiency [(p/sec/cm²/sr) / (µW /cm²)] alors qu'il y a un log d'écart dans les doses administrées (Figure 120). Nous avons donc choisi d'utiliser la dose de 100µg pour les protocoles suivants. Les quantifications étaient, pour les poumons présentés, de $1,45 \times 10^{10}$, $1,72 \times 10^{10}$ et $1,95 \times 10^{10}$ (p/sec/cm²/sr) / (µW /cm²) pour les doses de 50, 100 et 500µg de LPS utilisées respectivement.

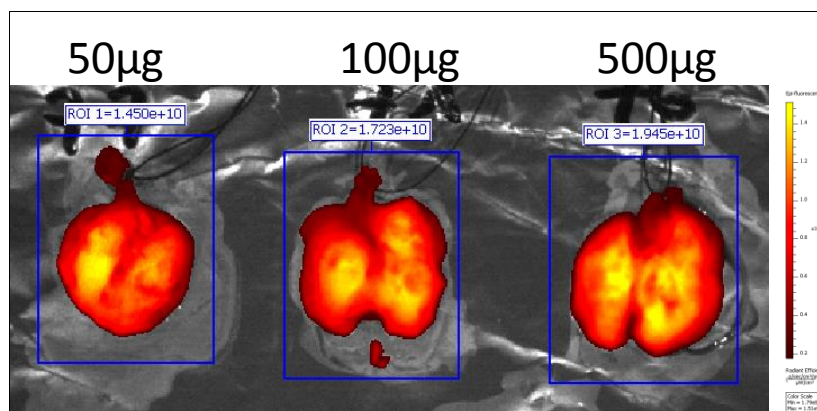


Figure 120 : Imagerie de fluorescence des poumons inflammés en fonction de la quantité de LPS utilisée (CIPA 2016).

Etude de la cinétique :

D'après les résultats obtenus pour les cinétiques d'instillation, nous avons retenu 24H comme temps adéquat pour que l'inflammation soit visualisable avec le maximum d'intensité de signal fluorescent.

Validation de la dose et de la cinétique pour ce modèle d'inflammation :

Les images obtenues 24H après instillation de 100µg de LPS et 24H après injection du ProSense®680 montrent que l'intensité du signal était en corrélation directe avec le degré de l'inflammation chez les 3 animaux instillés avec le LPS ($4,82 \times 10^9$ (p/sec/cm²/sr) / (µW/cm²)), par rapport à un faible signal dans les poumons des 3 animaux Témoins ($1,85 \times 10^9$ (p/sec/cm²/sr)/(µW/cm²)) (Figure 121&122). (Ces résultats correspondent aux moyennes des faces antérieures et postérieures des poumons des animaux de chacun des groupes).

Le statut inflammatoire des poumons était bien visible à l'œil nu et également par imagerie de fluorescence (Figure 119) et des analyses histologiques sur les poumons prélevés (fixés dans du formol 10% pendant 48h puis conservés dans l'éthanol 70%) confirmeront ces résultats.

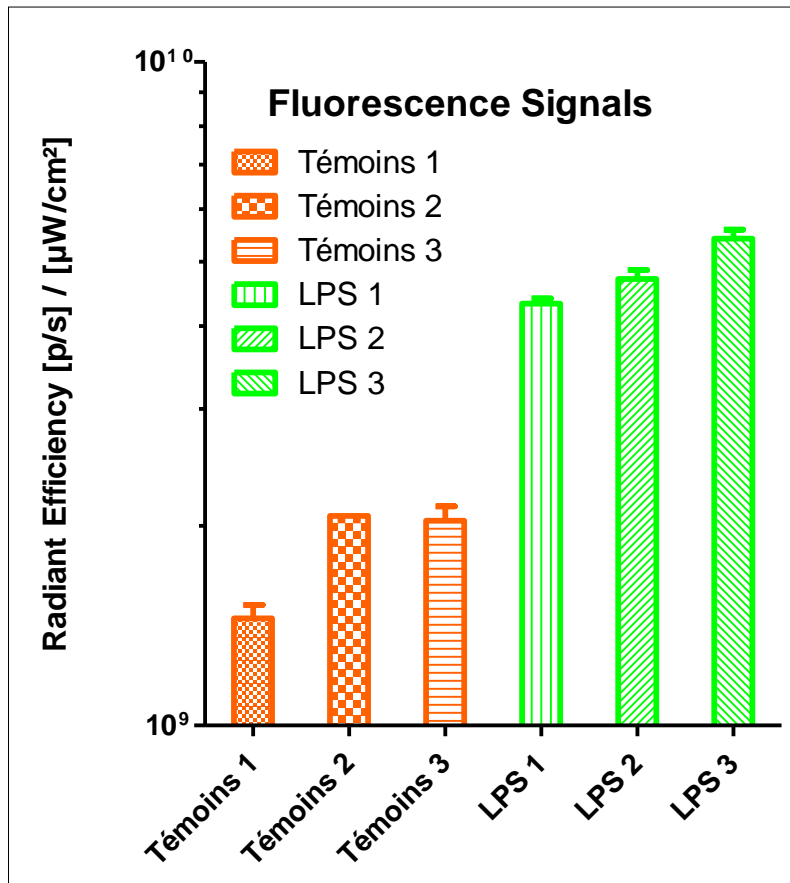


Figure 121 : Validation des conditions expérimentales conduisant à une inflammation pulmonaire aiguë. Ces résultats montrent la moyenne des quantifications des signaux collectés sur les faces antérieures et postérieures des poumons prélevés. (n=3 animaux par groupes).

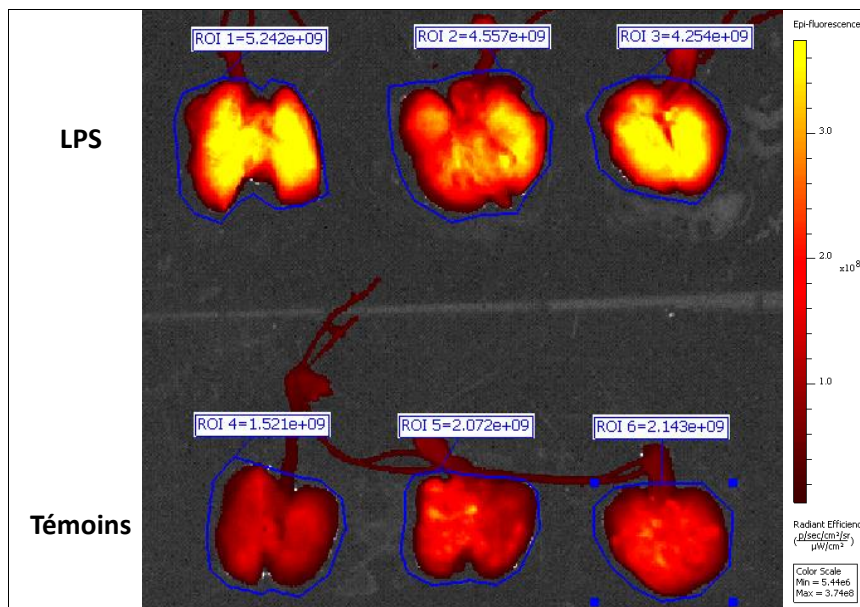


Figure 122 : Validation des conditions expérimentales conduisant à une inflammation pulmonaire aiguë. Nous pouvons observer l'inflammation intense pour le groupe instillé par le LPS (n=3 animaux par groupes) (CIPA 2016).

Etude avec administration de la Prodrogue 1 :

Les résultats obtenus ont montré que le composé était bien toléré à 1 et 2mg/kg aussi bien pour le groupe LPS que le groupe témoin. Pour chacun des groupes traités par 4 et 8 mg/kg avec administration de LPS, nous avons constaté le décès d'un animal sur 3. A 12mg/kg, aucun des animaux n'a survécu aussi bien pour le groupe Prodrogue 1 + LPS que pour le groupe LPS (Figures 123 et 124).

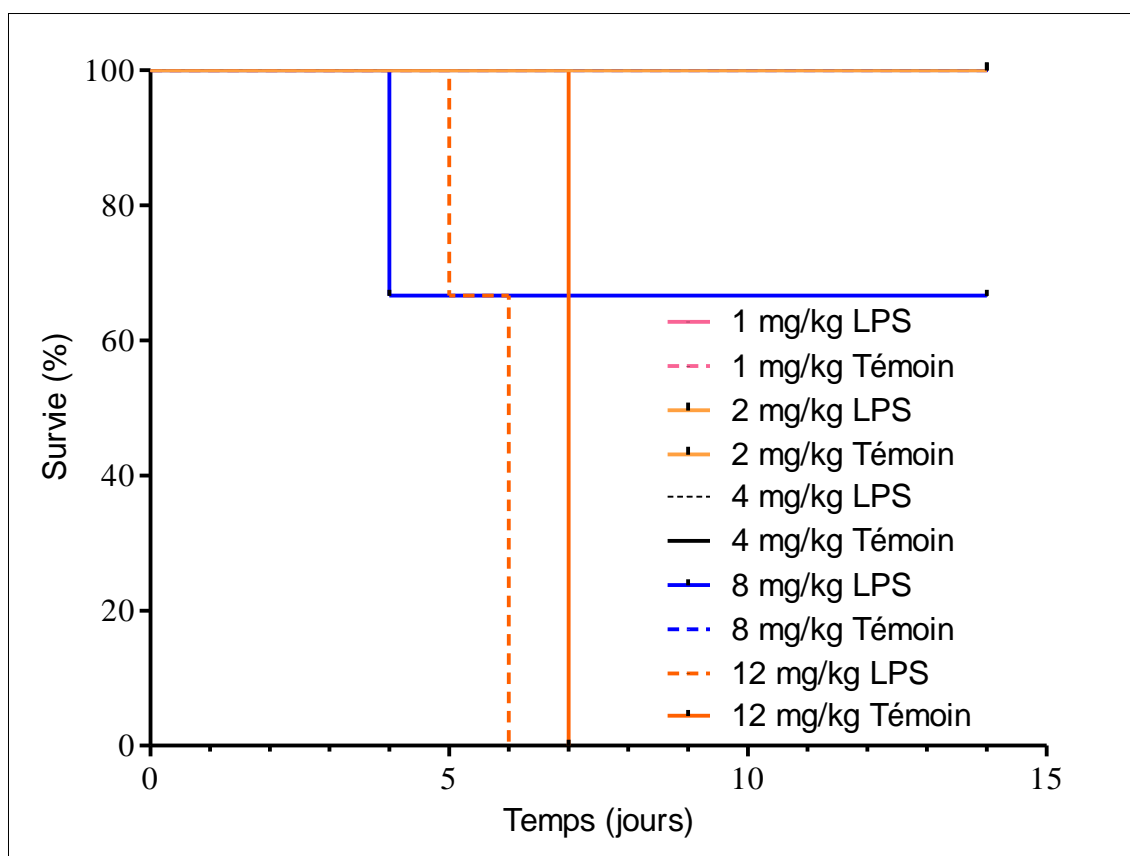


Figure 123 : Courbe de survie des animaux porteurs d'inflammation aigüe pulmonaire. Les groupes d'animaux avec ou sans syndrome inflammatoire ont été traités avec la Prodrogue 1.

	Nombre de souris mortes par groupe à J14				
	12mg/kg	8mg/kg	4mg/kg	2mg/kg	1mg/kg
LPS + Prodrogue 1	3/3	1/3	1/3	0/3	0/3
Prodrogue 1	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Figure 124 : Tableau récapitulatif du nombre de décès des animaux en fonction de la posologie de Prodrogue 1 utilisé.

En ce qui concerne le poids des animaux, les animaux ayant reçu le LPS + Prodrogue 1 à 8mg/kg ont perdu du poids avant de recouvrer leur poids initial. En revanche, les autres animaux n'ont pas perdu de poids.

La Prodrogue 1 est donc bien tolérée jusqu'à 2mg/kg et un risque potentiel apparait à la dose de 4mg/kg en cas de syndrome inflammatoire pulmonaire aigu, ce qui confirme les résultats de DMT obtenus en 2.2.1.2.2.

Les résultats de ces tests préliminaires de toxicité sur ce modèle d'inflammation ont permis d'extrapoler le risque de libération extra-tumoral de MMAE, sous sa forme active, encouru par des sujets présentant une inflammation.

2.3. Discussion et Conclusion

Discussion :

Nous avons mis au point et optimisé une plateforme intégrée d'imagerie multimodale pour l'imagerie *in vivo* de bioluminescence, de fluorescence, d'échographie et de photoacoustique. Celle-ci, combinant une imagerie 2D corps entier très sensible (biophotonique), avec une imagerie 3D haute résolution (Échographie et PA), est particulièrement adaptée pour des séries d'imageries à haut débit, avec une seule anesthésie des animaux pour réaliser les différents examens. La caméra (imagerie optique) et le transducteur (échographie/PA) ont été mis en œuvre dans l'enceinte commercialement disponible du Vevo[®] LAZR. L'enregistrement de l'ECG et de la fréquence respiratoire permettent le monitoring des animaux et assurent la qualité des images échographie/PA en s'affranchissant des mouvements physiologiques. Chaque modalité d'imagerie possède ses avantages et ses limites, l'objectif était de les combiner et d'obtenir des données anatomiques haute résolution associées à des données fonctionnelles et moléculaires à haute sensibilité. Ce travail fait d'ailleurs l'objet d'une publication qui est en cours de rédaction (cf. Annexe 1).

Concernant l'imagerie moléculaire préclinique, de nombreux travaux mettant en œuvre conjointement différentes modalités ont déjà été réalisés. Une approche multimodale habituellement mise en œuvre combine la BLI et la NIRF, car elles nécessitent toutes les deux un environnement étanche aux photons extérieurs ainsi que le même type de capteurs [328]. On trouve également des combinaisons d'échographie/NIRF [329,330], échographie/PA/NIRF [307,331-333], ou encore des combinaisons d'échographie/BLI/IRM [334]. Un certain nombre d'approches multimodales associant des techniques radioactives ont également été décrites dans la littérature, telles que TEP/NIRF [335], TEP/CT/BLI [336] ou TEMP/CT/BLI/NIRF [337,338]. Cependant, comme les radiations provenant des radio-isotopes, et des modalités elles-mêmes, peuvent avoir un impact sur les organes et la

biologie de la cellule, menant à des biais expérimentaux ^[293] (par exemple par suite d'une synergie entre effets chimiothérapeutiques et radiologiques), nous avons privilégié le développement d'une plateforme intégrée d'imagerie sans rayonnements ionisants. A noter que les combinaisons TEP/TDM-X et TEMP/TDM-X sont utilisées très couramment en imagerie clinique et préclinique, mais compte tenu des résolutions nécessaires, c'est en préclinique que la dosimétrie est la plus critique, principalement pour la TEP/TDM-X. La bimodalité TEP/IRM est actuellement en pleine évolution et de nombreux développements sont menés pour des applications aussi bien cliniques que précliniques.

Il serait intéressant de pouvoir confronter ultérieurement les résultats obtenus avec la plateforme intégrée d'imagerie multimodalité aux potentiels de l'IRM, elle-même technique non-irradiante, mais non disponible au CIPA.

Imagerie biophotonique :

L'imagerie biophotonique regroupe l'imagerie de bioluminescence (BLI) et de fluorescence (NIRF). La BLI consiste en la détection *in vivo* de photons émis par des cellules (préalablement modifiées pour exprimer le gène de la luciférase) grâce à l'utilisation d'une caméra ultrasensible. La NIRF consiste en la détection *in vivo* de photons de fluorescence qui sont émis suite au retour à l'état fondamental des électrons d'une molécule excitée par une lumière de longueur d'onde spécifique.

L'avantage principal de l'imagerie biophotonique est de pouvoir détecter les tumeurs et de localiser précisément les métastases au niveau du corps entier. Les informations complémentaires fournies par la BLI (prolifération tumorale à très haute sensibilité) et la NIRF (expression de très nombreux biomarqueurs) sont particulièrement intéressantes en fonction du questionnement biologique, cela d'autant plus qu'il n'est parfois pas possible de transduire certains types de cellules avec des gènes codant pour la luciférase. L'imagerie en fluorescence mettant en œuvre des sondes moléculaires ou des gènes codant pour des protéines fluorescentes constituent alors une alternative. Les procédures d'imagerie biophotonique sont rapides et relativement aisées à utiliser, tout en prenant en compte leurs limites identifiées. Cependant en imagerie optique, un paramètre important qui doit être considéré avec attention est la quantification des signaux. En effet, l'imagerie optique souffre des limites de pénétration et de diffusion de la lumière dans les tissus ^[339]. La forte absorption des photons et la diffusion aléatoire de ceux-ci restreignent les possibilités d'imagerie à des applications sur le petit animal ou à des applications cliniques superficielles ^[293]. Une fois les données acquises, les flux de photons sont souvent quantifiés en coups ou en photons/seconde ^[340]. Pour notre plateforme intégrée, les

signaux ont été étalonnés avec l'utilisation d'une source de lumière calibrée, permettant une quantification de la quantité de photons récupérés sur le capteur CMOS.

Une autre limite de la BLI est la forte absorption des photons par les tissus traversés, rendant la quantification et l'interprétation des résultats difficile avec cette imagerie planaire ^[273].

Par ailleurs, l'évaluation de l'activité de BLI dans les tumeurs présentant un certain degré d'hypoxie a montré une baisse significative des signaux quantifiés. Khalil et al. ont également montré que l'apparition de l'hypoxie ainsi que les changements de pH au niveau de la tumeur influencent l'activité de bioluminescence ^[284]. Parce que la réaction de bioluminescence est dépendante de la présence d'ATP et d'O₂, cette imagerie d'expression génique dépendante du métabolisme ne peut plus être utilisée comme un biomarqueur pertinent de la prolifération tumorale à partir du moment où une tumeur devient hypoxique. Ce phénomène est particulièrement mis en évidence chez les groupes véhicules pour les tumeurs pancréatiques et de la tête et du cou, qui présentent une diminution des signaux de BLI avec une croissance toujours continue des volumes tumoraux (Figures 94A&B et 109B&D). Pour les tumeurs mammaires, les perturbations des signaux BLI sont plus complexes, avec un processus en 2 phases associé à une prolifération tumorale périphérique retardée (Figure 114D). La BLI reste donc une modalité très intéressante pour monitorer la prise de greffes tumorales et rechercher avec une grande sensibilité l'apparition des métastases (pour le suivi des stades précoces de dissémination) ainsi que pour la constitution et la répartition des animaux dans des groupes de statut tumoral équivalent. Cependant, l'échographie 3D a clairement montré le manque de pertinence de la BLI quantitative particulièrement pour ces modèles de tumeurs hypoxiques.

Une des limites de la NIRF est due à la présence dans les tissus de molécules absorbantes vis-à-vis des photons (oxy-hémoglobine, desoxy-hémoglobine, eau, lipides), même si dans l'infrarouge, on se positionne dans une relative fenêtre de transparence ^[199]. Pour les examens de tumeurs orthotopiques, l'autofluorescence de la peau vers 680-700nm ainsi que celle de la chlorophylle de la nourriture présente dans les viscères doivent être considérées lors de la mise en place d'un schéma expérimental. Une nourriture non-autofluorescente peut être donnée aux animaux 7 jours avant l'imagerie, et ce jusqu'à la fin des examens de fluorescence, lorsque nécessaire. Dans ce travail, nous avons utilisé différents fluorochromes absorbant autour de 750nm, nous affranchissant ainsi de la composante d'autofluorescence de la peau et des tissus.

Imagerie Echographique :

Les mesures réalisées par échographie 3D nous ont permis de suivre et mesurer les volumes tumoraux au cours des traitements, sans perturbation liée à l'hypoxie. Ces mesures nous ont permis de confronter les données volumiques avec les signaux de bioluminescence, mettant en avant les perturbations des signaux de BLI dues à la présence d'hypoxie tout au long du développement tumoral. Dans le modèle KB, les acquisitions Doppler et d'imagerie de contraste ultrasonore se sont révélées particulièrement performantes pour évaluer la vascularisation des tumeurs ainsi que l'effet du traitement sur l'angiogenèse tumorale.

L'angiogenèse est un paramètre qui se prête bien à un suivi par imagerie multimodalités. La différence majeure entre les données obtenues par Power-Doppler et par imagerie de contraste non-ciblé réside dans la taille des vaisseaux qui peuvent être explorés. Le Power-Doppler apporte des informations sur le flux sanguin au niveau de vaisseaux de 100µm de diamètre environ, tandis que l'imagerie de contraste permet de mettre en évidence des vaisseaux plus petits (le diamètre des MB étant de 5µm de diamètre) ^[219,229].

L'échographie est très attractive pour les études d'onco-pharmacologie, du fait qu'elle est absolument sans effets vis-à-vis de la croissance tumorale en n'utilisant pas de radiations ionisantes ^[341], et peut ainsi être répétée avec de courts intervalles de temps pour le suivi de tumeurs à croissance rapide.

Les mesures échographiques 3D se sont révélées bien plus précises, pertinentes et reproductibles, pour les tumeurs superficielles que les mesures au pied à coulisse et elles sont bien sur les seules à être utilisables pour les tumeurs et métastases profondes. Les inconvénients du pied à coulisse pour les tumeurs sous-cutanées sont, une relative imprécision pour les tumeurs de petite taille et pour les tumeurs ayant une forme non sphérique ou non ellipsoïdale ^[342], rendant alors l'utilisation des formules appliquées non pertinentes pour calculer le volume. Par exemple, voici en Figure 125 la formule utilisée pour mesurer les volumes tumoraux pulmonaires ^[343]. Cette formule présente l'avantage d'un traitement rapide des données, mais elle ne permet pas de pouvoir mesurer de manière très précise les volumes tumoraux, comme c'est le cas avec les délimitations manuelles sur chacune des coupes d'une acquisition 3D, ou encore les segmentations automatiques, lorsqu'elles peuvent être réalisées.

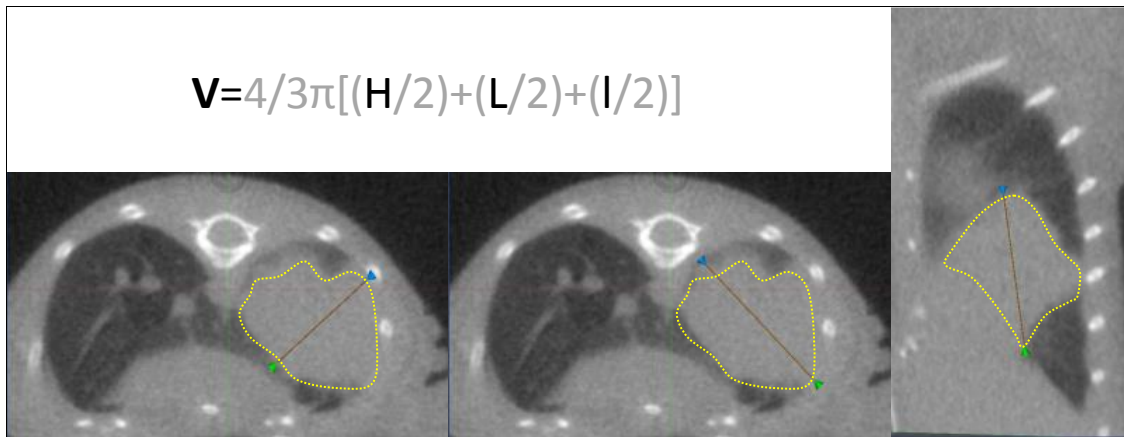


Figure 125 : Mesure du volume tumoral à partir des données de TDM-X suivant les 3 différents plans (coronal, sagittal et frontal) en utilisant la formule basée sur la hauteur, la largeur et la longueur (CIPA 2016).

Imagerie Photoacoustique :

L'imagerie PA est une modalité d'imagerie biomédicale hybride présentant les avantages des ultrasons et de l'imagerie optique, permettant ainsi des mesures physiologiques et anatomiques ^[344]. Cette technique évolue rapidement vers une meilleure sensibilité et une meilleure résolution ^[248]. C'est une ressource unique pour l'évaluation de l'oxygénation tissulaire et de l'hypoxie au cours de la croissance tumorale et ses données ont contribué fortement à l'invalidation de l'utilisation de la BLI pour l'évaluation de thérapies dans les modèles de cancers présentant une forte hypoxie.

L'échographie et la PA permettent l'obtention d'informations fonctionnelles avec une confrontation en temps réel à des données anatomiques, rendant notamment possible la mise en évidence de l'effet d'un traitement sur des tumeurs hypoxiques. Ces modalités sont donc précieuses pour l'évaluation de thérapies ciblant l'hypoxie tumorale ou de prodrogues ne devenant actives qu'au niveau du cœur hypoxique tumoral. Dans de telles circonstances, l'évaluation préclinique par imagerie multimodale de nouvelles thérapies ciblées ou prodrogues à demi-vie améliorée est tout à fait d'intérêt pour optimiser l'efficacité des systèmes de délivrance des médicaments.

Une limite actuellement importante de l'imagerie PA est le manque d'agents de contraste dédiés commercialement disponibles. De nombreuses équipes de recherche travaillent sur le développement de fluorochromes permettant une détection améliorée. Certains fluorochromes ont déjà été identifiés comme étant de potentiels agents de contraste PA, néanmoins l'utilisation *in vivo* de ces agents et leur détection sont plus délicates du fait de la faible sensibilité de la PA comparativement à la NIRF. Il est donc beaucoup plus difficile

de pouvoir détecter l'accumulation d'une sonde ciblée au sein des tissus d'intérêts, où le facteur de concentration supplémentaire requis pour atteindre la limite de détection devient peu réaliste. De plus, la limite à l'utilisation de certains fluorochromes réside dans leur propension à se dégrader à cause de leur photosensibilité lorsqu'ils sont irradiés par la lumière pulsée du laser, réduisant ainsi leur capacité à être excités ^[345]. Dans de futures expérimentations, il pourrait être intéressant d'utiliser le Black Hole Quencher 3 (BHQ3, Biosearch Technologies Inc.) qui est un fluorochrome commercialisé possédant un meilleur rendement que celui de l'AF750 pour l'imagerie PA ^[331]. Un autre point important à soulever ici concerne la toxicité des agents de contraste PA. En général, les nanoparticules de taille supérieure à 2nm qui sont utilisées à concentration modérée, et recouvertes d'une couche biocompatible (PEG par exemple), n'induisent pas de cytotoxicité. Cependant, comme ces agents de contraste contiennent des métaux lourds, leur sécurité à long terme reste préoccupante. Les nanoparticules de taille supérieure à 5nm s'accumulent dans le foie et dans la rate. A l'inverse, les nanoparticules inférieures à 5nm sont très rapidement éliminées par clairance rénale, et n'ont que très peu de chance d'atteindre leur cible ^[250]. La toxicité des nanoparticules peut avoir de multiples origines et elle est majoritairement due à leur accumulation intra-cellulaire où les particules risquent de provoquer des perturbations de l'immunité, ou des dérégulations de facteurs de transcription ^[346].

La micro-biodistribution d'agents de contraste est un domaine d'application très prometteur pour l'imagerie PA, puisque c'est pratiquement la seule technique ayant le potentiel d'une imagerie moléculaire à haute résolution. Certains de nos résultats préliminaires confirment ce fort potentiel de l'imagerie PA à pouvoir détecter la micro-biodistribution d'un Ac marqué à l'intérieur d'une tumeur, tout en restant vigilant quant à l'agent de contraste à utiliser (particulièrement lorsque l'on utilise des doses traceuses d'anticorps marqués comme agent d'imagerie moléculaire ne devant pas avoir d'impact immuno-pharmacologique sur sa cible tumorale). Nous avons pu par exemple comparer la micro-biodistribution de l'Ac cetuximab marqué à l'ICG à des données provenant du Power-Doppler, Oxy-Hemo et des acquisitions de contraste (Figure 126). D'autres équipes s'intéressent à la détection en PA d'anticorps (marqués par des agents de contraste) ciblant les cellules tumorales ^[347]. Nous sommes actuellement en train de réaliser des validations sur l'utilisation du cetuximab marqué par l'IR-Dye800, un fluorochrome NIRF plus prometteur pour des investigations PA, particulièrement pour l'évaluation de l'expression de l'EGFR au sein des tumeurs.

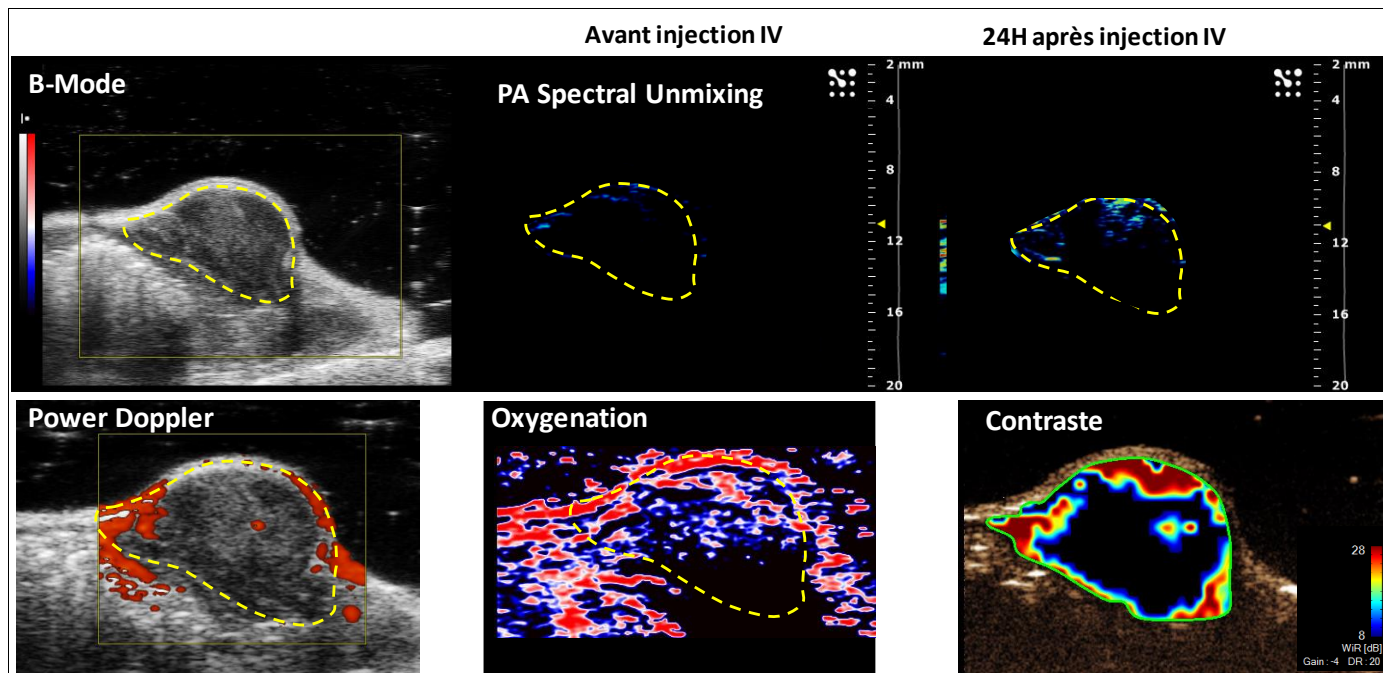


Figure 126 : Suivi de la micro-Biodistribution intra-tumorale. Micro-biodistribution de l'Ac cetuximab marqué à l'ICG. Aucun signal détecté avant injection. Faible signal spécifique 24H post injection IV. Images Power Doppler, OxyHemo et Contraste correspondantes (CIPA 2016).

Améliorations de la plateforme :

D'après les données de la littérature, la plateforme intégrée que nous avons mise en œuvre est la première à ce jour qui associe à ce jour ces 4 modalités d'imagerie.

La limite principale actuelle de l'imagerie biophotonique intégrée est la quantification des signaux. Concernant la BLI, une validation des quantifications par utilisation de sources de lumière calibrées associées à un post-traitement des images a été nécessaire pour obtenir des facteurs correctifs applicables à chaque type d'étude (en particulier concernant la distance entre la caméra et le sujet). Ces facteurs permettront de convertir des données acquises en nombre d'électrons en un débit de photons collectés sur le capteur (en photons/seconde). Dans un second temps, l'implantation dans différents organes ou territoires représentatifs des protocoles d'études chez la souris, de picoleds émettant dans le rouge et calibrées en photons/seconde permettra de corriger les intensités de lumière mesurées de l'absorption et de la diffusion *in vivo*. Pour la quantification des images de fluorescence, le problème initial résidait dans l'illumination de l'animal. En effet, la source de lumière excitatrice utilisée auparavant était placée sur le côté de la caméra. Le facteur très important qui rentrait en jeu concernant la possibilité de correction des signaux, était l'angle solide entre la source de lumière et le détecteur entraînant une illumination non-homogène des animaux. Nous avons donc amélioré le système d'illumination des animaux en utilisant un dispositif circulaire co-axial d'illumination qui va permettre une quantification

relative (Figure 76). De futurs développements s'intéresseront à la quantification de ces signaux.

Nous avons donc été en mesure d'utiliser notre source de lumière blanche filtrée, mais également d'exploiter la lumière laser mono-longueur d'onde provenant du système Vevo® LAZR, grâce à l'utilisation d'une fibre optique en silice fondue (permettant de résister à l'échauffement provoqué par le laser pulsé >680nm) munie d'un connecteur compatible avec les deux systèmes d'illumination. Ainsi, nous n'aurons plus besoin d'utiliser de filtres pour l'excitation et utiliserons une lumière excitatrice plus favorable à un spectre d'émission moins riche en composantes variantes (bruit de fond d'autofluorescence, ...).

De plus, lorsque l'imagerie est réalisée pour des fluorochromes absorbant vers de plus grandes longueurs d'onde, on se retrouve face à des limites technologiques. Le rendement des sources de lumière est plus faible, le rendement quantique de fluorescence ainsi que le rendement de détection par les caméras sont diminués (Figure 127). Par exemple, entre des fluorochromes absorbant à 680nm et à 750nm, il y a une perte de près de 20 à 30 fois du rendement final de fluorescence. Même si l'autofluorescence tissulaire est plus faible qu'à 680nm, il est plus difficile de détecter des fluorochromes à 750nm et au-delà. L'utilisation de la puissante lumière pulsée du laser du système Vevo® LAZR, permettra de s'affranchir de certaines de ces limites pour la détection de fluorochromes absorbant aux alentours des 750nm.

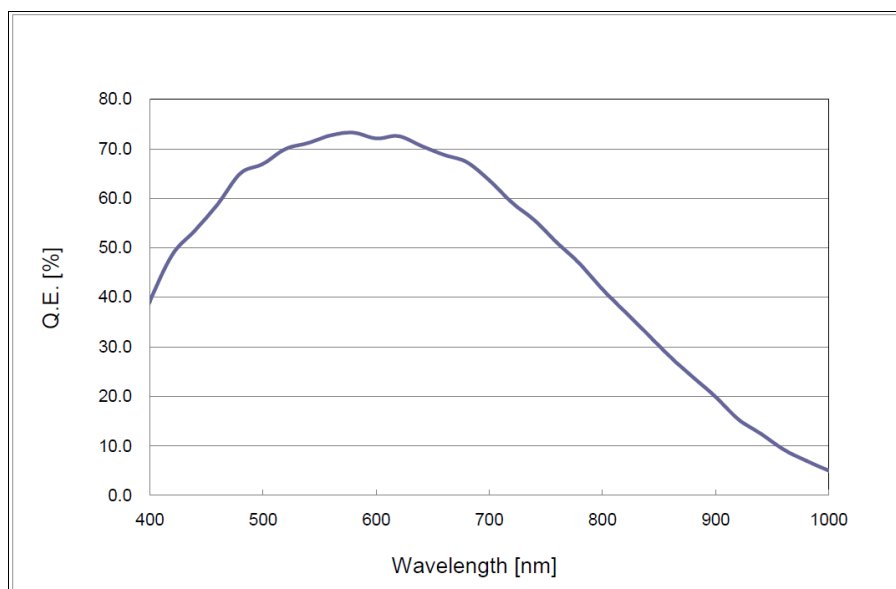


Figure 127 : Efficacité quantique de la caméra CMOS ORCA-Flash4.0 LT C11440-42U. L'efficacité quantique correspond au rapport entre la quantité de charges électroniques collectées et la quantité de photons incidents sur le capteur (Hamamatsu Photonics).

Nous pourrions également envisager de synchroniser les acquisitions faites par la caméra

sur la respiration (à partir de signaux provenant des électrodes connectées au lit thermostaté de la station Vevo®) des animaux grâce aux connecteurs de triggering/synchronisation existants sur la caméra. Cela permettrait, pour des localisations particulières telles que le foie, les poumons et le cœur, de s'affranchir des mouvements de la cage thoracique des animaux et ainsi de préserver la résolution des images. La mise en œuvre d'objectifs optimisés pour les infrarouges supérieurs à 700nm est une piste d'amélioration possible de la résolution et de la sensibilité mais avec un rapport amélioration des performances/coût qui reste encore incertain. L'utilisation d'objectifs avec des distances focales plus courtes permettrait de positionner la caméra plus proche de l'organe d'intérêt et, dans une première approche, d'obtenir ainsi une amélioration de la résolution et de la sensibilité de détection.

Après une primo-détection par imagerie optique, il sera possible pour de futures études de réaliser un suivi longitudinal individuel du développement de métastases à partir de la tumeur primaire. Nous pourrions ainsi documenter de nombreux paramètres biologiques concernant la formation et le développement de ces métastases. Nous avons déjà utilisé la plateforme intégrée pour le suivi du développement tumoral d'un modèle orthotopique de tumeurs pulmonaires humaines NCI-H460 [298], et avons documenté l'apparition et suivi le développement des métastases à partir de la tumeur primaire grâce à la haute sensibilité de la BLI.

Il serait également avantageux de pouvoir s'intéresser aux cinétiques de BLI de ces métastases, et d'apprécier le décalage entre l'apparition des signaux de BLI en fonction de la localisation de chaque métastase par rapport à la tumeur primaire (Figure 128). En effet, nous avons pu observer, pour certains des animaux qui présentaient des métastases, que le signal de BLI apparaît en décalé par rapport au signal de la tumeur primaire. Ces données permettraient ainsi de pouvoir obtenir des informations sur la cinétique de diffusion de la luciférine au niveau des métastases et d'optimiser les temps d'imagerie afin de ne pas « passer à côté » de métastases, qui est directement influencée par la perfusion de la métastase et des caractéristiques de son microenvironnement (diffusion).

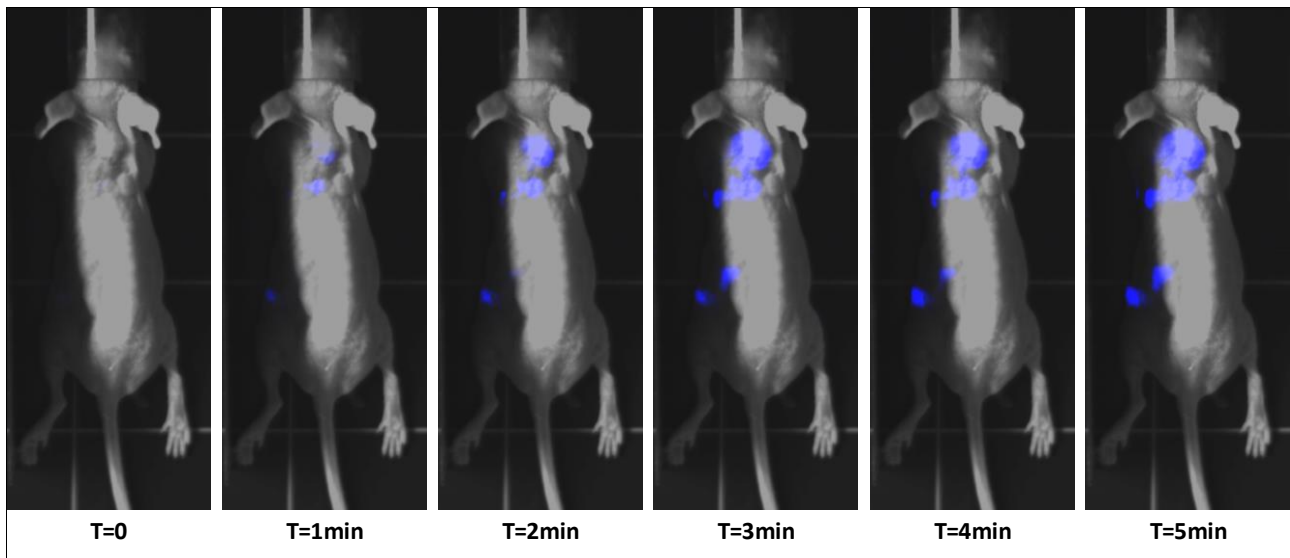


Figure 128 : Cinétique de bioluminescence d'un modèle de métastase spontanée à partir d'une tumeur orthotopique pulmonaire NCI-H460. La tumeur primaire étant très hypoxique, aucun signal provenant de cette tumeur n'a pu être détecté (CIPA 2016).

Un autre type d'application de la plateforme intégrée pour la recherche en oncologie consiste en l'imagerie *ex vivo* de tissus prélevés. Des travaux de Sun et al. ont déjà rapporté des examens *ex vivo* par NIRF/Échographie/PA [348]. Nous décrivons en 3.1.3 la mise en œuvre de la plateforme pour l'examen direct de tumeurs excisées et de ganglions sentinelles pour l'identification des marges et l'évaluation de l'invasion tumorale.

Des approches multimodales pour des études mécanistiques pourraient également être envisagées, particulièrement chez des animaux transgéniques exprimant des gènes rapporteurs spécifiques pour l'étude du développement tumoral et de l'expression de protéines particulières [349].

Des pistes pour l'amélioration du procédé de détection des signaux PA sont actuellement explorées sur le système Vevo®, comme par exemple l'utilisation d'un bras rotationnel sur lequel est fixée la sonde. De cette manière, il serait possible de réaliser de la pseudo-tomographie à l'acquisition, puis avec un traitement d'image, permettre l'amélioration de la détection des signaux profonds [350].

Modèles tumoraux :

Pour l'étude *in vivo* de la Prodrogue 1, nous avons tout d'abord considéré une stratégie d'évaluation mécanistique de libération de la MMAE, par rapport à d'autres constructions moléculaires synthétisées par l'équipe du Pr S. Papot, et à la molécule cytotoxique parentale sous sa forme libre, le tout à quantité de MMAE équivalente et avec un schéma thérapeutique identique [319]. Les doses administrées des différentes formulations ont été

déterminées grâce aux résultats *in vitro* et *in vivo* préalablement obtenus sur le modèle KB greffé en sous-cutané (protocoles réalisés à l'IC2MP et au CIPA). Les résultats ont montré la supériorité de la Prodrogue 1 à libérer de la MMAE au niveau tumoral.

Nous avons ensuite considéré une stratégie d'évaluation d'efficacité du composé d'intérêt, la Prodrogue 1, sur 3 modèles orthotopiques de cancers humains chez la souris, à des doses de Prodrogue 1 proches de la DMT.

Ces modèles ont été sélectionnés pour leur pertinence par rapport à la clinique, compte tenu de leurs caractéristiques génétiques, leur mauvais pronostic ou vis-à-vis de leur résistance aux traitements.

Parmi les lignées cellulaires disponibles, la lignée MIA-PaCa2 (adénocarcinome ductal pancréatique humain), représentative de 80% des cancers pancréatiques est apparue particulièrement bien adaptée pour nos investigations [351]. La lignée MDA-MB-231 (adénocarcinome mammaire humain), était un modèle de cancer du sein triple négatif (HER2, récepteurs à la progestérone, récepteurs aux estrogènes) de mauvais pronostic pour les patientes. La lignée NCI-H460 (carcinome pulmonaire non à petites cellules) représente environ 80% des tumeurs pulmonaires et est un cancer au pronostic sombre. Ces trois modèles présentaient tous, de plus, un statut hypoxique caractérisé par imagerie PA et confirmé par la méthode de référence en immuno-fluorescence avec marquages des plages hypoxiques au pimonidazole pour les modèles MIA-PaCa2 et MDA-MB-231 [294].

Efficacité de la prodrogue :

La Prodrogue 1 est un composé thérapeutique contenant un agent cytotoxique très puissant sous sa forme inactive, la MMAE. Une fois injectée par voie IV, elle se lie de manière covalente à l'albumine plasmatique et est transportée jusque dans le microenvironnement tumoral. La libération de l'agent cytotoxique est conditionnée à la présence de l'enzyme β -glucuronidase, qui va entraîner un relargage sélectif de MMAE dans le microenvironnement tumoral.

Les études présentées ci-avant démontrent que la Prodrogue 1 est significativement efficace sur ces différents modèles de tumeurs hypoxiques, comparé aux groupes traités par l'agent cytotoxique parental libre (MMAE) et le groupe témoin. Ces études montrent également que, comparé aux Prodrogues 2 et 3, le système de libération de la Prodrogue 1 est meilleur, du point de vue de la quantité de MMAE effectivement libérée au niveau de la tumeur dans les conditions expérimentales testées.

Cette prodrogue offre des perspectives très intéressantes pour le traitement des tumeurs par chimiothérapie tout en épargnant les tissus sains. La vectorisation d'agents anticancéreux apparaît comme la stratégie reconnue comme étant la plus susceptible d'améliorer significativement l'efficacité des chimiothérapies. De plus, étant donné l'effet critique de l'hypoxie sur la chimiosensibilité des traitements, l'utilisation de modèles de cancers hypoxiques caractérisés devrait offrir une meilleure prédictivité pour une translation vers la recherche clinique. L'imagerie PA couplée avec les mesures haute résolution de l'échographie permet une évaluation pertinente des effets des traitements sur des modèles hypoxiques de cancers humains. Ce travail a d'ailleurs fait l'objet d'une publication qui a été soumise (Annexe 8).

Conclusion :

Nos résultats ont confirmé la capacité de cette nouvelle plateforme intégrée d'imagerie pour détecter des signaux BLI et NIRF dans un premier temps, puis acquérir l'échographie et la PA dans un second temps. Cette stratégie ouvre de nouvelles perspectives pour des applications biologiques, surtout si l'on prend en compte les connexions qui existent entre l'hypoxie et la néoangiogenèse. Cette approche multimodale permet une confrontation unique d'informations fournies par l'échographie et la PA (B-Mode 3D ou 2D, Power Doppler, Contraste, PA-Modes, PA spectral unmixing) avec une multitude de biomarqueurs NIRF disponibles (intégrines, anhydrase carbonique IX, sondes activables...), comme une alternative aux examens par les technologies irradiantes.

Parce que l'angiogenèse est une des caractéristiques importantes du cancer [3], cette plateforme ouvre de nouvelles perspectives d'applications biologiques pour l'étude et le suivi dans le temps du développement angiogénique. De plus le statut hypoxique, le métabolisme tumoral, l'apoptose, l'expression génique ainsi que les paramètres liés au microenvironnement tumoral peuvent être monitorés de manière longitudinale en suivant une procédure optimisée en fonction de l'objectif.

Ainsi dans le modèle tumoral KB très hypoxique, le suivi de paramètres perfusionnels a permis de mettre en évidence des effets discrets de la prodrogue en complément de son activité antitumorale intrinsèque.

Par conséquent, cette approche intéressante apporte de nouvelles ressources quant à l'évaluation de thérapies anticancéreuses dans des modèles hypoxiques de cancers et de particulièrement dans des modèles bien établis et connus pour leur résistance aux chimiothérapies et radiothérapies. Considérant l'effet primordial de l'hypoxie sur la

sensibilité des cellules cancéreuses envers les traitements, l'utilisation de modèles hypoxiques devrait contribuer à une meilleure prédictibilité pour la translation vers des phases de recherche clinique. De futures études pourraient s'intéresser par exemple à l'efficacité de la Prodrogue 1 en combinaison avec un traitement par radiothérapie.

Nous avons également eu l'opportunité de réaliser une étude par imagerie multimodale sur le modèle orthotopique de tumeurs pulmonaires NCI-H460 (Figure 129). Dans ces travaux, nous avons comparé l'imagerie du métabolisme glucidique par le ^{18}F -FDG, à l'imagerie BLI de prolifération, ainsi qu'à l'imagerie anatomique par TDM-X, et à l'imagerie de la SO_2 par PA. Nous avons également corrélé ces données à des marquages immunohistologiques au pimonidazole afin de valider nos résultats. Ces travaux ont eu pour but de monitorer l'accumulation de ^{18}F -FDG au sein des tumeurs et d'en apprécier l'hétérogénéité, en le comparant à la mesure de SO_2 par PA afin de corréler les données avec la diminution des signaux de BLI au cours du temps. Les résultats sont actuellement en cours d'analyse.

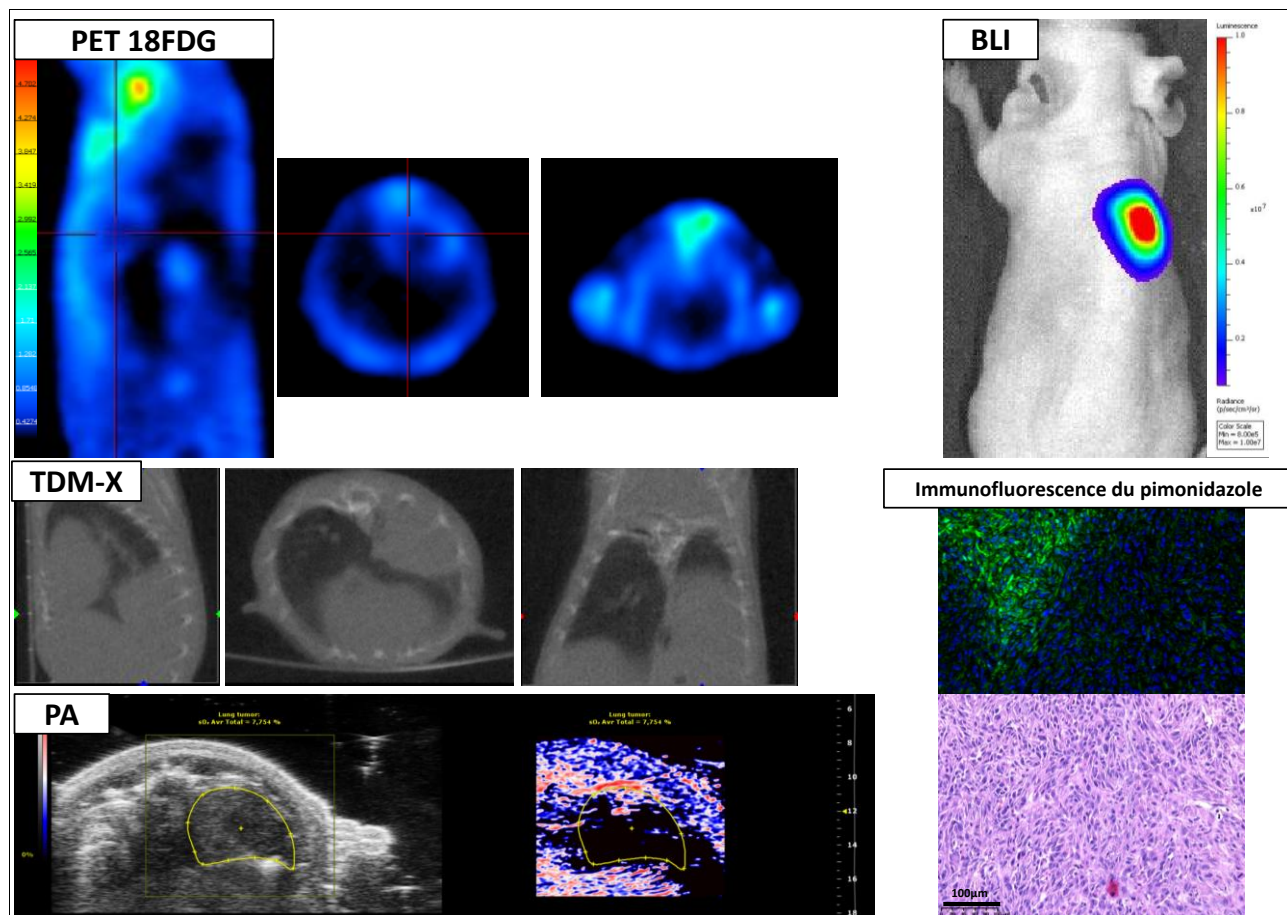


Figure 129 : Imagerie multimodale de tumeurs orthotopiques pulmonaires NCI-H460 chez la souris (CIPA 2016).

Partie 3

Autres contributions en imagerie Photoacoustique pour la recherche biomédicale

3. AUTRES CONTRIBUTIONS EN IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE POUR LA RECHERCHE BIOMEDICALE

3.1. Le ganglion sentinelle

3.1.1. La place du ganglion sentinelle en pratique clinique

En cancérologie, l'étude du premier ganglion de drainage lymphatique d'une tumeur également appelé « ganglion sentinelle », est une démarche qui s'est fortement développée, jusqu'à devenir une étape de routine en onco-chirurgie pour certains types de cancers. En effet, quand un cancer se développe, une ou plusieurs cellules tumorales peuvent passer dans la circulation lymphatique, et risquent d'envahir et de se multiplier dans ce ganglion, puis de se disséminer dans le système lymphatique, pour atteindre d'autres ganglions et d'autres sites propices au développement de métastases. L'intérêt d'explorer le ganglion sentinelle (GS) est d'obtenir des informations sur le degré d'envahissement tumoral [352], car l'invasion du GS par des cellules métastatiques est un facteur pronostique majeur pour les patients ayant une tumeur maligne d'origine épithéliale [353].

La recherche du ganglion sentinelle est réalisée en routine majoritairement dans les cas de cancers du sein. Cependant un consensus international vise à appliquer et à considérer cette recherche du ganglion sentinelle pour les cancers gastriques [354,355], du col de l'utérus, de la tête et du cou [356] et pour les mélanomes [352]. L'identification de la localisation de ces ganglions est donc de plus en plus en vue, afin de pouvoir retirer chirurgicalement ces ganglions, et ainsi limiter la progression des cellules cancéreuses par voie lymphatique. Les approches par imagerie pourraient fournir des informations sur le statut d'envahissement tumoral plus rapidement que les techniques anatomopathologiques.

Dans la pratique clinique, deux méthodes d'identification de ces ganglions sentinelles sont utilisées, le plus souvent conjointement (Figure 130) :

- La méthode isotopique, grâce à l'injection au niveau de la tumeur d'un produit appelé traceur radioactif, qui va être filtré par le ou les ganglions sentinelles. Le chirurgien dispose alors d'une sonde de détection de photons gamma au bloc opératoire pour le repérer et le retirer.
- La méthode colorimétrique, grâce à l'injection, au même endroit que le traceur radioactif, d'un colorant bleu qui suivra le même chemin (Bleu Patenté V Guerbet ou Bleu de méthylène), rendant ainsi plus facile son identification visuelle.

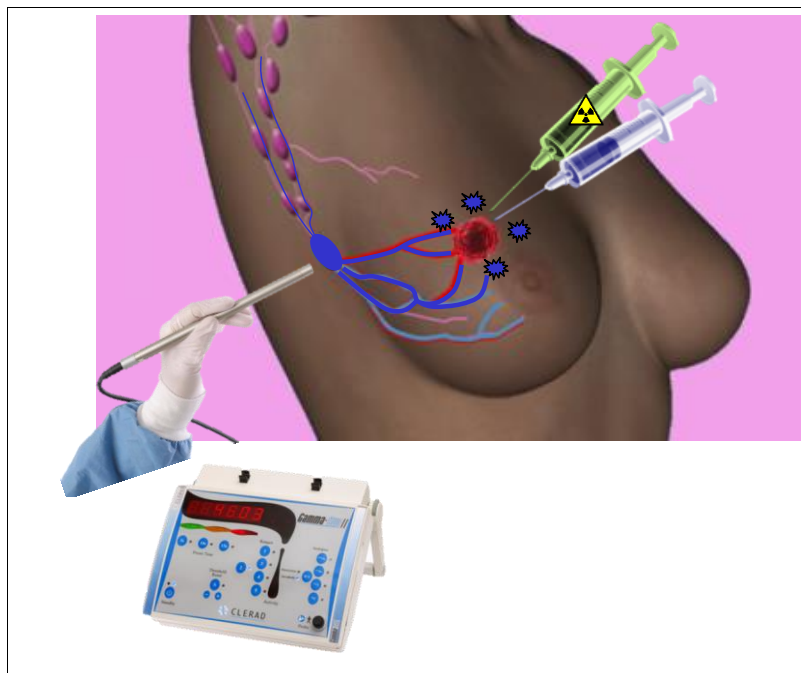


Figure 130 : Détection d'un ganglion sentinelle de cancer du sein. Injection d'un traceur radio-marqué et d'un colorant bleu en 4 points autour de la tumeur. Détection du signal radioactif à l'aide d'une sonde de détection peropératoire de photons gamma. (CIPA 2016).

Dans la pratique clinique, l'examen anatomopathologique des ganglions prélevés lors de la chirurgie reste la technique de référence pour la confirmation du statut cancéreux. A l'exception des tests de biologie moléculaire rapides et coûteux, comme l'OSNA (OneStep Nucleic Acid Amplification) [357,358], les examens anatomopathologiques de routine nécessitent 4 à 7 jours pour détecter et identifier avec certitude un faible envahissement, et ne permet donc pas une évaluation rapide du devenir chirurgical [359]. L'OSNA est une méthode de diagnostic moléculaire qui permet des mesures quantitatives de l'ARNm de la cytokératine 19 (un biomarqueur tumoral du cancer du sein), en seulement 30minutes. La micro-invasion des GS chez les patients est relativement rare [360,361], et la prise en charge des GS positifs dans le cancer du sein est actuellement revisitée. L'analyse anatomopathologique réalisée *a posteriori* sur le ganglion sentinelle conditionne la résection de toute la chaîne ganglionnaire correspondante. Si le GS est envahi par des cellules tumorales, les ganglions suivants seront alors retirés. Si le GS n'est pas atteint, le chirurgien laissera en place la chaîne ganglionnaire correspondante en place. Ainsi, cette recherche du ganglion sentinelle permet d'éviter de retirer d'emblée la chaîne ganglionnaire concernée, et ainsi d'éviter de lourds effets secondaires.

Cas particulier de la prise en charge du ganglion sentinelle du cancer du sein :

Prise en charge actuelle au niveau international :

Le prélèvement du ganglion sentinelle est la prise en charge la plus ancienne impliquant les ganglions lymphatiques dans le cancer du sein. La résection des chaînes ganglionnaires mammaires internes envahies reste associée à un pronostic sombre et une morbidité augmentée [362].

La biopsie du ganglion sentinelle est devenue une technique standardisée dans le cas de cancers à des stades précoces. Elle implique les premiers ganglions de drainage du sein, et non la chaîne entière [363-365]. La morbidité dans la prise en charge de l'aire axillaire, particulièrement le lymphœdème ainsi que les troubles neurologiques de la ceinture de l'épaule, a été améliorée depuis leur mise en place [366].

Le développement des analyses histologiques et moléculaires du ganglion par immunofluorescence et par PCR (Polymerase Chain Reaction) a permis la classification de l'implication des GS dans la pathologie métastatique, conformément à la présence de cellules isolées, de micro- ou de macro-métastases [367].

Enfin, la radiothérapie a été montrée comme provocatrice de lymphoedème. Elle est indiquée dans tous les stades impliquant des GS axillaires, supra-claviculaires et internes [368].

Controverses soulevées dans la prise en charge du GS axillaire :

L'essai clinique ACOSOG Z0011 a marqué un tournant dans la prise en charge du GS axillaire. Cet essai randomisé a inclus 800 patientes dans 2 bras d'étude. Toutes les patientes présentaient un GS positif à la coloration Hématoxyline/Eosine. Le premier bras a subi une résection des GS axillaires, tandis que l'autre non. Les résultats n'ont pas montré de différences significatives dans la survie et la récurrence locale après 6 ans de suivi [369], ce qui suggère que l'apport de la résection des chaînes ganglionnaires n'apporte pas de gain en termes de survie chez ces patientes.

Des résultats similaires ont été montrés pour les métastases des GS micro-envahis évalués en immuno-histochimie, par la présence de cellules tumorales isolées [367,370-372]. Ces résultats sont à l'origine de la controverse sur le choix ou non du curage axillaire après une atteinte des ganglions lymphatiques.

Choix de l'imagerie axillaire du ganglion sentinelle :

La biopsie du GS peut prévenir des complications de la résection. Cependant, il est question ici d'une alternative à la chirurgie pour la démarche thérapeutique en cas de GS

envahi. La comparaison entre la radiothérapie externe et la résection axillaire après une positivité du GS par biopsie, a montré une équivalence en termes de récurrence locale ainsi qu'une supériorité de la radiothérapie qui provoque moins de lymphœdèmes que le curage axillaire [368,373], ce qui suggère qu'il est préférable pour les patientes de ne recevoir que de la radiothérapie lorsqu'elles présentent des micro-métastases ganglionnaires.

Diagnostic et perspectives dans la prise en charge du GS axillaire :

L'imagerie conventionnelle de l'aire axillaire est basée sur la mammographie, l'échographie et l'IRM. Le stade précoce d'envahissement est habituellement évalué par mammographie et/ou l'échographie. L'IRM permet de raffiner l'exploration nodale et d'optimiser l'échographie et l'histologie [374]. La mammoscintigraphie par administration IV du ^{99m}Tc-MIBI (marqueur cellulaire de l'activité mitochondriale couplé au ^{99m}Technétium), tout comme la Mammographie d'Emission de Positons (PEM) après administration IV de ¹⁸F-FDG, offrent cependant la perspective d'une imagerie fonctionnelle pour mettre en évidence les GS de petite taille [375]. Les résultats obtenus en TEP/TDM-X et TEP-IRM sont prometteurs.

La biopsie et la résection des GS sont les techniques de routine actuellement utilisées dans la chirurgie du cancer du sein. De nombreuses innovations sont en cours d'optimisation, en diminuant les prises en charge par le ^{99m}Technétium radioactif, sans pour autant augmenter le risque pour les patientes. Leur contribution est cependant contestée, par des études comme l'ACOSOG Z0011.

En Annexe 9, nous pouvons retrouver le référentiel utilisé pour la prise en charge des cancers du sein et des ganglions sentinelles associés appliqué dans les centres hospitaliers du Grand-Est (Référentiel interrégional de prise en charge du cancer du sein 2014, RRC Grand Est - Référentiel Sein - Décembre 2014).

3.1.2. Contexte des recherches sur le ganglion sentinelle : Partenariat Sénégalais

Ce projet consistant à étudier l'envahissement du ganglion par des cellules tumorales grâce à différentes techniques d'imagerie prend place dans un contexte de partenariat entre le CIPA et le laboratoire de biophysique et de médecine nucléaire de Dakar. Le Professeur Oumar N'Doye, professeur de biophysique et médecine nucléaire co-dirige avec le Docteur Alain Le Pape, la Thèse de Sciences du Docteur Serigne Moussa Badiane, Assistant en Biophysique Médecine Nucléaire à l'UFR des Sciences de la Santé

de Saint Louis au Sénégal. La Thèse de Doctorat en Sciences du Dr Badiane porte sur le développement de stratégies d'imagerie pour la détection de l'envahissement du ganglion sentinelle en oncologie par fluorescence dans le proche infra-rouge.

Ces travaux sont à considérer dans le contexte de la prise en charge des cancers dans un territoire géographique où la disponibilité des ressources d'imagerie et de radiothérapie est relativement limitée. Ils visent donc à fournir des stratégies alternatives à l'utilisation de radio-éléments et de techniques d'anatomopathologie derniers cris. En effet, si les techniques de détection et de prise en charge des envahissements et micro-envahissement ganglionnaires des pays développés sont actuellement en pleine évolution, les stratégies existantes dans les pays moins développés et dans les régions plus isolées restent précaires et la mastectomie avec le plus souvent curage ganglionnaire reste la règle générale. La méthode de recherche du ganglion sentinelle considérée au niveau international comme la référence comporte certaines limites, surtout par son coût d'investissement et d'exploitation, les difficultés d'approvisionnement régulier en radioéléments et toutes les contraintes réglementaires liées à l'utilisation des radio-isotopes. Un des buts de ces travaux est donc de pouvoir proposer une technique de détection simple, rapide et efficace, ne nécessitant ni la mise en œuvre d'équipements lourds, ni l'utilisation de colloïdes technétiés et c'est dans ce contexte que la fluorescence dans le proche infrarouge constitue une alternative particulièrement pertinente.

3.1.2.1. Mise en place des modèles Rongeurs d'envahissement ganglionnaire

Pour le développement de ces modèles, il était nécessaire, pour créer un envahissement tumoral ganglionnaire, de mimer une migration des cellules cancéreuses par voie lymphatique. Dans ce travail, le modèle d'invasion ganglionnaire que nous avons mis en place chez le rat et la souris consistait à injecter des cellules tumorales, sous un très faible volume, dans un territoire de drainage déterminé (espace interdigité du membre antérieur). L'injection de cellules dans ce territoire de drainage permettait aux cellules cancéreuses de migrer passivement (grâce au flux lymphatique existant dans ces territoires), jusque dans un espace où elles sont retenues, à savoir le ganglion (celui servant de filtre vis-à-vis de ces cellules tumorales).

Les systèmes lymphatiques du rat et de la souris étant légèrement différents, nous avons mis en place ce modèle chez ces deux espèces animales, afin de pouvoir notamment pallier les limites de certaines modalités d'imagerie. Le modèle rat présente l'avantage d'être un modèle plus gros, permettant ainsi de se rapprocher de ce qui pourrait être fait chez l'Homme dans une démarche peropératoire (peau plus épaisse, profondeur et taille

des ganglions plus importante). Le développement du modèle de métastase ganglionnaire a donc été initié chez le rat, puis a été transféré chez la souris.

Modèle Rat :

Nos connaissances sur le modèle rat spontanément immunodéprimé (NIH-Nude) nous ont conduits à utiliser un prétraitement des animaux par un agent chimiothérapeutique (busulfan, agent alkylant), afin que leurs défenses immunitaires soient les plus diminuées possibles. L'immunodéficiência de ces rats est plus faible que chez la souris Balb/C nude, et le rejet du greffon est quasi systématique sans irradiation ou pré-traitement immunosuppresseur préalable.

3.1.2.1.1. Matériels et Méthodes - Modèle Rat

Culture cellulaire, animaux et modèle tumoral :

Les lignées de cellules MDA-MB-231-luc ont été cultivées comme décrit en 1.3.1.1. Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1. Au total, 6 rats femelles NIH-Nude ont été suivis de manière longitudinale.

Les cellules MDA-MB-231-luc ont été injectées dans l'espace sous-cutané de la partie distale d'un des membres antérieurs des animaux (2×10^6 cellules / 10 μ L PBS, aiguille 27G, seringue 0,5ml) sur animal anesthésié par isoflurane (2% dans l'air) et placé sur un lit chauffant à 37°C (Figure 131).

Protocole :

Afin de monitorer le développement de la tumeur au niveau ganglionnaire de manière longitudinale, nous avons suivi les animaux par BLI, 3 fois par semaine pendant 3 semaines. Le développement tumoral pouvait être suivi dès J3.

Il est nécessaire de réaliser un prétraitement unique au busulfan des rats 3 jours avant l'induction des tumeurs. Les effets du busulfan chez le rongeur conduisent à une immunodépression, l'activité pharmacologique ne s'exerçant que sur la moelle osseuse. La dose utilisée était de 10 mg/kg sous un volume final de 1mL par injection intrapéritonéale unique.

Le contrôle du développement tumoral a été réalisé par imagerie de bioluminescence selon la procédure décrite en 1.4.1.1.

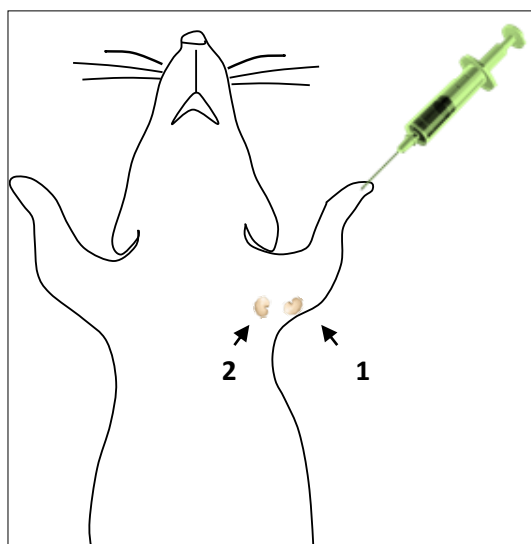


Figure 131 : Schéma représentatif de la procédure d'injection des cellules tumorales. Les cellules vont ensuite migrer jusqu'au ganglion axillaire (1) et/ou au ganglion brachial (2) (CIPA 2016).

3.1.2.1.2. Résultats - Modèle Rat

Une fois retenues au niveau du filtre ganglionnaire, les cellules tumorales se développaient dans ce ganglion, présentant alors les mêmes caractéristiques (du point de vue de l'invasion) qu'un ganglion sentinelle envahi chez l'homme. Ce modèle possédait l'avantage d'être relativement simple de mise en œuvre chez l'animal. Il a permis d'éviter d'induire une tumeur primaire chez l'animal, puis d'attendre que des métastases spontanées viennent envahir elles-mêmes un territoire ganglionnaire, ce qui nécessite habituellement une résection chirurgicale à un stade avancé de la tumeur primaire. Même si lors de l'induction de tumeurs mammaires chez l'animal, il existe un développement spontané de métastases ganglionnaires, celui-ci apparaît tardivement (à partir de 50 jours et plus) et a été bien documenté. Le point négatif de ce type de modèle est qu'il faut attendre que la tumeur se développe jusqu'à un stade proche du point limite, pour pouvoir observer une migration lymphatique et une accumulation ganglionnaire de cellules cancéreuses.

Nous avons donc obtenu grâce à cette procédure, une croissance cellulaire et tumorale satisfaisante au niveau ganglionnaire chez les animaux induits. Comme nous pouvons le voir en Figure 132, les cellules ont envahi aussi bien le ganglion axillaire que le ganglion brachial. Nous pouvons également noter un signal BLI provenant du membre antérieur gauche de l'animal. En effet, lorsque les cellules sont implantées au niveau palmaire, la croissance tumorale se fait également au site d'injection, et il est nécessaire de masquer

le site d'injection par du ruban adhésif noir, opaque aux photons, pour éviter de saturer la caméra lors de l'examen de foyers bioluminescents très discrets au niveau des ganglions.

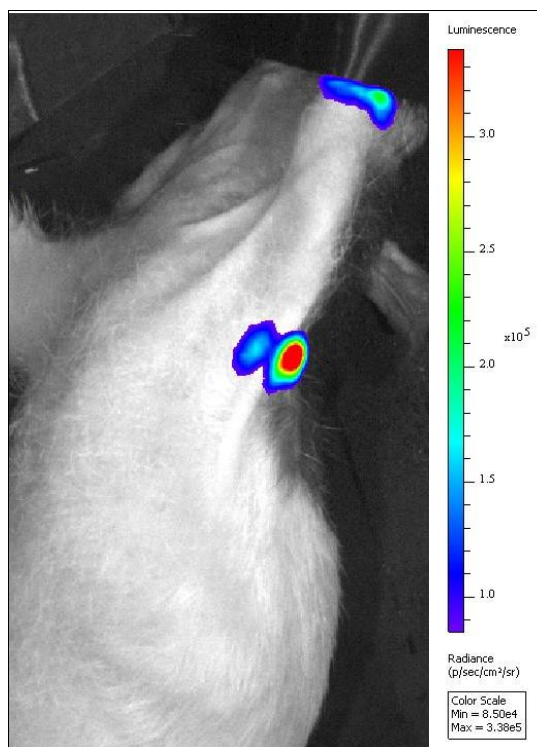


Figure 132 : Détection par BLI des cellules tumorales MDA-MB-231 au niveau du ganglion axillaire chez le rat. Les deux ganglions (axillaire et brachial) sont envahis (CIPA 2016).

Comme un foyer tumoral se développe également au point d'injection (espace interdigité du membre antérieur), il existe une perturbation locale du drainage lymphatique. Il était donc nécessaire d'administrer la luciférine en injection intrapéritonéale (IP) plutôt qu'en interdigité.

Modèle Souris :

3.1.2.1.3. Matériels et Méthodes - Modèle Souris

La même procédure que celle mise en œuvre chez le rat a été appliquée chez la souris immunodéprimée pour qui il n'est en revanche pas nécessaire de réaliser le pré-traitement au busulfan car leur statut d'immunodéficience est suffisamment important pour la prise de la xénogreffe.

Culture cellulaire, animaux et modèle tumoral :

Les cellules MDA-MB-231 ont été cultivées comme décrit en 1.3.1.1. Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1. Au total, 6 souris Balb/C Nude femelles ont été suivies de manière longitudinale.

Les cellules MDA-MB-231 ont été injectées dans l'espace sous-cutané de la partie distale d'un des membres antérieurs des animaux (2×10^6 cellules / 10 μ L PBS, aiguille 27G, seringue 0,5ml) sur animal anesthésié par isoflurane (2% dans l'air) et placé sur un lit chauffant à 37°C (Figure 131).

Protocole :

Afin de monitorer le développement de la tumeur au niveau ganglionnaire de manière longitudinale, nous avons suivi les animaux par BLI, 2 fois par semaine pendant 4 semaines. Le développement tumoral pouvait être suivi dès J3.

Sur ce modèle nous avons également recherché la présence des cellules tumorales par imagerie de fluorescence après injection IV d'IntegriSense[®]680 (100 μ L, 2nmol) ciblant les intégrines tumorales.

Une procédure de « spectral unmixing » a été appliquée lors des acquisitions de NIRF afin de retirer l'autofluorescence des tissus.

Sacrifice et prélèvement des organes :

Les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale sous anesthésie, et les ganglions ont été prélevés chez chaque animal pour des mesures *ex vivo* réalisées extemporanément.

3.1.2.1.4. Résultats - Modèle Souris

Sur le modèle souris, nous avons également pu mettre en évidence la croissance de cellules tumorales au niveau ganglionnaire. En Figure 133, nous pouvons observer l'image correspondante (A), après prélèvement (B), des signaux BLI et NIRF provenant des cellules dans le ganglion envahi.

Quand on compare les signaux de fluorescence des ganglions sains par rapport au ganglion envahi, on observe nettement la différence de taille et de signal sur le ganglion envahi. Après « spectral unmixing », nous n'obtenons plus que le signal spécifique de la sonde IntegriSense[®] provenant du ganglion envahi (D).

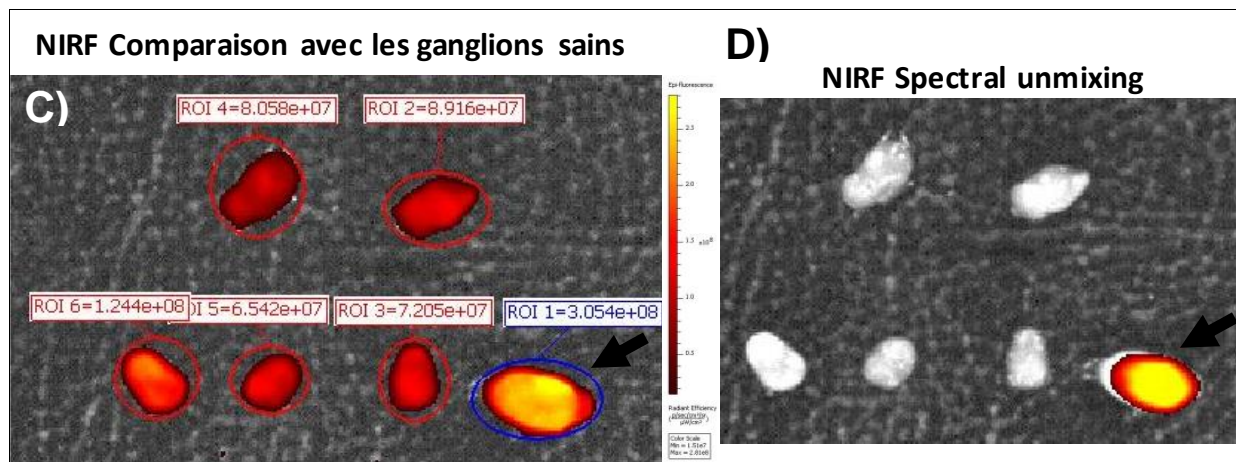
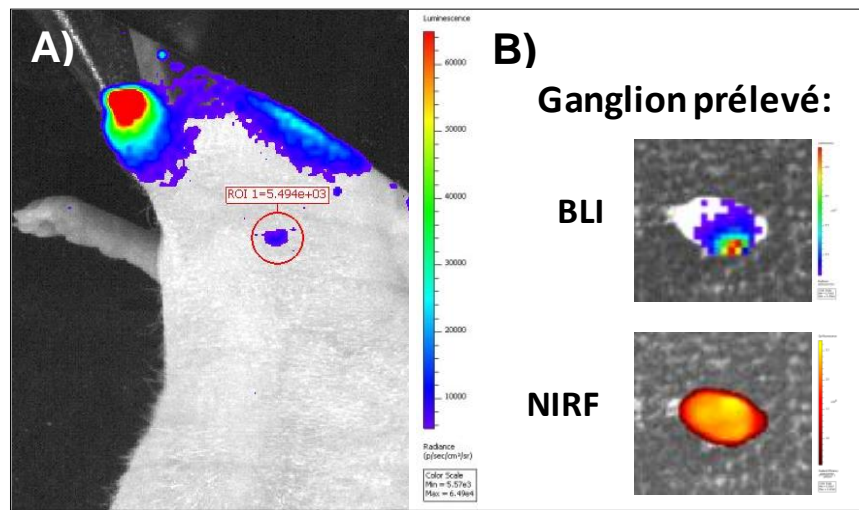


Figure 133 : Détection des cellules tumorales MDA-MB-231 au niveau du ganglion axillaire chez la souris. A) & B) Détection des cellules présentes dans le ganglion par BLI. Détection du signal de fluorescence sur le même ganglion. C) Comparaison des signaux de fluorescence du ganglion envahi par rapport aux autres ganglions sains. D) Séparation du signal spécifique de l'IntegriSense® par rapport au signal d'autofluorescence tissulaire (CIPA 2016).

Après la mise au point des modèles, nous nous sommes intéressés à la dynamique du flux lymphatique.

3.1.2.2. Etude de lymphographie dynamique - rationnel

Un examen de lymphographie permet d'obtenir des informations sur le flux lymphatique. Il consiste en l'injection d'un agent de contraste dans un territoire de drainage lymphatique, afin de suivre la migration de celui-ci grâce à une modalité d'imagerie.

Ainsi, ce type d'examen devrait également permettre d'évaluer le temps de migration des composés et d'estimer si l'envahissement perturbe le drainage lymphatique. En pratique clinique, la lymphographie (injection de colorant bleu pour identification d'un vaisseau lymphatique, puis injection d'un produit de contraste iodé pour une imagerie par TDM-X, ou injection de nanocolloïdes marqués au ^{99m}Tc suivi d'une imagerie TEMP) permet de

réaliser la cartographie des GS de chaque tumeur, lorsque les patients présentent plusieurs foyers tumoraux [376].

Dans beaucoup de cas, les informations apportées par le flux lymphatique ont été utiles pour l'évaluation du GS [377]. Il est parfois même nécessaire d'utiliser des images dynamiques en plus des observations dans l'évaluation des GS [378].

Pour cette partie expérimentale qui visait à détecter les GS par imagerie photoacoustique et fluorescence, il fallait sélectionner un agent de contraste détectable par ces 2 modalités afin de répondre à nos objectifs.

L'intérêt en imagerie optique dans le proche infrarouge de la fluorescence pour l'ICG en tant qu'agent de contraste, a grandi ces dernières années. L'ICG est un fluorochrome approuvé par les autorités de sûreté du médicament pour des applications cliniques. Il est notamment utilisé pour la détection des ganglions sentinelles de cancers du sein et ses applications cliniques se sont élargies à d'autres domaines, y compris à l'imagerie photoacoustique [379].

L'ICG libre et non-ciblé, en solution aqueuse, est instable. Il ne peut être préparé qu'exclusivement en solution de glucose à 5% pour des raisons de solubilisation et être préparé extemporanément car la fluorescence se trouve considérablement réduite avec le temps. L'ICG est également sujet au phénomène de quenching de fluorescence, il est donc primordial de ne pas utiliser de solutions trop concentrées afin d'obtenir les meilleurs rendements de fluorescence [380]. En revanche cet effet de quenching n'est pas observé en imagerie photoacoustique.

Imagerie Photoacoustique :

3.1.2.2.1. Matériels et Méthodes

Animaux :

Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1. Au total, 4 souris Balb/C Nude femelles et 4 rats NIH-Nude ont été suivis par imagerie PA et NIRF.

Modèles de lymphographie :

Lymphographie axillaire : Les animaux ont reçu une injection interdigitée d'ICG (SERB, France) de 129nmol sous 50µL et sous 10µL pour les rats et les souris respectivement.

Lymphographie cervicale : Les animaux ont reçu une injection intradermique d'ICG (Infracyanine[®], SERB, France) de 129nmol sous 10 μ L.

Protocole :

Afin de monitorer la migration de l'ICG libre (non-ciblé) au niveau ganglionnaire, nous avons suivi les animaux soit par NIRF, soit par PA à 800nm, juste après leurs avoir injecté l'ICG dans le territoire de drainage considéré.

Nous avons également utilisé le Mode Spectro du Vevo[®] LAZR, afin d'obtenir des informations d'absorption optique sur le range 680-970nm et de construire un spectre d'absorption. Ainsi, nous avons réalisé un « spectral unmixing » permettant de ne faire ressortir que le signal appartenant au composé d'intérêt, l'ICG.

3.1.2.2.2. Résultats

L'avantage de l'ICG est que son pic d'absorption de la lumière est aux alentours des 800nm. Ainsi, pour la réalisation d'études *in vivo* avec de l'ICG, il est donc plus aisé à détecter et à isoler (par « spectral unmixing ») du signal provenant de l'Hb. En effet, pour cette longueur d'onde on observe « un creux » au niveau des spectres d'absorptions de l'Hb oxygénée et de l'Hb désoxygénée (Figure 134).

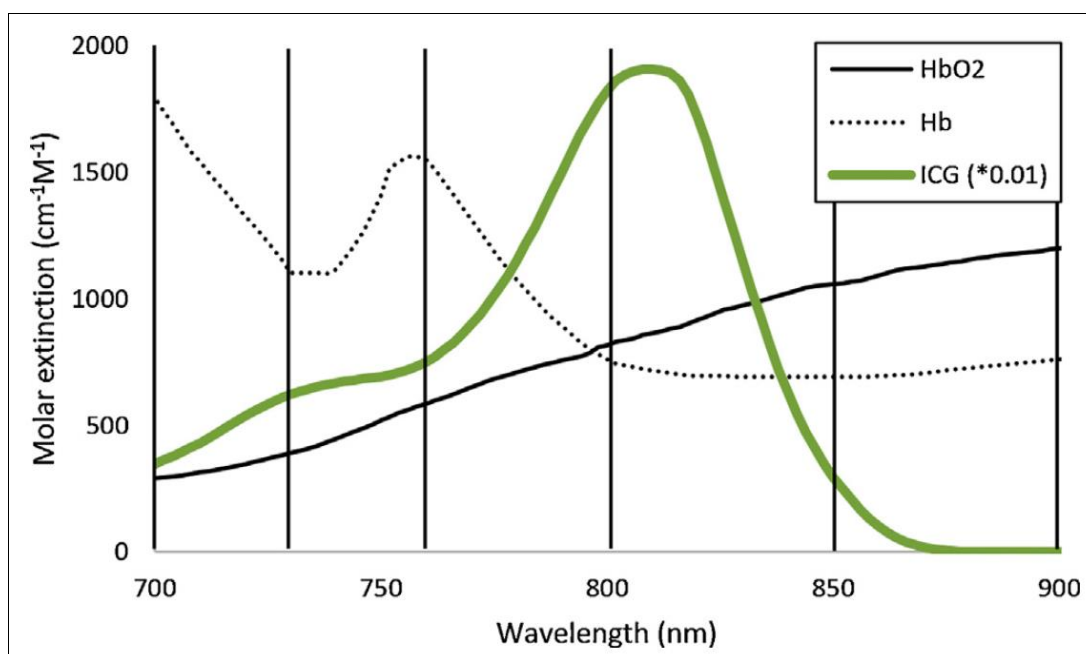


Figure 134 : Spectre d'absorption de l'ICG en fonction de la longueur d'onde, par rapport aux spectres de l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée (d'après [381]).

Nous avons pu évaluer chez le rat la lymphographie dynamique par PA, après injection d'ICG (129nmol) au niveau interdigité. Nous avons ainsi pu déterminer à partir de quand le

signal de l'ICG était détectable et observer le motif de diffusion de l'ICG au niveau du ganglion brachial (Figure 135).

Pour ces protocoles, nous avons tout d'abord enregistré une image de référence (Figure 135A), puis réalisé l'acquisition en soustrayant cette image de référence à une longueur d'onde prédéterminée (ici : 800nm). Nous n'avons observé alors qu'un très faible signal de base (Figure 135B). Puis, 5 minutes après l'injection interdigitée, nous avons vu l'ICG apparaître au fur et à mesure dans le ganglion (Figure 135C).

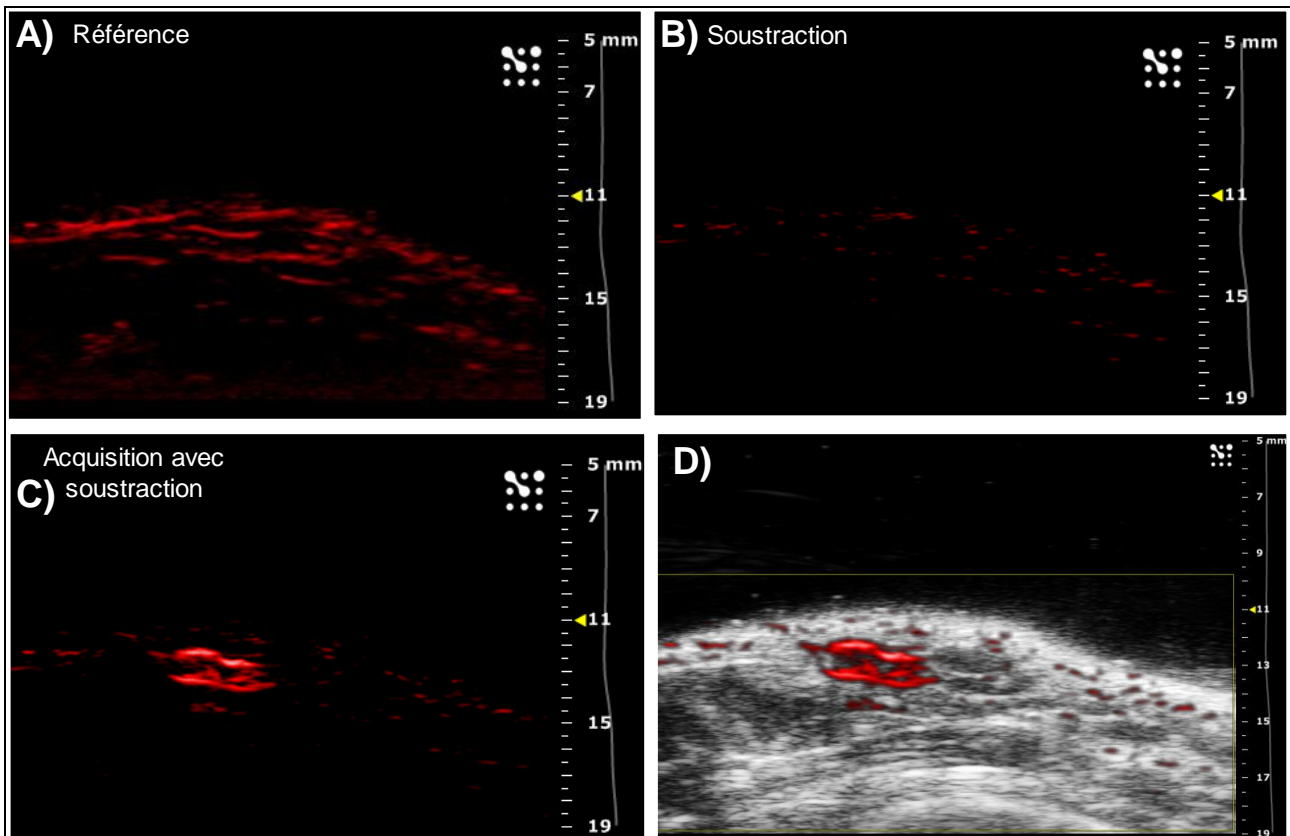


Figure 135 : Détection du signal photoacoustique de l'ICG au niveau ganglionnaire chez le rat. A) Image PA de référence. **B)** Image de référence après soustraction du bruit de fond. **C)** Signal PA spécifique de l'ICG après soustraction du bruit de fond. **D)** Superposition des images B-Mode et PA (CIPA 2016).

Nous avons également appliqué cette procédure chez la souris, après injection d'ICG (129nmol) en intradermique au niveau de l'oreille. Nous avons ainsi pu déterminer que le signal de l'ICG est détectable à partir de 6 min et observer le motif de diffusion de l'ICG au niveau du ganglion cervical (Figure 136).

La détection du ganglion dans ce modèle de migration lymphatique a été réalisée par PA mono-longueur d'onde (avec excitation laser à 800nm) et également après « spectral unmixing ». Les acquisitions montrent bien une localisation très précise du ganglion cervical. Sur les rendus en 3D, nous pouvons voir la position du signal d'ICG du ganglion

par rapport au cou de l'animal. Ce rendu 3D nous a permis de pouvoir comparer les signaux PA aux signaux NIRF mesurés avec la caméra.

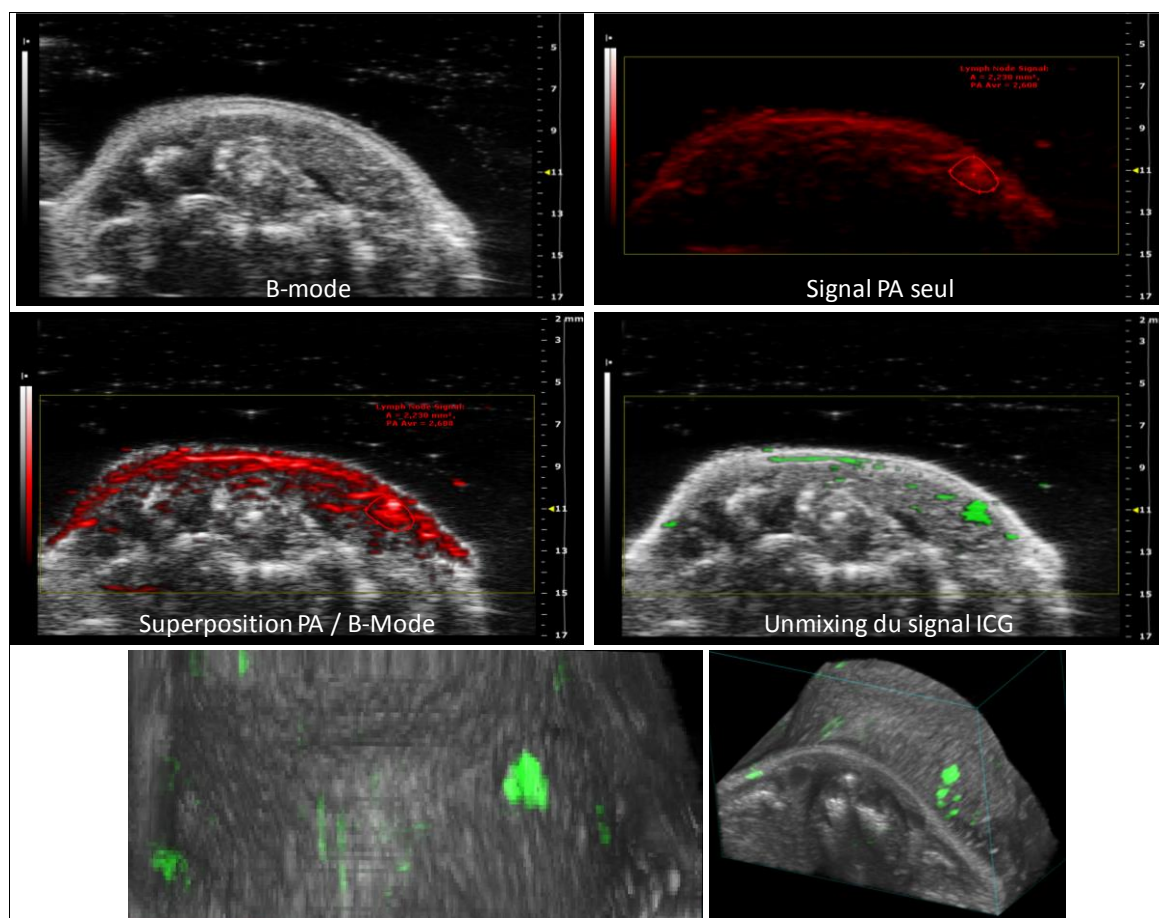


Figure 136 : Spectral unmixing réalisé au niveau du ganglion cervical d'une souris. Mise en évidence précise du signal spécifique de l'ICG (en vert) au niveau du ganglion (en coupe ou sur le rendu 3D) après « spectral unmixing » (CIPA 2016).

Lorsque nous avons réalisé un spectre PA (en faisant varier chacune des λ de 680 à 970nm) au niveau ganglionnaire après avoir injecté de l'ICG à l'animal, nous obtenons un spectre avec un pic majeur à 804nm (Figure 139). Les autres incurvations de la courbe spectrale sont dues à la présence d'Hb et de mélanine.

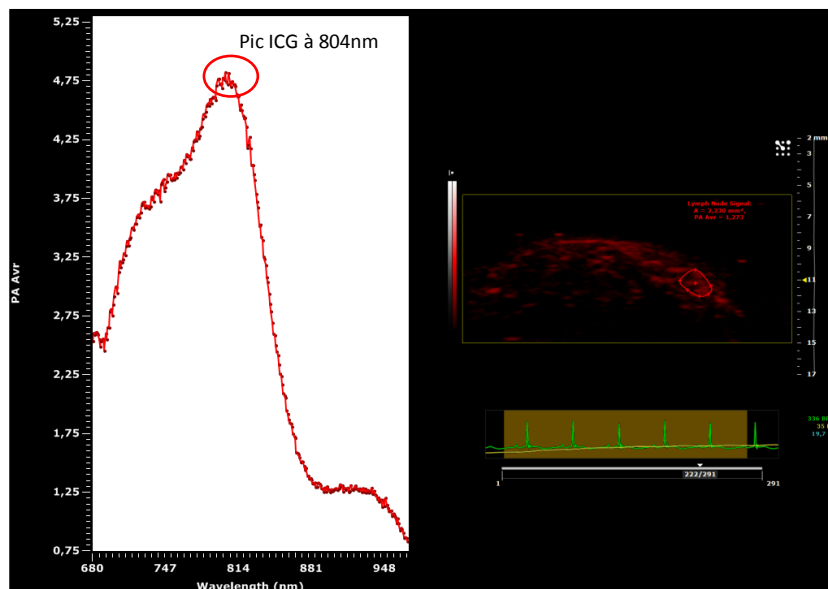


Figure 137 : Pic d'absorption de l'ICG mesuré au niveau ganglionnaire par photoacoustique. Pic a 804 nm. (ROI dessinée au niveau du ganglion cervical (cf. Figure 136) (CIPA 2016).

Discussion :

Cette étude visait à réaliser des examens de lymphographie dynamique à l'ICG. De nombreuses équipes s'intéressent au ciblage des ganglions sentinelles et à leur détection grâce à différents agents de contraste récemment développés. On peut par exemple citer les approches mettant en œuvre des nanotubes de carbone, qui sont de très bons agents de contraste PA [382], mais avec une toxicité relativement importante. Certaines équipes travaillent également sur différents couplages de fluorochromes avec les nanotubes de carbone pour en augmenter leur détectabilité, comme par exemple des nanotubes de carbone couplés à de l'ICG [383,384], ou à des gold nanostars [385]. Enfin, certains travaux s'intéressent à la détection des ganglions sentinelles grâce à du bleu de méthylène [386], avec des gold nanobeacons [387], ou encore avec des nanoparticules de cuivre [388].

Nous pourrions donc envisager par la suite de pouvoir détecter par imagerie PA les cellules cancéreuses présentes au sein des ganglions envahis, dans nos modèles, afin de quantifier la charge tumorale et suivre le développement de la métastase.

Imagerie de fluorescence :

3.1.2.2.3. Matériels et Méthodes

Animaux :

Les conditions d'hébergement des animaux ont été détaillées en 1.3.1.1. Au total, 4 souris

Balb/C Nude femelles ont été suivies par imagerie NIRF.

Modèles de lymphographie :

Lymphographie axillaire : les animaux ont reçu une injection interdigitée d'ICG (SERB, France) de 129nmol sous 10 μ L.

Protocole :

Afin de monitorer la migration de l'ICG au niveau ganglionnaire, nous avons suivi les animaux par NIRF après leurs avoir injecté l'ICG dans le territoire de drainage considéré.

3.1.2.2.4. Résultats

En utilisant la plateforme multimodale, nous avons évalué par fluorescence *in vivo* la migration d'ICG au niveau ganglionnaire à partir d'une injection interdigitée d'ICG. Nous avons observé que la charge des ganglions axillaires et brachiaux se fait en 2 étapes. La première étape permet la mise en évidence d'un premier ganglion 5 minutes post injection de l'ICG. La deuxième étape s'appuie sur une imagerie 1H après permettant la mise en évidence d'un second ganglion (Figure 138).

Nous pouvons également remarquer que le foie de l'animal est plus marqué par le fluorochrome au bout d'1 heure, comparativement au temps 5 minutes, car c'est dans cet organe qu'il va être métabolisé et éliminé.

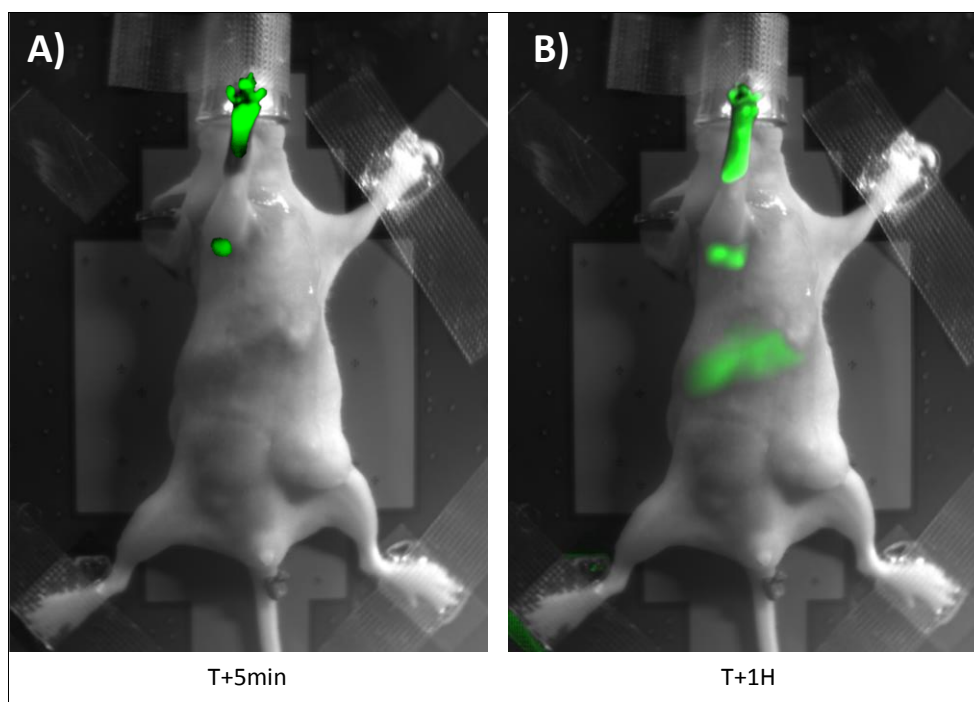


Figure 138 : Imagerie de fluorescence de l'ICG après injection dans l'espace interdigité chez la souris. A) T+5 minutes post injection B) T+1H post injection (CIPA 2016).

Lorsque nous avons comparé ces signaux de NIRF à ceux mesurés par PA à 800nm au-dessus de cette même aire ganglionnaire, nous avons pu observer que l'identification de chacun des ganglions est identique (Figure 139). En effet, les Figures 139A&B montrent deux seuillages différents du rendu B-Mode associé au signal PA, correspondant exactement aux signaux de l'ICG détectés par la caméra.

La lymphographie à l'ICG permet donc la détection de manière sensible, précise et rapide la détection des ganglions sentinelles après injection du fluorochrome dans le territoire de drainage.

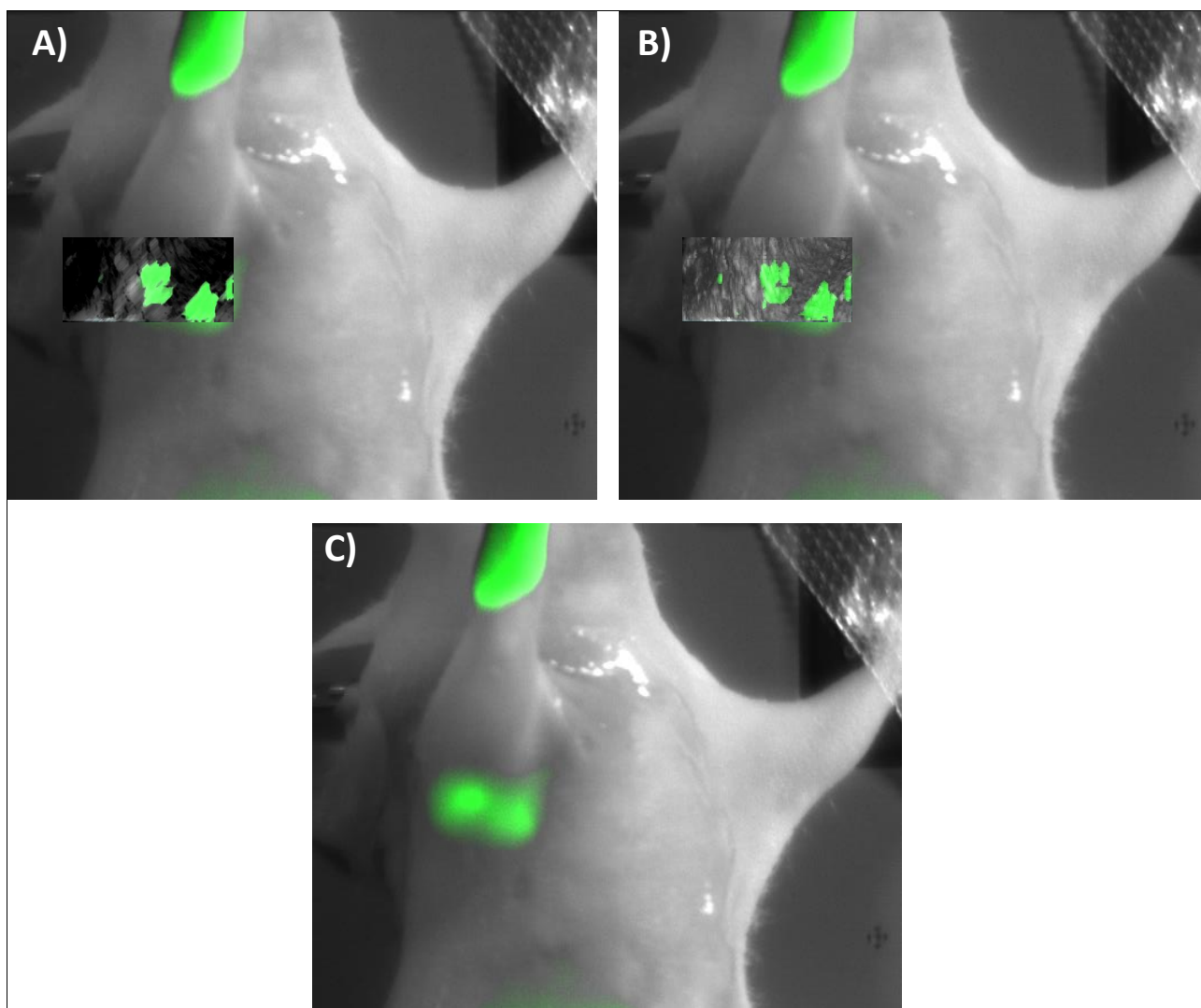


Figure 139 : Comparaison des signaux PA et NIRF de l'ICG mesurés au niveau axillaire. A) & B) Rendus photoacoustique 3D, vus du dessus, mettant en évidence le signal de l'ICG au niveau des deux ganglions axillaires et brachiaux. C) imagerie NIRF de l'ICG correspondante (CIPA 2016).

Ces résultats rejoignent des travaux réalisés par Wishart visant à mettre en évidence les GS par imagerie de fluorescence de l'ICG avec la mise en évidence de 2 ganglions dans la région axillaire de la souris Balb/C nude ^[389].

3.1.2.3. Etude de l'envahissement ganglionnaire

Dans la pratique clinique, chez l'Homme, les colorants bleus injectés dans le territoire de drainage de la tumeur marquent les GS de sorte que les médecins puissent aisément identifier ces GS à l'œil nu au cours de la chirurgie ^[352]. Lorsque cela est possible, des colloïdes radio-marqués sont co-injectés, permettant une localisation des GS à travers la peau du patient par détection de la radioactivité. Considérant les contraintes techniques et réglementaires associées à l'utilisation de radio-isotopes, l'imagerie directe des GS par des sondes fluorescentes (ex : ICG) pourrait être une alternative d'intérêt, plus simple de mise en œuvre.

De nos jours, il existe de nombreux agents d'imagerie utilisables chez l'Homme, dédiés soit à la localisation des ganglions, soit à l'évaluation de leur invasion ^[390,391]. Parmi ceux-ci, l'ICG est un fluorochrome utilisable en clinique pour l'imagerie de fluorescence peropératoire. Les mimétiques RGD marqués (qui seront évoqués en 3.1.3) ciblant les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$, ont été identifiés comme des sondes efficaces pour l'imagerie *in vivo* (TEP, TEMP, IRM, Fluorescence infrarouge) des cellules et de l'angiogenèse tumorale ^[392]. Parmi les modalités d'imagerie mises en œuvre pour ces sondes, la fluorescence infrarouge est de plus en plus étudiée pour l'imagerie peropératoire en temps réel des tumeurs et des ganglions associés ^[356,393].

Dans l'étude suivante, nous avons réalisé des explorations sur le micro-envahissement tumoral dans un modèle de GS chez le rat. Nous avons sélectionné la BLI grâce à sa très haute sensibilité pour détecter un très faible nombre de cellules tumorales, dans le but d'obtenir des animaux avec un statut d'envahissement du GS prédéfini. Plusieurs stratégies ont été considérées pour la détection des GS dans ce modèle rat : nous avons utilisé le Bleu Patente V (BPV), l'ICG ou encore une sonde fluorescente de ciblage des intégrines. Afin de valider la possibilité d'utiliser des sondes fluorescentes dans le proche infrarouge, associée à une détection par un colorant bleu, nous avons étudié le potentiel effet de quenching du ciblage des intégrines et de l'ICG sur les intensités de fluorescence lorsque ces agents sont co-injectés ou injectés seuls, sans perturber le protocole habituel. Nous avons également exploré la capacité de la NIRF à déterminer le degré d'envahissement aussi bien *in vivo* qu'*ex vivo* sur les ganglions excisés (sachant que le colorant BPV est utilisé habituellement en clinique pour la localisation des GS).

3.1.2.3.1. Matériels et Méthodes

Culture cellulaire

Les cellules d'adénocarcinome mammaire humain MDA-MB-231-luc-D3H2LN ont été obtenues chez Perkin Elmer® (France). Selon les données du fournisseur, l'activité de bioluminescence *in vitro* de ces cellules est d'environ 200 photons/seconde/cellule. Cette lignée cellulaire a été maintenue conformément aux instructions du fournisseur.

Animaux

Des rats NIH-Nude femelles âgées de 8 à 12 semaines provenant de chez Taconic (Allemagne) ont été acclimatés pendant 7 jours dans le laboratoire avant les protocoles d'expérimentations. Les animaux étaient hébergés dans des cages en portoir ventilé avec un accès à l'eau et la nourriture *ad libitum* et avec un cycle jour/nuit de 12h/12h pendant toute la durée de l'expérimentation. Ils ont ensuite été observés quotidiennement au niveau des signes cliniques, de détresse ou de diminution d'activité physique et pesés 1 fois par semaine. Des lots de 3 rats ont été constitués pour chacune des conditions expérimentales.

Imagerie de Bioluminescence

La BLI a été réalisée 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'étude (jour 28) avec un IVIS-Lumina II (Perkin Elmer®, France). Chaque rat a reçu une injection IP de 20mg de luciférine (Promega, France). Les rats anesthésiés par isoflurane 1,5% ont ensuite été placés sur le tapis thermo-régulé de l'imageur (37°C) pendant l'acquisition. Le binning et la durée d'acquisition ont été définis suivant l'activité tumorale et l'intensité du signal. Celle-ci était ensuite quantifiée comme le flux total de photons (Photons/secondes) à l'intérieur des ROIs tracées manuellement autour de l'aire tumorale en utilisant le logiciel Living Image 4.4 (Perkin Elmer®, France).

Estimation du nombre de cellules tumorales présentes au niveau du GS

Une courbe de calibration a été réalisée à partir de quantités connues de cellules (500, 1000, 5000, 10000 & 50000 cellules), déposées soit sur la peau de l'animal, soit injectées en sous-cutané au niveau axillaire. L'injection sous-cutanée des cellules permettait une modélisation de la localisation des GS axillaires. Les cellules étaient injectées sous 100µL de milieu de culture supplémenté par de la luciférine (300µg/mL). Immédiatement après l'ajout de luciférine, la suspension cellulaire a été déposée ou injectée, puis l'acquisition de BLI a été réalisée 5 minutes après.

Imagerie de Fluorescence

La NIRF a été réalisée *in vivo* et *ex vivo* sur les ganglions excisés avec un IVIS-Lumina II (Perkin Elmer[®], France). Les rats sélectionnés à partir des BLI ont été injectés avec 20nmol d'IntegriSense[®]680 (Perkin Elmer[®], France) 24 heures avant le jour de l'examen d'imagerie. Les rats anesthésiés par isoflurane 1,5% ont été placés sur le tapis thermo-régulé de l'imageur (37°C) en position latérale. L'intensité du signal était quantifiée comme la radiance ([Photons/seconde]/[μW.cm⁻¹]) à l'intérieur des ROIs tracées manuellement autour de l'aire ganglionnaire en utilisant le logiciel Living Image 4.4 (Perkin Elmer[®], France).

Evaluation du quenching de fluorescence

Pour ces expériences, 50μL (0,5nmol) de Bleu Patente V (BPV) (Guerbet, France), d'IntegriSense[®]680 (Perkin Elmer[®], France), d'ICG, ou 50 μL d'un mélange des deux colorants (BPV+IntegriSense[®]680 ou BPV+ICG) a été injecté dans le coussinet plantaire du rat. Les ganglions axillaires étaient ensuite prélevés 15 minutes après l'injection, de telle sorte que la NIRF puisse être réalisée sur les ganglions excisés.

Sacrifice et prélèvement des organes

Les rats sous anesthésie ont été sacrifiés par injection intraveineuse létale de pentobarbital, et les ganglions prélevés chez chaque animal pour une évaluation *ex vivo* immédiate.

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad, Etats-Unis).

3.1.2.3.2. Résultats

Evaluation du quenching de fluorescence, et cinétique d'élimination au niveau des ganglions sains de rats :

Nous n'avons pas observé de différences significatives dans les intensités de fluorescence quantifiées sur les ganglions réséqués après injection d'IntegriSense[®]680 versus IntegriSense[®]680+BPV (Figure 140A). Il n'y avait pas non plus de différences significatives dans les intensités de fluorescence mesurées après injection d'ICG versus ICG+BPV (Figure 140B). Une telle absence de quenching a également été observée après injection d'une très faible quantité d'IntegriSense[®]680 (Figure 140C).

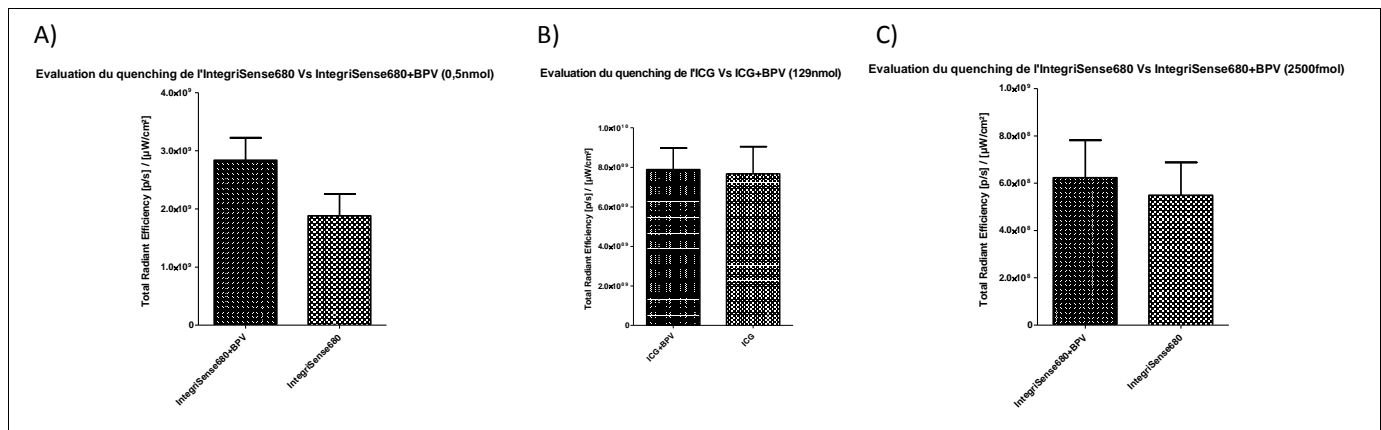


Figure 140 : Evaluation du quenching de fluorescence sur des ganglions sains de rats sains après injections interdigitées de fluorochromes. A) Evaluation du quenching de fluorescence de l'IntegriSense®680 (0,5nmol) par le Bleu Patente V (0,5nmol). Quantifications réalisées par NIRF *ex vivo* sur les ganglions axillaires (n=6 ganglions par groupe). **B)** Evaluation du quenching de l'ICG libre (129nmol) par le Bleu Patente V (0,5nmol). Quantifications réalisées par NIRF *ex vivo* sur les ganglions axillaires (n=6 ganglions par groupe). **C)** Evaluation du quenching de l'IntegriSense®680 (2,5pmol) par le Bleu Patente V (0,5nmol). Quantifications réalisées par NIRF *ex vivo* sur les ganglions axillaires (n=6 ganglions par groupe).

Après injection d'IntegriSense®680 dans le territoire de drainage, la comparaison entre les signaux de fluorescence des ganglions axillaires et brachiaux a mis en évidence une rétention de la sonde plus importante au niveau axillaire (Figure 141B). En effet, quand les sondes fluorescentes sont injectées au niveau de l'aire de drainage lymphatique, elles rejoignent les ganglions et s'accumulent momentanément avant d'être éliminées, ce qui permet de les mettre en évidence (Figure 141A). Il n'y avait pas de différence dans les intensités de signal entre 5H30 et 19H pour ces deux ganglions. Cette clairance limitée dans les ganglions sains démontre que la détection des cellules tumorales dans les GS à haute sensibilité ne peut pas être réalisée après injection locorégionale des sondes due au bruit de fond trop important résultant vraisemblablement de la rétention au niveau ganglionnaire d'oligomères ou de micro-agrégats des sondes fluorescentes. La voie intraveineuse s'avère donc nécessaire pour pouvoir obtenir cette détection.

Validation de la quantification de la BLI :

Le statut de micro-envahissement a été déterminé grâce à des expérimentations *in vivo* de calibration par la quantification de quantités connues de cellules injectées, préalablement mises en suspension dans du milieu de culture en présence de luciférine. Les signaux de bioluminescence étaient stables pendant au moins 9 minutes suivant l'injection. L'atténuation des photons par la peau était d'environ 77% (Figure 142A). A partir du nombre connu de cellules injectées, la courbe de calibration obtenue d'équation $Y=348X-277556$ (Figure 142B), a montré un seuil de détection d'environ 500 cellules (5 fois plus

important que l'activité du bruit de fond) (Figure142C).

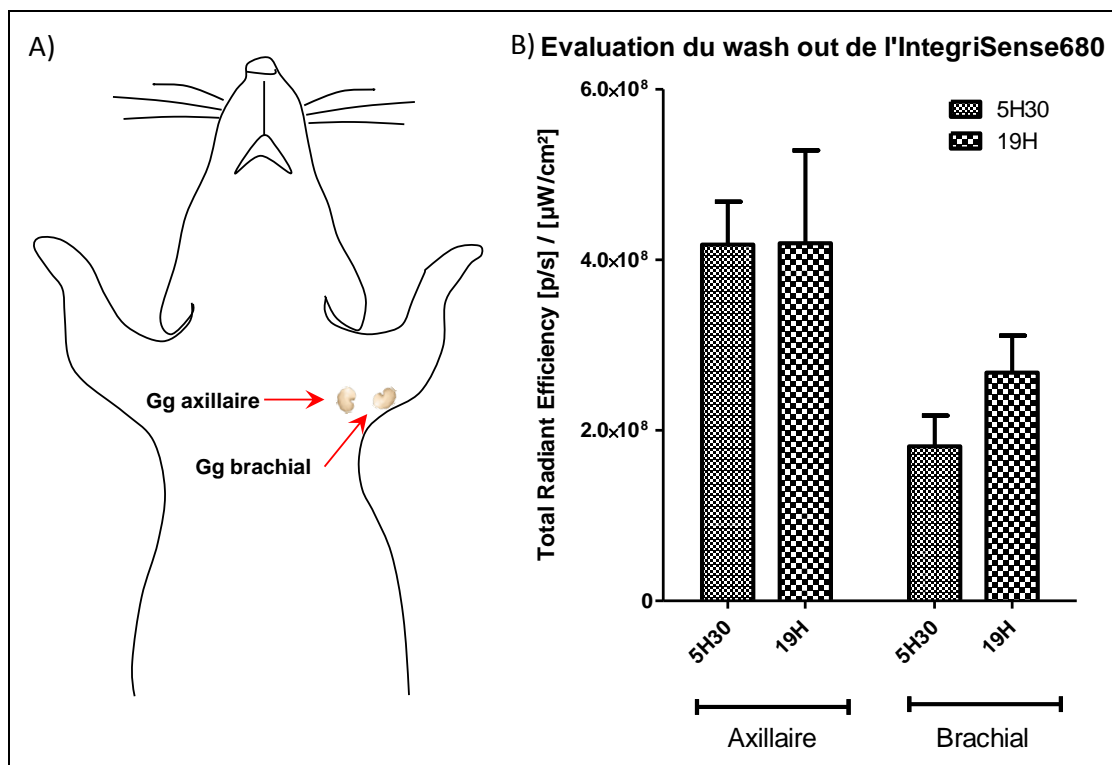


Figure 141 : Ganglions brachiaux et axillaires. A) Schéma montrant la localisation du ganglion brachial et axillaire chez le rat. B) Comparaison des cinétiques de wash-out d'IntegriSense[®]680 entre les ganglions axillaires et brachiaux provenant de rats, par quantification *ex vivo* des signaux de NIRF (n=6 ganglions par groupe) (CIPA 2016).

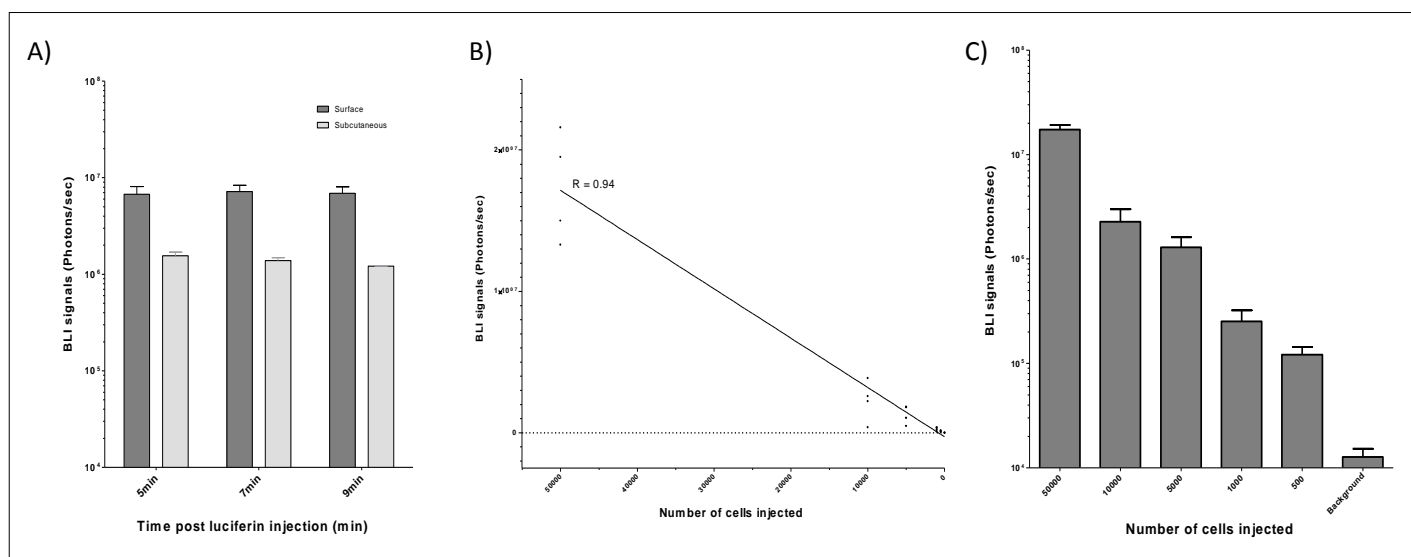


Figure 142 : Validation de la quantification de la BLI. A) Comparaison des signaux BLI *in vivo* après injection sous-cutanée de cellules ou dépôt de cellules au-dessus de la peau. Chaque injection ou dépôt contenait une quantité de 10 000 cellules, qui ont été préalablement supplémentées en substrat (n=2 par condition). B) Détermination de la courbe de corrélation pour les quantifications *in vivo* du nombre de cellules (R=0,94). C) Evaluation des signaux BLI en fonction de différentes charges tumorales suivant l'injection sous-cutanée de cellules supplémentées en substrat (n=4 par conditions).

Modèle de ganglion sentinelle envahi :

Grâce à la BLI, il a été possible de confirmer l'invasion limitée par les cellules tumorales des ganglions axillaires et brachiaux *in vivo* (Figure 143A&B). Cependant, nous avons remarqué que les cellules tumorales tendaient à se développer de manière plus systématique dans le ganglion axillaire par rapport au ganglion brachial. A partir de la courbe de calibration déterminée par BLI, l'estimation de la charge tumorale était d'approximativement 18700 cellules pour le rat A (Figure 143A) avec un GS brachial envahi, comparé au rat B présentant une invasion d'environ 1500 cellules (Figure 143B) au niveau du ganglion axillaire.

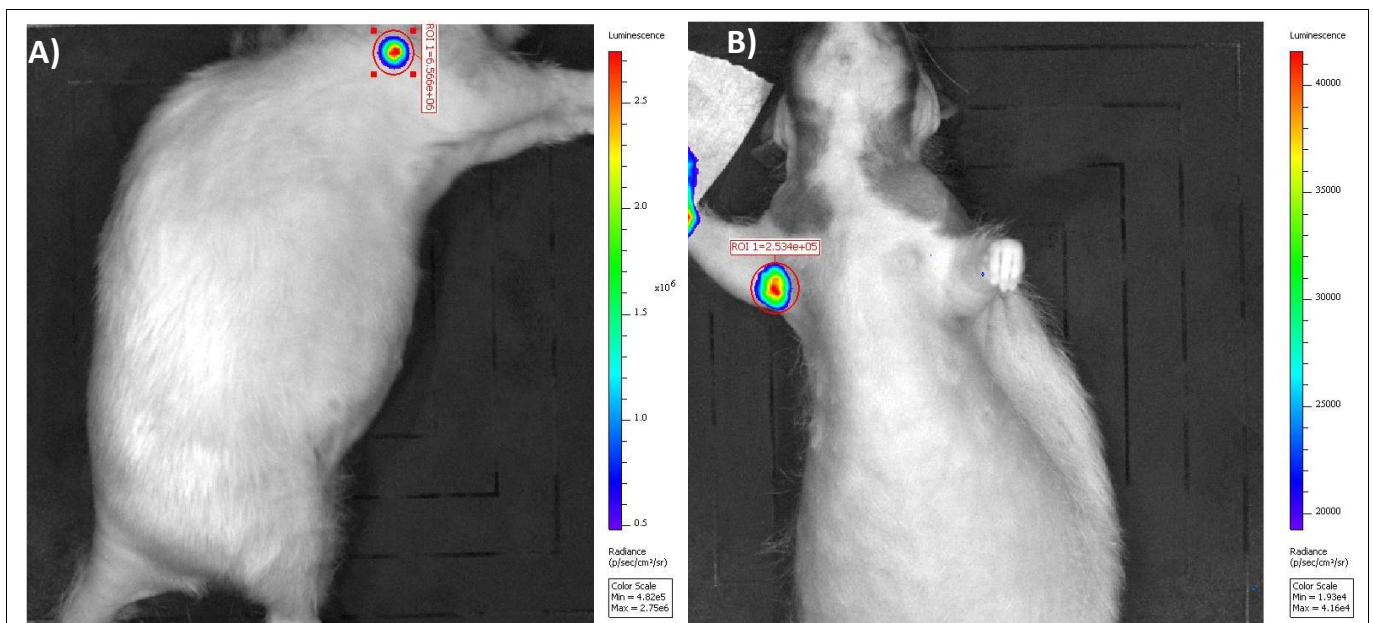


Figure 143 : Imagerie de bioluminescence de rats ayant un Gg sentinelle envahi par des cellules tumorales. Pour réaliser une quantification plus précise, la meilleure incidence pour réaliser les acquisitions BLI était la face antérieure pour le Gg axillaire et latérale pour le Gg brachial. A) BLI de la face latérale droite du rat A. B) BLI de la face antérieure du rat B (CIPA 2016).

Ciblage des intégrines $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$:

Comme l'injection locorégionale de la sonde IntegriSense[®]680 ciblant les intégrines conduit à une clairance incomplète au niveau des ganglions sains, cette voie d'administration ne peut être utilisée pour détecter une faible invasion tumorale, à cause du bruit de fond trop important qui persistera au niveau des GS. La seule voie IV a donc été considérée pour l'administration de cette sonde fluorescente. Chez les animaux avec un GS envahi par environ 2000 cellules (quantification basée sur les signaux de BLI), il n'a pas été possible de mettre en évidence une invasion ganglionnaire *in vivo* par NIRF. Cependant, après excision des ganglions et imagerie *ex vivo* en fluorescence (associée à un « spectral unmixing » afin de soustraire les signaux d'autofluorescence), nous avons pu

confirmer le statut d'invasion minimale du ganglion axillaire gauche par des cellules tumorales (Figure 144). Globalement les signaux mesurés étaient 3 à 20 fois supérieurs à ceux obtenus pour les ganglions sains contrôles. Les images acquises en NIRF des ganglions excisés correspondaient parfaitement aux foyers d'invasion bioluminescents mesurés *in vivo*.

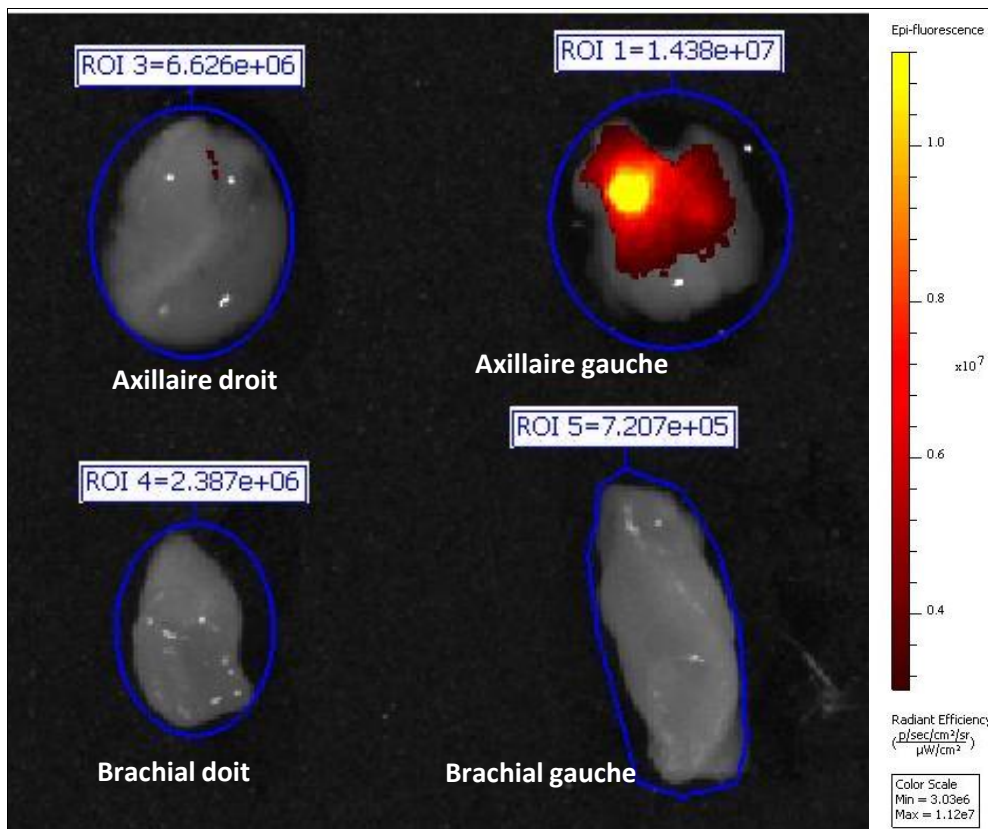


Figure 144 : Imagerie NIRF *ex vivo* pour l'identification de la micro-invasion tumorale au niveau du ganglion axillaire gauche, après injection IV d'IntegriSense®680 (20nmol). Les quantifications ont été réalisées après un « spectral unmixing » à l'émission (CIPA 2016).

Discussion :

Nos résultats ont démontré une absence de quenching par le BPV sur la fluorescence de l'ICG et des agents ciblant les intégrines. L'imagerie de fluorescence est donc compatible avec les procédures de chirurgie standard basées sur l'utilisation du BPV.

Lorsque nous utilisons les deux sondes fluorescentes de manière simultanée ($ICG_{excitation}=780nm$; $ICG_{émission}=812nm$ and $IntegriSense®680_{excitation}=675$; $IntegriSense®680_{émission}=693nm$), des paramètres optimisés d'excitation et d'émission par utilisation de filtres passe-bandes, permettent l'imagerie *in vivo* des GS par ICG sans interférences de l'IntegriSense®680.

Du fait qu'il y ait une très faible intensité de fluorescence présente au niveau des GS

minimalement envahis, alors que le bruit de fond d'autofluorescence est négligeable, il n'est pas possible *in vivo* de réaliser une détection ultrasensible par l'IntegriSense®680. Des examens *ex vivo* sur ganglions excisés avec utilisation de « spectral unmixing » sont donc nécessaires pour supprimer l'autofluorescence ainsi que la contribution de l'ICG. Dans ces conditions, le haut rendement quantique de fluorescence de l'IntegriSense®680 est favorable pour le niveau de détection requis et permet de mettre en évidence une micro-invasion aussi faible que 1500 cellules.

Les colorants fluorescents possédant une émission autour des 800nm sont habituellement plus adaptés pour l'imagerie peropératoire grâce à la plus faible autofluorescence des tissus et la compatibilité avec l'éclairage des salles opératoires [394]. Toutefois, les sondes de ciblage avec des longueurs d'ondes d'émission plus élevées souffrent d'un rendement quantique affaibli (10 à 30 fois plus faible) donnant une sensibilité intrinsèque insuffisante, ce qui n'est pas adapté pour détecter peu de cellules tumorales, même sur des pièces excisées. Manifestement il n'est pas possible de mettre en œuvre l'utilisation de l'ICG et d'une sonde de ciblage spécifique fluorescente dans la même fenêtre de longueurs d'onde (par exemple IntegriSense®750). Un protocole d'imagerie NIRF complet associerait donc un repérage du ganglion sentinelle *in vivo* par l'ICG ou des colloïdes marqués par l'AF750 puis une imagerie avec « spectral unmixing » de l'IntegriSense®680. La NIRF pour des applications chirurgicales est une modalité à haut potentiel, aidant la vision du chirurgien car elle fournit une imagerie en temps réel avec un fort contraste. Les sondes moléculaires ciblant les tumeurs, plus particulièrement les Ac monoclonaux et les sondes fluorescentes ciblant le RGD, sont très prometteuses pour l'évaluation du statut d'invasion tumorale [395].

En conclusion, la BLI ne peut être mise en œuvre chez l'Humain, mais reste la modalité d'imagerie la plus sensible pour l'évaluation d'un très faible envahissement tumoral (moins de 1500 cellules) pour la recherche en oncologie chez l'animal. La fluorescence infrarouge des sondes ciblant les intégrines à l'intérieur d'un ganglion envahi est possible *in vivo* pendant la chirurgie, mais sa sensibilité n'est pas suffisante pour signer une micro-invasion par un examen direct *in vivo*. Enfin, lorsque cette technique est réalisée sur des ganglions excisés, la haute sensibilité de la NIRF *ex vivo*, associée à un « spectral unmixing » permet la détection de la micro-invasion. Ce travail a d'ailleurs fait l'objet d'une publication qui a été soumise (Annexe 10).

3.1.3. Modèle de tumeurs mammaires spontanées chez le lapin

Afin de confirmer nos résultats expérimentaux obtenus chez le rat et la souris, et d'évaluer le potentiel des techniques mises en œuvre sur un modèle animal plus gros dans une

démarche de recherche translationnelle, nous avons poursuivi nos investigations sur des modèles de tumeurs mammaires spontanées chez la lapine angora âgée. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Dr Jérôme ABADIE, Maître de conférences (cancérologie et anatomopathologie), et le Dr Nicolas CHOUIN physicien (imagerie) au sein de l'équipe AMaROC (Cancers animaux, Modèles pour la Recherche en Oncologie Comparée) de l'Ecole Nationale Vétérinaire, ONIRIS, de Nantes, partenaire du Cancéropôle Grand Ouest.

L'adénocarcinome mammaire est relativement fréquent chez les lapines. La tumeur apparait le plus fréquemment chez les femelles multipares au cours de la 3^{ème} ou 4^{ème} année de vie, mais apparait également chez les femelles nullipares. Un rôle de l'influence hormonal dans l'apparition de ces tumeurs est possible. En effet, l'adénocarcinome utérin est fréquemment retrouvé avec des tumeurs mammaires chez les lapines [396,397]. L'adénocarcinome utérin restant la tumeur la plus communément rencontrée. Ces tumeurs spontanées n'apparaissant que chez des sujets âgés, elles ne sont pratiquement jamais observées chez les femelles reproductrices des élevages qui sont mises à mort au cours de la 3^{ème} année par suite d'une baisse de la fécondité. C'est pourquoi nous nous sommes rapprochés d'un élevage de lapin angora (environ 1000 lapins, principalement des femelles) chez lesquelles les poils sont collectés 2 à 3 fois par an, cela durant toute la vie des animaux.

Les protocoles expérimentaux présentés ci-après, s'intéressent à la détection des ganglions sentinelles chez la lapine, en utilisant la technique couramment utilisée en médecine (scintigraphie aux colloïdes technétiés) que nous avons associé à une technique de détection par fluorescence infra-rouge. Nous nous sommes ensuite penchés sur la mise en évidence des cellules tumorales par l'utilisation d'un ciblage de l'angiogenèse tumorale par un mimétique RGD marqué au Cy5.5.

Ciblage par RGD :

Afin de marquer les tumeurs mammaires pour l'imagerie de fluorescence, nous avons utilisé un ciblage par RGD mimétique marqué avec de la cyanine 5.5 (Cy5.5), un fluorochrome ayant les caractéristiques suivantes : λ_{ex} : 675nm ; λ_{em} : 694nm. (Figure 145).

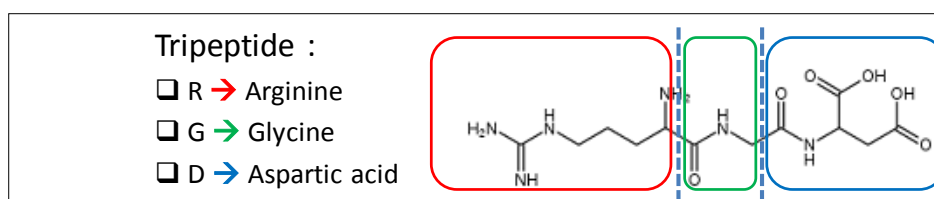


Figure 145 : Composition du tripeptide RGD (CIPA 2016).

Les intégrines permettent l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, mais également des cellules entre elles, par le biais de composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la fibronectine, la vitronectine, la laminine, l'ostéopontine, la thrombospondine, le fibrinogène, ou encore le facteur de von Willebrand.

Ce sont des récepteurs hétérodimériques transmembranaires composés d'une sous-unité α (18 différentes existantes) et d'une sous-unité β (8 différentes existantes). L'association de ces sous-unités conduit à la formation de 24 hétérodimères différents, ayant chacun des propriétés spécifiques vis-à-vis des interactions possibles.

Les intégrines sont impliquées dans les voies de signalisation responsables du développement de nombreuses tumeurs (Figure 146), qu'elles activent, ce qui entraînera par la suite des résistances aux chimiothérapies et radiations ionisantes. Les intégrines sont donc impliquées dans les phénomènes d'invasion, de prolifération et de migration tumorale, ainsi que dans les processus de survie des cellules cancéreuses. Elles sont exprimées de manière constitutive au niveau épithélial et sont conservées lors de la progression de la pathologie tumorale. Nous pouvons noter que les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ sont elles, peu exprimées constitutivement (à l'exclusion de leur présence au niveau des ostéoclastes), mais peuvent être surexprimées dans de nombreux types de cancers [398].

Integrins in cancer progression		
Tumour type	Integrins expressed	Associated phenotypes
Melanoma	$\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$	Vertical growth phase ^{35,172-174} and lymph node metastasis ^{173,175}
Breast	$\alpha6\beta4$ and $\alpha\beta3$	Increased tumour size and grade ¹⁷⁶ , and decreased survival ¹⁷⁷ ($\alpha6\beta4$). Increased bone metastasis ^{26-38,64} ($\alpha\beta3$)
Prostate	$\alpha\beta3$	Increased bone metastasis ³⁹
Pancreatic	$\alpha\beta3$	Lymph node metastasis ⁴⁰
Ovarian	$\alpha4\beta1$ and $\alpha\beta3$	Increased peritoneal metastasis ¹⁷⁸ ($\alpha4\beta1$) and tumour proliferation ¹⁷⁹ ($\alpha\beta3$)
Cervical	$\alpha\beta3$ and $\alpha\beta6$	Decreased patient survival ^{41,180}
Glioblastoma	$\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$	Both are expressed at the tumour-normal tissue margin and have a possible role in invasion ¹⁸¹
Non-small-cell lung carcinoma	$\alpha5\beta1$	Decreased survival in patients with lymph node-negative tumours ¹⁸²
Colon	$\alpha\beta6$	Reduced patient survival ¹⁰⁹

Figure 146 : Expression des intégrines en fonction de la pathologie cancéreuse. (d'après [395]).

Sur la Figure 147 représentant les différentes associations possibles des dimères, les sous-unités incluses dans la zone en pointillé rouge correspondent aux intégrines qui peuvent interagir avec le motif RGD.

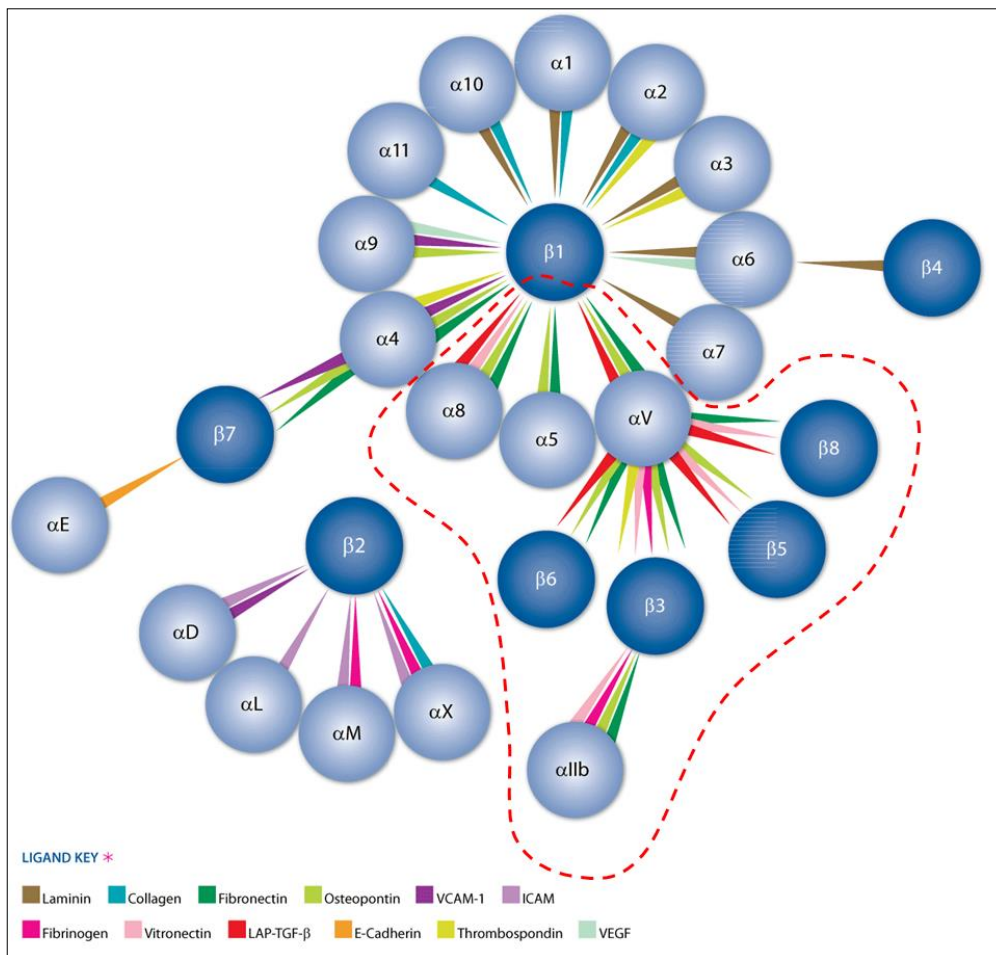


Figure 147 : Les différentes familles d'intégrines. En lignes rouges pointillées, on retrouve la famille des intégrines qui lie spécifiquement le motif RGD. (d'après [399]).

Le motif RGD correspond à un motif d'enchaînement de 3 acides aminés : Arginine-Glycine-Acide Aspartique. Ce motif est le ligand endogène de huit intégrines : $\alpha\nu\beta 1$, $\alpha\nu\beta 3$, $\alpha\nu\beta 5$, $\alpha\nu\beta 6$, $\alpha\nu\beta 8$, $\alpha 11\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$.

Le rôle physiologique des séquences RGD est de permettre l'adhésion cellulaire. Lorsqu'il est présent dans la matrice extracellulaire, le motif RGD autorise l'ancrage des cellules via les intégrines exprimées à leur surface. A l'inverse, lorsque le motif RGD est soluble, il agit en tant que leurre et inhibe l'adhésion cellulaire.

Pour obtenir un mimétique RGD spécifique des intégrines $\alpha\nu\beta 3$ et $\alpha\nu\beta 5$, un test de compétition à la vitronectine est réalisé [400,401]. Ce test consiste en la mise en présence de cellules incubées avec le mimétique RGD d'intérêt et une surface recouverte du ligand naturel des intégrines $\alpha\nu\beta 3$ et $\alpha\nu\beta 5$, la vitronectine. Une compétition s'opère entre le mimétique RGD et le ligand naturel. Les cellules non-adhérentes sont ensuite éliminées par lavage, et un colorant activable (par action enzymatique lysosomale) est incubé avec les cellules adhérentes. La lecture se fait à 405nm donnant un résultat en pourcentage par

rapport à l'adhésion des cellules n'ayant pas subi de pré-incubation avec le mimétique RGD (considérée comme référence : 100% de l'adhésion) (Figure 148).

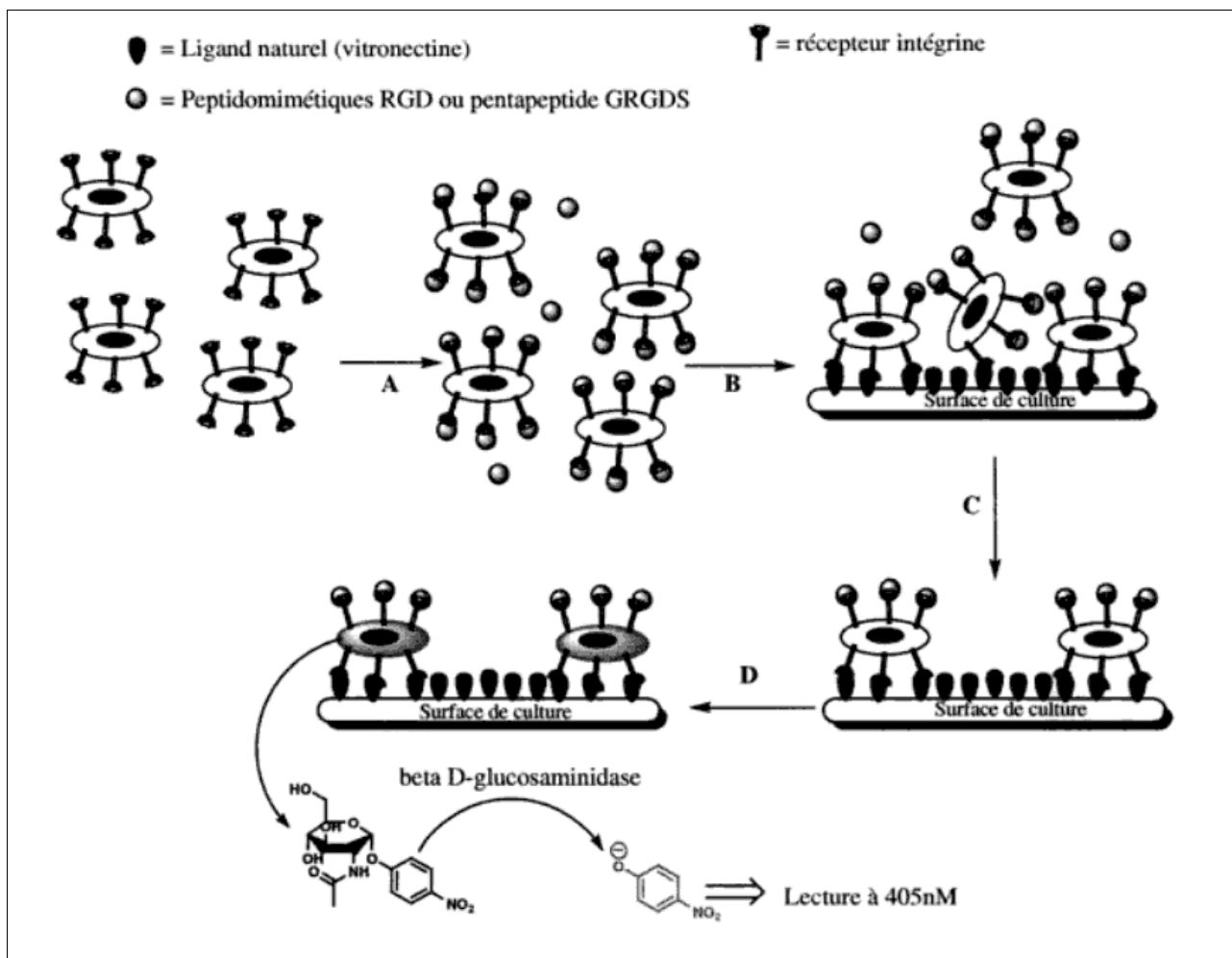


Figure 148 : Test de compétition à la vitronectine visant à évaluer la sélectivité du mimétique RGD pour les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$. (d'après [402]).

Animaux :

Les animaux utilisés pour ces protocoles sont des lapins femelles angora français provenant d'un élevage agréé (Lapin angora de France, La Chevrolière, France). Ces animaux ont développé spontanément des tumeurs mammaires et le diagnostic confirmé en clinique vétérinaire en incluant des examens d'imagerie a conduit à une indication d'euthanasie.

Au total, 6 animaux ont été inclus.

Protocole :

Pour ce protocole, les animaux ont reçu 24H avant imagerie, une injection IV de mimétique RGD-Cy5.5 à 26nmol. Les animaux ont ensuite reçu une injection sous-cutanée de BPV, d'ICG et de colloïdes- ^{99m}Tc 6H avant imagerie. Les imageries

échographiques ont été réalisées 24H avant les imageries TEMP et de fluorescence. Les animaux ont ensuite été euthanasiés et les tumeurs et ganglions détectés ont été prélevés pour des analyses extemporanées. Un échantillon de chacune des tumeurs et les ganglions prélevés ont été conservés pour des analyses histologiques de confirmation.

Nous avons, comme dans la prise en charge des ganglions sentinelles chez l'homme pour les carcinomes mammaires, conservé l'injection de colloïdes technétiés ainsi que le Bleu Patente V pour le repérage anatomique au cours de l'autopsie.

Imagerie :

Pour l'imagerie échographique, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits au paragraphe 1.3.1.1., l'échographe mobile Vevo[®]2100 du CIPA étant préalablement déplacé sur le site d'ONIRIS.

Pour l'imagerie de fluorescence, les acquisitions ont été réalisées selon les paramètres décrits paragraphe 2.1.1.1. Nous avons utilisé la caméra ORCA Flash 4.0 LT (Hamamatsu Photonics) munie de filtres d'émission et associée à une lumière excitatrice filtrée.

Pour l'imagerie TEMP, les animaux ont été placés anesthésiés dans l'imageur (Optima-640, General Electric). Les données ont ensuite été reconstruites et un seuillage adapté à la mise en évidence des ganglions marqués a été sélectionné.

Sacrifice et prélèvement des organes :

Les animaux ont été euthanasiés par injection intraveineuse d'une solution de KCl saturée, sous anesthésie générale (Ketamine (30mg/kg) / Xylazine (4mg/kg)), et les tumeurs et ganglions ont été prélevés chez chaque animal, conservées à +4°C pour retour immédiat au CIPA et explorations complémentaires *ex vivo* en NIRF et photoacoustique avec « spectral unmixing » puis histologie.

3.1.3.1. Imagerie TEMP

3.1.3.1.1. Matériel et Méthodes

Préparation des colloïdes :

Les colloïdes utilisés lors de ces protocoles sont préparés sous inertage par l'azote selon une procédure opératoire standardisée du CIPA. Une formulation à base d'acide ascorbique, de SnF₂ et de NaCl, est congelée en azote liquide puis lyophilisée en flacons sous vide pour éviter tous phénomènes d'oxydation. La taille de ces colloïdes est

comprise entre 80 et 110µm.

Les colloïdes de SnF₂ lyophilisés ont été remis en suspension par une solution de pertechnétate de sodium fraîchement éluée par NaCl 0,9% d'un générateur de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. L'activité de la seringue de 1mL préparée était d'environ 200MBq.

Injection des colloïdes :

Les animaux ont reçu 6H avant imagerie une injection sous-cutanée d'une solution de colloïdes-^{99m}Tc en 4 ou 5 points chacun autour de la tumeur, en fonction de la taille de celle-ci.

3.1.3.1.2. Résultats

Grâce aux images TEMP, nous avons pu identifier précisément la localisation et le nombre de GS pour chaque animal. Pour la partie antérieure de l'animal, nous avons pu mettre en évidence la présence d'un GS au niveau axillaire (Figure 149).

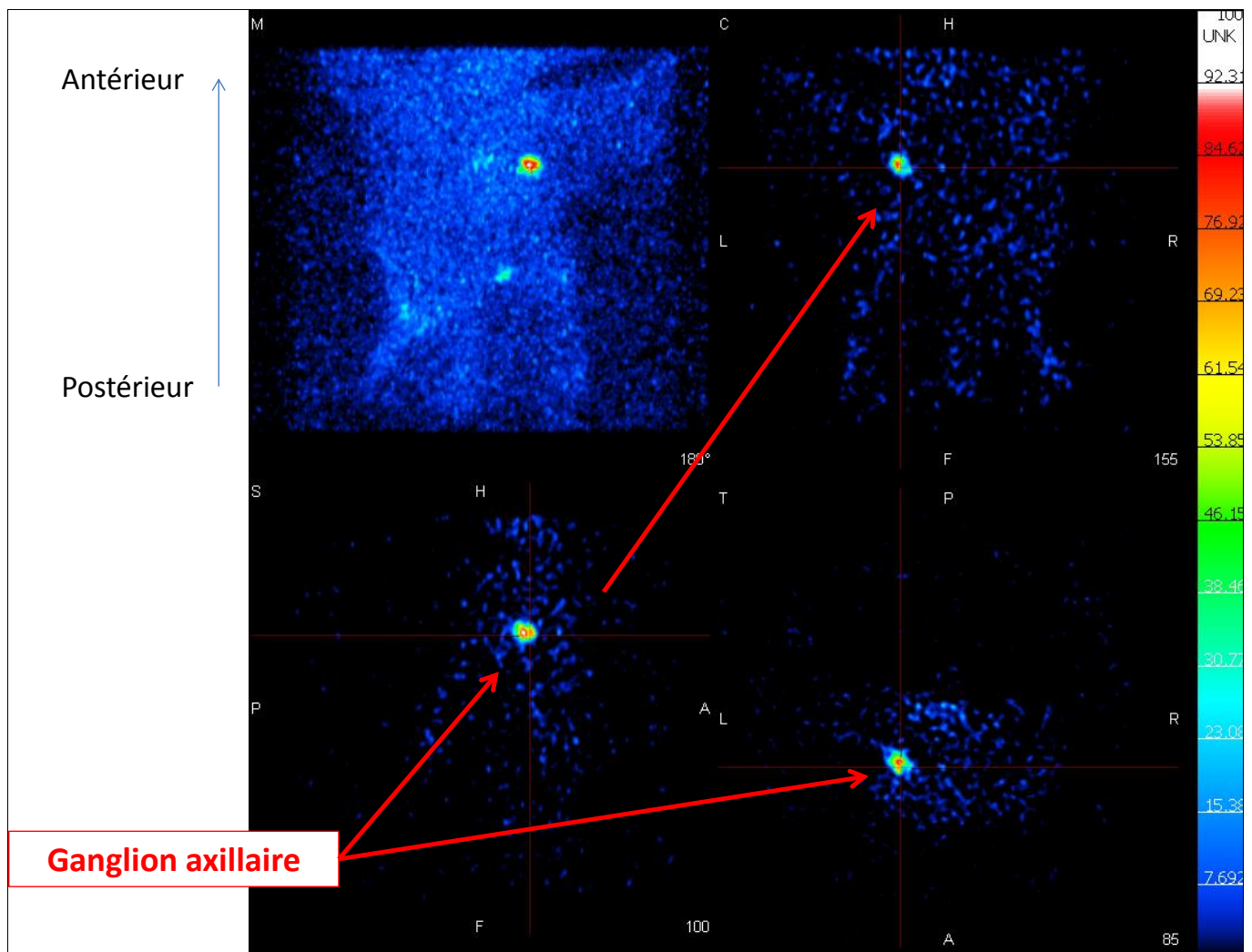


Figure 149 : Imagerie TEMP *in vivo* aux radio-colloïdes de ^{99m}Tc de l'hémicorps antérieur d'une lapine porteuse de tumeur mammaire spontanée 6H après injection dans le territoire de drainage tumoral (200MBq). Identification d'un ganglion axillaire sentinelle.

Pour l'hémicorps postérieur de cet animal, nous avons mis en évidence la présence d'un GS au niveau inguinal (Figure 150). Au total, deux ganglions ont été marqués par les colloïdes sur cet animal.

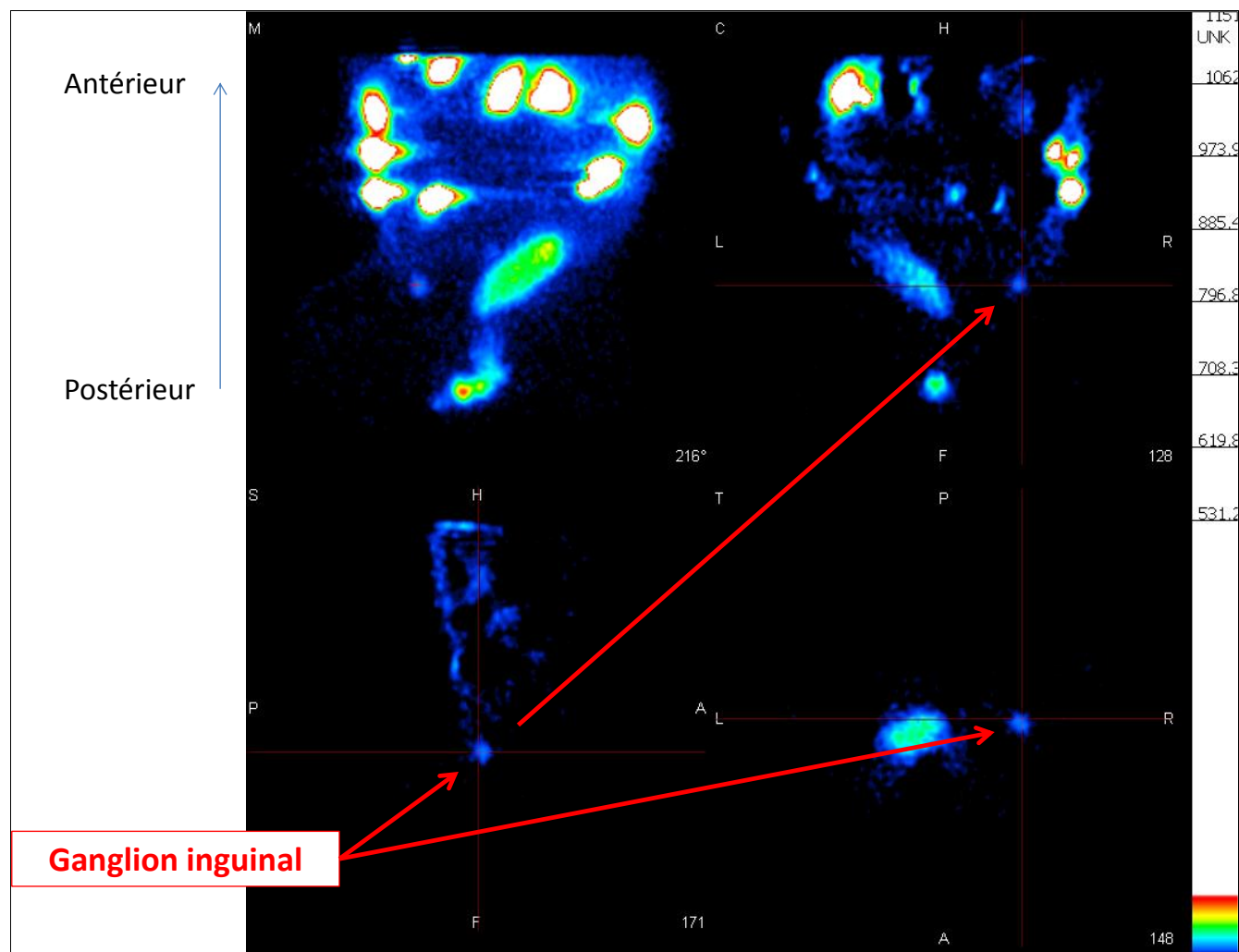


Figure 150 : Imagerie TEMP *in vivo* aux radio-colloïdes de ^{99m}Tc de l'hémicorps postérieur d'une lapine porteuse de tumeur mammaire spontanée 6H après injection dans le territoire de drainage tumoral (200MBq). Identification d'un ganglion inguinal sentinelle à proximité des sites d'injection des colloïdes.

Nous pouvons également voir, à l'exception du ganglion inguinal visible sur les 3 plans de coupe, tous les foyers correspondant aux sites d'injection des colloïdes technétiés.

La technique de détection du ganglion sentinelle par injection de radio-colloïdes technétiés est une technique qui s'avère très efficace pour la localisation précise des ganglions. Pour chacun des protocoles mis en œuvre en utilisant les colloïdes de ^{99m}Tc , nous avons pu mettre en évidence la présence d'un ou plusieurs GS.

En revanche cette technique nécessite un environnement de radioprotection particulier et expose le sujet comme l'opérateur aux radiations ionisantes du technétium.

3.1.3.2. Imagerie de fluorescence

3.1.3.2.1. Matériels et Méthodes

Injection du mimétique-RGD-Cy5.5 :

Les animaux ont reçu une injection IV d'une solution de mimétique-RGD-Cy5.5 24H avant imagerie (24nmol).

Injection des traceurs fluorescents pour la détection des GS :

Une co-injection de BPV et d'ICG a également été réalisée au même moment que l'injection des colloïdes (en 4 ou 5 points chacun autour de la tumeur, 6H avant les imageries). L'administration de BPV (1mL de Bleu Patente V, Guerbet) était destinée à la mise en évidence visuelle des GS, celle d'ICG (1mL d'Infracyanine[®], à 10mg/mL, SERB) permettant leur mise en évidence par fluorescence.

3.1.3.2.2. Résultats

Imagerie des tumeurs mammaires :

L'imagerie des tumeurs a confirmé la fixation du mimétique-RGD-Cy5.5 ciblant les intégrines. Comme présenté en Figure 151 pour cette tumeur diffuse, nous avons pu déceler la présence de nodules tumoraux ayant nettement fixé le mimétique (couleur verte). L'acquisition de cette image a été réalisée sur la face intérieure de l'abdomen de l'animal entre le feuillet cutané et le feuillet musculaire. Toutes les tumeurs présentaient une localisation exclusive au niveau des glandes mammaires mais aucune n'avait de caractère infiltrant.

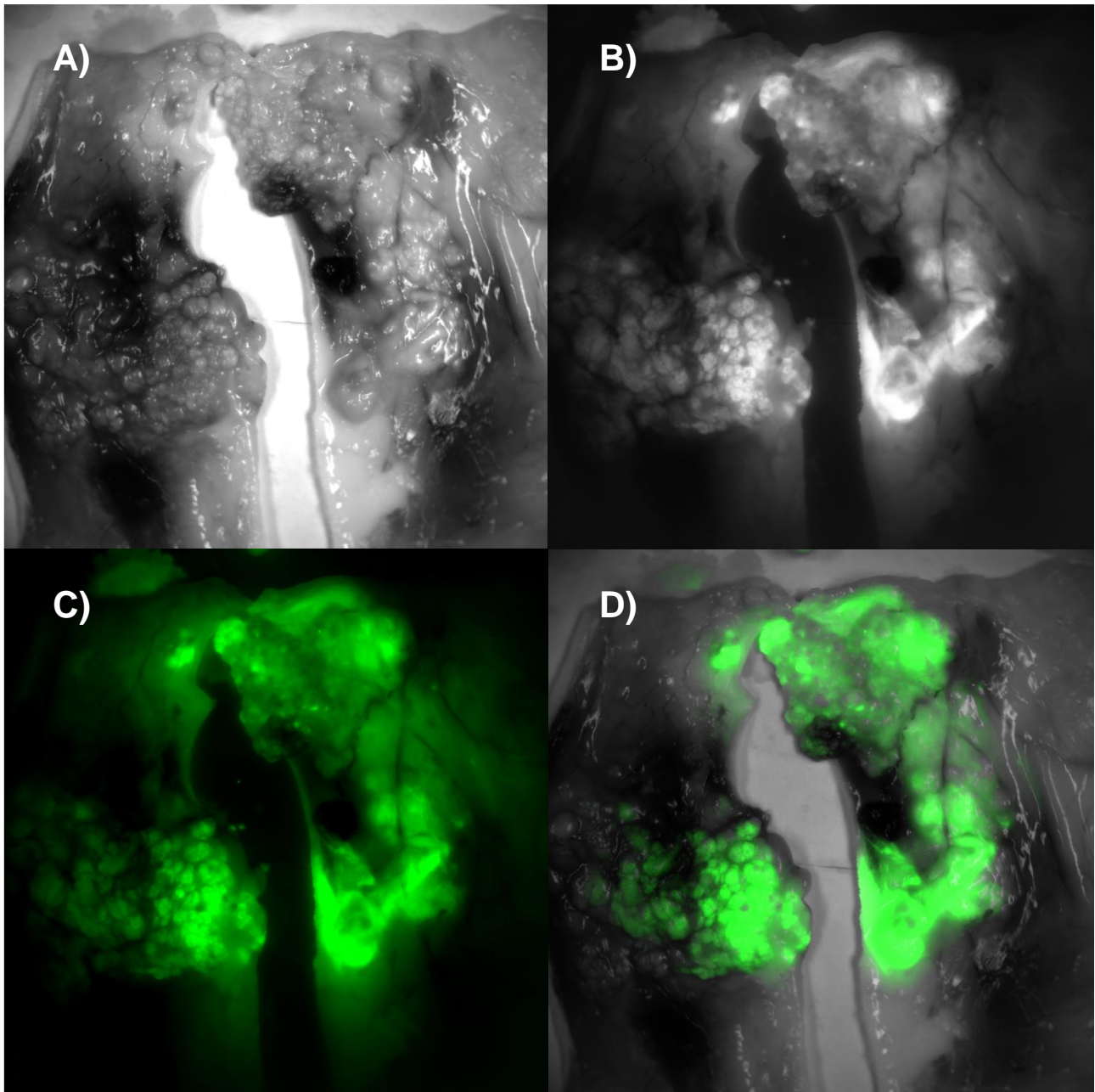


Figure 151 : Imagerie de fluorescence sur une pièce opératoire chez une lapine porteuse de tumeurs mammaires spontanées 24H après injection IV de mimétique RGD-Cy5.5 (24nmol). A) Image en niveau de gris sous lumière blanche. B) Imagerie de fluorescence mettant en évidence les zones marquées. C) Signal de fluorescence correspondant. D) Superposition de l'image de fluorescence et de l'image en niveau de gris de référence (CIPA 2016).

Imagerie des ganglions sentinelles :

Après détection par TEMP, et localisation par NIRF de l'ICG, nous avons évalué la fixation de mimétique-RGD-Cy5.5 sur ces ganglions. Certains ganglions se sont révélés positifs à la fluorescence à 680nm. En Figure 152D, nous pouvons voir la positivité de 2 GS en comparaison avec d'autres tissus prélevés comme témoin. Ces deux ganglions sont l'un en 2^{ème} position en partant du haut sur la rangée de gauche, l'autre en dernière position en partant du haut sur la rangée de droite.

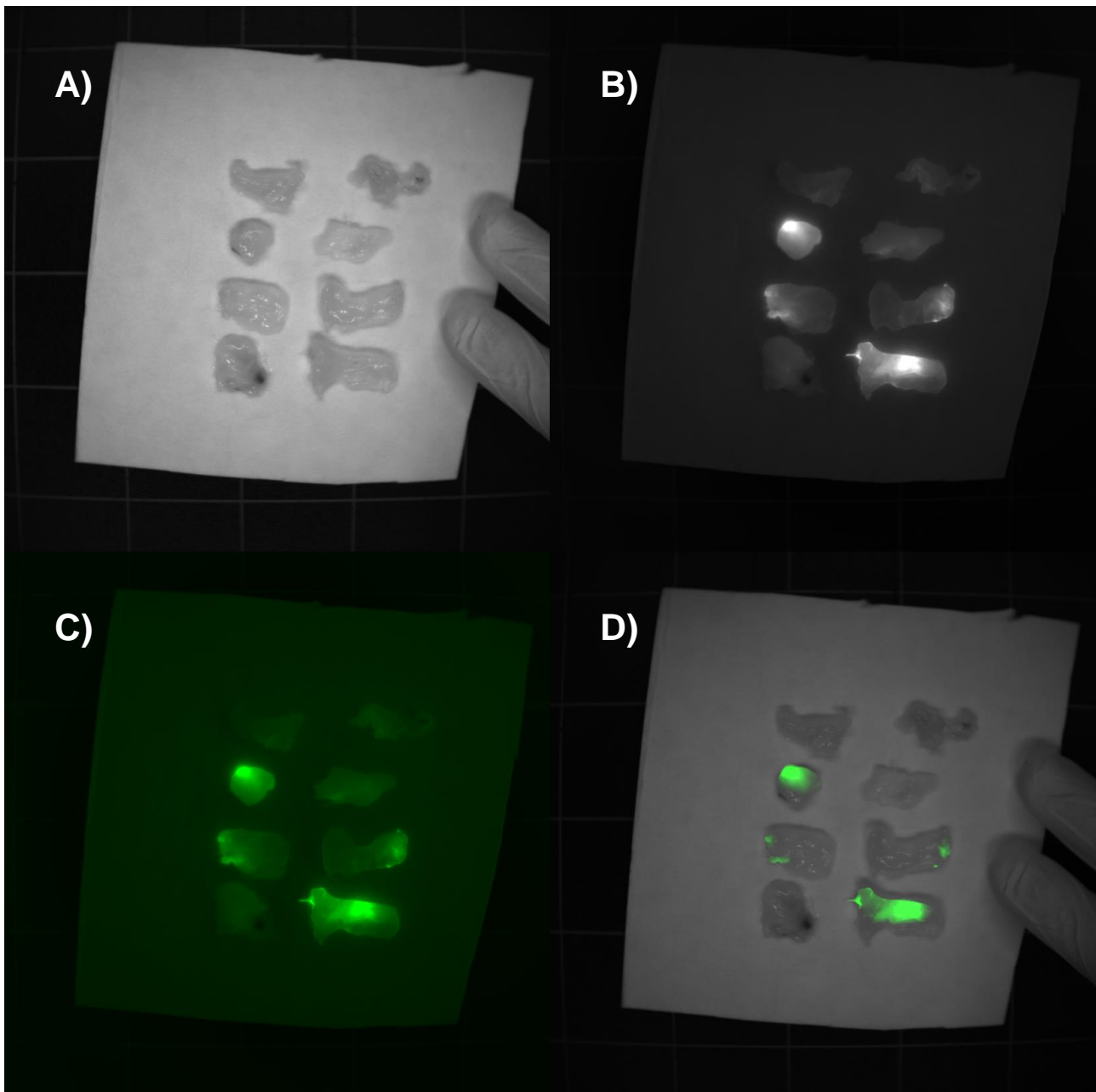


Figure 152 : Imagerie de fluorescence sur des pièces opératoires excisées provenant d'une lapine porteuse de tumeurs mammaires spontanées 24 après injection IV de mimétique RGD-Cy5.5 (24nmol). Différents tissus dont les ganglions sentinelles ont été comparés sur cette planche, afin de s'affranchir de l'autofluorescence tissulaire et choisir un seuillage adapté. **A)** Image en niveau de gris sous lumière blanche. **B)** Imagerie de fluorescence mettant en évidence les zones marquées. **C)** Signal de fluorescence correspondant. **D)** Superposition de l'image de fluorescence et de l'image en niveau de gris de référence (CIPA 2016).

Afin de confirmer nos résultats, nous avons ensuite placé le GS ayant le plus fort signal (parmi d'autres tissus prélevés) dans l'imageur IVIS Lumina II, afin d'effectuer une acquisition avec « spectral unmixing » (Figure 153). Ce procédé a permis de mettre en évidence la présence d'ICG et de Cy5.5 au niveau du ganglion (le ganglion d'intérêt étant le tissu ayant le plus fort signal sur la Figure 153C). En effet, le GS ayant été chargé par l'ICG mais également par l'agent de ciblage des intégrines (mimétique RGD-Cy5.5), le bruit de fond de fluorescence de ce GS n'était pas négligeable. Cette confrontation des

signaux spécifiques de chacun des fluorochromes nous a autorisés à confirmer le statut d'envahissement du ganglion. L'image composite permet de superposer les signaux du Cy5.5 (Vert) et d'ICG (Bleu) (Figure 153B).

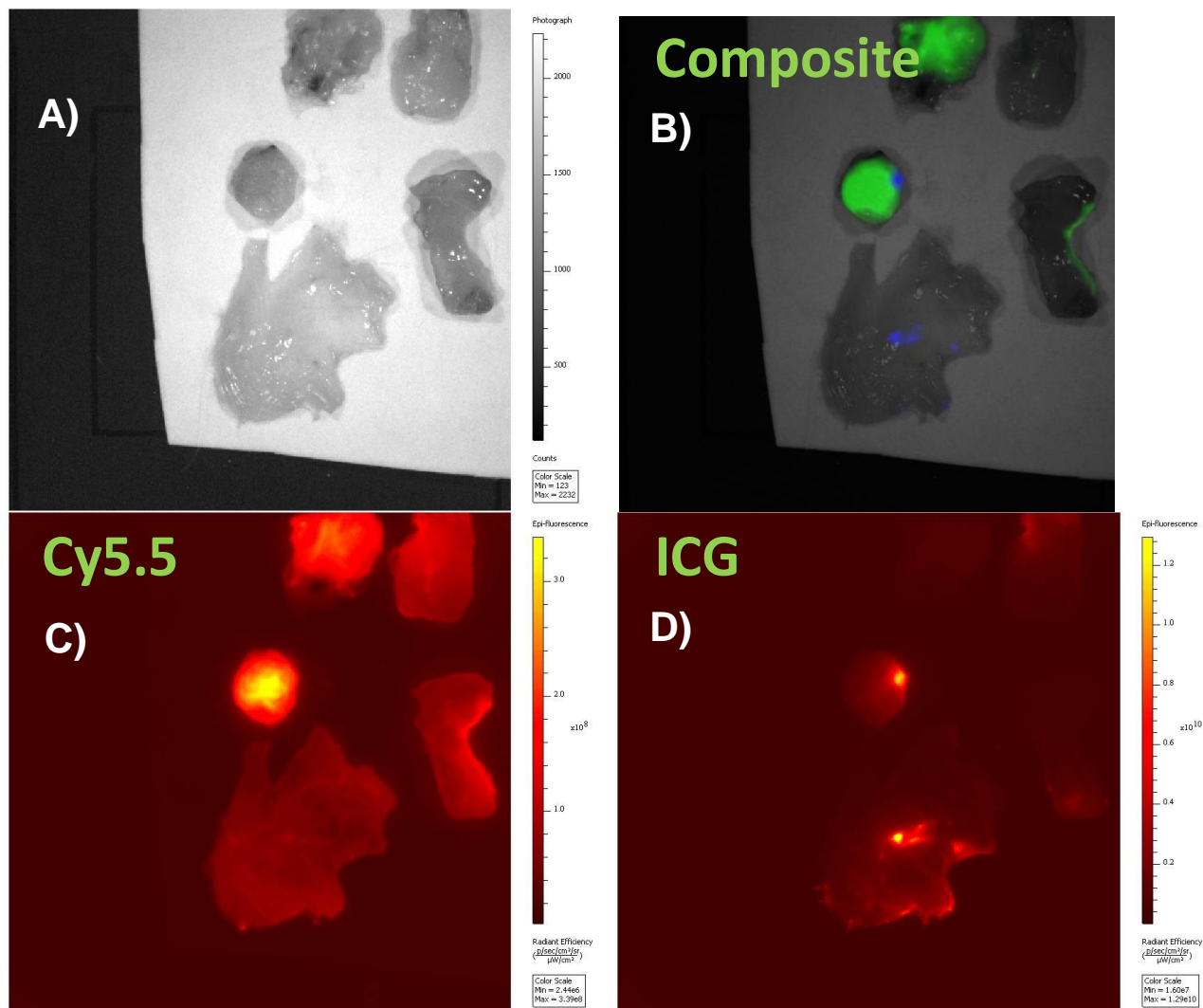


Figure 153 : Imagerie de fluorescence sur des pièces opératoires excisées provenant d'une lapine porteuse de tumeurs mammaires spontanées 24h après injection IV de mimétique RGD-Cy5.5 (24nmol). A) Image en niveau de gris sous lumière blanche. B) Image composite permettant d'apprécier la présence de Cy5.5 (Vert) et d'ICG (Bleu). C) Signal de fluorescence correspondant au Cy5.5. D) Signal de fluorescence correspondant à l'ICG (CIPA 2016).

Cas d'une tumeur utérine associée :

Comme évoqué précédemment en introduction de ce chapitre, l'analyse de la littérature montre qu'il n'est pas rare d'observer une tumeur utérine chez un animal ayant développé une tumeur mammaire spontanée. Pour un des animaux de l'étude, lors de l'autopsie, nous avons pu confirmer la présence d'une tumeur utérine préalablement détectée *in vivo* par échographie. Le signal de fluorescence provenant de la sonde de ciblage des intégrines met en évidence de manière flagrante cette tumeur sur l'une des deux trompes

utérines (Figure 154B).

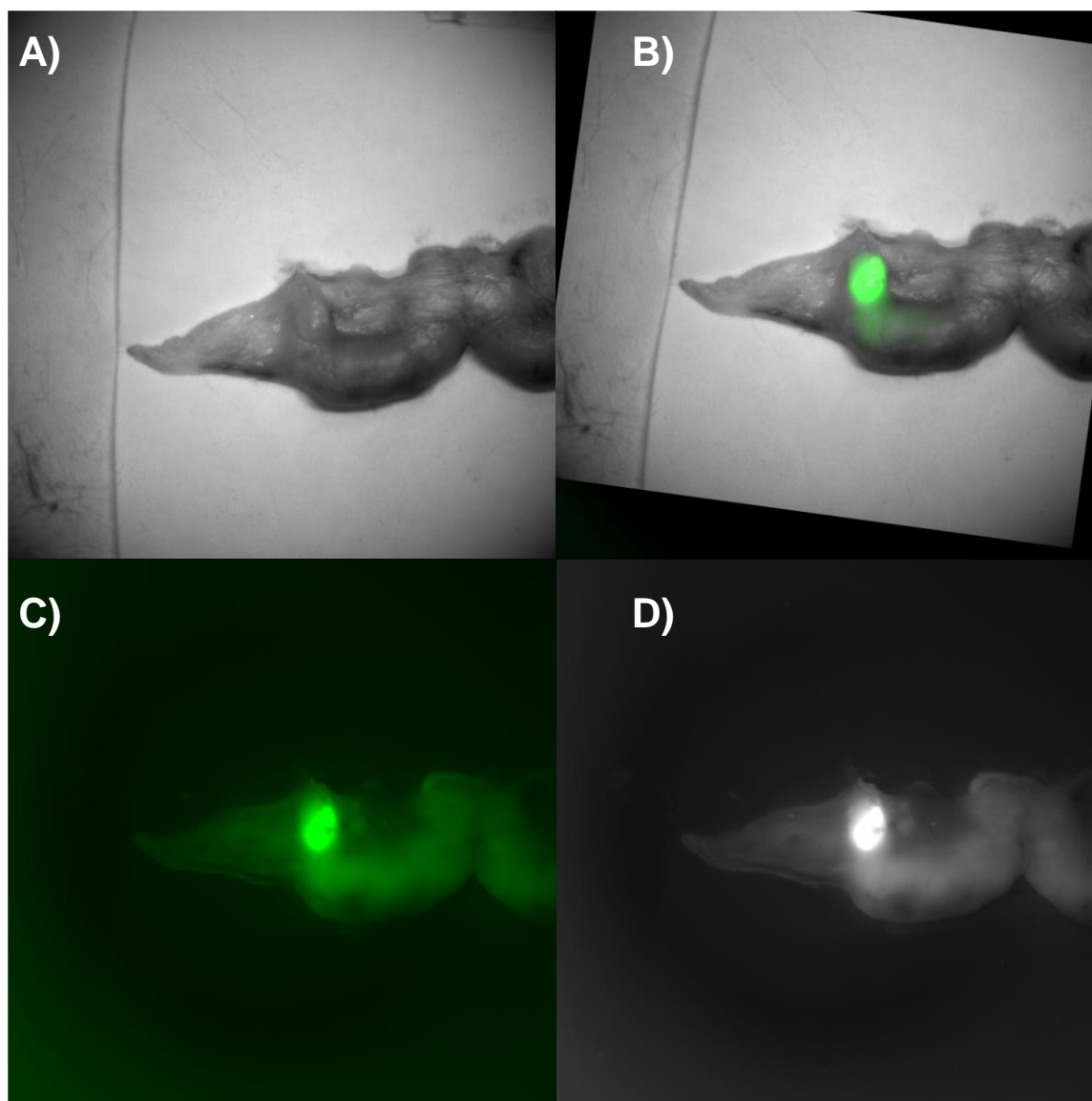


Figure 154 : Imagerie de fluorescence sur utérus excisé provenant d'une lapine porteuse de tumeurs mammaires spontanées 24 après injection IV de mimétique RGD-Cy5.5 (24nmol). Nous pouvons voir précisément la localisation de la tumeur utérine. **A)** Image en niveau de gris sous lumière blanche. **B)** Superposition de l'image de fluorescence et de l'image en niveau de gris de référence. **C)** Signal de fluorescence correspondant. **D)** Imagerie de fluorescence mettant en évidence les zones marquées (CIPA 2016).

Discussion :

La primo-localisation par NIRF de l'ICG après dissection du plan cutané, associée à une confirmation visuelle de la présence de BPV a permis d'identifier les GS. L'utilisation seule de la NIRF de l'ICG aurait également conduit à l'identification des GS. En revanche, la localisation précise de ces GS par NIRF de l'ICG sans incision du plan cutané aurait été plus complexe. D'après notre expérience, il est possible d'identifier et de localiser ces GS superficiels pour la majorité des cas, mais certains GS moins chargés en ICG n'étaient

pas identifiables à travers la peau des animaux.

En ce qui concerne le marquage par le mimétique-RGD-Cy5.5, il a permis de révéler l'expression d'intégrines au niveau tumoral mammaire, ganglionnaire et également au niveau de la tumeur utérine. Les analyses histologiques par microscopie de fluorescence à 680nm qui sont en cours (Quantacell, Pessac), permettront de confirmer le statut des ganglions envahis avec une caractérisation du type tumoral.

De nombreuses équipes travaillent sur le ciblage tumoral en fluorescence grâce à l'expression des intégrines, notamment dans le glioblastome [403], le cancer ovarien [404], ou encore le fibrosarcome chez le chat [405].

En pratique clinique, de plus en plus d'études valorisent l'utilisation de l'ICG pour la recherche des GS dans le cancer du sein [389,406-408]. Des systèmes commerciaux de détection par imagerie de fluorescence infrarouge existent déjà, comme le FLARE. Cette technologie a été mise en œuvre avec succès pour la détection de GS de cancer du sein [409,410]. Cette pratique semble gagner de l'ampleur et pourra probablement à l'avenir, devenir une technique utilisée en routine.

L'imagerie moléculaire de fluorescence, pour d'autres applications en cancérologie est également de plus en plus employée pour permettre au chirurgien l'identification de tissus cancéreux, une meilleure délimitation de marges d'exérèse et de bénéficier d'une exploration très sensible en temps réel [411-416].

3.1.3.3. Imagerie échographique

3.1.3.3.1. Matériels et Méthodes

Afin de pouvoir réaliser des images B-Mode des tumeurs mammaires et utérine des lapines, nous avons utilisé la sonde d'échographie ayant une fréquence centrale de 21MHz (augmentant ainsi la profondeur d'imagerie par rapport à la sonde de 40MHz).

3.1.3.3.2. Résultats

Les images échographiques B-Mode ont permis d'obtenir des informations sur le type de tumeurs (liquidienne ou solide) ainsi que de documenter leur hétérogénéité. En effet, pour un des animaux, les caractéristiques tumorales étaient différentes, à savoir une tumeur plutôt liquidienne, s'apparentant plus à une inflammation des glandes mammaires. Pour tous les autres animaux, les tumeurs étaient des tumeurs solides constituées, de formes

variables, allant de la tumeur très localisée à la tumeur plus diffuse. De la même manière nous avons pu mesurer la taille des tumeurs et en déterminer précisément les marges. En Figure 155 par exemple, la tumeur présentée est de type solide, localisée et avec une faible hétérogénéité.

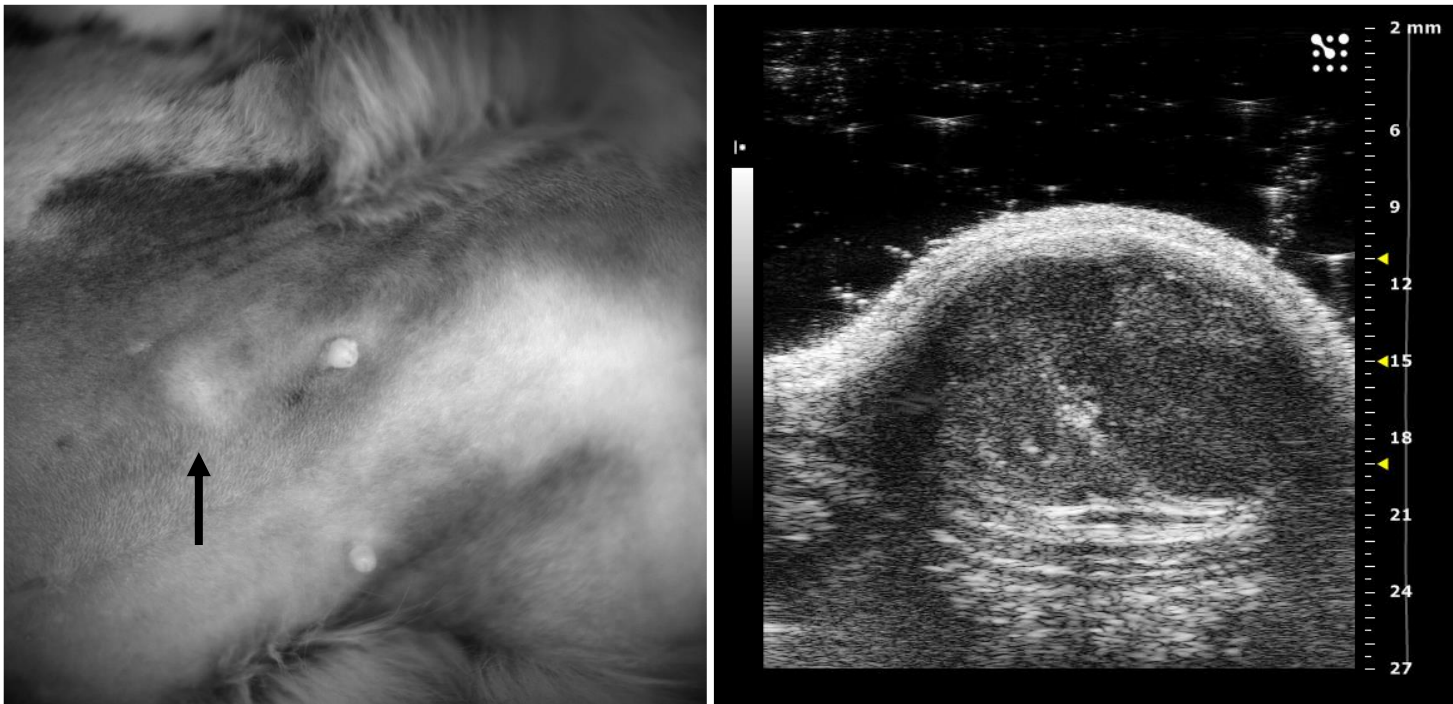


Figure 155 : Image B-Mode d'une tumeur mammaire spontanée chez une lapine.

Grâce à une acquisition 3D, nous avons mesuré son volume et contrôlé son statut d'infiltration. Cette tumeur était bien définie et non infiltrante, à savoir aucune inclusion de tissu tumoral n'était détectable sur le feuillet musculaire sous-jacent (Visualisation 3D présentée en Figure 156).

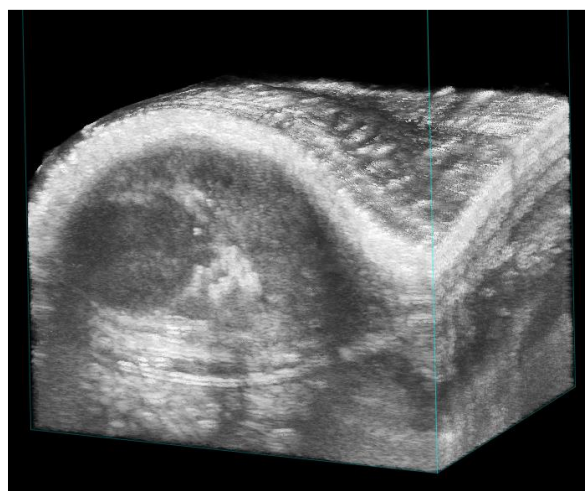


Figure 156 : Visualisation 3D provenant de l'acquisition B-Mode sur la tumeur mammaire spontanée.

Pour la tumeur utérine, nous avons pu caractériser son hétérogénéité et sa taille, car cette tumeur était localisée suffisamment en surface dans l'abdomen. Cette tumeur hétérogène présentait des petites inclusions très échogènes (Figure 157).

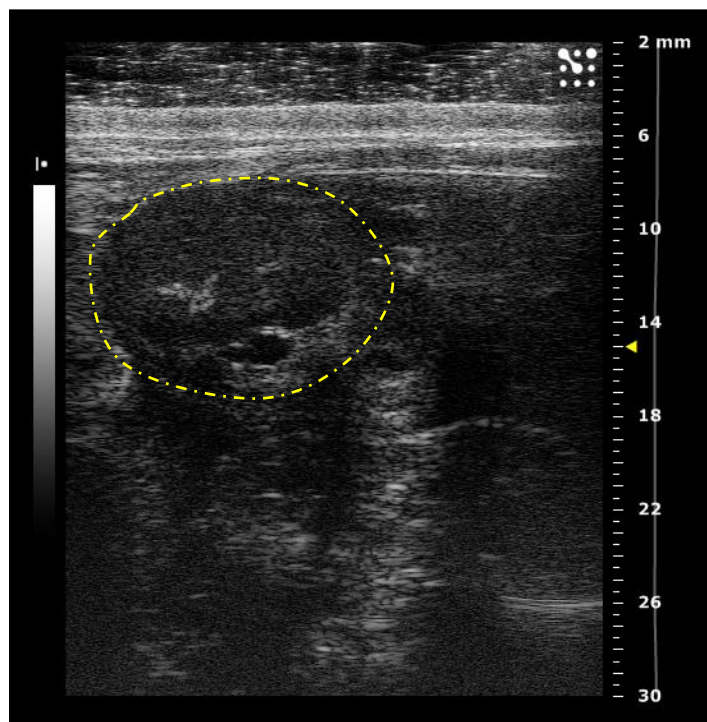


Figure 157 : Images B-Mode d'une tumeur utérine spontanée chez la lapine.

3.1.3.4. Imagerie Photoacoustique

3.1.3.4.1. Matériels et Méthodes

Imagerie :

Nous avons évalué par PA-spectral unmixing la microbiodistribution du BPV et de l'ICG sur les ganglions prélevés. Ces acquisitions ont pu être réalisées en 3D après inclusion des ganglions d'intérêt dans du gel d'échographie.

3.1.3.4.2. Résultats

Imagerie photoacoustique Spectral Unmixing sur ganglions excisés :

Après une primo-détection par imagerie de fluorescence, nous nous sommes intéressés à la cartographie de la présence de BPV et d'ICG au sein des ganglions. En Figure 158A, nous pouvons voir un groupe de 3 ganglions qui ont été chargés par de l'ICG après migration lymphatique. L'image d'échographie B-Mode permet d'établir le lien qui existe entre ces 3 ganglions et de les identifier avec précision (Figure 158B&C).

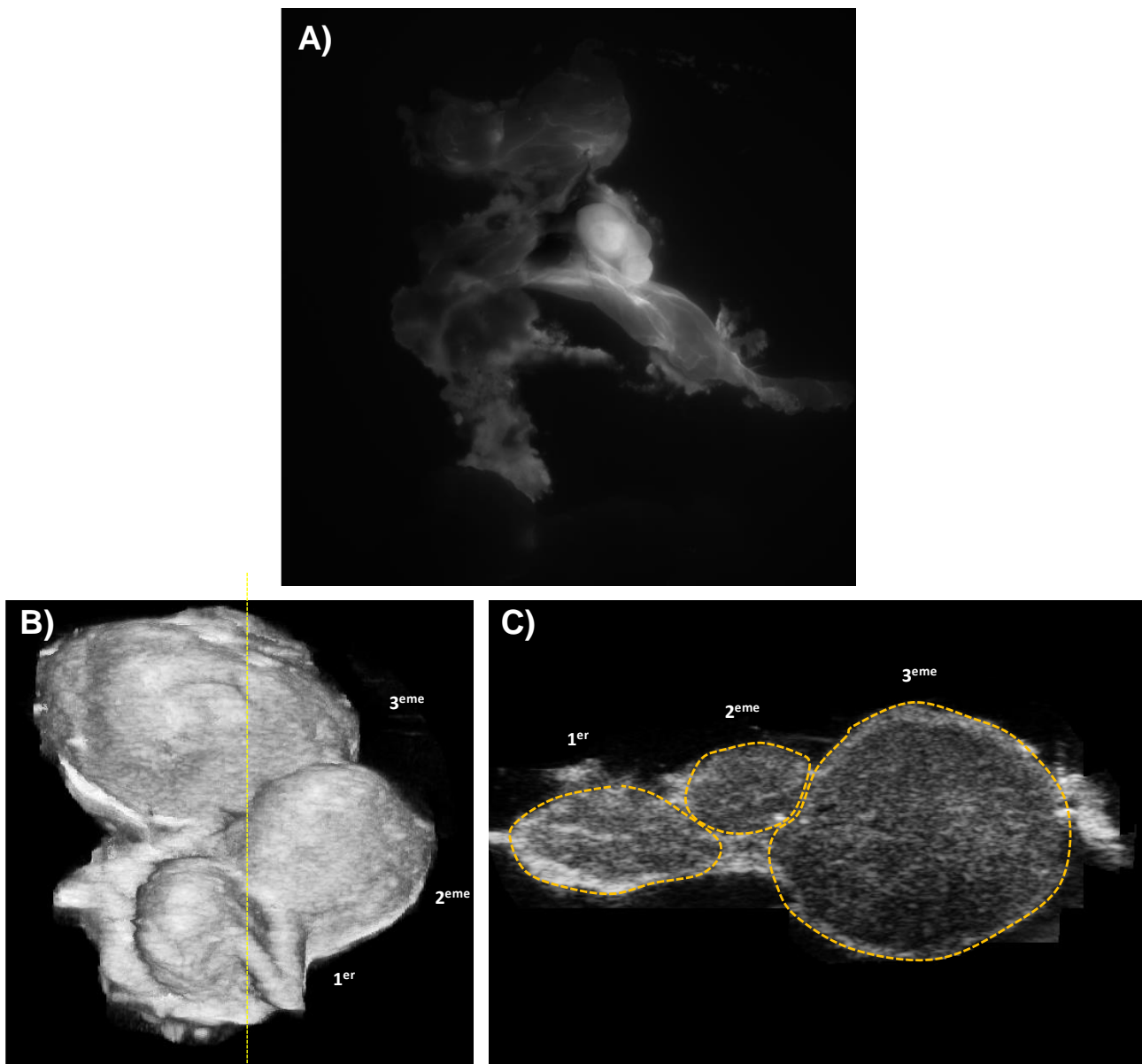


Figure 158 : Explorations *ex vivo* sur des ganglions sentinelles prélevés chez une lapine porteuse de tumeur mammaire spontanée. A) Imagerie de fluorescence sur les ganglions prélevés préalablement détectés grâce à la présence d'ICG et de BPV. B) & C) Rendu 3D et image B-Mode correspondante sur le groupe des 3 ganglions prélevés (CIPA 2016).

En utilisant le « spectral unmixing », après balayage des longueurs d'ondes et analyse des spectres de BPV et de l'ICG, nous avons pu mettre en évidence la présence de BPV et d'ICG au sein de chacun des ganglions. La Figure 159 montre en vert la biodistribution de l'ICG au sein du 1^{er} ganglion par rapport à la biodistribution du BPV en bleu. En Figure 160, nous pouvons voir en vert la biodistribution de l'ICG au sein du 3^{ème} ganglion par rapport à la biodistribution du BPV en bleu.

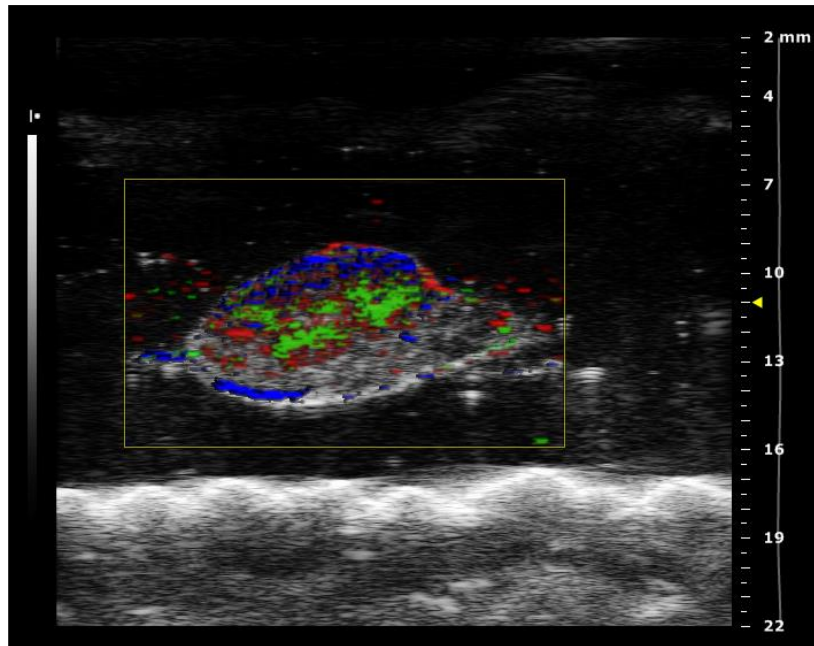


Figure 159 : Image photoacoustique *ex vivo* réalisée sur le premier ganglion. Après « spectral unmixing », nous pouvons voir la micro-biodistribution de l'ICG en vert et du BPV en bleu (CIPA 2016).

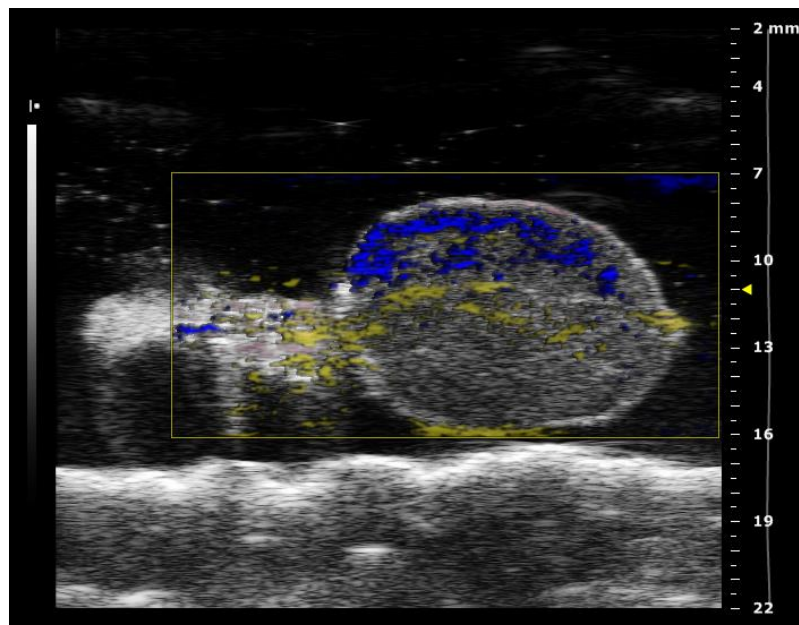


Figure 160 : Image photoacoustique *ex vivo* réalisée sur le troisième ganglion. Après « spectral unmixing », nous pouvons voir la micro-biodistribution de l'ICG en vert et du BPV en bleu (CIPA 2016).

Discussion :

Concernant les études menées sur la micro-biodistribution du BPV et de l'ICG, nous avons observé que ces molécules sont réparties de manière différente au sein des ganglions, ce qui suggère que la diffusibilité de ces deux molécules est différente. L'ICG semble être

chargé à l'intérieur des ganglions, tandis que le BPV semble s'être accumulé en périphérie.

Les approches sur le modèle spontané de tumeurs mammaires chez le lapin ont donc permis de montrer l'intérêt de la détection extemporanée de l'envahissement des ganglions sentinelles par imagerie du ciblage des intégrines en fluorescence à 680nm. Cette technique permet d'obtenir des informations rapides sur le statut d'invasion sans nécessiter d'investissements coûteux. La détection des ganglions après injection péri-tumorale d'ICG s'est révélée être une technique fiable, non-invasive et non-radioactive. Par contre, l'épaisseur de la peau du sujet reste un point important à considérer, puisqu'elle va constituer une limite importante à leur détection (comparé à l'imagerie TEMP aux colloïdes de ^{99m}Tc ou à la simple détection peropératoire par sonde collimatée).

Enfin, l'imagerie photoacoustique *ex vivo* sur les ganglions prélevés pourrait permettre d'évaluer et de quantifier la charge tumorale présente au sein du ganglion envahi, après détection d'un agent de contraste ciblé associé à une procédure de « spectral unmixing ».

Ce travail qui fait également l'objet d'une publication qui est en cours de rédaction (cf. Annexe 1), a conduit au développement d'un système d'imagerie de fluorescence peropératoire facilement déplaçable et opérationnel pour l'exploitation d'agents de contraste de type ICG ou de ciblage des intégrines. Réalisé à l'interface de deux thèses de doctorat en Sciences dont celle du Dr Moussa Badiane au CHU de St Louis, Sénégal, il débouchera en 2017 sur un programme de validation en recherche clinique en onco-chirurgie mammaire à St Louis et à Dakar. Une opération de transfert technologique entre le CNRS-TAAP-CIPA, ONIRIS et le Cancéropôle Grand Ouest est également envisagée pour la réalisation d'un système dédié à l'onco-chirurgie, principalement chez le chien.

Afin d'assurer sa mission de service à la communauté scientifique pour l'imagerie dédiée à l'innovation thérapeutique, le CIPA s'implique dans des projets de R&D visant à anticiper les besoins des chercheurs et à mieux définir les périmètres d'exploitation des nouvelles modalités d'imagerie. La photoacoustique, de développement récent, est une parfaite illustration de cette situation. Par ailleurs, dans l'objectif de confier au CIPA de nouveaux travaux, les chercheurs ont souvent besoin d'études de faisabilité préalablement au dépôt de projets.

Dans ce contexte, nous avons eu l'opportunité d'identifier le potentiel de l'imagerie PA pour plusieurs projets pour lesquels les résultats obtenus lors des premières études effectuées en la présence des chercheurs, permettront à ces équipes de valoriser leurs travaux sous forme d'articles scientifiques et de dépôts de projets pour financements par les organismes.

3.2. Exploration de chondrosarcomes orthotopiques par imagerie photoacoustique chez la souris

Le chondrosarcome représente la seconde tumeur maligne osseuse la plus fréquente chez l'adulte après l'ostéosarcome. Du fait de sa matrice extracellulaire chondrogénique abondante, de sa faible vascularisation et de son environnement hypoxique, le chondrosarcome est une tumeur très résistante aux chimiothérapies et radiothérapies. De nos jours, le seul traitement efficace reste la prise en charge chirurgicale. Le laboratoire INSERM/UdA UMR990 Clermont Ferrand (Dr Noirault) développe une nouvelle stratégie de ciblage thérapeutique qui exploite les 2 caractéristiques du microenvironnement des chondrosarcomes : une matrice extracellulaire associée à un tissu hypoxique. Se basant sur l'affinité du fragment ammonium quaternaire pour les protéoglycanes, les chercheurs de cette équipe exploitent cette fonction pour adresser sélectivement des prodrogues activées en conditions hypoxiques à la matrice extracellulaire des chondrosarcomes. Ils ont donc proposé de vectoriser, grâce à l'ammonium quaternaire, une prodrogue via une entité nitromidazole ou nitrofurane clivable ^[417]. Nous avons donc évalué par imagerie PA et échographie les caractéristiques hypoxiques et vasculaires de ces chondrosarcomes.

3.2.1. Matériels et Méthodes :

La lignée cellulaire de chondrosarcome humain HEMC-SS constitue une lignée tumorale invasive du tissu conjonctif. Le modèle qui a été développé est basé sur une culture cellulaire en 3D sous forme de sphéroïdes. Ces sphéroïdes sont ensuite implantés en

sous-cutané ou au niveau de l'articulation fémoro-tibiale, chez la souris NMRI Nude (Charles River, L'Arbresle, France). Les greffes tumorales ont été réalisées par l'équipe du Dr Noirault.

Au total, 5 animaux ont été étudiés, 6 semaines après l'implantation SC ou orthotopique des cellules tumorales (4 animaux avec des tumeurs SC, 1 animal avec une tumeur orthotopique).

Les protocoles d'imagerie PA, B-Mode, Doppler et Contraste utilisés ont été détaillés en 1.3.1.1.

3.2.2. Résultats

Les résultats obtenus sur le modèle de sphéroïdes injectés en SC confirment le caractère hypoxique de ces tumeurs à J 42. En Figure 161A on observe une très forte hypoxie en profondeur et une oxygénation relativement plus élevée en surface. La SO_2 3D de cette tumeur était de 36,6%. En ce qui concerne la vascularisation mesurée en Doppler, nous avons observé que certains gros vaisseaux traversent la tumeur, mais la vascularisation principale est localisée en périphérie (Figure 161B). L'imagerie de contraste confirme qu'il y a bien une micro-circulation persistante jusqu'à l'intérieur de la tumeur. En Figure 161E,F&G, nous pouvons voir que la charge de microbulles se fait pratiquement sur toute l'aire tumorale.

Par contre, pour le modèle orthotopique, nous avons observé une hétérogénéité très importante de l'échogénicité (Figure 162C), avec un développement de la tumeur qui se fait au niveau de l'articulation, mais qui envahit également les muscles environnants. La vascularisation mesurable au Power Doppler est plus importante que pour les modèles SC (Figure 161A&B), ce qui signifie qu'il y a une proportion plus importante de vaisseaux de tailles supérieures à 100 μ m. Il y a également présence de zones hypoxiques dans ce modèle orthotopique (Figure 162D).

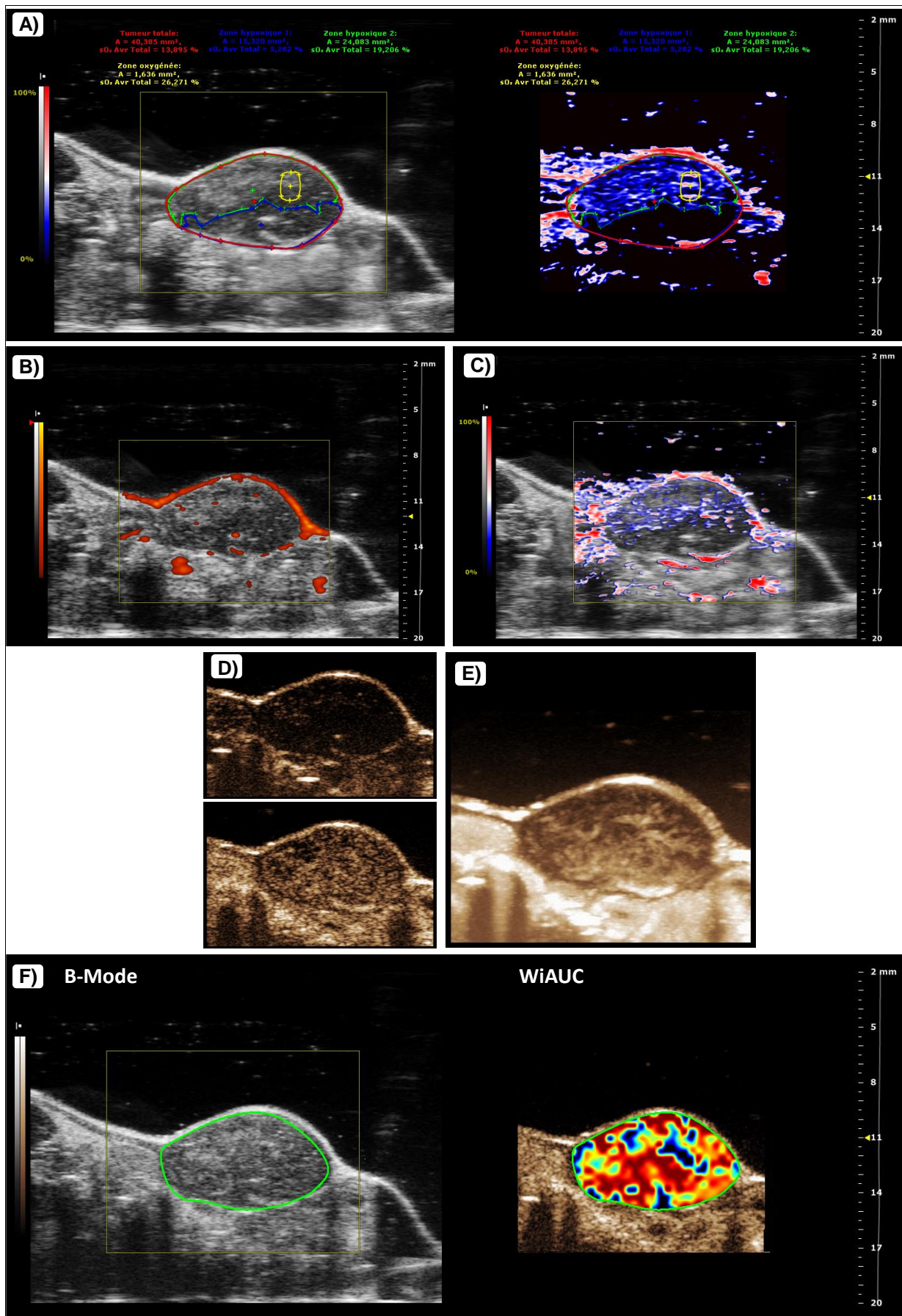


Figure 161 : Suivi de paramètres physiopathologiques dans un modèle sous-cutané de chondrosarcome humain chez la souris NMRI Nude. A) Image OxyHemo de la tumeur. **B)** Image Power Doppler 2D correspondante. **C)** Superposition de l'image B-Mode et OxyHemo. **D)** Imagerie de contraste avant et après l'injection IV de microbulles non-ciblées. **E)** MIP de la perfusion 10 sec après injection des microbulles. **F)** Image paramétrique du WiAUC (CIPA 2016).

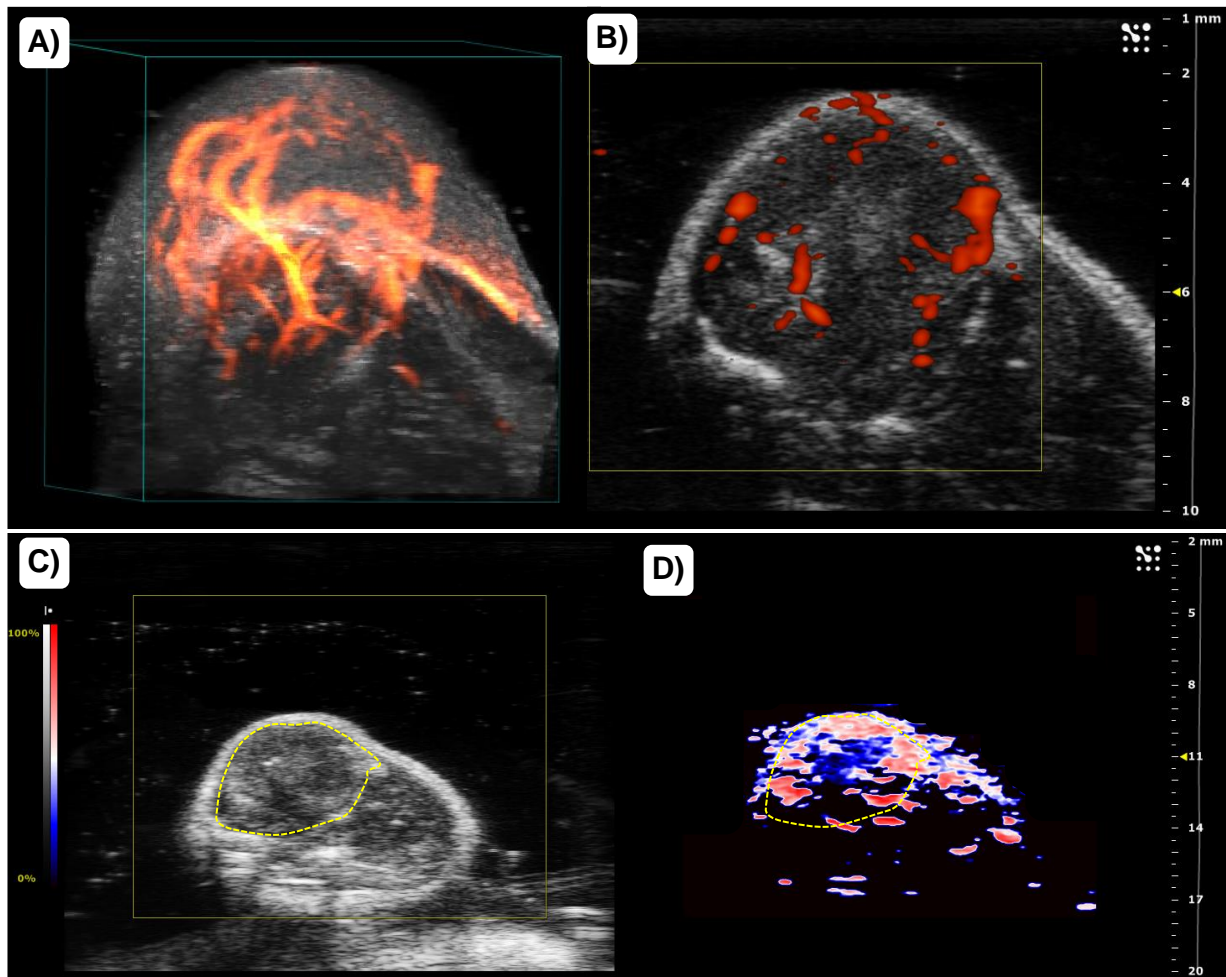


Figure 162 : Suivi de paramètres physiopathologiques dans un modèle orthotopique de chondrosarcome humain chez la souris NMRI Nude. A) Visualisation 3D du power Doppler. B) Image Power Doppler 2D correspondante. C) Image B-Mode de la tumeur orthotopique. D) Image OxyHemo correspondante (CIPA 2016).

Discussion :

Les explorations menées en PA et échographie ont permis de valider le statut hypoxique des tumeurs, et d'apporter un moyen de suivre aussi bien l'hypoxie que le statut perfusionnel de ces tumeurs. En effet, l'hypoxie associée à une micro-circulation toujours présente (mais vraisemblablement perturbée) permettrait l'accumulation dans la tumeur du traitement et de bénéficier de l'environnement hypoxique. De futures études pourraient permettre de s'intéresser à l'évolution de l'hypoxie au cours des traitements activés en conditions hypoxiques.

Cette nouvelle stratégie thérapeutique offre un réel espoir pour le traitement des cancers se développant au niveau cartilagineux, une pathologie relativement rare, mais particulièrement redoutable compte tenu de l'absence actuellement de molécules efficaces. Ce travail a d'ailleurs fait l'objet d'une publication qui a été soumise (Annexe 11).

3.3. Exploration de rétinoblastomes orthotopiques par imagerie photoacoustique chez la souris

Le rétinoblastome est une maladie infantile rare avec une incidence de 1/15 000 naissances [418]. Le laboratoire INSERM U759, Orsay (Dr Thomas) et l'Institut Curie (Dr Lemaître) développent une nouvelle stratégie thérapeutique de traitement des rétinoblastomes par photothérapie dynamique, évitant ainsi les effets secondaires bien connus des chimiothérapies, tels que la perte de cheveux, les nausées et vomissements, la fatigue ou encore les diarrhées. Ce traitement consiste en un traitement antitumoral non-mutagène très localisé utilisant une porphyrine photosensible excitée par la lumière. La porphyrine est administrée à l'animal, puis une application de lumière laser permet d'entraîner des effets directs (formation de ROS (Reactive Oxygen Species)), ainsi que des effets indirects (activation des voies de signalisation induisant la mort cellulaire).

3.3.1. Matériels et Méthodes

Différents modèles de rétinoblastomes orthotopiques ont été testés. Les lignées Rb200, Rb102 et Rb111 isolées chez des patients ont été implantées chez les souris. Pour ces protocoles, des souris SCID et C57Bl6 tyr c (albinos) ont été sélectionnées en fonction de la lignée tumorale et de l'expérience de l'équipe sur ces modèles. Les greffes tumorales ont été réalisées par l'équipe du Dr Thomas.

Au total, 6 animaux ont été étudiés, 3 semaines après l'implantation orthotopique des cellules tumorales au niveau de la rétine des animaux.

Les protocoles d'imagerie PA, B-Mode, Doppler et Contraste utilisés ont été détaillés en 1.3.1.1. Pour les investigations non-photoacoustiques, nous avons pu travailler à très haute résolution avec un transducteur d'échographie possédant une fréquence centrale de 50MHz.

3.3.2. Résultats

Nous avons comparé, pour chacun des protocoles d'imagerie, l'œil sain à l'œil tumoral. Les résultats de l'imagerie échographique permettent de mettre en évidence les tumeurs de manière extrêmement précise, et également de pouvoir mesurer le volume tumoral par rapport au volume de l'œil. Il a été possible de réaliser des mesures d'oxygénation sur ce modèle, même si la taille des yeux et des tumeurs des animaux était relativement faible. Les données photoacoustiques acquises sur l'œil tumoral (œil droit) montrent que le tissu tumoral est hypoxique à certains endroits (Figure 163). Lorsque nous avons comparé les

données obtenues aux images acquises sur l'œil sain (œil gauche), nous avons pu observer qu'aucun signal en B-Mode n'est détectable à l'intérieur de l'œil sain de l'animal. L'échogénicité et les caractéristiques échographiques de ce rétinoblastome orthotopique sont particulièrement favorables à la mise en œuvre des modalités d'exploration ultrasonores.

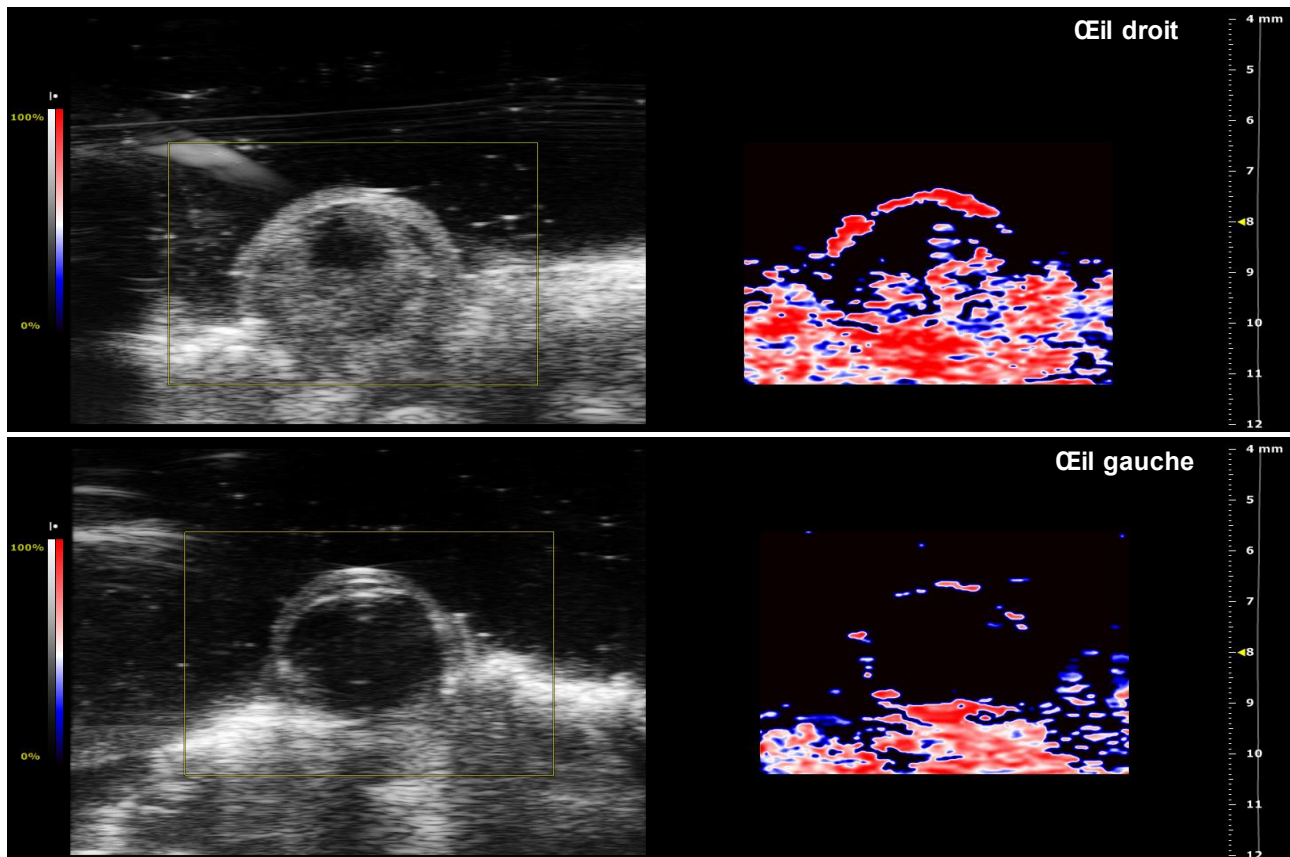


Figure 163 : Imagerie photoacoustique OxyHemo d'un œil avec rétinoblastome orthotopique humain (œil droit) et d'un œil sain (œil gauche) (CIPA 2016).

Pour les images Power Doppler, nous avons noté que les yeux présentant des tumeurs possédaient une proportion de gros vaisseaux moins importante que les yeux sains. En visualisation 3D, les images Power Doppler montrent une vascularisation plus périphérique de l'œil où a été implantée la tumeur par rapport à l'œil sain (Figure 164).

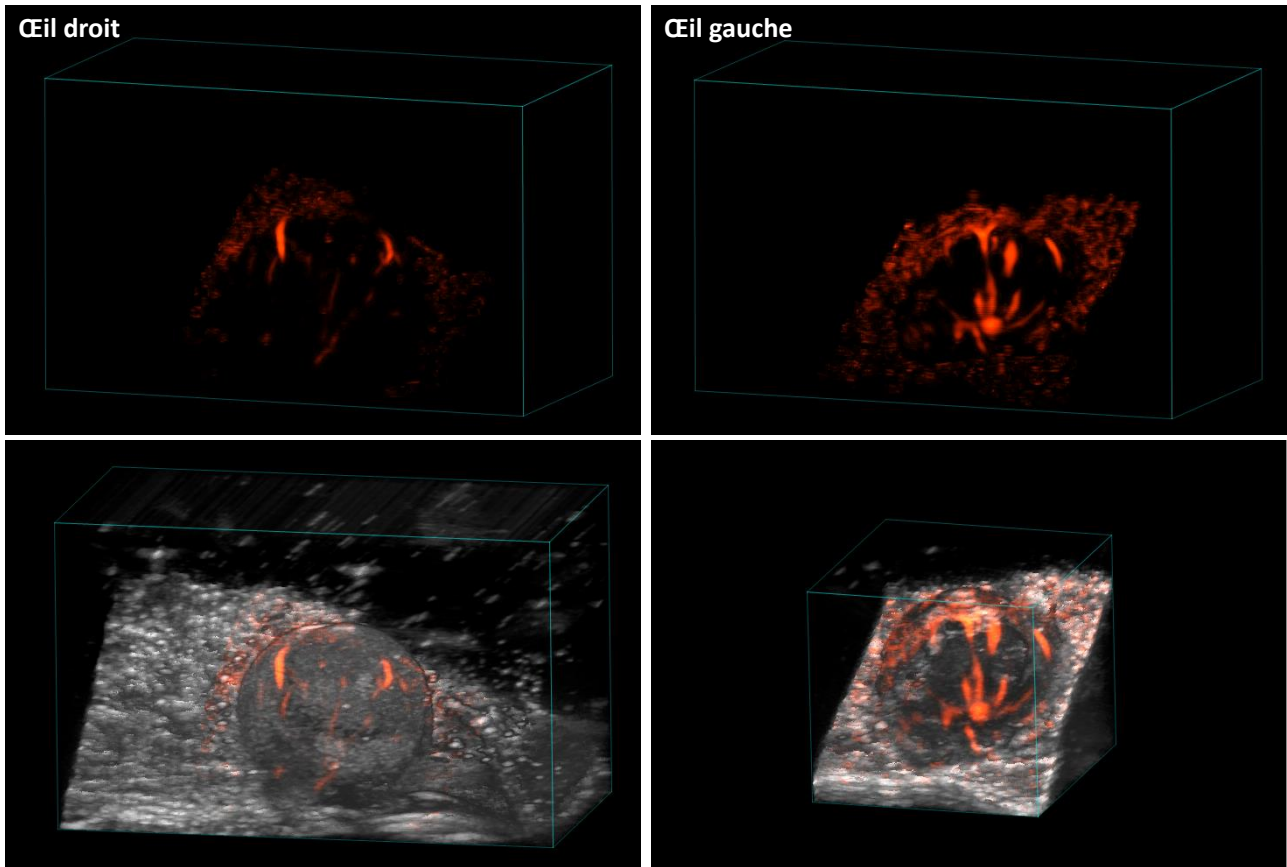


Figure 164 : Rendus Power Doppler 3D d'un œil avec rétinoblastome orthotopique humain (œil droit) et d'un œil sain (œil gauche) (CIPA 2016).

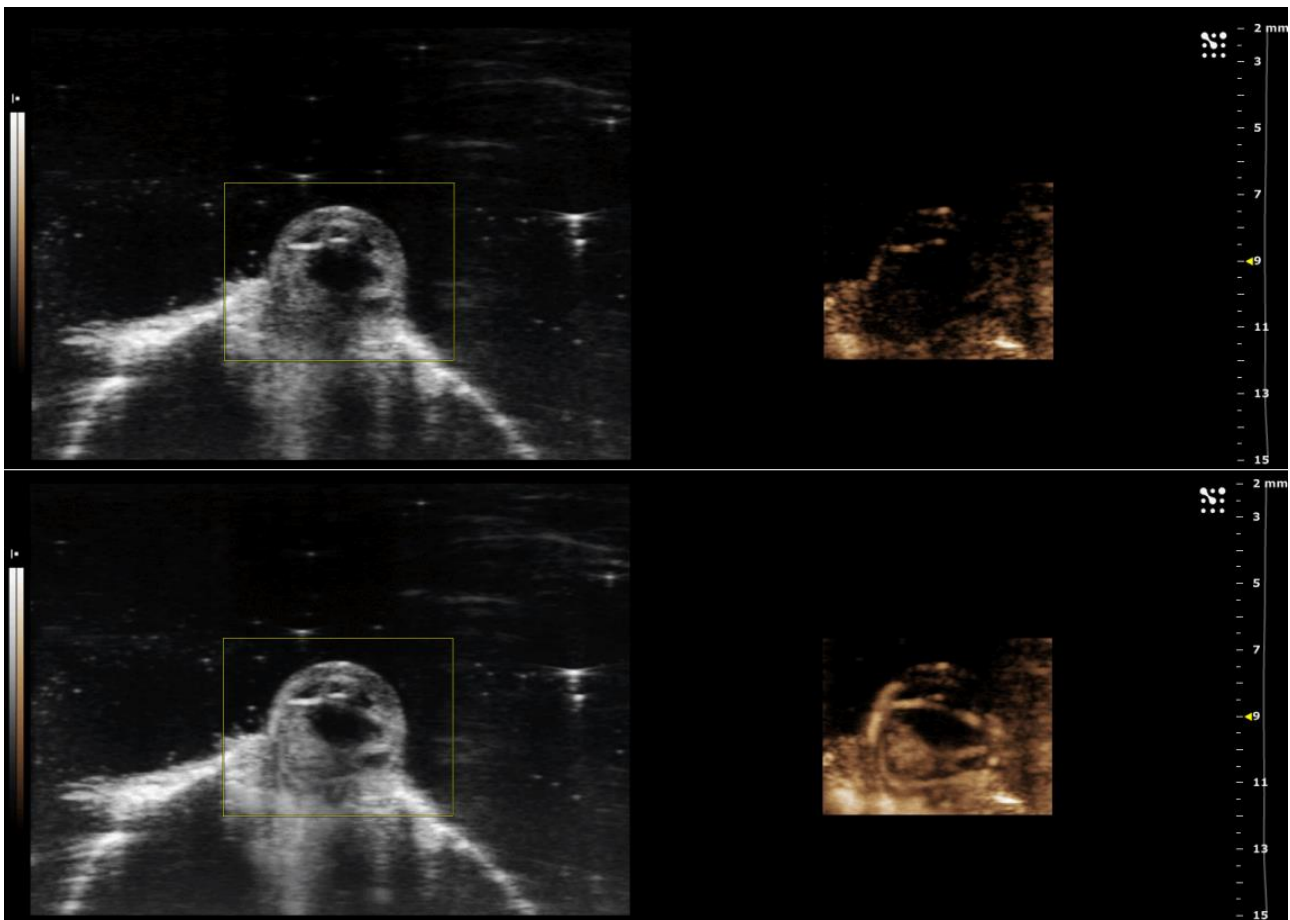


Figure 165 : Maximum Intensity Projection (MIP) provenant d'acquisitions d'échographie de contraste d'un œil avec rétinoblastome orthotopique humain avant et après injection IV de microbulles non-ciblées (CIPA 2016).

Grâce à l'imagerie de contraste, nous avons mis en évidence la perfusion de ces tumeurs. En Figure 165, nous avons enregistré un MIP d'acquisition de contraste sur l'œil tumoral avant et 30 secondes après l'injection des MB. Nous pouvons clairement identifier un tissu tumoral dans la partie inférieure de l'œil.

Nous avons ensuite comparé ces données avec l'histologie réalisée sur les yeux prélevés et retrouvé les structures observées en échographie (pour la tumeur présentée), à savoir un tissu tumoral fin au niveau de la chambre antérieure de l'œil, ainsi qu'un autre tissu tumoral accolé à la rétine. Nous retrouvons également sur les deux types d'images le cristallin, ainsi que l'iris (Figure 166).

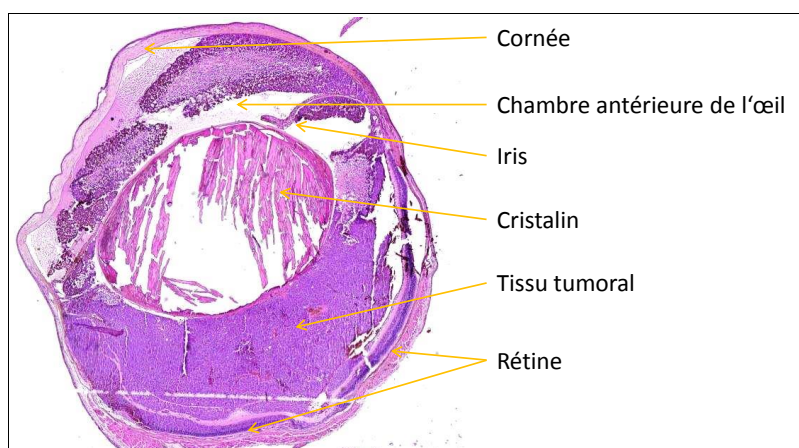


Figure 166 : Coupe histologique de l'œil présentant un rétinoblastome orthotopique. Images acquises après injection IV de microbulles non-ciblées (S. Lemaitre, C. Thomas, 2016).

Discussion :

Cette approche par échographie permet de détecter la prolifération tumorale à un stade précoce (tumeurs < 1 mm³) et de prédire l'évolution de la localisation et la forme de la tumeur. Une des techniques utilisées actuellement par les équipes de recherche en ophtalmologie animale est l'imagerie OCT (Optical Coherence Tomography). L'OCT réalise une imagerie haute résolution en sections des microstructures internes dans les tissus biologiques en mesurant les échos de la lumière rétrodiffusée [419]. Le système optique est composé d'un laser femtoseconde qui projette un faisceau de lumière sur un miroir semi-réfléchissant de référence, placé avec un angle de 45° permettant la séparation du faisceau en 2. Une partie du faisceau va éclairer un miroir de référence, l'autre partie éclairant la rétine de l'animal. Les 2 faisceaux réfléchis sont ensuite dirigés vers un spectromètre qui va analyser les longueurs d'onde, ce qui va entraîner la formation d'interférences (interférogramme). Ces interférences sont analysées par

transformée de Fourier permettant la formation d'images. Cette technique peut être apparentée à de « l'échographie optique ».

L'équipe de S. Lemaitre et C. Thomas utilise cette technique (Micron IV retinal imaging microscope, Phoenix research labs, Etats-Unis) afin d'obtenir des informations sur la rétine des animaux, mais il est parfois difficile de pouvoir mesurer avec précision la taille de la tumeur, à partir du moment où l'on n'obtient que des acquisitions 2D (pour le modèle mis en œuvre pour ces protocoles). L'avantage de l'approche par échographie 3D est de mesurer le volume tumoral, pour une évaluation plus précise de l'efficacité d'une thérapie.

Le fait que le Power Doppler montre des vaisseaux de taille supérieure à 100µm en nombre moins important au niveau des yeux présentant des tumeurs par rapport aux yeux sains pourrait s'expliquer par le fait que la pression est plus importante au sein du globe oculaire, ou que la vascularisation est de plus en plus perturbée à l'intérieur de l'œil porteur de la tumeur. Les gros vaisseaux ne sont plus fonctionnels, ce qui conduirait à une irrigation persistante par le réseau vasculaire collatéral.

Des analyses histologiques plus poussées permettront de comparer la vascularisation (Power Doppler et imagerie de contraste) à la localisation des vaisseaux à l'intérieur des tumeurs (histologie). Il est également prévu de corréliser ces données aux acquisitions d'oxygénation 3D monitorées par PA en mode OxyHemo.

3.4. Exploration de l'oxygénation fœto-placentaire par imagerie photoacoustique chez la rate gestante

L'insuffisance placentaire se traduit par une diminution de la croissance chez le fœtus (retard de croissance intra utérin ou RCIU) et/ou une hypertension artérielle, une insuffisance rénale et hépatique chez la mère (pré-éclampsie). La pré-éclampsie survient chez 4 % de la population des femmes enceintes et le retard de croissance concerne 10% des grossesses. Ces pathologies sont un véritable enjeu de santé publique car elles représentent une cause majeure de morbi-mortalité maternelle et fœtale. Aujourd'hui la prise en charge des pathologies liées à l'insuffisance placentaire repose sur leur dépistage, le traitement symptomatique de l'hypertension artérielle, et lors de la mauvaise tolérance materno-fœtale un arrêt de la grossesse. Ces pathologies sont liées d'une part à une diminution de la perfusion placentaire et d'autre part à une diminution de l'oxygénation au sein du placenta. Pour le dépistage, les obstétriciens disposent de l'échographie qui est utilisée quotidiennement dans leurs services. Cependant ils ne disposent que de paramètres de mesures indirects de la fonction placentaire et d'une description

anatomique mais non fonctionnelle du placenta. Les paramètres de mesures indirectes sont le Doppler des artères utérines qui reflète une anomalie lors de l'implantation du placenta et le Doppler de l'artère ombilicale qui permet d'évaluer les résistances placentaires.

Actuellement aucune étude sur l'oxygénation placentaire par imagerie photoacoustique n'est publiée à notre connaissance. Cependant l'évaluation de l'oxygénation de l'unité foeto-placentaire est un paramètre qui semble prometteur pour la meilleure compréhension de l'insuffisance placentaire en pratique clinique. Des travaux ont été menés sur la mesure de l'oxygénation foeto-placentaire par BOLD IRM [420,421]. La probable perturbation de l'oxygénation au sein de l'unité foeto-placentaire lors des insuffisances placentaires justifie le développement de modalités d'imagerie médicale permettant d'apprécier la saturation en oxygène au sein du placenta. Ce projet est donc novateur dans le domaine de l'imagerie photoacoustique. L'équipe 5 INSERM UMR930 (Dr Bouakaz) et les gynécologues obstétriciens du CHU de Tours (Dr Arthuis) s'intéressent tout particulièrement au développement de l'imagerie fonctionnelle en échographie pour mieux appréhender la compréhension de la fonction placentaire et de ses pathologies. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux paramètres de perfusion et d'oxygénation du sang au sein du placenta lors de la gestation physiologique chez la rate (en couplant l'échographie de contraste et l'imagerie photoacoustique).

3.4.1. Matériel et Méthodes

Animaux :

Pour réaliser cette étude nous avons travaillé avec des rates femelles Sprague Dawley (Janvier, France), d'une part, car le placenta de la rate est de type hémochorial (villosités choriales au contact direct du sang maternel dans la chambre intervillieuse) comme dans l'espèce humaine, et d'autre part car les modifications histologiques du placenta aux différents stades de la gestation chez la souche Sprague Dawley sont bien décrites dans la littérature. Ceci nous permettra de comparer nos résultats avec la littérature existante et avec les études précédentes de notre équipe partenaire [422]. La gestation chez la rate dure 21 jours. L'étude des 14ème, 17ème et 20ème jours de gestation a été définie par rapport aux données histologiques de la littérature. En effet, la mise en place du triangle mésométrial (zone d'implantation maternelle du placenta) et le développement du réseau capillaire placentaire chez le rat s'effectue essentiellement lors de la fin de la deuxième semaine [423].

Un nombre total de 15 femelles gestantes ont été nécessaires pour cette étude.

Pour chaque procédure, l'animal était pesé, puis anesthésié par un mélange Isoflurane/air (1.5% isoflurane, Isoflo®, AXIENCE S.A.S, Pantin, France). Un rasage à la tondeuse et une épilation à la crème dépilatoire (Veet, Reckitt Benckiser, Massy, France) de l'abdomen étaient nécessaires. L'animal était ensuite sous surveillance des paramètres physiologiques (température, fréquence respiratoire et fréquence cardiaque) et installé sur une plaque chauffante pour l'ensemble de la procédure.

Protocole expérimental :

- J14 : imagerie photoacoustique sur les placentas accessibles à l'échographie (pour 5 rates).
- J17 : imagerie photoacoustique sur les placentas accessibles à l'échographie (pour 5 autres rates).
- J20 : imagerie photoacoustique sur les placentas accessibles à l'échographie (pour 5 autres rates).

Imagerie :

Lors de l'examen en photoacoustique, l'image est centrée sur une unité foëto-placentaire en B-mode puis nous passons en mode photoacoustique. Tout d'abord, l'oxygénation du sang au sein du placenta est mesurée avec un taux en oxygène à 100% (dans le mélange gazeux qui est distribué dans le masque d'anesthésie) puis à 5% et enfin de nouveau à 100%. La période d'hypoxie est de 3 minutes (taux d'oxygène du mélange gazeux à 5%). La variation de l'oxygénation lors de ces changements est observée et quantifiée, jusqu'à la ré-oxygénation de l'unité foëto-placentaire. Des séquences vidéo de 11 minutes sont enregistrées afin de suivre l'effet d'une hypoxie induite (5% d'oxygène). L'ensemble est comparé à l'oxygénation de la peau du rat qui présente une hypoxie rapide lors du passage du taux d'oxygène de 100% à 5% et une réoxygénation rapide lorsque l'on repasse à 100%. L'objectif est de rechercher une tolérance foëtale à l'hypoxie et de vérifier la faisabilité de la quantification de l'oxygénation du sang dans le placenta (tracé d'une courbe variant en fonction du taux d'oxygène). Plusieurs mesures de photoacoustique peuvent être réalisées chez un même animal mais dans ce cas un temps suffisamment long de ré-oxygénation doit être respecté entre deux explorations. La durée de 3 minutes d'hypoxie a été validée au cours d'une étude de faisabilité. Celle-ci est bien tolérée par les animaux et nous permet d'étudier les variations de l'oxygénation qui sont assez lentes au

sein de l'unité foeto -placentaire. Les échographies de contraste étaient réalisées en premier puis l'imagerie photoacoustique quelques minutes après afin de diminuer la durée de l'anesthésie.

Quatre ROIs (1,35mm²) ont été manuellement définies par le Dr Arthuis, gynécologue obstétricienne : la peau, le triangle mesométrial, ainsi que le feuillet maternel et foetal du placenta (Figure 167). Les paramètres d'oxygénation ont été calculés pour chacune des ROIs à partir des courbes temps-intensités. Le ΔSO_2 correspondant au changement de la SO_2 entre hyperoxygénation (100% d'O₂ ventilé) et hypoxie (5% d'O₂ ventilé) a été défini comme :

$$\Delta SO_2 = SO_2 \text{ hyper-oxygenation} - SO_2 \text{ hypoxie.}$$

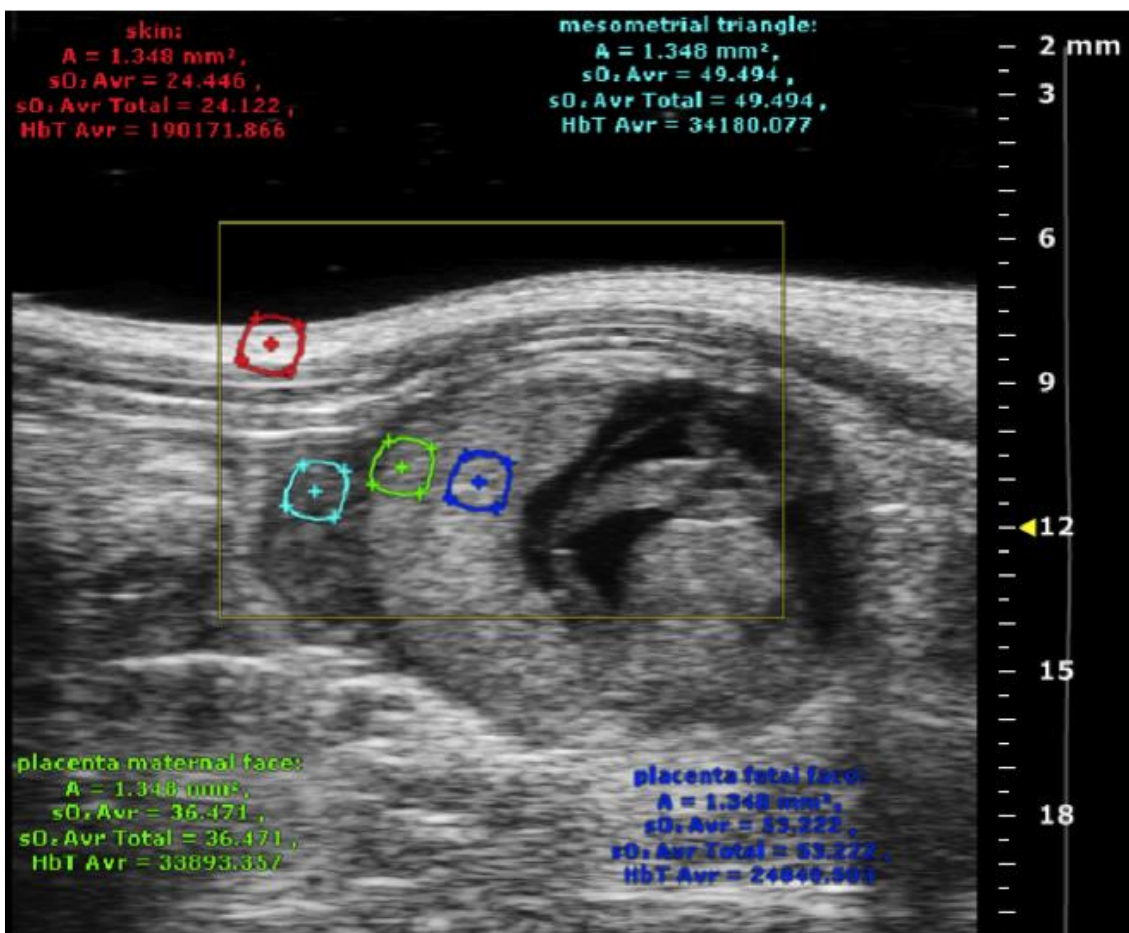


Figure 167 : Placement des différentes ROIs sur l'image B-Mode. L'unité foetoplacentaire (ROI rouge), le triangle mésométrial (ROI bleu clair), le feuillet maternel (ROI verte) et le feuillet foetal (ROI bleu foncé) (CIPA 2016).

3.4.2. Résultats

Quelques secondes après la diminution de la concentration en O₂ du mélange gazeux respiratoire, la SO_2 diminue de manière significative dans chaque ROI ($p < 0,001$). L'effet

de l'hyperoxygénation a également été visualisé significativement par des SO_2 augmentées dans les ROIs ($p < 0,001$) (Figures 168,169,170). Au cours de la gestation, les taux moyens de SO_2 au niveau de la peau ont augmenté ($p = 0,02$) tandis qu'ils diminuaient au niveau du feuillet placentaire fœtal ($p < 0,001$) et maternel ($p = 0,04$).

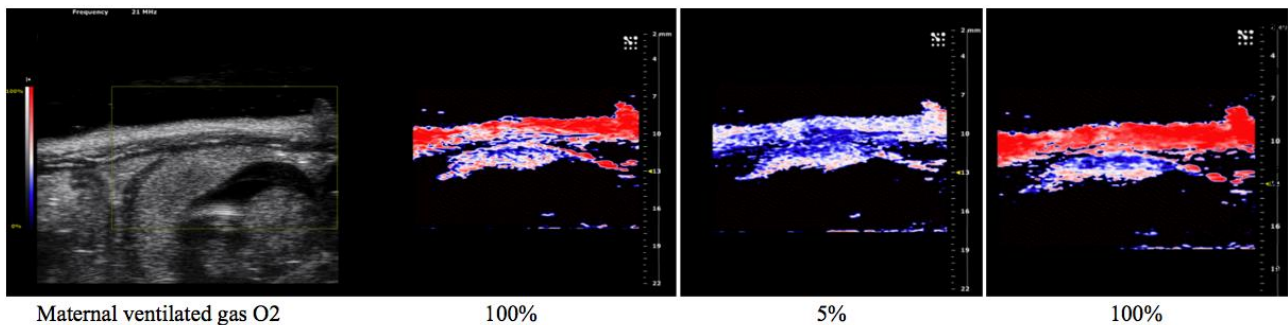


Figure 168 : Imagerie photoacoustique de l'oxygénation foeto-placentaire au jour 17 de gestation en coupe sagittale, suivant la modification de la quantité d'oxygène dans le mélange gazeux (100% - 5% - 100%) (CIPA 2016).

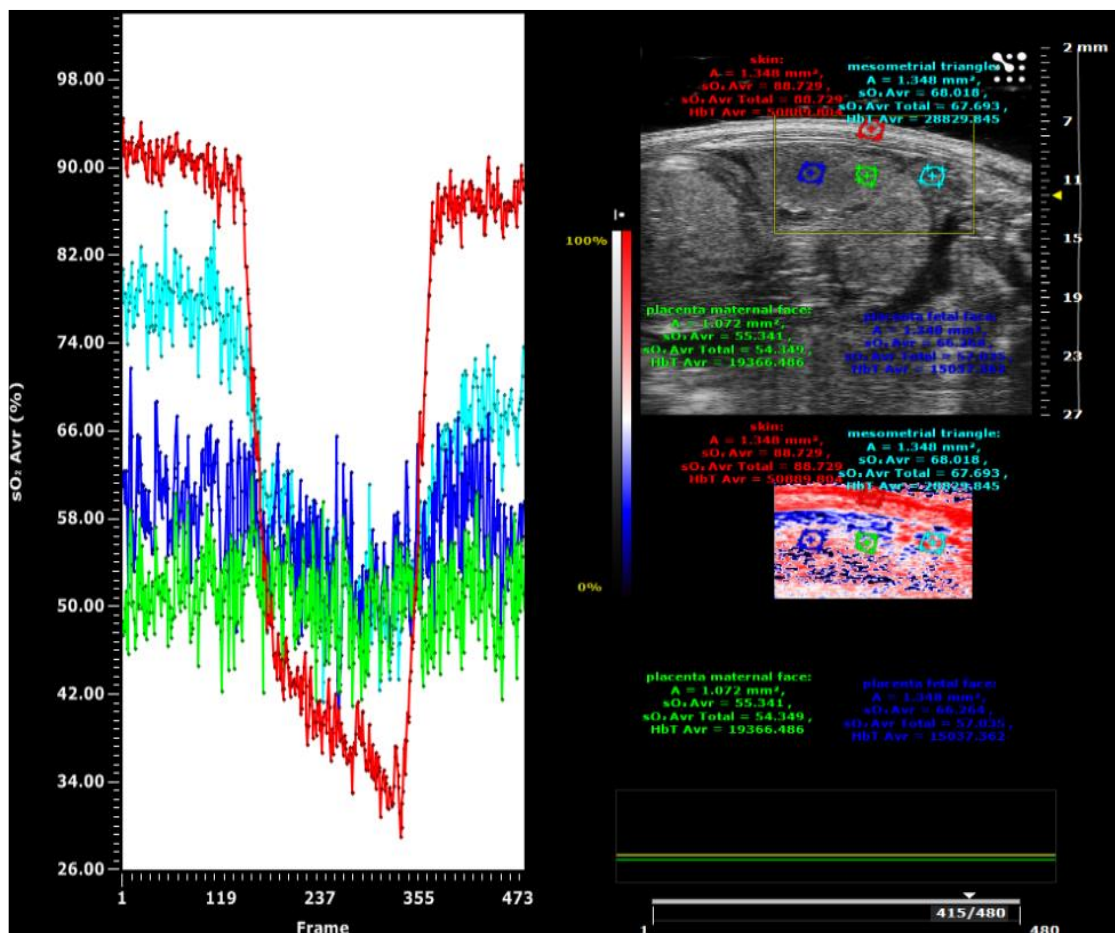


Figure 169 : Changements de la saturation de l'oxygène au niveau de l'unité fœtoplacentaire (ROI rouge), du triangle mésométrial (ROI bleu clair), du feuillet maternel (ROI verte) et du feuillet fœtal (ROI bleu foncé) au jour 20 de gestation, au cours de la variation de la quantité d'oxygène du mélange gazeux ventilé maternel (100% - 5% - 100%) (CIPA 2016).

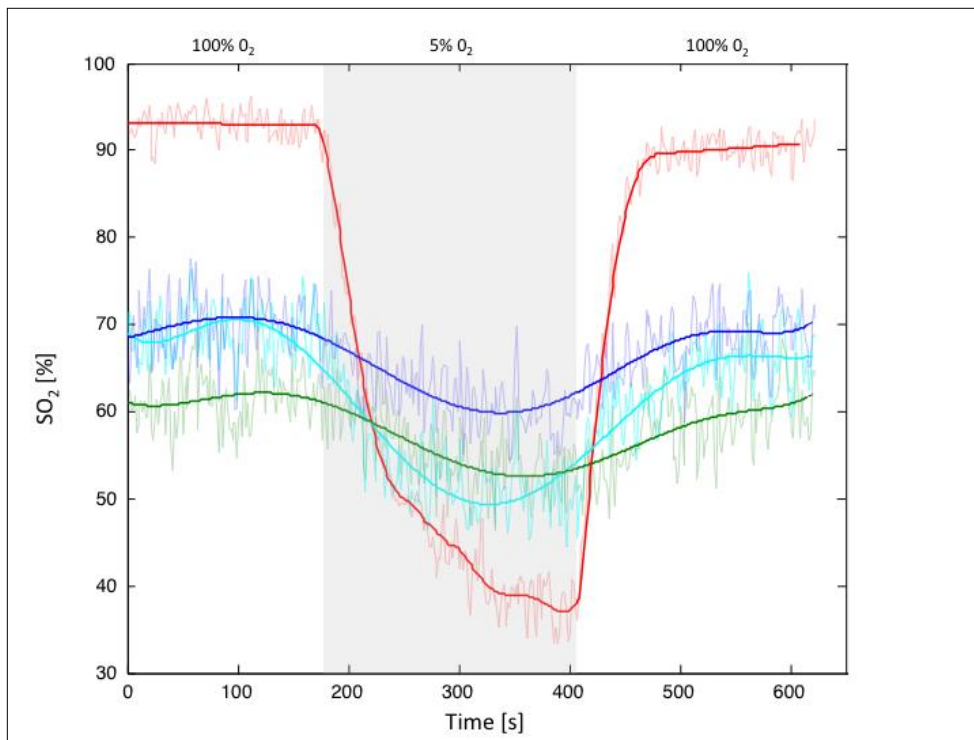


Figure 170 : Courbes ajustées correspondant aux changements de la saturation de l'oxygène (SO₂ [%]) au niveau de l'unité fœtoplacentaire (courbe rouge), du triangle mésométrial (courbe bleu clair), du feuillet maternel (courbe verte) et du feuillet fœtal (courbe bleu foncé) au jour 20 de gestation, au cours de la variation de la quantité d'oxygène du mélange gazeux ventilé maternel (100% - 5% - 100%), en fonction du temps (secondes).

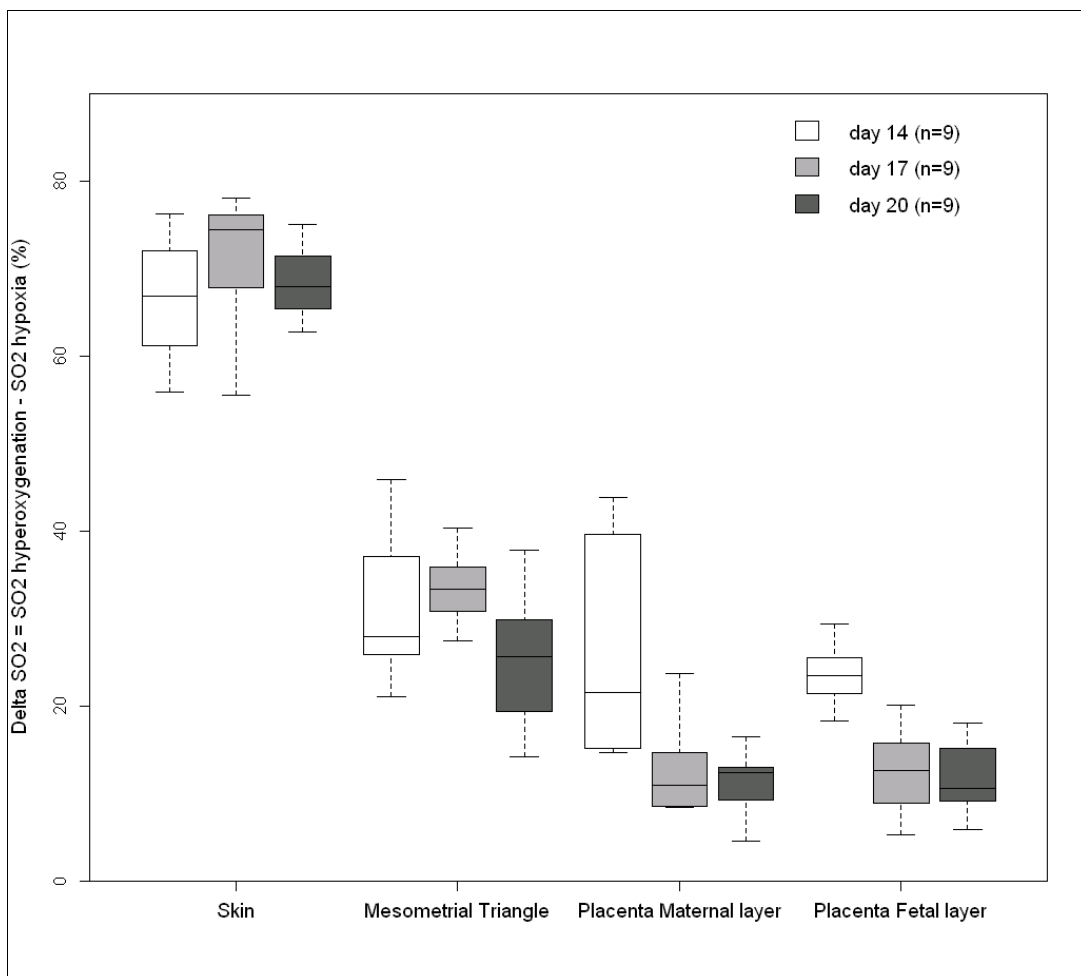


Figure 171 : Diagramme en boîte montrant le Δ SO₂ moyen au niveau de la peau, du triangle mésométrial, du feuillet maternel ainsi que du feuillet fœtal placentaire au cours des différents jours de gestation suite aux variations du niveau d'oxygène (100% - 5% - 100%) avec des intervalles de confiance à 95% des valeurs moyennes.

ROI	Jour 14 (Moyenne ± Ecart-Type)	Jour 17 (Mean ± Ecart-Type)	Jour 20 (Mean ± Ecart-Type)	Valeur de P
Peau				
SO ₂ maximale (%)	84.81 ± 6.72	90.37 ± 5.29	92.45 ± 5.06	0.02
SO ₂ minimale (%)	18.55 ± 2.22	19.63 ± 5.88	24.63 ± 6.44	0.03
Triangle Mésométrial				
SO ₂ maximale (%)	69.98 ± 6.86	70.21 ± 8.84	70.94 ± 8.28	0.97
SO ₂ minimale (%)	39.23 ± 6.35	37.55 ± 5.44	45.47 ± 5.25	0.004
Feuillet fœtal				
SO ₂ maximale (%)	76.78 ± 4.17	68.21 ± 6.85	64.47 ± 4.94	<0.001
SO ₂ minimale (%)	53.44 ± 1.58	54.63 ± 3.32	54.39 ± 4.25	0.78
Feuillet maternel				
SO ₂ maximale (%)	65.42 ± 10.42	54.80 ± 5.88	56.45 ± 3.59	0.04
SO ₂ minimale (%)	38.57 ± 3.68	41.67 ± 5.21	44.45 ± 4.57	0.02

Figure 172 : Tableau récapitulatif de l'analyse quantitative de la SO₂ suivant les jours 14, 17 et 20 de gestation pour les 4 ROIs.

Notre étude comparative montre que le Δ SO₂ est significativement différent entre la peau et les autres ROIs ($p < 0,001$) (Figures 171 & 172). En effet, le Δ SO₂ est plus important pour la peau ($70,74\% \pm 7,65$) qu'au niveau du triangle mésométrial ($32,66\% \pm 5,75$) et des autres régions du placenta (feuillet fœtal : $18,58\% \pm 6,61$; feuillet maternel : $13,13\% \pm 5,72$) au cours de la gestation. De plus, le Δ SO₂ diminue au niveau placentaire au cours de la gestation ($23,34\% \pm 3,75$ à J14 versus $10,10\% \pm 4,28$ à J20) ($p = 0,005$), sans différence significative entre les deux feuillets. Ces résultats ainsi que les variations de SO₂ étaient significativement différentes d'un tissu à l'autre en fonction du jour de gestation.

Afin d'évaluer l'atténuation du signal PA au cours de la procédure, des mesures ont également été réalisées après une légère incision chirurgicale cutanée pour imager directement l'unité fœtoplacentaire. Aucune différence n'a été observée entre les deux lots de données ($p > 0,05$). Ces résultats suggèrent que la peau n'a pas d'influence sur les résultats de l'imagerie PA.

Discussion :

Cette étude de preuve de concept démontre que l'imagerie PA peut être mise en œuvre pour monitorer les effets de l'hyperoxygénation et de l'hypoxie en temps réel au niveau des placentas de rates gestantes. Le résultat principal de cette étude est que la SO₂ placentaire semble être plus faible que la saturation maternelle. Ce travail a d'ailleurs fait l'objet d'une publication qui a été soumise (Annexe 12).

La SO₂ du placenta au cours d'une hypoxie chronique est pour le moment peu documentée. Nous émettons donc l'hypothèse que cette perfusion placentaire affaiblie et

le RCIU pourrait être associés à de faibles concentrations en oxygène, ce qui expliquerait l'hypoxie rencontrée en cas de RCIU ^[424,425].

Pour l'étude de l'insuffisance placentaire chez l'animal nous sommes confrontés à un problème. En effet, la pré-éclampsie est une pathologie exclusivement humaine. Nous devons donc induire un RCIU et mimer une diminution de la perfusion placentaire chez l'animal. Quelques modèles sont décrits : Celui de la ligature d'une des deux artères utérines décrit par Wigglesworth en 1964 et largement utilisé pour l'étude du placenta par imagerie ^[421] paraît le plus adapté. La rate présentant un utérus bicorné, en ligaturant une seule artère utérine sur les deux, alors chaque animal demeure son propre contrôle. D'après l'ensemble des données de la littérature, la ligature sera réalisée au 17^{ème} jour de gestation chez la rate. De futures expérimentations s'intéresseront à l'évaluation de l'oxygénation au cours de ce RCIU afin d'essayer de mieux comprendre l'implication de l'hypoxie au niveau fœtal.

Discussion Générale

L'imagerie préclinique est une ressource incontournable pour la recherche biologique et médicale, qui se situe à l'interface de nombreuses spécialités et dont les applications sont très diverses. En effet, l'imagerie préclinique, de par son fort potentiel, fournit des informations aussi bien au niveau de la recherche amont, que de la recherche préclinique jusqu'aux phases cliniques.

Ce manuscrit présente diverses approches par imagerie échographique, photoacoustique et de fluorescence dans le proche infrarouge pour le suivi de la pathologie cancéreuse.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'hypoxie tumorale. L'hypoxie induit des modifications du métabolisme des cellules cancéreuses et des modifications épigénétiques qui ont été mises en cause dans des mécanismes de chimiorésistance. Ce statut hypoxique empêche une bonne réponse aux besoins métaboliques d'une cellule ou d'un tissu et devient donc un facteur de résistance aux traitements décrits précédemment. Au final, le statut hypoxique d'une tumeur représente un facteur de mauvais pronostic pour les patients atteints. En effet, la diffusion des molécules de chimiothérapie au sein des tumeurs étant relativement faible, ces cellules se développant en conditions hypoxiques sont le plus souvent protégées et peu ou pas atteintes par les traitements conventionnels [426]. Ce phénomène ne nuit pas à leur croissance, car les cellules tumorales ont la capacité de passer du métabolisme aérobie au métabolisme anaérobie. C'est pourquoi il existe des stratégies thérapeutiques qui visent à ré-oxygéner la tumeur, et il est désormais nécessaire de caractériser le statut hypoxique d'une tumeur avant de commencer à la traiter. Des études précliniques sont donc réalisées pour tenter de proposer une solution adaptée à ce problème. Afin d'étudier au mieux ce phénomène il est, dans un premier temps, important de pouvoir le détecter et pour cela, l'imagerie in vivo est la méthode de choix. Une revue bibliographique présente les particularités du phénomène de l'hypoxie avec les méthodes permettant de l'évaluer, ainsi qu'un inventaire des modalités d'imagerie disponibles pour la quantifier ou en apprécier l'apparition. Une partie expérimentale s'intéresse à la validation des mesures de l'hypoxie par imagerie photoacoustique, puis à la caractérisation de l'hypoxie et son suivi au cours du temps dans des modèles superficiels et profonds de cancers humains, mettant en avant les limites d'exploration de certaines modalités d'imagerie largement utilisées par la communauté scientifique.

Dans un second temps, nous avons développé et mis en œuvre une plateforme intégrée d'imagerie multimodalité dédiée à l'onco-pharmacologie expérimentale. Différentes stratégies d'imagerie multimodale ont ensuite été mises en œuvre pour évaluer l'efficacité

d'une nouvelle prodrogue thérapeutique permettant la libération d'une molécule active dans le proche environnement tumoral sur des modèles humains de tumeurs pancréatiques, mammaires et pulmonaires. Des approches mécanistiques par imagerie, réalisées sur des molécules apparentées ont permis de sélectionner la prodrogue optimale. Le relargage *in vivo* du principe actif de cette prodrogue résultant d'une hydrolyse par la glucuronidase exprimée par des cellules tumorales, mais également par les macrophages inflammatoires, le risque de toxicité a été évalué dans un modèle d'inflammation pulmonaire aiguë.

Enfin, dans un contexte de recherche translationnelle, nous avons exploré le potentiel de l'imagerie photoacoustique et de la fluorescence infrarouge pour la mise en évidence de l'invasion ganglionnaire tumorale en mettant en œuvre des modèles souris et rat de ganglions sentinelles minimalement envahis. Compte tenu de l'intérêt croissant porté au niveau international sur les modèles de tumeurs spontanées pour la recherche translationnelle, nous avons poursuivi les explorations sur les ganglions envahis dans un modèle de tumeurs mammaires spontanées chez la lapine âgée. En collaboration avec des équipes de recherche partenaire du CIPA, nous avons précisé les champs d'application de l'imagerie PA pour explorer l'hypoxie dans des modèles murins de chondrosarcomes et de rétinoblastomes, ainsi que pour évaluer l'oxygénation foeto-placentaire dans un modèle de rates gestantes.

Principaux résultats :

Dans un contexte de technologie émergente et de première implantation en France d'un système photoacoustique, nous avons d'abord validé la technique de mesure de l'hypoxie par imagerie photoacoustique en comparaison à des techniques de référence reconnues comme la mesure de PO₂ par oxymétrie de fluorescence et par l'immuno-histologie du pimonidazole. La corrélation entre ces différentes modalités de mesure a permis de montrer la capacité de l'imagerie PA à mettre en évidence et mesurer l'apparition de l'hypoxie au niveau tumoral.

Dans cette première partie, nous avons montré la limite importante de l'imagerie de bioluminescence pour un modèle de tumeurs hypoxiques, comme par exemple celui du cancer du pancréas Mia-PaCa2. Les résultats obtenus montrent que la BLI ne peut pas être exploitée de manière pertinente en tant que biomarqueur de prolifération tumorale lorsque les tumeurs présentent un certain degré d'hypoxie (particulièrement lors d'essais d'efficacité de molécules anti-tumorales) et qu'il est donc nécessaire d'avoir recours à une

autre modalité d'imagerie anatomique (comme l'échographie 3D haute résolution). Les hypothèses émises suite aux analyses des données BLI ont été confirmées par les acquisitions en PA montrant que l'apparition de l'hypoxie est un phénomène qui peut être très précoce (perturbation des signaux de BLI dès J7 post implantation tumorale pour le modèle le plus rapidement hypoxique). Nous avons ensuite mis en place une stratégie non-invasive et non-irradiante d'exploration de tumeurs orthotopiques pulmonaires chez la souris par imagerie échographique et PA, qui contourne les limites rencontrées par les modalités d'imagerie conventionnelles telles que la BLI ou la TDM-X. Les plus notables sont l'utilisation d'agents de contraste et surtout la dosimétrie délivrée à la tumeur, principalement lorsque les examens doivent être répétés. L'adaptation du modèle tumoral orthotopique de cancer pulmonaire, indispensable pour cette méthodologie d'exploration particulière, propose de s'affranchir de l'utilisation d'agents de contraste X, n'est ni perturbé par l'hypoxie, ni par la dosimétrie reçue par les animaux, et fournit à la communauté scientifique un nouvel outil de mesure longitudinale de l'hypoxie intratumorale (phénomène qui est au cœur de la problématique du cancer pulmonaire actuellement). De plus, cette stratégie novatrice d'exploration *in vivo* de tumeurs pulmonaires orthotopique par échographie permet une confrontation directe des données d'oxygénation (PA), de vascularisation (Doppler), de perfusion (échographie de contraste), mais également d'imagerie moléculaire (échographie de contraste ciblé montrant l'expression du VEGFR2 par exemple, et microbiodistribution d'agents de contraste par PA). Les explorations échographiques n'étant pas réalisables sur le parenchyme pulmonaire, nous avons dû adapter le modèle tumoral de cancer orthotopique pulmonaire. Cette stratégie est déclinable à volonté sur tout autre type de tumeurs pulmonaires pour réaliser ces imageries fonctionnelles.

La seconde partie des travaux réalisés au cours de ce travail de thèse présente le développement d'une plateforme intégrée d'imagerie multimodale. Après avoir mis en œuvre chacune de ces modalités séparément, il est apparu évident d'associer l'imagerie optique avec l'imagerie échographique et PA. La plateforme propose la combinaison d'une imagerie 2D corps entier très sensible (biophotonique), avec une imagerie 3D haute résolution (Échographie et PA) complémentaire et non-invasive. Elle est aujourd'hui la première plateforme intégrée qui associe ces 4 modalités d'imagerie. Les modalités mises en œuvre évitent une irradiation répétée des animaux et des tumeurs (paramètre devant être pris en compte lors des sessions d'imagerie, particulièrement lorsqu'elles sont réalisées longitudinalement) en comparaison à la TDM-X et aux techniques radioactives.

Les doses de rayonnements délivrées par gramme de tissu avec ces techniques restent très significativement supérieures à celles observées chez l'homme, et de ce fait sont susceptibles d'introduire un biais dans les études d'onco-pharmacologie par suite d'une synergie entre traitement et effet radiobiologique. Cette plateforme ne nécessite donc pas d'environnement de radioprotection particulier et les protocoles appliqués sont absolument inertes vis-à-vis de la croissance tumorale.

Cette approche multimodale permet une confrontation unique d'informations fournies par l'échographie et la PA (B-Mode 3D ou 2D, Power Doppler, Contraste, PA-Modes, PA spectral unmixing) avec une multitude de biomarqueurs NIRF disponibles (intégrines, anhydrase carbonique IX, sondes activables...), comme une alternative aux examens par les technologies irradiantes. De plus les informations complémentaires fournies par la BLI (évaluation de la prolifération tumorale à très haute sensibilité) et la NIRF sont particulièrement intéressantes en fonction du questionnement biologique. L'échographie est une modalité d'imagerie à haut rendement, adaptable et facile de mise en œuvre pour l'étude anatomique des organes et des pathologies. L'imagerie PA est une modalité d'imagerie fonctionnelle et moléculaire très sensible qui permet de mesurer de nombreux paramètres biologiques complémentaires aux explorations possibles par BLI, NIRF et échographie.

Ce nouvel outil ouvre des perspectives d'applications biologiques intéressantes pour l'étude et le suivi dans le temps du développement angiogénique, du statut hypoxique, du métabolisme tumoral, de l'apoptose, de l'expression génique, et des paramètres liés au microenvironnement tumoral, car ils peuvent être monitorés de manière longitudinale en suivant une procédure optimisée en fonction de l'objectif. La plateforme se positionne également comme une ressource avantageuse quant à l'évaluation de thérapies anticancéreuses dans des modèles hypoxiques de cancers. L'imagerie multimodale proposée permet d'accélérer le développement de nouveaux marqueurs d'imagerie et améliore les connaissances sur les processus pathologiques cancéreux (chaque technique pouvant apporter des données complémentaires et compenser les limites des autres).

La particularité de la plateforme est la procédure en deux étapes ne nécessitant qu'une seule anesthésie (nombreux paramètres d'imagerie pouvant être mesurés sans avoir à transférer l'animal d'un système à un autre) et qu'une seule installation de l'animal sur la plaque chauffante, sans déplacements, permettant une superposition des données facilitée entre BLI/NIRF et échographie/PA. Pour optimiser cette plateforme sur le plan fonctionnel, il serait nécessaire de remplacer l'enceinte actuelle du Vevo LAZR par une

chambre étanche à la lumière et de développer un logiciel spécifique permettant la quantification relative des images acquises en NIRF.

Les résultats obtenus avec les différentes constructions moléculaires permettant la « vectorisation » de la MMAE sous forme inactive puis la libération de MMAE active dans le microenvironnement tumoral cible ont montré que seule la Prodrogue 1 permet un relargage adéquat et suffisant de MMAE au sein des tumeurs pour exercer une activité antitumorale, lorsqu'elles sont utilisées à quantités de MMAE équivalentes. Cette prodrogue est construite pour être activée sous l'action de la β -glucuronidase libérée par les cellules tumorales, sa biodistribution et sa pharmacocinétique étant optimisées par l'établissement *in vivo* d'une liaison covalente avec l'albumine plasmatique. Des approches par imagerie multimodale ont ensuite montré que la Prodrogue 1 sélectionnée exerce un effet antitumoral très puissant sur les modèles orthotopiques de cancers hypoxiques du pancréas et mammaire, à savoir des disparitions de tumeurs observables en échographie et en BLI chez certains animaux (les disparitions de tumeurs humaines chez la souris lors d'évaluations de thérapies sont très rares en oncologie préclinique). La Prodrogue 1 a également montré un effet protecteur significatif contre la métastase dans un modèle de tumeurs orthotopiques pulmonaires. Ces résultats montrent bien le fort potentiel de cette thérapie pour le traitement des tumeurs solides hypoxiques ou normoxiques.

Enfin, dans la troisième partie de ce travail, nous avons mis en place un modèle d'étude de l'envahissement ganglionnaire par des cellules tumorales bioluminescentes mimant une migration cellulaire dans un ganglion sentinelle chez la souris et le rat. Ce modèle original, conçu pour le développement de stratégies d'imagerie peropératoire du ganglion sentinelle minimalement envahi, nous permet de caractériser et quantifier pour chaque animal une très faible charge tumorale présente dans le ganglion envahi et ainsi n'inclure dans les études que les seuls animaux d'intérêt. En ce qui concerne l'imagerie de fluorescence infrarouge et de bioluminescence, il existe un certain nombre de systèmes commerciaux dédiés donnant toute satisfaction mais avec une configuration pour une exploitation exclusivement sur paillasse (IVIS Lumina II, Perkin Elmer® ; BioFLECT, TriFoil ; ...). Compte tenu de la nécessaire portabilité pour l'imagerie NIRF peropératoire, notre choix s'est porté sur une caméra miniaturisée de dernière génération utilisant une technologie de capteur CMOS très sensible et rapide. Cette caméra portable, qui ne nécessite pas de système de refroidissement haute performance, nous a permis d'acquérir des images de bioluminescence et de fluorescence pour de nombreuses

applications en oncologie expérimentale. Nous avons pu caractériser et quantifier la charge tumorale présente dans le ganglion envahi par BLI *in vivo*, ainsi que par NIRF des intégrines *ex vivo*. Les résultats préliminaires de lymphographie à l'ICG libre par imagerie PA laissent entrevoir des perspectives intéressantes quant à la possibilité d'identifier, de quantifier et de cartographier l'invasion au sein d'un ganglion en utilisant des agents de contraste ciblés (comme les agents ciblant les intégrines par exemple). Ce modèle d'envahissement contrôlé apporte ainsi la possibilité de tester de nouveaux agents de contraste ciblés pour la détection d'un envahissement des ganglions sentinelles.

En ce qui concerne les protocoles réalisés sur les modèles spontanés de tumeurs mammaires chez la lapine, nous avons montré la capacité de l'imagerie NIRF à identifier les ganglions sentinelles dans un premiers temps (en réalisant des imageries *in vivo* de l'ICG libre utilisé en tant qu'agent de contraste pris en charge par le drainage lymphatique), puis identifier *ex vivo* la présence de cellules tumorales aussi bien au niveau de la lésion primaire, qu'au niveau ganglionnaire, en utilisant une sonde fluorescente ciblant les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$. L'imagerie PA *ex vivo* s'est révélée prometteuse et permettra l'identification et la quantification de foyers tumoraux au sein des ganglions sentinelles une fois prélevés. Ces essais montrent la possibilité de développer un outil facilitant la détection (NIRF *in vivo* de l'ICG pour le repérage sans nécessité d'utilisation de traceurs radioactifs) et le diagnostic rapide des ganglions prélevés. Cette stratégie sensible et à moindre coûts (par imagerie PA *ex vivo* d'un agent de contraste ciblant les cellules tumorales) serait particulièrement intéressante, dans des centres où les techniques radioactives, immuno-histologiques et de biologie moléculaire dernier cris ne sont pas disponibles pour la prise en charge des ganglions sentinelles. Ces protocoles ont été réalisés conjointement avec les techniques de détection classiques (Bleu Patente V et colloïdes de ^{99m}Tc) afin de confirmer nos résultats et démontrer son applicabilité potentielle si un essai clinique venait à être lancé (ne perturbant ainsi en rien la procédure standard réalisée par les chirurgiens).

Imagerie photoacoustique :

Bien que l'effet PA ait été découvert il y a plus d'un siècle, ce n'est que récemment qu'il y a eu une très forte manifestation d'intérêt pour son utilisation dans le domaine biomédical, notamment avec l'imagerie préclinique.

Le système Vevo[®] LAZR, qui est exploité au CIPA, représentait la première implantation de l'imagerie photoacoustique préclinique en France et l'une des premières en Europe. Cette modalité est actuellement en plein essor, et de nombreuses équipes de recherche s'attèlent à définir des champs d'application d'intérêt pour le transfert de cette technologie vers la pratique clinique. On peut d'ailleurs constater depuis 3 ans que de plus en plus de communications et posters sont présentés en congrès internationaux et que le nombre de publications dans le domaine augmente régulièrement.

L'imagerie photoacoustique est une modalité très prometteuse, notamment dans le domaine de la cancérologie. Parmi ses applications à fort potentiel, l'imagerie PA permet de s'intéresser en temps réel et de manière non-invasive à l'hypoxie, l'angiogenèse ou encore la détection d'agents de contraste ou de récepteurs cellulaires spécifiques visant à améliorer des ciblage moléculaires dans un organe particulier. Les changements relatifs à l'oxygénation tumorale apportent une valeur diagnostique et peuvent par ailleurs être utilisés pour évaluer une réponse précoce aux chimiothérapies ciblant la néoangiogenèse.

Outre ces avantages majeurs, il y a encore des défis importants à surmonter. Les limites liées à la profondeur d'exploration et aux propriétés mécaniques des tissus ne permettent pas de couvrir tous les organes avec la même sensibilité et la même précision, et l'application de cette modalité pour la détection de tumeurs profondes (>1cm en dessous de la surface de la peau) est à ce jour toujours impossible avec le système préclinique mis en œuvre au cours de ce travail de thèse. De nombreux développements sont en cours, comme par exemple l'utilisation d'un bras rotationnel supportant la sonde, qui permettrait de réaliser de la pseudo-tomographie à l'acquisition, puis avec un traitement d'image, d'améliorer la détection des signaux profonds ^[350]. On peut également mentionner l'utilisation d'un dispositif permettant de concentrer les fibres optiques au niveau du centre du transducteur, pour une imagerie du cerveau à travers la boîte crânienne des animaux, ou l'obtention d'une profondeur d'imagerie plus importante, cela au prix d'une réduction du champ de vue.

Au cours d'un examen PA, la peau est irradiée avec une lumière laser. Pour des raisons de sécurité, l'irradiation doit rester en dessous de l'exposition maximale autorisée pour laquelle il n'y aura pas de conséquences biologiques ^[427]. Lorsqu'on utilise de plus fortes énergies d'illumination, on améliore le rapport signal sur bruit, mais si l'énergie est trop forte, la température du tissu illuminé va augmenter et peut potentiellement conduire à des brûlures ^[428], ou à des perturbations au niveau des tumeurs (activation des protéines de choc thermique, vasodilatation, ...).

Un autre point à considérer pour l'utilisation clinique est la sécurité des manipulateurs et patients vis-à-vis de l'exposition de l'œil à la lumière laser. Si pour le moment certains systèmes testés en phases cliniques nécessitent le port de lunettes de sécurité laser, d'autres entreprises développent des procédés d'illumination différents. On peut par exemple évoquer l'utilisation de lentilles divergentes en sortie de fibre optique, qui permettent d'illuminer le tissu d'intérêt de manière identique, mais avec une meilleure sécurité d'utilisation et donc moins de contraintes (le faisceau laser n'étant pas focalisé, une exposition de la rétine à un faisceau non-convergent diminue notablement la nocivité).

L'imagerie PA mettant en œuvre des agents de contraste exogènes est un domaine émergent. Néanmoins, la toxicité à long terme due à l'accumulation de particules et nanoparticules sera une préoccupation majeure [429]. Ces risques de toxicité et d'accumulation sont très variables en fonction de la taille, de la géométrie ou encore des caractéristiques surfaciques des nanoparticules. Pour les particules qui seront sélectionnées pour rentrer dans des protocoles d'évaluation clinique, il est important que leur toxicité soit étudiée de façon plus approfondie compte tenu de leur très faible biodégradabilité. Ainsi, de nombreux groupes de recherche s'intéressent à la sécurité des nanoparticules métalliques qui sont les agents de contraste les plus prometteurs dans ce domaine [430,431].

Des recherches sont actuellement menées sur de futurs agents de contraste PA dits « intelligents » pour l'imagerie moléculaire en oncologie. Ils pourraient voir leurs propriétés et signaux modifiés sélectivement lorsqu'ils rentrent en contact avec le microenvironnement tumoral et il serait alors possible de détecter un signal spécifique associé à certaines caractéristiques du microenvironnement [333].

L'imagerie photoacoustique a montré des capacités intéressantes pour devenir une modalité d'imagerie clinique avec des avantages remarquables, notamment vis-à-vis de la haute résolution, de la génération de signaux non ionisants, de la disponibilité d'agents de contraste d'imagerie non radioactifs, et du potentiel d'acquisition d'images en temps réel. En pratique clinique, l'imagerie PA pourrait être mise en œuvre non seulement de manière non-invasive, mais aussi par voie endoscopique et peropératoire.

Ses capacités uniques de fournir une imagerie moléculaire de résolution submillimétrique voire micrométrique *in vivo* pour explorer les tumeurs et leur vascularisation, les micrométastases et les cellules tumorales circulantes (sous réserve qu'elles puissent être ciblées par un agent de contraste adéquat) pourraient grandement contribuer à une meilleure compréhension des voies moléculaires associées à divers cancers. La résolution

spatiale étant associée à la profondeur de pénétration, l'imagerie de petites tumeurs localisées en profondeur dans les tissus doit être mieux documentée en termes de faisabilité avant de pousser plus loin des développements spécifiques. Ainsi à terme, l'imagerie photoacoustique permettrait aux médecins de mieux caractériser un cancer à ses premiers stades de développement, augmentant ainsi les taux de survie, et de réduire les coûts des soins de santé associés aux procédures de traitement du cancer.

Des systèmes de scan rapide à longueur d'onde variable fournissant des images multi-spectrales en temps réel vont être développés, ainsi que leurs interfaces utilisateurs, afin de rendre cette technique plus abordable et facile à utiliser en ce qui concerne les acquisitions de données et leur analyse ^[247].

L'imagerie photoacoustique peut être combinée facilement avec d'autres modalités d'imagerie moléculaire basées sur l'utilisation d'ultrasons (imagerie de contraste ultrasonore notamment). Un autre de ses avantages est que son implantation peut être relativement simple sur des systèmes d'échographie clinique pour en élargir le champ d'utilisation vers une imagerie moléculaire et fonctionnelle associées.

Cependant, l'utilisation clinique de l'imagerie PA reste encore très restreinte de par les profondeurs limitées de pénétration de la lumière excitatrice, ainsi que vis-à-vis du contexte réglementaire associé à l'utilisation d'agents de contraste qui doivent être approuvés par les autorités de sûreté du médicament ^[432]. Les améliorations technologiques dans le domaine des transducteurs ultrasonores et les développements d'agents de contraste étant actuellement en pleine expansion, l'imagerie PA deviendra probablement une modalité incontournable de l'imagerie médicale dans les prochaines années.

Imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge :

Les modalités d'imagerie optique ont retenu l'attention des équipes de recherche grâce à leurs performances remarquables principalement en termes de sensibilité ^[433]. Elles sont par ailleurs non-invasives, non-irradiantes et présentent une résolution et un rapport coût/efficacité avantageux. Ces modalités offrent de nombreuses perspectives d'applications pour le développement pharmaceutique, l'évaluation thérapeutique ou encore pour les études physiopathologiques.

L'imagerie moléculaire optique possède un potentiel d'applications énorme, mais elle nécessite encore un certain nombre d'améliorations portant à la fois sur la technologie et la chimie des sondes moléculaires.

Tout d'abord, le contraste entre la fluorescence des tissus et le bruit de fond doit être augmenté. Cela peut être réalisé en développant des sondes moléculaires ciblées avec des fluorochromes ayant de meilleurs rendements de fluorescence ou encore en améliorant les rendements des systèmes de détection en fonction des longueurs d'onde utilisées. Des travaux pourraient également être réalisés dans le sens d'un passage facilité des sondes d'imagerie à travers les barrières biologiques, afin de se lier de manière plus efficiente à leurs cibles ^[434]. Comme nous avons pu le constater, le plus gros obstacle à surmonter réside pour le moment dans la complexité des propriétés physiques de la lumière et du trajet des photons dans la matière, comme l'absorption et la diffusion, en sachant que chaque tissu possède des propriétés propres de diffusion, réflexion, transmission et absorption. En améliorant des méthodes de suppression du bruit, nous pourrions également espérer obtenir une meilleure résolution des images obtenues. L'avenir de l'imagerie de fluorescence infrarouge réside probablement dans l'utilisation de capteurs permettant de faire de l'imagerie multispectrale en temps réel.

La caméra que nous avons sélectionnée pour nos travaux possède des performances remarquables et pourrait trouver des applications pour la mammographie optique. La détection des tumeurs mammaires par NIRF a été très étudiée, car le sein humain est relativement transparent à la lumière infrarouge permettant sur ce tissu une détection à haute sensibilité ^[435-443]. En revanche, le contraste tumoral intrinsèque n'est pas idéal pour permettre d'améliorer la détection de la tumeur par rapport à la mammographie classique. En l'état actuel des développements technologiques, il est difficile de considérer que l'imagerie de fluorescence, avec une utilisation d'agents de contraste ciblé, puisse offrir une alternative à la mammographie. Elle offrira probablement une complémentarité très intéressante pour la réalisation de « biopsies virtuelles » pour la surveillance de petits foyers tumoraux ou à risque, à un stade où les apports de l'échographie et de la mammo-IRM sont limités. Ces « biopsies virtuelles » devraient largement pouvoir bénéficier d'agents fluorescents pour l'imagerie moléculaire de biomarqueurs spécifiques, et des études ont montré qu'il est possible de détecter la présence d'agents de contraste exogènes à travers le sein *in vivo* ^[444,445], de faibles quantités de fluorochrome ayant été détectées à plus de 12cm de profondeur sur des fantômes représentatifs de seins humains ^[446-448].

Dans l'ensemble, nous avons pu voir que les techniques d'imagerie précises par fluorescence infrarouge sont très prometteuses et leur essor est très significatif dans la pratique clinique ^[449].

L'imagerie moléculaire optique se développe rapidement ; cependant, la conversion des avancées en recherche fondamentale vers des applications cliniques reste une préoccupation majeure mais avec de nombreux challenges. Des collaborations multidisciplinaires sont donc nécessaires pour concevoir les nouvelles générations de sondes d'imagerie, de systèmes de détection et de méthodes de reconstruction.

Imagerie de bioluminescence :

La bioluminescence a été utilisée car elle est l'une des techniques de référence et assurément la plus sensible (quelques dizaines à quelques centaines de cellules selon la lignée cellulaire et la profondeur) pour évaluer la croissance tumorale *in vivo*. Néanmoins, cette technique, bien que très répandue, présente plusieurs limites qui peuvent aboutir au fait que la quantité de lumière détectée n'est pas la représentation fidèle du phénomène observé.

La quantification du signal de BLI peut être fortement biaisée car l'intensité du signal détecté est plus faible que l'intensité du signal transmis en raison de l'absorption et de la diffusion des photons lumineux par les tissus traversés. Ainsi, un site tumoral près de la surface apparaît plus lumineux et plus ponctuel qu'un équivalent, mais situé plus profondément. A cause de la diffusion des photons, certains foyers tumoraux apparaissent plus étendus qu'ils ne le sont en réalité, mais cette diffusion des photons peut être corrigée avec des techniques de restauration d'image ^[450]. De manière approximative, l'intensité des photons diminue environ d'un facteur 10 par millimètre de tissus traversés ^[451]. Une alternative pour obtenir des données plus précises serait la tomographie de bioluminescence (bioluminescence 3D). Nous prévoyons d'utiliser prochainement la caméra CMOS dans le but de réaliser de l'imagerie de bioluminescence tomographique dans une autre chambre étanche à la lumière, munie d'un système de rotation 3D de la caméra par rapport à un lit fixe horizontal, associé à un logiciel de reconstruction des images (partenariat avec la société FVM Electronique de Longjumeau dans le cadre du stage de 4^{ème} année d'école d'ingénieur en électronique de Polytech Paris Sud de Melle Xiu-ran Wang).

La réaction de bioluminescence implique plusieurs molécules telles que l'ATP, l'O₂ ou la luciférine. Si l'une de ces molécules est présente en quantité insuffisante, l'intensité lumineuse n'est alors plus représentative de l'activité de la luciférase.

De ce fait, une quantification relative est envisageable et permet le suivi dans le temps de foyers tumoraux ainsi que la comparaison des activités de bioluminescence pour des localisations strictement identiques dans des animaux différents, tandis qu'une quantification absolue est difficile voire impossible.

Lorsque les tumeurs se développent très rapidement, la zone centrale devient hypoxique. L'hypoxie apparaît lorsque les besoins des cellules tumorales excèdent les possibilités d'approvisionnement via les vaisseaux sanguins. Des anomalies de structure de ces vaisseaux ainsi que la faible distance de diffusion de l'O₂ dans la tumeur (<70 µm) contribuent alors à créer des zones hypoxiques avec une pression partielle en oxygène inférieure à 10 mmHg. Dans ce cas, les cellules ne peuvent plus utiliser l'O₂ et la synthèse de l'ATP est très faible, de sorte que l'émission de bioluminescence est également réduite. Ainsi il n'y a donc plus de corrélation entre signal de bioluminescence et volume tumoral. Cela remet donc en cause la pertinence de l'imagerie de bioluminescence à partir du moment où la tumeur présente des régions hypoxiques. La diminution de la bioluminescence tout au long de la croissance de la tumeur, associée à la progression de l'hypoxie, est donc une limitation importante à considérer pour une évaluation thérapeutique de médicament. Ainsi, l'utilisation de la bioluminescence pour une étude longitudinale de la tumeur primaire doit être considérée uniquement pendant le temps où le flux de photons reste proportionnel à la taille tumorale [294].

Innovations thérapeutiques : Prodrogues antitumorales

Nous avons pu voir, au cours des différents essais d'efficacité de la molécule d'intérêt « Prodrogue 1 » que les résultats ont été très encourageants, notamment dans le modèle de cancer pancréatique à cellules MIA-PaCa2 que nous avons mis en œuvre et optimisé pour les besoins de nos études en échographie et PA.

L'adénocarcinome ductal pancréatique représente 80% des cancers qui touchent le pancréas et son pronostic chez l'homme est effroyable. En effet, il a été identifié comme la 5^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde occidental [452].

Pour les tumeurs du pancréas inopérables, et les récurrences après chirurgie, la chimiothérapie seule ou en association avec la radiothérapie sont les seules alternatives

thérapeutiques possibles ^[453]. De plus, les nouvelles molécules développées ne se montrent que trop peu efficaces face à l'adénocarcinome ductal pancréatique. Cette nouvelle prodrogue pourrait donc être une thérapie très intéressante si les futures investigations menées se révèlent concluantes.

Les résultats obtenus avec la Prodrogue 1 sont d'autant plus démonstratifs que d'après les données bibliographiques, il n'existe pas de traitements classiques par chimiothérapie qui aient, sur les mêmes modèles précliniques, présenté une action aussi puissante vis-à-vis de la croissance tumorale (à savoir un effet protecteur contre la métastase, une diminution très significative des volumes tumoraux, voire des disparitions de tumeurs). Dans le cancer du pancréas, les molécules de chimiothérapies actuellement utilisées en clinique sont la gemcitabine et le 5-FU. Sur le modèle Mia-PaCa2, ces molécules n'avaient pas montré de diminution du volume tumoral ^[455-456]. Dans le cancer du sein triple négatif, les molécules de chimiothérapies actuellement utilisées en clinique sont doxorubicine, l'épirubicine, le paclitaxel, le docetaxel, le cis-Pt ou encore le carbo-Pt. Sur le modèle MDA-MB-231, ces molécules n'ont également pas entraîné de décroissance du volume tumoral ^[457-461]. Dans le cancer du poumon non à petites cellules, les molécules de chimiothérapies actuellement utilisées en clinique sont la gemcitabine, le docetaxel, la vinorelbine, le pemetrexed, le paclitaxel ou l'étoposide, en association ou non avec le cis-Pt ou le carbo-Pt. Sur le modèle H460, ces molécules n'ont pas provoqué non plus de réductions des tumeurs ^[462-467]. On peut s'interroger sur l'absence de régression tumorale observée dans ces modèles reconnus de tumeurs, alors même que les chimiothérapies conduisent le plus souvent chez les patients à une régression, certes souvent transitoire, de la tumeur primaire. Ces observations posent le problème de la prédictivité des études réalisées dans les modèles tumoraux, mais nos résultats expérimentaux renforcent la démonstration du potentiel de la Prodrogue 1 pour le traitement des tumeurs solides.

Le chemin vers l'application clinique est encore long et de nombreux tests de pharmacologie de sécurité sont nécessaires avant de pouvoir considérer cette molécule dans l'arsenal thérapeutique disponible. Le brevet de cette prodrogue vient d'être licencié à la société SYNDIVIA qui sera en charge d'améliorer le procédé de synthèse chimique, réaliser les essais toxicologiques et éventuellement proposer cette molécule pour rentrer dans des essais cliniques de phase I.

La MMAE est un composé cytotoxique qui est largement étudié, car il a une activité antitumorale très importante mais une toxicité systémique qui exclut son utilisation sous sa forme libre (la plupart des chimiothérapies conventionnelles sont utilisées sous leurs formes libres). Les équipes de recherche s'appliquent donc à vectoriser cette molécule

afin de pouvoir cibler spécifiquement les cellules tumorales et en réduire les effets secondaires systémiques.

Une équipe a déjà essayé avec des résultats probants dans des modèles de mélanome, de cibler la MMAE par l'anticorps monoclonal CR011 [468]. La Société d'oncologie Takeda avait lancé un essai clinique de phase III de brentuximab-vedotin chez les patients présentant une maladie de Hodgkin. ADCETRIS® est maintenant leur conjugué anticancéreux anticorps-chimiothérapie, commercialisé. L'ADCETRIS est conçu pour être non toxique dans le sang, et pour libérer la MMAE lors de l'internalisation dans les cellules tumorales exprimant CD30 [469].

Il existe désormais tout un arsenal d'anticorps vectorisant la MMAE sous sa forme inactive, qui ciblent spécifiquement les cellules tumorales en fonction des marqueurs qu'elles expriment. On peut ainsi mentionner le sofituzumab vedotin (Phase I cancer ovaire, pancreas et peritoine), le polatuzumab vedotin (phase II lymphome et leucémie [470]), l'enfortumab vedotin (Phase I tumeurs solides [471]), ou encore le glembatumumab vedotin [468], le lifastuzumab vedotin, le pinatuzumab vedotin, ou l'indusatumab vedotin.

Les anticorps conjugués à des molécules thérapeutiques sont des candidats idéaux pour les thérapies ciblées à base de prodrogues. Ce type de thérapie fait partie de la nouvelle génération de médicaments couplés à des anticorps grâce à leur spécificité de ciblage par rapport aux tissus sains [472].

Bien que les anticorps confèrent aux systèmes de ciblage correspondants un degré de sélectivité élevé, leur utilisation se heurte cependant à deux problèmes majeurs pour le traitement des tumeurs solides. En raison de leur masse moléculaire importante, ils pénètrent difficilement au sein de la masse tumorale, ce qui limite leur efficacité. De plus, ils possèdent une durée de séjour dans l'organisme relativement longue, avec des temps de demi-vies pouvant atteindre plusieurs mois, susceptible d'entraîner une toxicité non sélective au cours du temps. Un point que l'on peut également soulever concernant ces immuno-thérapies est leur coût, extrêmement élevé, alors que le traitement nécessite de multiples injections au cours de la survie des patients.

Perspectives :

L'utilisation d'appareils d'imagerie multimodaux va grandement influencer la pratique de l'imagerie médicale du futur. Les systèmes permettront la visualisation de tumeurs de très

petite taille *in vivo*, avec une résolution spatiale et une sensibilité améliorées en utilisant des sondes ciblant spécifiquement les phénomènes biologiques d'intérêt de manière à améliorer leur diagnostic précoce. L'imagerie de biomarqueurs spécifiques sera développée pour permettre aux médecins d'assurer de meilleures stratégies de prise en charge des patients, de classification des stades cancéreux et de pratiquer une médecine personnalisée de qualité. Dans le contexte des tumeurs de très petites tailles, leur management fait l'objet actuellement d'une complète révision (cas des tumeurs du sein et de la prostate) et vise à être moins interventionniste mais nécessite une surveillance parfois de longue durée. Cette démarche débouche directement sur le besoin de « biopsies virtuelles », strictement dépendantes d'une imagerie loco-régionale de biomarqueurs sensibles et spécifiques. Par ailleurs, la progression rapide des connaissances sur la pathologie cancéreuse, associée au recul que nous avons sur les thérapies actuelles, laissent entrevoir des découvertes capitales dans le domaine pour les quelques années à venir.

La combinaison de nouvelles approches par imagerie de dernière génération et des futures stratégies thérapeutiques promettent des avancées majeures pour la prise en charge des patients.

Références Bibliographiques

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* Mar;65(2):87-108 (2015).
- [2] Weinberg RA. The biology of cancer. 2nd Ed. Garland Science. (2013).
- [3] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 144(5):p.646-674 (2011).
- [4] McGartland Rubio D, Schoenbaum EE, Lee LS et al. Defining Translational Research: Implications for Training. *Acad Med.* Mar; 85(3): 470-475 (2010).
- [5] Trochim W, Kane C, Graham M, et al. Evaluating Translational Research: A Process Marker Model. *Clin Transl Sci.* Jun; 4(3): 153-162 (2011).
- [6] Byrne DW, Biaggioni I, Bernard GR, et al. Clinical and Translational Research Studios: A Multidisciplinary Internal Support Program. *Acad Med.* Aug; 87(8): 1052-1059 (2012).
- [7] Hostiuc S, Moldoveanu A, Dascălu MI, et al. Translational research-the need of a new bioethics approach. *J Transl Med.* 14:16 (2016).
- [8] Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare. (1959).
- [9] Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* Mar; 54(2): 120-132 (2015).
- [10] Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & Dev.* 17:545-580 (2003).
- [11] Rudin M, Weissleder R. Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* Feb;2(2):123-31 (2003).
- [12] Pysz M, Gambhir SS, Willmann JK. Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clin Radiol.* Jul;65(7):500-16 (2010).
- [13] Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature.* Apr 3;452(7187):580-9 (2008).
- [14] Wild C, Hintringer K, Nachtnebel A. Orphan drugs in oncology. *Pharmaceuticals Policy and Law* 13. 223-232 (2011).

- [15] Rudin M, Weissleder R. Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* Feb;2(2):123-31 (2003).
- [16] James ML, Gambhir SS. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol Rev.* 92:897-965 (2012).
- [17] Willmann JK, van Bruggen N, Dinkelborg LM, et al. Molecular imaging in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery.* 7,591-607 (2008).
- [18] De Palma M, Hanahan D. The biology of personalized cancer medicine: facing individual complexities underlying hallmark capabilities. *Mol Oncol.* Apr;6(2):111-27 (2012).
- [19] Malaney P, Nicosia SV, Davé V. One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett.* Mar 1;344(1):1-12 (2014).
- [20] Bernsen MR, Kooiman K, Segbers M, et al. Biomarkers in preclinical cancer imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 42(4): 579-596 (2015).
- [21] Hanahan D, Weinberg R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 100 (1):p.57-70 (2000).
- [22] Avni R, Cohen B, Neeman M. Hypoxic stress and cancer: imaging the axis of evil in tumor metastasis. *NMR in Biomedicine.* 24(6):p.569-581 (2011).
- [23] Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med.* 365: 537-547 (2011).
- [24] Vaupel P, Kelleher DK, Höckel M. Oxygenation status of malignant tumors: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Seminars in Oncology.* 28, Supplement 8 (0):p.29-35 (2001).
- [25] Hall E, Giaccia AJ. *Radiobiology for the radiologist.* 6th ed., Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins,.122 (2006).
- [26] Horsman MR, Mortensen LS, Petersen JB, et al. Imaging hypoxia to improve radiotherapy outcome. *Nat Rev Clin Oncol.* Dec;9(12):674-87 (2012).
- [27] Dewhirst MW. Relationships between Cycling Hypoxia, HIF-1, Angiogenesis and Oxidative Stress. *Radiat Res.* Dec;172(6): 653-665 (2009).

- [28] Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev.* 8:425-437 (2008).
- [29] Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat. Rev.* 8:180-192 (2008).
- [30] Matsumoto S, Yasui H, Mitchell JB, et al. Imaging Cycling Tumor Hypoxia. *Cancer Res.* Dec 15;70(24):10019-10023 (2010).
- [31] Isa AY, Ward TH, West CM, et al. Hypoxia in head and neck cancer. *Br J Radiol.* 79:791-798 (2006).
- [32] Simon JM. Hypoxie et angiogenèse. *Bulletin du cancer.* Volume 94, supplément 5, numéro spécial, juillet (2007).
- [33] Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, et al. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res.* 61:6394- 6399 (2001).
- [34] Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, et al. Hypoxia inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60:7075-7083 (2000).
- [35] Medina RA, Owen GI. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res* 35:9-26, (2002).
- [36] Rademakers SE, Lok J, van der Kogel AJ, et al. Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF- 1alpha, CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. *BMC Cancer.* 11: 167 (2011).
- [37] Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, et al. GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding. *Int J Cancer.* 104:85-91 (2003).
- [38] Kunkel M, Reichert TE, Benz P, et al. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 97:1015-1024 (2003).
- [39] Hoskin PJ, Sibtain A, Daley FM, et al. GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *Br J Cancer.* 89: 1290- 1297 (2003).

- [40] Zhu Y, Denhardt DT, Cao H, et al. Hypoxia upregulates osteopontin expression in NIH-3T3 cells via a Ras-activated enhancer. *Oncogene*. 24: 6555-6563 (2005).
- [41] Fyles AW, Milosevic M, Wong R, et al. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiotherapy and Oncology*. 48 (2):p.149-156 (1998).
- [42] Gray LH, Conger AD, Ebert M, et al. The Concentration of Oxygen Dissolved in Tissues at the Time of Irradiation as a Factor in Radio therapy. *Br J Radiol*. 26(312):p.638-648 (1953).
- [43] Tatum JL. Hypoxia: Importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *Int J of Radiation Biol*. 82(10):p.699-757 (2006).
- [44] William AD. The role of hypoxia - activated prodrugs in cancer therapy. *The Lancet Oncology*. 1(1):p.25-29 (2000).
- [45] Payen E, Bettan M, Henri A. Oxygen tension and a 123 pharmacological switch in the regulation of transgene expression for gene therapy. *The Journal of Gene Medicine*. 3(5):p.498-504 (2001).
- [46] Trédan O, Grantab R, Dumontet C. L'hypoxie tumorale peut-elle devenir un avantage pour la chimiothérapie? *Bulletin du cancer*. Volume 95, numéro 5, mai (2008).
- [47] Fyles A, Milosevic M, Hedley D, et al. Tumor Hypoxia Has Independent Predictor Impact Only in Patients With Node - Negative Cervix Cancer. *J Clin Oncol*. 20(3):p.680-687 (2002).
- [48] Höckel M, Vaupel P. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *J Nat Cancer Inst*. 93(4):p.266-276 (2001).
- [49] Höckel M, Schlenger K, Aral B, et al. Association between Tumor Hypoxia and Malignant Progression in Advanced Cancer of the Uterine Cervix. *Cancer Res*. 56(19):p.4509-4515 (1996).
- [50] Pastorekova S, Supuran CT. Carbonic anhydrase IX: from biology to therapy. *Hypoxia and cancer - Biological implications and therapeutic opportunities*. Humana Press, Springer; New York, Heidelberg, Dordrecht, London p.121-53 (2014).

- [51] Thomson D, Yang H, Baines H, et al. NIMRAD - a phase III trial to investigate the use of nimorazole hypoxia modification with intensity-modulated radiotherapy in head and neck cancer. *Clin Oncol.* Jun;26(6):344-7 (2014).
- [52] Shinde SS, Hay MP, Patterson AV, et al. Spin trapping of radicals other than the $^{\bullet}\text{OH}$ radical upon reduction of the anticancer agent tirapazamine by cytochrome P450 reductase. *J Am Chem Soc.* 131:14220-14221 (2009).
- [53] Marcu L, Olver I. Tirapazamine: from bench to clinical trials. *Curr Clin Pharmacol.* 1:71-79 (2006).
- [54] Gluck AA, Aebersold DM, Zimmer Y, et al. Interplay between receptor tyrosine kinases and hypoxia signaling in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 62:101-114 (2015).
- [55] Liu Q, Sun JD, Wang J, et al. TH-302, a hypoxia-activated prodrug with broad in vivo preclinical combination therapy efficacy: optimization of dosing regimens and schedules. *Cancer Chemother Pharmacol.* Jun;69(6):1487-1498 (2012).
- [56] Oldham WM, Clish CB, Yang Y, et al. Hypoxia-mediated increases in 1-2-hydroxyglutarate coordinate the metabolic response to reductive stress. *Cell Metab.* 22:291-303 (2015).
- [57] Guise CP, Mowday AM, Ashoorzadeh A, et al. Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia. *Chin J Cancer.* 33:80-86 (2014).
- [58] Liapis V, Labrinidis A, Zinonos I, et al. Hypoxia-activated pro-drug TH-302 exhibits potent tumor suppressive activity and cooperates with chemotherapy against osteosarcoma. *Cancer Lett.* 357:160-169 (2015).
- [59] Patterson AV, Silva S, Guise C, et al. The hypoxia activated EGFR-TKI TH-4000 overcomes erlotinib-resistance in preclinical NSCLC models at plasma levels achieved in phase 1 clinical trial. *Cancer Res.* 75: Abstract number 5358 (2015).
- [60] Patterson AV, Silva S, Guise C, et al. TH-4000, a hypoxia-activated EGFR/Her2 inhibitor to treat EGFR-TKI resistant T790M-negative NSCLC. *J Clin Oncol.* 33: abstract e13548 (2015).
- [61] Plumb JA, Workman P. Unusually marked hypoxic sensitization to indoloquinone EO9 and mitomycin C in a human colon-tumour cell line that lacks DT-diaphorase activity. *Int J Cancer.* 56:134-139 (1994).

- [62] Robertson N, Haigh A, Adams GE, et al. Factors affecting sensitivity to EO9 in rodent and human tumour cells in vitro: DT-diaphorase activity and hypoxia. *Eur J Cancer*. 30A:1013-1019 (1994).
- [63] Dirix LY, Tonnesen F, Cassidy J, et al. EO9 phase II study in advanced breast, gastric, pancreatic and colorectal carcinoma by the EORTC Early Clinical Studies Group. *Eur J Cancer*. 32A:2019-2022 (1996).
- [64] Pavlidis N, Hanauske AR, Gamucci T, et al. A randomized phase II study with two schedules of the novel indoloquinone EO9 in non-small-cell lung cancer: a study of the EORTC Early Clinical Studies Group (ECSG) *Ann Oncol*. 7:529-531 (1996).
- [65] Hendricksen K, Gleason D, Young JM, et al. Safety and side effects of immediate instillation of apaziquone following transurethral resection in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol*. 180:116-120 (2008).
- [66] Nishida CR, Ortiz de Montellano PR. Reductive heme-dependent activation of the n-oxide prodrug AQ4N by nitric oxide synthase. *J Med Chem*. 51:5118-5120 (2008).
- [67] Raleigh SM, Wanogho E, Burke MD, et al. Involvement of human cytochromes P450 (CYP) in the reductive metabolism of AQ4N, a hypoxia activated anthraquinone di-N-oxide prodrug. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Nov 1;42(4):763-7 (1998).
- [68] McKeown SR, Hejmadi MV, McIntyre IA, et al. AQ4 N: an alkylaminoanthraquinone N-oxide showing bioreductive potential and positive interaction with radiation in vivo. *Br J Cancer*. 72:76-81 (1995).
- [69] Patterson LH, McKeown SR, Ruparelia K, et al. Enhancement of chemotherapy and radiotherapy of murine tumours by AQ4 N, a bioreductively activated anti-tumour agent. *Br J Cancer*. 82:1984-1990 (2000).
- [70] Gieling RG, Fitzmaurice RJ, Telfer BA, et al. Dissemination via the lymphatic or angiogenic route impacts the pathology, microenvironment and hypoxia-related drug response of lung metastases. *Clin Exp Metastasis*. 32:567-577 (2015).
- [71] O'Rourke M, Ward C, Worthington J, et al. Evaluation of the antiangiogenic potential of AQ4 N. *Clin Cancer Res*. 14:1502-1509 (2008).

- [72] Albertella MR, Loadman PM, Jones PH, et al. Hypoxia-selective targeting by the bioreductive prodrug AQ4N in patients with solid tumors: results of a phase I study. *Clin Cancer Res.* 14:1096-1104 (2008).
- [73] Papadopoulos KP, Goel S, Beeram M, et al. A phase 1 open-label, accelerated dose-escalation study of the hypoxia-activated prodrug AQ4N in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res.* 14:7110-7115 (2008).
- [74] Steward WP, Middleton M, Benghiat A, et al. The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic end points to determine the dose of AQ4N, a novel hypoxic cell cytotoxin, given with fractionated radiotherapy in a phase I study. *Ann Oncol.* 18:1098-1103 (2007).
- [75] Hunter FW, Hsu HL, Su J, et al. Dual targeting of hypoxia and homologous recombination repair dysfunction in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 13:2501-2514 (2014).
- [76] Konopleva M, Thall PF, Yi CA, et al. Phase I/II study of the hypoxia-activated prodrug PR104 in refractory/relapsed acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 100:927-934 (2015).
- [77] Yeh JJ, Kim WY. Targeting tumor hypoxia with hypoxia-activated prodrugs. *J Clin Oncol.* May 1;33(13):1505-8 (2015).
- [78] Phillips RM. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother Pharmacol.* 77:441-457 (2016).
- [79] Dhani N, Fyles A, Hedley D, et al. The clinical significance of hypoxia in human cancers. *Semin Nucl Med.* Mar;45(2):110-21 (2015).
- [80] Vanderkooi JM, Maniara G, Green TJ, et al. An optical method for measurement of dioxygen concentration based upon quenching of phosphorescence. *J Biol Chem.* Apr 25;262(12):5476-82 (1987).
- [81] Griffiths JR, Robinson SP. The OxyLite: a fibre-optic oxygen sensor. *Br J Radiol.* Jul;72(859):627-30 (1999).
- [82] Brurberg KG, Graff BA, Rofstad EK. Temporal heterogeneity in oxygen tension in human melanoma xenografts. *Br J Cancer.* Jul 21;89(2):350-6 (2003).

- [83] Tran LBA, Bol A, Labar D, et al. Hypoxia imaging with the nitroimidazole 18F-FAZA PET tracer: A comparison with OxyLite, EPR oximetry and 19F-MRI relaxometry. *Radiother Oncol.* Oct;105(1):29-35 (2012).
- [84] Collet G, Robert E, Lenoir A, et al. Plasma jet-induced tissue oxygenation: potentialities for new therapeutic strategies. *Plasma Sources Sci. Technol.* 23 012005 (2014).
- [85] Wen B, Urano M, Humm JL, et al. Comparison of Helzel and OxyLite systems in the measurements of tumor partial oxygen pressure (pO₂). *Radiat Res.* Jan;169(1):67-75 (2008).
- [86] Jarm T, Lešničar H, Serša G, et al. First experience with a novel luminescence-based optical sensor for measurement of oxygenation in tumors. *Radiol Oncol.* 35(4): 277-91 (2001).
- [87] Baudelet C, Gallez B. Effect of anesthesia on the signal intensity in tumors using BOLD-MRI: comparison with flow measurements by Laser Doppler flowmetry and oxygen measurements by luminescence-based probes. *Magn Reson Imaging.* 22:905 (2004).
- [88] Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 56:941 (1996).
- [89] Okunieff P, Ding I, Vaupel P, et al. Evidence for and against hypoxia as the primary cause of tumor aggressiveness. *Adv Exp Med Biol.* 510:69 (2003).
- [90] Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, et al. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* 51:3316 (1991).
- [91] Hou H, Abramovic Z, Lariviere JP, et al. Effect of a topical vasodilator on tumor hypoxia and tumor oxygen guided radiotherapy using EPR oximetry. *Radiat Res.* 173:651-658 (2010).
- [92] Hou H, Dong R, Lariviere JP, et al. Synergistic combination of hyperoxygenation and radiotherapy by repeated assessments of tumor pO₂ with EPR oximetry. *J Radiat Res.* 52:568-574 (2011).
- [93] Hou H, Lariviere JP, Demidenko E, Gladstone D, Swartz H, and Khan N. Repeated tumor pO₂ measurements by multi-site EPR oximetry as a prognostic marker for

- enhanced therapeutic efficacy of fractionated radiotherapy. *Radiother Oncol.* 91:126-131 (2009).
- [94] Goda F, Bacic G, O'Hara JA, et al. The relationship between partial pressure of oxygen and perfusion in two murine tumors after X-ray irradiation: a combined gadopentetate dimeglumine dynamic magnetic resonance imaging and in vivo electron paramagnetic resonance oximetry study. *Cancer Res.* 56:3344-3349 (1996).
- [95] Goda F, O'Hara JA, Rhodes ES, et al. Changes of oxygen tension in experimental tumors after a single dose of X-ray irradiation. *Cancer Res.* 55:2249-2252 (1995).
- [96] Kodibagkar VD, Wang X, Mason RP. Physical principles of quantitative nuclear magnetic resonance oximetry. *Front Biosci.* 13:1371-1384 (2008).
- [97] Clark LC, Ackerman JL, Thomas SR, et al. Perfluorinated organic liquids and emulsions as biocompatible NMR imaging agents for ^{19}F and dissolved oxygen. *Adv Exp Med Biol.* 180:835-845 (1984).
- [98] Lee CP, Payne GS, Oregioni A, et al. A phase I study of the nitroimidazole hypoxia marker SR4554 using ^{19}F magnetic resonance spectroscopy. *Br J Cancer.* 101:1860-1868 (2009).
- [99] Ahmad R, Kuppusamy P. Theory, Instrumentation, and Applications of EPR Oximetry. *Chem Rev.* May 12;110(5):3212-3236 (2010).
- [100] Pawlowski M, Wilson DF. Monitoring of the oxygen pressure in the blood of live animals using the oxygen dependent quenching of phosphorescence. *Adv Exp Med Biol.* 316:179 (1992).
- [101] Shibata M, Ichioka S, Ando J, et al. Microvascular and interstitial PO_2 measurements in rat skeletal muscle by phosphorescence quenching. *J Appl Physiol.* 91:321 (2001).
- [102] Vinogradov SA, Lo LW, Jenkins WT, et al. Noninvasive imaging of the distribution in oxygen in tissue in vivo using near-infrared phosphors. *Biophys J.* 70:1609 (1996).
- [103] Lo LW, Jenkins WT, Vinogradov SA, et al. Oxygen distribution in the vasculature of mouse tissue in vivo measured using a near infra red phosphor. *Adv Exp Med Biol.* 411:577 (1997).

- [104] Wilson DF, Cerniglia GJ. Oxygenation of tumors as evaluated by phosphorescence imaging. *Adv Exp Med Biol.* 345:539 (1994).
- [105] Dengler J, Frenzel C, Vajkoczy P, et al. Cerebral tissue oxygenation measured by two different probes: challenges and interpretation. *Intensive Care Med.* 37: 1809-1815 (2011).
- [106] Zhang C, Bélanger S, Pouliot P, et al. Measurement of Local Partial Pressure of Oxygen in the Brain Tissue under Normoxia and Epilepsy with Phosphorescence Lifetime Microscopy. *PLoS ONE.* 10(8):e0135536 (2015).
- [107] Severinghaus JW, Astrup PB. History of blood gas analysis. VI. Oximetry. *J Clin Monit.* 2:270 (1986).
- [108] Boushel R, Piantadosi CA. Near-infrared spectroscopy for monitoring muscle oxygenation. *Acta Physiol Scand.* Apr;168(4):615-22 (2000).
- [109] Boushel R, Langberg H, Olesen J, et al. Monitoring tissue oxygen availability with near infrared spectroscopy (NIRS) in health and disease. *Scand J Med Sci Sports.* Aug;11(4):213-22 (2001).
- [110] Vo-Dinh T, Stokes DL, Wabuyele MB, et al. A hyperspectral imaging system for in vivo optical diagnostics. Hyperspectral imaging basic principles, instrumental systems, and applications of biomedical interest. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 23:40 (2004).
- [111] Sorg BS, Moeller BJ, Donovan O, et al. Hyperspectral imaging of hemoglobin saturation in tumor microvasculature and tumor hypoxia development. *J Biomed Opt.* 10:44004 (2005).
- [112] Zuzak KJ, Schaeberle MD, Gladwin MT, et al. Noninvasive determination of spatially resolved and time-resolved tissue perfusion in humans during nitric oxide inhibition and inhalation by use of a visible-reflectance hyperspectral imaging technique. *Circulation.* 104:2905 (2001).
- [113] Dische S, Saunders MI, Bennett MH, et al. A comparison of the tumour concentrations obtainable with misonidazole and Ro 03-8799. *Br J Radiol.* 59:911-917 (1986).

- [114] Dische S, Machin D, Chassagne D. A trial of Ro 03- 8799 (pimonidazole) in carcinoma of the uterine cervix: an interim report from the Medical Research Council Working Party on advanced carcinoma of the cervix. *Radiother Oncol.* 26: 93-103 (1993).
- [115] Koch CJ, Scheuermann JS, Divgi C, et al. Biodistribution and dosimetry of (18)F-EF5 in cancerpatients with preliminary comparison of (18)F-EF5 uptakeversus EF5 binding in human glioblastoma. *Eur J NuclMed Mol Imaging.* 37:2048-2059 (2010).
- [116] Evans SM, Judy KD, Dunphy I, et al. Comparative measurements of hypoxia in human brain tumorsusing needle electrodes and EF5 binding. *Cancer Res.* 64:1886-1892 (2004).
- [117] Evans SM, Du KL, Chalian AA, et al. Patterns and levels of hypoxia in head and neck squamouscell carcinomas and their relationship to patient outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 69: 1024-1031 (2007).
- [118] Evans SM, Hahn S, Pook DR, et al. Detection of hypoxia in human squamouscell carcinoma by EF5 binding. *Cancer Res.* 60:2018-2024 (2000).
- [119] Rasey JS, Grunbaum Z, Magee S, et al. Characterization of radiolabeled fluoromisonidazole as a probe for hypoxic cells. *Radiat Res.* 111: 292-304 (1987).
- [120] Chang J, Wen B, Kazanzides P, et al. A robotic system for 18FFMISO PET-guided intratumoral pO₂ measurements. *Med Phys.* 36:5301-5309 (2009).
- [121] Zips D, Zophel K, Abolmaali N, et al. Exploratory prospective trial of hypoxia-specific PET imaging during radiochemotherapy in patients with locally advanced head-and-neck cancer. *Radiother Oncol.* 105: 21-28 (2012).
- [122] Nehmeh SA, Lee NY, Schroder H, et al. Reproducibility of intratumor distribution of (18)F-fluoromisonidazole in head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 70: 235-242 (2008).
- [123] Doss M, Zhang JJ, Belanger MJ, et al. Biodistribution and radiation dosimetry of the hypoxia marker 18F-HX4 in monkeys and humans determined by using whole-body PET/CT. *Nucl Med Commun.* 31:1016-1024 (2010).
- [124] Dubois LJ, Lieuwes NG, Janssen MH, et al. Preclinical evaluation and validation of [18F]HX4, a promising hypoxia marker for PET imaging. *Proc Natl Acad Sci.* 108:14620-14625 (2011).

- [125] Chen L, Zhang Z, Kolb HC, et al. 18F-HX4 hypoxia imaging with PET/CT in head and neck cancer: a comparison with (18)F-FMISO. *Nucl Med Commun.* 33:1096-1102 (2012).
- [126] Doss M, Kolb HC, Walsh JC, et al. Biodistribution and radiation dosimetry of the hypoxia marker [18F]-HX4 in monkeys and humans determined by using whole-body PET/CT. *Nucl Med Commun.* 31:1016-1024, (2010).
- [127] Kumar P, Stypinski D, Xia H, et al. Fluoroazomycin arabinoside (FAZA): synthesis, 2H and 3H-labelling and preliminary biological evaluation of a novel 2-nitroimidazole marker of tissue hypoxia. *J Label Compd Radiopharm.* 42: 3-16 (1999).
- [128] Piert M, Machulla HJ, Picchio M, et al. Hypoxia-specific tumor imaging with 18Ffluoroazomycin arabinoside. *J Nucl Med.* 46:106-113 (2005).
- [129] Busk M, Horsman MR, Jakobsen S, et al. Imaging hypoxia in xenografted and murine tumors with 18F-fluoroazomycin arabinoside: a comparative study involving microPET, autoradiography, PO₂-polarography, and fluorescence microscopy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 70:1202-1212 (2008).
- [130] Mortensen LS, Busk M, Nordmark M, et al. Accessing radiation response using hypoxia PET imaging and oxygen sensitive electrodes: a preclinical study. *Radiother Oncol.* 99:418-423 (2011).
- [131] Rischin D, Fisher R, Peters L, et al. Hypoxia in head and neck cancer: studies with hypoxic positron emission tomography imaging and hypoxic cytotoxins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 69:S61-S63 (2007).
- [132] Grosu AL, Souvatzoglou M, Roper B, et al. Hypoxia imaging with FAZA-PET and theoretical considerations with regard to dose painting for individualization of radiotherapy in patients with head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 69:541-551 (2007).
- [133] Mortensen LS, Johansen J, Kallehauge J, et al. FAZA PET/CT hypoxia imaging in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiotherapy: results from the DAHANCA 24 trial. *Radiother Oncol.* 105:14-20 (2012).
- [134] Ziemer LS, Evans SM, Kachur AV, et al. Noninvasive imaging of tumor hypoxia in rats 1552 WALSH ET AL. using the 2-nitroimidazole 18F-EF5. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 30:259-266 (2003).

- [135] Yapp DTT, Woo J, Kartono A, et al. Non-invasive evaluation of tumour hypoxia in the Shionogi tumour model for prostate cancer with ^{18}F -EF5 and positron emission tomography. *BJU Int.* 99:1154-60 (2007).
- [136] Komar G, Seppanen M, Eskola O, et al. ^{18}F -EF5: a new PET tracer for imaging hypoxia in head and neck cancer. *J Nucl Med* 49:1944-1951 (2008).
- [137] Mahy P, Geets X, Lonneux M, et al. Determination of tumour hypoxia with ^{18}F EF3 in patients with head and neck tumours: a phase I study to assess the tracer pharmacokinetics, biodistribution and metabolism. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 35:1282-9 (2008).
- [138] Evans SM, Kachur AV, Shiue CY, et al. Noninvasive detection of tumor hypoxia using the 2- nitroimidazole ^{18}F EF1. *J Nucl Med.* 41:327-36 (2000).
- [139] Lehtiö K, Oikinen V, Grönroos T, et al. Imaging of blood flow and hypoxia in head and neck cancer: initial evaluation with ^{15}O and ^{18}F fluoroerythronitromidazole PET. *J Nucl Med.* 42:1643-52 (2001).
- [140] Barthel H, Wilson H, Collingridge DR, et al. In vivo evaluation of ^{18}F fluoroetanidazole as a new marker for imaging tumour hypoxia with positron emission tomography. *Br J Cancer.* 1;90(11):2232-42 (2004).
- [141] Walsh JC, Lebedev A, Aten E, et al. The clinical importance of assessing tumor hypoxia: relationship of tumor hypoxia to prognosis and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* Oct 1;21(10):1516-54 (2014).
- [142] Bowen SR, van der Kogel AJ, Nordmark M, et al. Characterization of positron emission tomography hypoxia tracer uptake and tissue oxygenation via electrochemical modeling. *Nucl Med Biol.* 38: 771-780 (2011).
- [143] Holland JP, Lewis JS, Dehdashti F. Assessing tumor hypoxia by positron emission tomography with Cu- ATSM. *J Nucl Med Mol Imaging.* 53:193-200 (2009).
- [144] Obata A, Yoshimoto M, Kasamatsu S, et al. Intra-tumoral distribution of ^{64}Cu -ATSM: a comparison study with FDG. *Nucl Med Biol.* 30:529-34 (2003).
- [145] Tanaka T, Furukawa T, Fujieda S, et al. Double-tracer autoradiography with Cu-ATSM/ FDG and immunohistochemical interpretation in four different mouse implanted tumor models. *Nucl Med Biol.* 33:743-50 (2006).

- [146] Dehdashti F, Mintun MA, Lewis JS, et al. In vivo assessment of tumor hypoxia in lung cancer with ^{60}Cu - ATSM. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 30:844-850 (2003).
- [147] Lewis JS, Laforest R, Dehdashti F, et al. An imaging comparison of ^{64}Cu -ATSM and ^{60}Cu -ATSM in cancer of the uterine cervix. *J Nucl Med*. 49:1177-82 (2008).
- [148] Bentzen L, Keiding S, Horsman MR, et al. Feasibility of detecting hypoxia in experimental mouse tumours with ^{18}F -fluorinated tracers and positron emission tomography. *Acta Oncol*. 39:629-37 (2000).
- [149] Zanzonico P, Campa J, Polycarpe-Holman D, et al. Animal-specific positioning molds for registration of repeat imaging studies: comparative microPET imaging of F18-labeled fluoro-deoxyglucose and fluoro-misonidazole in rodent tumors. *Nucl Med Biol*. 33:65-70 (2006).
- [150] Zimny M, Gagel B, DiMartino E, et al. FDG a marker of tumour hypoxia? A comparison with [^{18}F]fluoromisonidazole and pO $_2$ - polarography in metastatic head and neck cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 33:1426-31 (2006).
- [151] Veenith TV, Carter EL, Geeraerts T, et al. Pathophysiologic Mechanisms of Cerebral Ischemia and Diffusion Hypoxia in Traumatic Brain Injury. *JAMA Neurol*. May 1;73(5):542-50 (2016).
- [152] Iqbal R, Kramer GM, Verwer EE, et al. Multiparametric Analysis of the Relationship Between Tumor Hypoxia and Perfusion with ^{18}F -Fluoroazomycin Arabinoside and ^{15}O -H $_2\text{O}$ PET. *J Nucl Med*. Apr;57(4):530-5 (2016).
- [153] Bruehlmeier M, Roelcke U, Schubiger PA, et al. Assessment of hypoxia and perfusion in human brain tumors using PET with ^{18}F -fluoromisonidazole and ^{15}O -H $_2\text{O}$. *J Nucl Med*. Nov;45(11):1851-9 (2004).
- [154] Verwer EE, Boellaard R, van der Veldt AA. Positron emission tomography to assess hypoxia and perfusion in lung cancer. *World J Clin Oncol*. Dec 10;5(5):824-844 (2014).
- [155] Oosterwijk-Wakka JC, Boerman OC, Mulders PF et al. Application of Monoclonal Antibody G250 Recognizing Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. Jun; 14(6):11402-11423 (2013).

- [156] Peeters SG, Zegers CM, Lieuwes NG, et al. A comparative study of the hypoxia PET tracers [¹⁸F]HX4, [¹⁸F]FAZA, and [¹⁸F]FMISO in a preclinical tumor model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Feb 1;91(2):351-9 (2015).
- [157] Almuhaideb A, Papathanasiou N, Bomanji J. 18F-FDG PET/CT Imaging In Oncology. *Ann Saudi Med.* Jan-Feb;31(1):3-13 (2011).
- [158] Lamberts LE, Williams SP, Terwisscha van Scheltinga AG, et al. Antibody positron emission tomography imaging in anticancer drug development. *J Clin Oncol.* May 1;33(13):1491-504 (2015).
- [159] Floor C, van de Watering J, Rijpkema M, et al. Zirconium-89 Labeled Antibodies: A New Tool for Molecular Imaging in Cancer Patients. *BioMed Research International* (2014).
- [160] Zhang Y, Hong H, Caia W. PET Tracers Based on Zirconium-89. *Curr Radiopharm.* Apr 1;4(2):131-139 (2011).
- [161] Kobayashi K, Sasaki T, Takenaka F, et al. A novel PET imaging using ⁶⁴Cu-labeled monoclonal antibody against mesothelin commonly expressed on cancer cells. *J Immunol Res.* 268172 (2015).
- [162] Mannan RH, Somayaji VV, Lee J, Mercer JR, et al. Radioiodinated 1-(5-iodo-5-deoxy-β-D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazole (iodoazomycin arabinoside: IAZA): a novel marker of tissue hypoxia. *J Nucl Med.* 32:1764-70 (1991).
- [163] Urtasun RC, Parliament MB, McEwan AJ, et al. Measurement of hypoxia in human tumours by non-invasive spect imaging of iodoazomycin arabinoside. *Br J Cancer Suppl.* 27:S209-S12 (1996).
- [164] Linder KE, Chan YW, Cyr JE, et al. TcO(PnA.O-1-(2-nitroimidazole)) [BMS-181321], a new technetium-containing nitroimidazole complex for imaging hypoxia: synthesis, characterization, and xanthine oxidase catalyzed reduction. *J Med Chem.* 37:9-17 (1994).
- [165] Ballinger JR, Kee JWM, Rauth AM. In vitro and in vivo evaluation of a technetium-99m-labeled 2-nitroimidazole (BMS181321) as a marker of tumor hypoxia. *J Nucl Med.* 37:1023-31 (1996).

- [166] Hoebbers FJP, Janssen HLK, Olmos RAV, et al. Phase 1 study to identify tumour hypoxia in patients with head and neck cancer using technetium-99m BRU 59-21. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 29:1206-11 (2002).
- [167] Zhang X, Melo T, Ballinger JR, et al. Studies of ^{99m}Tc- BnAO (HL-91): a non-nitroaromatic compound for hypoxic cell detection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 42:737-40 (1998).
- [168] Cook GJR, Houston S, Barrington SF, et al. Technetium-99m-labeled HL91 to identify tumor hypoxia: correlation with fluorine-18-FDG. *J Nucl Med*. 39:99-103 (1998).
- [169] Li L, Yu J, Xing L, et al. Serial hypoxia imaging with ^{99m}Tc-HL91 SPECT to predict radiotherapy response in nonsmall cell lung cancer. *Am J Clin Oncol*. 29:628-33 (2006).
- [170] Pautler RG. Mouse MRI: Concepts and Applications in Physiology. *Physiology*. 19:4,168-175 (2004).
- [171] Kim YR, Savellano MD, Savellano DH, et al. Measurement of tumor interstitial volume fraction: Method and implication for drug delivery. *Magn Reson Med*. Sep;52(3):485-94 (2004).
- [172] Pacheco-Torres J, López-Larrubia P, Ballesteros P. Imaging tumor hypoxia by magnetic resonance methods. *NMR Biomed*. 24(1):1-16 (2011).
- [173] Matsumoto K, Bernardo M, Subramanian S, et al. MR assessment of changes of tumor response to hyperbaric oxygen treatment. *Magn Reson Med*. 56(2):240-246 (2006).
- [174] Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci*. 87(24):9868-9872 (1990).
- [175] Hoskin PJ, Carnell DM, Taylor NJ, et al. Hypoxia in prostate cancer: correlation of BOLD-MRI with pimonidazole immunohistochemistry-initial observations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 68:1065-1071 (2007).
- [176] Rich LJ, Seshadri M. Photoacoustic Imaging of Vascular Hemodynamics: Validation with Blood Oxygenation Level-Dependent MR Imaging. *Radiology*. 275(1):110-118 (2015).
- [177] Hallac RR, Zhou H, Pidikiti R, et al. Correlations of noninvasive BOLD and TOLD MRI with pO₂ and relevance to tumor radiation response. *Magn Reson Med*. May;71(5):1863-73 (2013).

- [178] Zhang Z, Hallac RR, Peschke P, et al. A noninvasive tumor oxygenation imaging strategy using magnetic resonance imaging of endogenous blood and tissue water. *Magn Reson Med*. Feb;71(2):561-9 (2013).
- [179] Jordan BF, Cron GO, Gallez B. Rapid monitoring of oxygenation by ¹⁹F magnetic resonance imaging: Simultaneous comparison with fluorescence quenching. *Magn Reson Med*. Mar;61(3):634-8 (2009).
- [180] Zhao D, Ran S, Constantinescu A, et al. Tumor oxygen dynamics: correlation of in vivo MRI with histological findings. *Neoplasia*. Jul-Aug;5(4):308-18 (2003).
- [181] Kodibagkar VD, Cui W, Merritt ME, et al. Novel ¹H NMR approach to quantitative tissue oximetry using hexamethyldisiloxane. *Magn Reson Med*. 55(4), 743-8 (2006).
- [182] Agarwal S, Shankar RV, Inge LJ, et al. MRI assessment of changes in tumor oxygenation post hypoxia-targeted therapy. In *Progress in Biomedical Optics and Imaging. Proceedings of SPIE [941714]* (2015).
- [183] Jordan BF, Magat J, Colliez F, et al. Mapping of oxygen by imaging lipids relaxation enhancement: a potential sensitive endogenous MRI contrast to map variations in tissue oxygenation. *Magn Reson Med*. Sep;70(3):732-44 (2013).
- [184] Mendonça-Dias MH, Gaggelli E, Lauterbur PC. Paramagnetic contrast agents in nuclear magnetic resonance medical imaging. *Semin Nucl Med*. 13:364-76 (1983).
- [185] Robinson SP, Howe FA, Griffiths JR. Noninvasive monitoring of carbogen-induced changes in tumor blood flow and oxygenation by functional magnetic resonance imaging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 33(4):855-859 (1995).
- [186] Baudalet C, Ansiaux R, Jordan BF, et al. Physiological noise in murine solid tumours using T²*-weighted gradient-echo imaging: a marker of tumour acute hypoxia? *Phys Med Biol*. 49(15):3389-3411 (2004).
- [187] Baudalet C, Gallez B. How does blood oxygen level-dependent (BOLD) contrast correlate with oxygen partial pressure (pO₂) inside tumors? *Magn Reson Med*. 48(6):980-986 (2002).
- [188] McPhail LD, Robinson SP. Intrinsic susceptibility MR imaging of chemically induced rat mammary tumors: relationship to histologic assessment of hypoxia and fibrosis. *Radiology*. 254(1):110-118 (2010).

- [189] Howe FA, Robinson SP, McIntyre DJ, et al. Issues in flow and oxygenation dependent contrast (FLOOD) imaging of tumours. *NMR Biomed.* 14(7-8):497-506 (2001).
- [190] Jordan BF, Magat J, Colliez F, et al. Application of MOBILE (mapping of oxygen by imaging lipids relaxation enhancement) to study variations in tumor oxygenation. *Adv Exp Med Biol.* 789:281-8 (2013).
- [191] Colliez F, Neveu MA, Magat J, et al. Qualification of a noninvasive magnetic resonance imaging biomarker to assess tumor oxygenation. *Clin Cancer Res.* Nov 1;20(21):5403-11 (2014).
- [192] Matsumoto K, Subramanian S, Devasahayam N, et al. Electron paramagnetic resonance imaging of tumor hypoxia: enhanced spatial and temporal resolution for in vivo pO₂ determination. *Magn Reson Med.* 55:1157-1163 (2006).
- [193] Matsumoto S, Hyodo F, Subramanian S, et al. Low-field paramagnetic resonance imaging of tumor oxygenation and glycolytic activity in mice. *J Clin Invest.* 118:1965-1973 (2008).
- [194] Elas M, Ahn KH, Parasca A, et al. Electron paramagnetic resonance oxygen images correlate spatially and quantitatively with Oxylite oxygen measurements. *Clin Cancer Res.* 12:4209-4217 (2006).
- [195] Lee CT, Boss MK, Dewhirst MV. Imaging Tumor Hypoxia to Advance Radiation Oncology. *Antioxid Redox Signal.* Jul 10;21(2):313-337 (2010).
- [196] Rizwan A, Periannan K. Theory, Instrumentation, and Applications of EPR Oximetry. *Chem Rev.* May 12;110(5):3212-3236 (2010).
- [197] O'Connor JPB, Boulton JKR, Jamin Y, et al. Oxygen-enhanced MRI accurately identifies, quantifies, and maps tumor hypoxia in preclinical cancer models. *Cancer Res.* 76:787-95 (2016).
- [198] Dewhirst MW, Birrer SR. Oxygen-Enhanced MRI Is a Major Advance in Tumor Hypoxia Imaging. *Cancer Res.* Feb 15;76(4):769-72 (2016).
- [199] Leblond F, Davis SC, Valdés PA, et al. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *J Photochem Photobiol B.* Jan 21;98(1):77-94 (2010).

- [200] General Electric, "Fluorescence Imaging principles and methods", handbook, 63-0035-28, Rev.B, (2002-10).
- [201] In Vivo Fluorescent Agents & Dyes [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.perkinelmer.com/category/in-vivo-fluorescent-agents-dyes> (consulté le 17/05/16).
- [202] Contag CH, Contag PR, Mullins JI, et al. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol.* 18: 593-603 (1995).
- [203] Debbage P, Jaschke W. Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors. *Histochem Cell Biol.* 130: 845-875 (2008).
- [204] Luker GD, Luker KE. Optical imaging: current applications and future directions. *J Nucl Med.* 49: 1-4 (2008).
- [205] Nakajima EC, Laymon C, Oborski M, et al. Quantifying Metabolic Heterogeneity in Head and Neck Tumors in Real Time: 2-DG Uptake Is Highest in Hypoxic Tumor Regions. *PLoS ONE.* 9(8):e102452 (2014).
- [206] Bao B, Groves K, Zhang J, et al. In vivo imaging and quantification of carbonic anhydrase IX expression as an endogenous biomarker of tumor hypoxia. *PLoS ONE.* 7(11):p.e50860 (2012).
- [207] van Brussel AS, Adams A, Oliveira S, et al. Hypoxia-Targeting Fluorescent Nanobodies for Optical Molecular Imaging of Pre-Invasive Breast Cancer. *Mol Imaging Biol.* Aug;18(4):535-44 (2016).
- [208] Lv PC, Roy J, Putt KS, et al. Evaluation of a Carbonic Anhydrase IX-Targeted Near-Infrared Dye for Fluorescence-Guided Surgery of Hypoxic Tumors. *Mol Pharm.* May 2;13(5):1618-25 (2016).
- [209] Kiyose K, Hanaoka K, Oushiki D, et al. Hypoxia-Sensitive Fluorescent Probes for in Vivo Real-Time Fluorescence Imaging of Acute Ischemia. *J Am Chem Soc.* 132(45),pp15846-15848 (2010).
- [210] Elmes RB. Bioreductive fluorescent imaging agents: applications to tumour hypoxia. *Chem Commun.* Jul 12;52(58):8935-56 (2016).
- [211] Wu JB, Shao C, Li X, et al. Near-infrared fluorescence imaging of cancer mediated by tumor hypoxia and HIF1 α /OATPs signaling axis. *Biomaterials.* Sep;35(28):8175-85

(2014).

[212] Okuda K, Okabe Y, Kadonosono T, et al. 2-Nitroimidazole-tricarbocyanine conjugate as a near-infrared fluorescent probe for in vivo imaging of tumor hypoxia. *Bioconjug Chem.* 23: 324-329 (2012).

[213] Zhou F, Zanganeh S, Mohammad I, et al. Targeting tumor hypoxia: a third generation 2-nitroimidazole-indocyanine dye-conjugate with improved fluorescent yield. *Org Biomol Chem.* Dec 14;13(46):11220-7 (2015).

[214] Near Infrared Fluorescence (NIRF) Khamis RY, Woollard KJ, Hyde GD, et al. Molecular Imaging of Oxidized LDL with an Autoantibody in Experimental Atherosclerosis. *Sci Rep.* Feb 25;6:21785 (2016).

[215] Khamis R, Woollard K, Hyde G, et al. Near-infrared fluorescence (nirf) whole body and intra-arterial molecular imaging of oxidized LDL in experimental atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 63(12_S) (2014).

[216] Zhang X, Tian Y, Zhang C, et al. Near-infrared fluorescence molecular imaging of amyloid beta species and monitoring therapy in animal models of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci.* Aug 4;112(31):9734-9 (2015).

[217] B Zhu, Sevick-Muraca EM. A review of performance of near-infrared fluorescence imaging devices used in clinical studies. *Br J Radiol.* Jan88(1045):20140547 (2015).

[218] Hyvelin JM, Tardy I, Arbogast C, et al.. *Invest Radiol.* Aug;48(8):570-83 (2013).

[219] Foster FS, Hossack J, Adamson SL. Micro-ultrasound for preclinical imaging. *Interface Focus.* Aug6;1(4):576-601 (2011).

[220] de Jong N, Bouakaz A, Frinking P. Basic acoustic properties of microbubbles. *Echocardiography.* Apr;19(3):229-40 (2002).

[221] Needles A, Arditi M, Rognin NG, et al. Nonlinear contrast imaging with an array-based micro-ultrasound system. *Ultrasound Med Biol.* Dec;36(12):2097-106 (2010).

[222] Willmann JK, Kimura RH, Deshpande N, et al. Targeted contrast-enhanced ultrasound imaging of tumor angiogenesis with contrast microbubbles conjugated to integrin-binding knottin peptides. *J Nucl Med.* 51:433Y440 (2010).

- [223] Willmann JK, Lutz AM, Paulmurugan R, et al. Dual-targeted contrast agent for US assessment of tumor angiogenesis in vivo. *Radiology*. 248:936Y944 (2008).
- [224] Lyshchik A, Fleischer AC, Huamani J, et al. Molecular imaging of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression using targeted contrast-enhanced high-frequency ultrasonography. *J UltrasoundMed*. 26:1575Y1586 (2007).
- [225] Kaufmann BA, Sanders JM, Davis C, et al. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation*. 116:276Y284 (2007).
- [226] Anderson CR, Hu X, Zhang H, et al. Ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis with an integrin targeted microbubble contrast agent. *Invest Radiol*. 46:215Y224 (2011).
- [227] Anderson CR, Rychak JJ, Backer M, et al. scVEGF microbubble ultrasound contrast agents: a novel probe for ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis. *Invest Radiol*. 45:579Y585 (2010).
- [228] Kaneko OF, Willmann JK. Ultrasound for molecular imaging and therapy in cancer. *Quant Imaging Med Surg*. Jun;2(2):87-97 (2012).
- [229] Cai W, Chen X. Multimodality molecular imaging of tumor angiogenesis. *J Nucl Med*. Jun;49 Suppl 2:113S-28S (2008).
- [230] Kiessling F, Fokong S, Koczera P, et al. Ultrasound microbubbles for molecular diagnosis, therapy, and theranostics. *J Nucl Med*. Mar;53(3):345-8 (2012).
- [231] Van Rooij T, Daeichin V, Skachkov I, et al. Targeted ultrasound contrast agents for ultrasound molecular imaging and therapy. *Int J Hyperthermia*. Mar;31(2):90-106 (2015).
- [232] Barrefelt A, Zhao Y, Larsson MK, et al. Fluorescence labelled microbubbles for multimodal imaging. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug28;464(3):737-42 (2015).
- [233] Pysz MA, Foygel K, Rosenberg J, et al. Antiangiogenic cancer therapy: monitoring with molecular US and a clinically translatable contrast agent (BR55). *Radiology*. 256:519Y527 (2010).
- [234] Wiesinger I, Schreml S, Wohlgemuth WA, et al. Perfusion quantification of vascular malformations using contrast-enhanced ultrasound (CEUS) with time intensity curve

- analysis before and after treatment: First results. *Clin Hemorheol Microcirc.* Sep25;62(4):283-90 (2015).
- [235] Varetto G, Gibello L, Castagno C, et al. Use of Contrast-Enhanced Ultrasound in Carotid Atherosclerotic Disease: Limits and Perspectives. *Biomed Res Int.* 2015:293163 (2015).
- [236] Feinstein SB, Coll B, Staub D, et al. Contrast enhanced ultrasound imaging. *J Nucl Cardiol.* Jan-Feb;17(1):106-15 (2010).
- [237] Scaife M, Giannakopoulos T, Al-Khoury GE, et al. Contemporary Applications of Ultrasound in Abdominal Aortic Aneurysm Management. *Front Surg.* May 27;3:29 (2016).
- [238] Escoffre JM, Novell A, Piron J, et al. Microbubble attenuation and destruction: are they involved in sonoporation efficiency? *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* Jan;60(1):46-52 (2013).
- [239] Escoffre JM, Mannaris C, Geers B, et al. Doxorubicin liposome-loaded microbubbles for contrast imaging and ultrasound-triggered drug delivery. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* Jan;60(1):78-87 (2013).
- [240] Bell AG. Upon the production and reproduction of sound by light. 1880 *American Journal of Science.* (118):305 (1880).
- [241] Mallidi S, Luke GP, and Emelianov SY. Photoacoustic imaging in cancer detection, diagnosis, and treatment guidance. *Trends Biotechnol.* May; 29(5):213-221 (2011).
- [242] Stanislav Y. Emelianov, Pai-Chi Li, Matthew O'Donnell. Photoacoustics for molecular imaging and therapy. *Phys Today.* May1;62(8):34-39 (2009).
- [243] Hudson SV, Huang JS, Yin W, et al. Targeted Non-invasive Imaging of EGFR-expressing Orthotopic Pancreatic Cancer using Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT). *Cancer Res.* Nov1;74(21):6271-9. (2014).
- [244] Bohndiek SE, Bodapati S, Van De Sompel D, et al. Development and Application of Stable Phantoms for the Evaluation of Photoacoustic Imaging Instruments. *PLoS ONE.* 8(9): e75533 (2013).
- [245] Su R, Ermilov SA, Liopo AV, et al. Three-dimensional optoacoustic imaging as a new noninvasive technique to study long-term biodistribution of optical contrast agents in small animal models. *J Biomed Opt.* Oct;17(10):101506 (2012).

- [246] Bayer CL, Luke GP and Emelianov SY. Photoacoustic imaging for medical diagnostics. *Acoust Today*. 8, 15-23 (2012).
- [247] Zackrisson S, van de Ven SM, Gambhir SS. Light In and Sound Out: Emerging Translational Strategies for Photoacoustic Imaging. *Cancer Res*. 74:979-1004 (2014).
- [248] Xia J, Yao J, Wang LV. Photoacoustic tomography: principles and advances. *Electromagn Waves*. 147:1-22 (2014).
- [249] Wang LV, Hu S. Photoacoustic tomography: in vivo imaging from organelles to organs. *Science*. Mar23;335(6075):1458-62 (2012).
- [250] Luke GP, Yeager D and Emelianov SY. Biomedical applications of photoacoustic imaging with exogenous contrast agents. *Ann Biomed Eng*. Feb;40(2):422-37 (2012).
- [251] Wang X, Xie X, Ku G, et al. Noninvasive imaging of hemoglobin concentration and oxygenation in the rat brain using high-resolution photoacoustic tomography. *J Biomed Opt*. 11, 024015-024015 (2006).
- [252] Needles A, Heinmiller P, Ephrat C, et al. Development of a Combined Photoacoustic Micro-Ultrasound System for Estimating Blood Oxygenation. *IEEE International Ultrasonics Symposium Proceedings* 390-393 (2010).
- [253] Jokerst JV, Cole AJ, Van de Sompel D, et al. Gold Nanorods for Ovarian Cancer Detection with Photoacoustic Imaging and Resection Guidance via Raman Imaging in Living Mice. *ACS Nano*. 6:10366-10377 (2012).
- [254] Nguyen KT, Sreejith S, Zhao Y. Metallic and Upconversion Nanoparticles as Photoacoustic Contrast Agents for Biomedical Imaging. *Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry*. 1-24 (2016).
- [255] Jokerst JV, Van de Sompel D, Bohndiek SE, et al. Cellulose Nanoparticles are a Biodegradable Photoacoustic Contrast Agent for Use in Living Mice. *Photoacoustics*. Sep1;2(3):119-127 (2014).
- [256] de la Zerda A, Bodapati S, Teed R, et al. Family of enhanced photoacoustic imaging agents for high-sensitivity and multiplexing studies in living mice. *ACS Nano*. Jun 26;6(6):4694-701 (2012).

- [257] Ku G, Zhou M, Song S, et al. Copper sulfide nanoparticles as a new class of photoacoustic contrast agent for deep tissue imaging at 1064 nm. *ACS Nano*. Aug28;6(8):7489-96 (2012).
- [258] Bayer CL, Chen YS, Kim S, et al. Multiplex photoacoustic molecular imaging using targeted silica-coated gold nanorods. *Biomed Opt Express*. Jul1;2(7):1828-35 (2011).
- [259] Manohar S, Ungureanu C, Van Leeuwen TG. Gold nanorods as molecular contrast agents in photoacoustic imaging: the promises and the caveats. *Contrast Media Mol Imaging*. Sep-Oct;6(5):389-400 (2011).
- [260] Chen YS, Frey W, Kim S, et al. Silica-coated gold nanorods as photoacoustic signal nanoamplifiers. *Nano Lett*. Feb9;11(2):348-54 (2011).
- [261] Li PC, Wang CR, Shieh DB, et al. In vivo photoacoustic molecular imaging with simultaneous multiple selective targeting using antibody-conjugated gold nanorods. *Opt Express*. Nov10;16(23):18605-15 (2008).
- [262] Lu W, Huang Q, Ku G, et al. Photoacoustic imaging of living mouse brain vasculature using hollow gold nanospheres. *Biomaterials*. Mar;31(9):2617-26 (2010).
- [263] Nam SY, Ricles LM, Suggs LJ, et al. In vivo ultrasound and photoacoustic monitoring of mesenchymal stem cells labeled with gold nanotracers. *PloS ONE*. 7(5):e37267 (2012).
- [264] Jeon M, Song W, Huynh E, et al. Methylene blue microbubbles as a model dual-modality contrast agent for ultrasound and activatable photoacoustic imaging. *J Biomed Opt*. Jan;19(1):16005 (2014).
- [265] Mai L, Yao A, Li J, et al. Cyanine 5.5 Conjugated Nanobubbles as a Tumor Selective Contrast Agent for Dual Ultrasound-Fluorescence Imaging in a Mouse Model. *PloS ONE*. 8(4):e61224 (2013).
- [266] Wang YH, Liao AH, Chen JH, et al. Photoacoustic/ultrasound dual-modality contrast agent and its application to thermotherapy. *J Biomed Opt*. Apr;17(4):045001 (2012).
- [267] Zerda A, de la Liu Z, Bodapati S, et al. Ultrahigh Sensitivity Carbon Nanotube Agents for Photoacoustic Molecular Imaging in Living Mice. *Nano Letters*. 10:2168-2172 (2010).
- [268] Pagel MD. Science to practice: can photoacoustic imaging be used to monitor tumor oxygenation and the effects of antivascular chemotherapies? *Radiology*. Apr;275(1):1-2 (2015).

- [269] Wang LV. Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography. *Nat Photonics*. 3(9):503-509 (2009).
- [270] Stoffels I, Morscher S, Helfrich I, et al. Metastatic status of sentinel lymph nodes in melanoma determined noninvasively with multispectral optoacoustic imaging. *Sci Transl Med*. Dec9;7(317):317ra199 (2015).
- [271] Garcia-Uribe A, Erpelding TN, Krumholz A, et al. Dual-Modality Photoacoustic and Ultrasound Imaging System for Noninvasive Sentinel Lymph Node Detection in Patients with Breast Cancer. *Sci Rep*. Oct29;5:15748 (2015).
- [272] Nam SY, Chung E, Suggs LJ, et al. Combined ultrasound and photoacoustic imaging to noninvasively assess burn injury and selectively monitor a regenerative tissue-engineered construct. *Tissue Eng Part C Methods*. Jun;21(6):557-66 (2015).
- [273] Lerondel S, Le Pape A. Bioluminescence Imaging in Rodents: When Light Illuminates Cancer Research. *Current Molecular Imaging*. 2:18-29 (2013).
- [274] Badr C, Tannous B. Bioluminescence imaging: progress and applications. *Trends in Biotechnology*. 29(12):624-633 (2011).
- [275] Brullé Laura. Développement de stratégies d'imagerie multimodalités pour la pharmacologie des agents anticancéreux. Thèse de doctorat en sciences : Biologie cellulaire et moléculaire. Université d'Orléans : 2012.
- [276] Dunlap P. Biochemistry and genetics of bacterial bioluminescence. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 144:37-64 (2014).
- [277] Teicher BA. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther*. 5(10):2435-43 (2006).
- [278] Kim MP, Evans DB, Wang HM, et al. Generation of Orthotopic and Heterotopic Human Pancreatic Cancer Xenografts in Immunodeficient Mice. *Nature Protocols*. 4:11,1670-1680 (2009).
- [279] Graves E, Vilalta M, Cecic IK, et al. Hypoxia in models of lung cancer: Implications for targeted therapeutics. *Clin Cancer Res*. 16(19): 4843-4852 (2010).
- [280] Le QT, Chen E, Salim A, et al. An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*. 12(5):1507-1514 (2006).

- [281] Fushiki H, Miyoshi S, Noda A, et al. Pre-clinical validation of orthotopically-implanted pulmonary tumor by imaging 18F-fluorothymidine-positron emission tomography/computed tomography. *Anticancer Research*. 33:4741-4750 (2013).
- [282] Andouard S, Guilhem MT, Le Rouzic G, et al. Impact of radiation dose delivered by repeated CTscan examinations on tumor growth in preclinical model of lung cancer. Poster communication, SFPM 51th Ed. (2011).
- [283] Vrigneaud JM, Courteau A, Ranouil J, et al. Application of the optically stimulated luminescence (OSL) technique for mouse dosimetry in micro-CT imaging. *Med Phys*. Dec;40(12):122102 (2013).
- [284] Khalil AA, Jameson MJ, Broaddus WC, et al. The influence of hypoxia and pH on bioluminescence imaging of luciferase-transfected tumor cells and xenografts. *Int J Mol Imaging*. 287697 (2013).
- [285] Lichtenstein DA. Lung ultrasound in the critically ill. *Ann Intensive Care*. 4:1 (2014).
- [286] Gargani L. Lung ultrasound: a new tool for the cardiologist. *Cardiovasc Ultrasound*. 9:6 (2011).
- [287] Wallace MB, Pascual JMS, Raimondo M, et al. Minimally invasive endoscopic staging of suspected lung cancer. *J Am Med Assoc*. 299(5):540-546 (2008).
- [288] Colella C, Vilmann P, Konge L, et al. Endoscopic ultrasound in the diagnosis and staging of lung cancer. *Endosc Ultrasound*. 3(4):205-212 (2014).
- [289] Gagnadoux F, Le Pape A, Lemarié E, et al. Aerosol delivery of chemotherapy in an orthotopic model of lung cancer. *Eur Respir J*. 26:657-6 (2005).
- [290] Wathen CA, Foje N, Avermaete T, et al. In vivo X-ray computed tomographic imaging of soft tissue with native, intravenous, or oral contrast. *Sensors*. 13(6): 6957-6980 (2013).
- [291] Paulus MJ, Gleason SS, Kennel SJ, et al. High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia*. 2,62-70 (2000).
- [292] Willekens I, Buls N, Lahoutte T, et al. Evaluation of the radiation dose in micro-CT with optimization of the scan protocol. *Contrast Media Mol Imaging*. (4):201-7 (2010).

- [293] Kagadis GC, Loudos G, Katsanos K, et al. In vivo small animal imaging: Current status and future prospects. *Med Phys*. 37(12):6421-6442 (2010).
- [294] Brulle L, Vandamme M, Ries D, et al. Effects of a non thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a MIA PaCa2-luc orthotopic pancreatic carcinoma model. *PloS ONE*. 2012;7(12): e52653.
- [295] Rooij T, Daeichin V, Skachkov I, et al. Targeted ultrasound contrast agents for ultrasound molecular imaging and therapy. *Int J Hyperthermia*. 31(2):90-106 (2015).
- [296] Lamuraglia M, Bridal SL, Santin M, et al. Clinical relevance of contrast-enhanced ultrasound in monitoring anti-angiogenic therapy of cancer: current status and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*. Mar;73(3):202-12 (2010).
- [297] jiang Y, Allen D, Kerseman, et al. Acute vascular response to cediranib treatment in human non-small-cell lung cancer xenografts with different tumour stromal architecture. *Lung cancer*. 90:191-198 (2015).
- [298] Raes F, Sobilo J, Le Mee M, et al. High resolution ultrasound and photoacoustic imaging of orthotopic lung cancer in mice: new perspectives for onco-pharmacology. *PloS ONE*. 11(4):e0153532 (2016).
- [299] Borad M, Reddy S, Bahary N, et al. Randomized phase ii trial of gemcitabine plus th-302 versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 33(13):1475-81 (2014).
- [300] Chawla S, Cranmer L, Van Tine B, et al. Phase II Study of the safety and antitumor activity of the hypoxia-activated prodrug th-302 in combination with doxorubicin in patients with advanced soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol*. 32(29):3299-306 (2014).
- [301] Zegers C, van Elmp W, Reymen B, et al. In vivo quantification of hypoxic and metabolic status of nslc tumors using [18F]HX4 and [18F]FDG-PET/CT imaging. *Clin Cancer Res*. 20(24):6389-97 (2014).
- [302] Peeters S, Zegers C, Biemans R, et al. TH-302 in combination with radiotherapy enhances the therapeutic outcome and is associated with pretreatment [18F]HX4 hypoxia pet imaging. *Clin Cancer Res*. 21(13):2984-92 (2015).
- [303] Maillet A, Guilleminault L, Lemarié E, et al. The airways, a novel route for delivering monoclonal antibodies to treat lung tumors. *Pharm Res*. 28:2147-2156 (2011).

- [304] Mahajan A, Goh V, Basu S, et al. Bench to bedside molecular functional imaging in translational cancer medicine: to image or to imagine? *Clin Radiol*. Oct;70(10):1060-82 (2015).
- [305] de Jong M, Essers J, van Weerden WM Imaging preclinical tumour models: improving translational power. *Nat Rev Cancer*. Jul;14(7):481-93 (2014).
- [306] Wessels JT, Busse AC, Mahrt J, et al. In vivo imaging in experimental preclinical tumor research-a review. *Cytometry A*. Aug;71(8):542-9 (2007).
- [307] Kang J, Chang JH, Wilson BC, et al. A prototype hand-held tri-modal instrument for in vivo ultrasound, photoacoustic, and fluorescence imaging. *Rev Sci Instrum*. Mar;86(3):034901 (2015).
- [308] Wang Y, Tseng JC, Sun Y, et al. Noninvasive imaging of tumor burden and molecular pathways in mouse models of cancer. *Cold Spring Harb Protoc*. Feb 2;2015(2):135-44 (2015).
- [309] Dosio F, Brusa P, Cattel L. Immunotoxins and anticancer drug conjugate assemblies: the role of the linkage between components. *Toxins*. Jul;3(7):848-83 (2011).
- [310] Mohammad RM, Varterasian ML, Almatchy, VP, et al. Successful treatment of human chronic lymphocytic leukemia xenografts with combination biological agents auristatin PE and bryostatin 1. *Clin Cancer Res*. 4,1337-1343 (1998).
- [311] Pettit GR, Flahive EJ, Boyd MR, et al. Antineoplastic agents 360. Synthesis and cancer cell growth inhibitory studies of dolastatin 15 structural modifications. *Anti-Cancer Drug Des*. 13, 47-66 (1998).
- [312] Turner T, Jackson WH, Pettit GR, et al. Treatment of human prostate cancer cells with dolastatin 10, a peptide isolated from a marine shell-less mollusc. *Prostate*. 34, 175-181 (1998).
- [313] Bai R, Pettit GR, Hamel E. Binding of dolastatin-10 to tubulin at a distinct site for peptide antimetabolic agents near the exchangeable nucleotide and vinca alkaloid sites. *J Biol Chem*. 265,17141-17149 (1990).
- [314] Doronina SO, Toki BE, Torgov MY, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat Biotechnol*. 21, 778-784 (2003).
- [315] Dolabella Auricularia [en ligne]. Disponible à l'adresse :

<http://www.animaliitalia.it/prodotto/dolabella-auricularia/> (consulté le 02/06/16).

[316] Thomas M, Clarhaut J, Strale PO, et al. A Galactosidase-Responsive “Trojan Horse” for the Selective Targeting of Folate Receptor-Positive Tumor Cells. *Chem Med Chem*. 6(6):1006-1010 (2011).

[317] Legigan T, Clarhaut J, Renoux B, et al. Synthesis and Antitumor Efficacy of a β -Glucuronidase-Responsive Albumin-Binding Prodrug of Doxorubicin. *J Med Chem*. 55:4516-4520 (2012).

[318] Hoffman R. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Investigational New Drugs*. 17: 343-359 (1999).

[319] Legigan T, Clarhaut J, Tranoy I, et al. The First Generation of β -Galactosidase-Responsive Prodrugs Designed for the Selective Treatment of Solid Tumors in Prodrug Monotherapy. *Angew Chem Int Ed*. 51:1-6 (2012).

[320] Legigan T, Clarhaut J, Renoux B, et al. Synthesis and biological evaluations of a monomethylauristatin E glucuronide prodrug for selective cancer chemotherapy. *Eur J Med Chem*. Sep;67:75-80 (2013).

[321] Vlahov IR, Leamon CP. Engineering folate-drug conjugates to target cancer: from chemistry to clinic. *Bioconjug Chem*. Jul18;23(7):1357-69 (2012).

[322] Novell A, Escoffre JM, Bouakaz A. Ultrasound Contrast Imaging in Cancer-Technical Aspects and Prospects. *Current Molecular Imaging*. 2:1pp.77-88(12) (2013).

[323] Tranoy-Opalinski I, Legigan T, Barat R, et al. β -Glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: an update. *Eur J Med Chem*. Mar3;74:302-13 (2014).

[324] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. Mar-Apr;55(2):74-108 (2005).

[325] Les cancers en France - Edition 2014, *Institut National du Cancer* (2015).

[326] Shimoi K., Nakayama T. Glucuronidase Deconjugation in Inflammation. *Methods in Enzymology*. 400p 263-272 (2005).

[327] Guo Z, Li Q Han Y, et al. Prevention of LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice by Progranulin. *Mediators of Inflammation*. vol. 2012, Article ID 540794, 10 pages (2012).

- [328] Yan W, Xiao D, Yao K. Combined bioluminescence and fluorescence imaging visualizing orthotopic lung adenocarcinoma xenograft in vivo. *Acta Biochim Biophys Sin.* Aug;43(8):595-600 (2011).
- [329] Hwang JY, Park J, Kang BJ, et al. Multimodality imaging in vivo for preclinical assessment of tumor-targeted doxorubicin nanoparticles. *PloS ONE.* 7(4):e34463 (2012).
- [330] Snyder CS, Kaushal S, Kono Y, et al. Complementarity of ultrasound and fluorescence imaging in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *Bio Med Central Cancer.* 9:106 (2009).
- [331] Maeda A, Bu J, Chen J, et al. Dual in vivo photoacoustic and fluorescence imaging of HER2 expression in breast tumors for diagnosis, margin assessment, and surgical guidance. *Mol Imaging.* 13 (2014).
- [332] James J, Murukeshan VM, Who LS. Integrated photoacoustic, ultrasound and fluorescence platform for diagnostic medical imaging-proof of concept study with a tissue mimicking phantom. *Biomed Opt Express.* Jul1;5(7):2135-2144 (2014).
- [333] Wilson KE, Wang TY, Willmann JK. Acoustic and photoacoustic molecular imaging of cancer. *J Nucl Med.* Nov;54(11):1851-4 (2013).
- [334] Kalmuk J, Folaron M, Buchinger J, et al. Multimodal imaging guided preclinical trials of vascular targeting in prostate cancer. *Oncotarget.* Sep15;6(27):24376-92 (2015).
- [335] Hong H, Zhang Y, Severin GW, et al. Multimodality imaging of breast cancer experimental lung metastasis with bioluminescence and a monoclonal antibody dual-labelled with ⁸⁹Zr and IRDye 800CW. *Mol Pharm.* Aug6;9(8):2339-49 (2012).
- [336] Deroose CM, De A, Loening AM, et al. Multimodality imaging of tumor xenografts and metastases in mice with combined small-animal PET, small-animal CT, and bioluminescence imaging. *J Nucl Med.* Feb;48(2):295-303 (2007).
- [337] Van Oosterom MN, Kreuger R, Buckle T, et al. U-SPECT-BioFluo: an integrated radionuclide, bioluminescence, and fluorescence imaging platform. *EJNMMI Res.* Oct11;4:56 (2014).
- [338] Edwards WB, Akers WJ, Ye Y, et al. Multimodal imaging of integrin receptor-positive tumors by bioluminescence, fluorescence, gamma scintigraphy, and single-photon

- emission computed tomography using a cyclic RGD peptide labelled with a near-infrared fluorescent dye and a radionuclide. *Mol Imaging*. Mar-Apr;8(2):101-10 (2009).
- [339] Liu Y, Yu G, Tian M, et al. Optical probes and the applications in multimodality imaging. *Contrast Media Mol Imaging*. Jul-Aug;6(4):169-77 (2011).
- [340] Gammon ST, Foje N, Brewer EM, et al. Preclinical anatomical, molecular, and functional imaging of the lung with multiple modalities. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. May15;306(10):L897-914 (2014).
- [341] Serkova NJ. Multimodal imaging of mice. *Proc Intl Soc Mag Reson Med*. 19 (2011).
- [342] O'Farrell AC, Shnyder SD, Marston G, et al. Non-invasive molecular imaging for preclinical cancer therapeutic development. *Br J Pharmacol*. Jun;169(4):719-35 (2013).
- [343] lochmann S, Lerondel S, Bléchet C et al. Monitoring of tumour progression using bioluminescence imaging and computed tomography scanning in a nude mouse orthotopic model of human small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 77(1),pp.70-76 (2012).
- [344] Kim J, Lee D, Jung U, et al. Photoacoustic imaging platforms for multimodal imaging. *Ultrasonography*. Apr;34(2):88-97 (2015).
- [345] Beard P. Biomedical photoacoustic imaging. *Interface Focus*. 1:602-631 (2011).
- [346] Fratoddi I, Venditti L, Cametti C, et al. How toxic are gold nanoparticles? The state-of-the-art. *Nano Research*. 8:6,1771-1799 (2015).
- [347] Xiang L, Yuan Y, Xing D, et al. Photoacoustic molecular imaging with antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes for early diagnosis of tumor. *J Biomed Opt*. Mar-Apr;14(2):021008 (2009).
- [348] Sun Y, Stephens DN, Park J, et al. Development of a Multi-modal Tissue Diagnostic System Combining High Frequency Ultrasound and Photoacoustic Imaging with Lifetime Fluorescence Spectroscopy. *Proc IEEE Ultrason Symp*. 570-573 (2008).
- [349] Youna H, Hong KJ. In vivo noninvasive small animal molecular imaging. *Osong Public Health Res Perspect*. Mar;3(1): 48-59 (2012).
- [350] Forbrich A, Heinmiller A, Jose J, et al. Photoacoustic imaging with rotational compounding for improved signal detection. *SPIE Proceedings*. Vol.9323 (2015).

- [351] Deer EL, Gonzalez-Hernandez J, Coursen J, et al. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas*. 39:425-435 (2010).
- [352] Suman BM, Gao S, Zhu N, et al. Real-time Fluorescence Image-Guided Oncologic Surgery. *Adv Cancer Res*. 124:171-211 (2014).
- [353] Nathanson SD. Insights into the Mechanisms of Lymph Node Metastasis. *Cancer*. Jul;98(2):413-423 (2003).
- [354] Takeuchi H, Kitagawa Yuko. Sentinel Lymph Node Biopsy in Gastric Cancer. *Cancer J*. Feb.21(1) (2015).
- [355] Fujimura T, Fushida S, Tsukada T, et al. A new stage of sentinel node navigation surgery in early gastric cancer. *Gastric Cancer*. Apr;18(2),210-217 (2015).
- [356] Handgraaf HJ, Boogerd LS, Verbeek FP, et al. Intraoperative fluorescence imaging to localize tumors and sentinel lymph nodes. *Rectal cancer*. Feb;25(1):48-53 (2016).
- [357] Ohi Y, Umekita Y, Sagara Y, et al. Whole sentinel lymph node analysis by a molecular assay predicts axillary node status in breast cancer. *Br J Cancer*. Oct9;107(8):1239-43 (2012).
- [358] Brambilla T, Fiamengo B, Tinterri C, et al. One-Step Nucleic Acid Amplification in Breast Cancer Sentinel Lymph Node: A Single Institutional Experience and a Short Review. *Front Med*. Jun4;2:37 (2015).
- [359] Themelis G, Harlaar NJ, Kelder W, et al. Enhancing Surgical Vision by Using Real-Time Imaging of $\alpha\beta 3$ -Integrin Targeted Near-Infrared Fluorescent Agent. *Translational Research Ann Surg Oncol*. Nov;18(12):3506-3513 (2011).
- [360] Lyman GH, Temin S, Edge SN, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients with Early-Stage Breast Cancer. *J Clin Oncol*. May;32(13):1365-1383 (2014).
- [361] Gojon H, Fawunmi D, Valachis A. Sentinel lymph node biopsy in patients with microinvasive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. Jan;40(1):5-11 (2014).
- [362] Veronesi U, Valagusa P. Inefficacy of internal mammary nodes dissection in breast cancer surgery. *Cancer*. 1:47(1):170-5 (1981).

- [363] Maguire A, Brogi E. Sentinel lymph nodes for breast carcinoma: an update on current practice. *Histopathology*. 68(1):152-67 (2016).
- [364] Vijaykumar DK, Arunlal M. Management of the axilla in 2015 in India Scenario. *Indian J Surg Oncol*. 6(4):435-9 (2015).
- [365] Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA*. 305(6):569-75 (2011).
- [366] Ochoa D, Korourian S, Boneti C, et al. Axillary reverse mapping; five year experience. *Surgery*. 156(5):1261-8 (2014).
- [367] Tallet A, Lambaudi E, Cohen M, et al. Locoregional treatment of early breast cancer with isolated tumor cells or micro metastasis in sentinel lymph node biopsy. *World J Clin Oncol*. 10;7(2):243-52 (2016).
- [368] Donker M, Can T, Tihoven G, Straver ME, et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): A randomized, multicenter, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 15(12):1303-10 (2014).
- [369] Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastasis: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. *Ann Surg*. 252(3):426-32 (2010).
- [370] Co M, Kwong A. Macrometastasis, micrometastasis, and isolated tumor cells in sentinel lymph nodes of early breast cancers: a 10-year histopathological and survival analysis of 537 Asian patients. *World J Surg*. Jun;39(6):1438-42 (2015).
- [371] Li CZ, Zhang P, Li RW, et al. Axillary lymph node dissection versus sentinel lymph node biopsy alone for early breast cancer with sentinel node metastasis: A meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. Aug;41(8):958-66 (2015).
- [372] Tsuda H. Histological examination of sentinel lymph nodes: significance of macrometastasis, micrometastasis, and isolated tumor cells. *Breast Cancer*. May;22(3):221-9 (2015).

- [373] Donker M, Slaets L, Van Tienhoven G, et al. Axillary lymph node dissection versus axillary radiotherapy in patients with a positive sentinel node: the AMAROS trial. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 159:A9302 (2015).
- [374] Javid S, Segara D, Lotfi P, et al. Can breast MRI predict axillary lymph node metastasis in women undergoing neoadjuvant chemotherapy? *Ann SurgOncol.* 17(7):1841-6 (2010).
- [375] Zaidi H, Thompson C. Evolution and developments instrumentation for positron Emission Mammography. *PET Clin.* 4(4):317-27 (2009).
- [376] Brouwer OR, Vermeeren L, van der Ploeg IM, et al. Lymphoscintigraphy and SPECT/CT in multicentric and multifocal breast cancer: does each tumour have a separate drainage pattern? Results of a Dutch multicentre study (MULTISENT). *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* Jul;39(7):1137-43 (2012).
- [377] Ishihara T, Kaguchi A, Matsushita S, et al. Management of sentinel lymph nodes in malignant skin tumors using dynamic lymphoscintigraphy and the single-photon-emission computed tomography/computed tomography combined system. *Int J Clin Oncol.* Jun;11(3):214-20 (2006).
- [378] Miura H, Ono S, Shibutani K, et al. Contribution of dynamic sentinel lymphoscintigraphy images to the diagnosis of patients with malignant skin neoplasms in the upper and lower extremities. *Springerplus.* Oct 22;3:625 (2014).
- [379] Kitai T, Inomoto T, Miwa M, et al. Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer. *Breast Cancer.* 12: 211-5 (2005).
- [380] Mitsuharu Miwa. The Principle of ICG Fluorescence Method. *The Open Surgical Oncology Journal.* 2(2):26-28 (2010).
- [381] Morscher S, Driessen W, Claussen J, et al. Semi-quantitative Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT) for volumetric PK imaging of gastric emptying. *Photoacoustics.* Jun27;2(3):103-10 (2014).
- [382] Pramanik M, Song KH, Swierczewska M, et al. In vivo carbon nanotube-enhanced non-invasive photoacoustic mapping of the sentinel lymph node. *Phys Med Biol.* Jun7;54(11):3291-3301 (2009).

- [383] Koo J, Jeon M, Oh Y, et al. In vivo non-ionizing photoacoustic mapping of sentinel lymph nodes and bladders with ICG-enhanced carbon nanotubes. *Phys Med Biol*. Dec7;57(23):7853-62 (2012).
- [384] Zanganeh S, Li H, Kumavor PD, et al. Photoacoustic imaging enhanced by indocyanine green-conjugated single-wall carbon nanotubes. *J Biomed Opt*. Sep;18(9):096006 (2013).
- [385] Chulhong K, Hyon-Min S, Xin C, et al. In vivo photoacoustic mapping of lymphatic systems with plasmon-resonant nanostars. *J Mater Chem*. Jan1;21(9): 2841-2844 (2011).
- [386] Song KH, Stein EW, Margenthaler JA, et al. Noninvasive photoacoustic identification of sentinel lymph nodes containing methylene blue in vivo in a rat model. *J Biomed Opt*. Sep-Oct;13(5):054033 (2008).
- [387] Pan D, Pramanik M, Senpan A, et al. Near infrared photoacoustic detection of sentinel lymph nodes with gold nanobeacons. *Biomaterials*. May;31(14):4088-93 (2010).
- [388] Pan D, Cai X, Yalaz C, et al. Photoacoustic sentinel lymph node imaging with self-assembled copper neodecanoate nanoparticles. *ACS Nano*. Feb28;6(2):1260-7 (2012).
- [389] Wishart GC, Loh SW, Jones L, et al. A feasibility study (ICG-10) of indocyanine green (ICG) fluorescence mapping for sentinel lymph node detection in early breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. Aug;38(8):651-6 (2012).
- [390] Niu G, Chen X. Lymphatic Imaging: Focus on Imaging Probes. *Theranostics*. 5(7):686-697 (2015).
- [391] Li L, Shiro Mori S, Sakamoto M, et al. Mouse Model of Lymph Node Metastasis via Afferent Lymphatic Vessels for Development of Imaging Modalities. *PLoS ONE*. Feb8(2):e55797 (2013).
- [392] Bach-Gansmo T, Danielsson R, Saracco A, et al. Integrin receptor imaging of breast cancer: a proof-of-concept study to evaluate ^{99m}Tc-NC100692. *J Nucl Med*. Sep;47(9):1434-9 (2006). Erratum in: *J Nucl Med*. Apr;48(4):567 (2007).
- [393] Atallah I, Milet C, Quatre R, et al. Role of near-infrared fluorescence imaging in the resection of metastatic lymph nodes in an optimized orthotopic animal model of HNSCC. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. Dec;132(6):337-42 (2015).

- [394] Adams KE, Ke S, Kwon S, et al. Comparison of visible and near-infrared wavelength-excitable fluorescent dyes for molecular imaging of cancer. *J Biomed Opt.* Mar-Apr;12(2):024017 (2007).
- [395] Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* Jan;10(1):9-22 (2010).
- [396] Greene HSN, Strauss JS. Multiple primary tumors in the rabbit. *Cancer.* 2,673e691 (1949).
- [397] Suckow MA, Brammer DW, Rush HG, et al. Biology and diseases of rabbits. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, et al, eds. *Laboratory animal medicine.* 2nd ed. San Diego: Academic Press.356 (2002).
- [398] Wu Y, Cai W, Chen X. Near-infrared fluorescence imaging of tumor integrin alpha v beta 3 expression with Cy7-labeled RGD multimers. *Mol Imaging Biol.* Jul-Aug;8(4):226-36 (2006).
- [399] Integrin subunit interaction [en ligne] ; [consulté le 14/05/16]. Disponible sur : https://resources.rndsystems.com/images/site/bb_spring07_17wide_2360.png
- [400] Patent: Novel Imaging Agent: process for the preparation thereof and pharmaceutical composition containing the same. Brevet copropriété industrie/CNRS. Priorité : FR11/02213 du 13/07/2011. Extension internationale n°W02013007959 du 17/01/2013.
- [401] Guillaume Réveillon. Développement d'un mime RGD fluorescent pour l'imagerie de ciblage des intégrines en oncologie. Thèse de doctorat en sciences. Université d'Orléans. 2012.
- [402] Vincent Rerat. Peptidomimétiques RGD (Arg-Gly-Asp) greffables : design, synthèse et évaluation dans des modèles d'adhésion cellulaire et de vectorisation. Thèse de doctorat en sciences. Faculté des sciences. Université Catholique de Louvain. 2008.
- [403] Huang R, Vider J, Kovar JL, et al. Integrin $\alpha\beta 3$ -Targeted IRDye 800CW Near-Infrared Imaging of Glioblastoma. *Clin Cancer Res.* Oct 15; 18(20): 5731-5740 (2012).
- [404] Harlaar NJ, Kelder W, Sarantopoulos A, et al. Real-time near infrared fluorescence (NIRF) intra-operative imaging in ovarian cancer using an $\alpha(v)\beta(3-)$ integrin targeted agent. *Gynecol Oncol.* Mar;128(3):590-5 (2013).

- [405] Wenk CH, Ponce F, Guillermet S, et al. Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin molecular probe. *Cancer Lett.* 334(2):188-95 (2013).
- [406] Sentinel lymph node biopsy for breast cancer patients using fluorescence navigation with indocyanine green. Aoyama K, Kamio T, Ohchi T, et al. *World J Surg Oncol.* Dec 2;9:157 (2011).
- [407] Lee ES, Kim TS, Kim SK. Current status of optical imaging for evaluating lymph nodes and lymphatic system. *Korean J Radiol.* Jan-Feb;16(1):21-31 (2015).
- [408] Hirche C, Murawa D, Mohr Z, et al. ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* Jun;121(2):373-8 (2010).
- [409] Troyan SL, Kianzad V, Gibbs-Strauss SL, et al. The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. *Ann Surg Oncol.* Oct;16(10):2943-52 (2009).
- [410] Mieog JS, Troyan SL, Hutteman M, et al. Toward optimization of imaging system and lymphatic tracer for near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping in breast cancer. *Ann Surg Oncol.* Sep;18(9):2483-91 (2011).
- [411] Nguyen QT, Tsien RY. Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation--a new cutting edge. *Nat Rev Cancer.* Sep;13(9):653-62 (2013).
- [412] Bu L, Shen B, Cheng Z. Fluorescent imaging of cancerous tissues for targeted surgery. *Adv Drug Deliv Rev.* Sep30;76:21-38 (2014).
- [413] Gioux S, Cho HS, Frangioni JV. Image-Guided Surgery using Invisible Near-Infrared Light: Fundamentals of Clinical Translation. *Mol Imaging.* Oct;9(5):237-255 (2010).
- [414] Chi C, Du Y, Ye J, et al. Intraoperative Imaging-Guided Cancer Surgery: From Current Fluorescence Molecular Imaging Methods to Future Multi-Modality Imaging Technology. *Theranostics.* 4(11):1072-1084 (2014).
- [415] Handgraaf HJ, Verbeek FP, Tummers QR, et al. Real-time near-infrared fluorescence guided surgery in gynecologic oncology: a review of the current state of the art. *Gynecol Oncol.* Dec;135(3):606-13 (2014).

- [416] Schaafsma BE, Mieog JS, Hutteman M, et al. The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J Surg Oncol*. Sep1;104(3):323-32 (2011).
- [417]. Miot-Noirault E, Vidal A, Morlieras J, et al. Small rigid platforms functionalization with quaternary ammonium: targeting extracellular matrix of chondrosarcoma. *Nanomedicine*. Nov;10(8):1887-95 (2014).
- [418] Thomas CD, Poyer F, Maillard P, et al. Cellular density, a major factor involved in PDT cytotoxic responses: Study on three different lines of human retinoblastoma grafted on nude mice. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. Jun;12(2):267-75 (2015).
- [419] Huang D, Swanson EA, Lin CP, et al. Optical coherence tomography. *Science*. 254, 1178-1181 (1991).
- [420] Sørensen A, Pedersen M, Tietze A, et al. BOLD MRI in sheep fetuses: a non-invasive method for measuring changes in tissue oxygenation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 34(6):687-692 (2009).
- [421] Chalouhi GE, Alison M, Deloison B, et al. Fetoplacental oxygenation in an intrauterine growth restriction rat model by using blood oxygen level-dependent MR imaging at 4.7 T. *Radiology*. Oct;269(1):122-9 (2013).
- [422] Arthuis CJ, Novell A, Escoffre JM, et al. New insights into uteroplacental perfusion: quantitative analysis using Doppler and contrast-enhanced ultrasound imaging. *Placenta*. May;34(5):424-31 (2013).
- [423] Vercruyssen L, Caluwaerts S, Luyten C, et al. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta*. Jan;27(1):22-33 (2006).
- [424] Nicolaidis KH, Economides DL, Soothill PW. Blood gases, pH, and lactate in appropriate and small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol*. Oct;161(4):996-1001 (1989).
- [425] Soothill PW, Nicolaidis KH, Bilardo K, et al. Utero-placental blood velocity resistance index and umbilical venous pO₂, pCO₂, pH, lactate and erythroblast count in growth-retarded fetuses. *Fetal Ther*. 1(4):176-9 (1986).
- [426] Takeda Company. Brentuximab vedotin. *Drugs R. D*. 11(1):85-95 (2011).

- [427] American National Standard for the Safe Use of Lasers ANSI Z136.1-2000. American National Standards Institute, Inc; New York: 2000.
- [428] Mehrmohammadi M, Yoon SJ, Yeager D, et al. Photoacoustic Imaging for Cancer Detection and Staging. *Curr Mol Imaging*. March;2(1):89-105 (2013).
- [429] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small*. 4:26-49 (2008).
- [430] Choi HS, Liu W, Misra P, et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol*. 25:1165-70 (2007).
- [431] El-Sayed IH, Singer MI, Civantos F. Sentinel lymph node biopsy in head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 38:145-60 (2005).
- [432] Bouchard R, Sahin O, Emelianov S. Ultrasound-Guided Photoacoustic Imaging: Current State and Future Development. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. Mar;61(3):450-66 (2014).
- [433] Qin C, Zhu S, Tian J. New optical molecular imaging systems. *Curr Pharm Biotechnol*. Sep 1;11(6):620-7 (2010).
- [434] Chen ZI, Wang YX, Yang F, et al. New Researches and Application Progress of Commonly Used Optical Molecular Imaging Technology. *Biomed Res Int*. 2014:429198 (2014).
- [435] Franceschini MA, Moesta KT, Fantini S, et al. Frequency-domain techniques enhance optical mammography: initial clinical results. *Proc Nat Acad Sci*. 94:6468-73 (1997).
- [436] Grosenick D, Moesta KT, Wabnitz H, et al. Time-domain optical mammography: initial clinical results on detection and characterization of breast tumors. *Appl Opt*. 42:3170-86 (2003).
- [437] Taroni P, Danesini G, Torricelli A, et al. Clinical trial of time-resolved scanning optical mammography at 4 wavelengths between 683 and 975 nm. *J Biomed Opt*. 9:464-73 (2004).
- [438] Pogue BW, Poplack SP, McBride TO, et al. Quantitative hemoglobin tomography with diffuse near-infrared spectroscopy: Pilot results in the breast. *Radiology*. 218:261-66 (2001).

- [439] Tromberg BJ, Shah N, Lanning R, et al. Noninvasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia*. 2:26-40 (2000).
- [440] Choe R, Corlu A, Lee K, et al. Diffuse optical tomography of breast cancer during neoadjuvant chemotherapy: a case study with comparison to MRI. *Med Phys*. 32:1128-39 (2005).
- [441] Heffer E, Pera V, Schutz O, et al. Near-infrared imaging of the human breast: complementing hemoglobin concentration maps with oxygenation images. *J. Biomed Opt*. 9:1152-60 (2004).
- [442] Moesta KT, Totkas S, Fantini S, et al. Frequency domain laser scanning mammography of the breast first clinical evaluation study. *Eur J Cancer*. 33:358-58 (1997).
- [443] Li A, Miller EL, Kilmer ME, et al. Tomographic optical breast imaging guided by three-dimensional mammography. *Appl Opt*. 42:5181-90 (2003).
- [444] Intes X, Ripoll J, Chen Y, et al. In vivo continuous-wave optical breast imaging enhanced with Indocyanine Green. *Med Phys*. 30:1039-47 (2003).
- [445] Ntziachristos V, Yodh AG, Schnall M, et al. Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc Natl Acad Sci*. 97:2767-72 (2000).
- [446] Ntziachristos V, Bremer C, Weissleder R. Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in-vivo molecular imaging. *Eur J Radiol*. 13:195-208 (2003).
- [447] Ntziachristos V, Ripoll J, Weissleder R. Would near-infrared fluorescence signals propagate through large human organs for clinical studies. *Opt Lett*. 27:333-35 (2002).
- [448] Godavarty A, Sevick-Muraca EM, Eppstein MJ. Three-dimensional fluorescence lifetime tomography. *Med Phys*. 32:992-1000 (2005).
- [449]. Ntziachristos V. Fluorescence molecular imaging. *Annu Rev Biomed Eng*. 8:1-33 (2006).
- [450] Pesnel S, Pillon A, Créancier L, et al. Quantitation in bioluminescence imaging by correction of tissue absorption for experimental oncology. *Mol Imaging Biol*. Aug;13(4):646-52 (2011).

- [451] Sadikot RT and Blackwell TS. Bioluminescence Imaging. *Proc Am Thorac Soc*. Dec; 2(6): 537-540 (2005).
- [452] Bartholin L. Pancreatic cancer and the tumor microenvironment: Mesenchyme's role in pancreatic carcinogenesis. In: Grippo PJ, Munshi HG (Eds.), *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Trivandrum (India): Transworld Research Network; p55-94 (2012).
- [453] Le Calvé B, Griveau A, Vindrieux D, et al. Lysyl oxidase family activity promotes resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma to chemotherapy by limiting the intratumoral anticancer drug distribution. *Oncotarget*. Apr1 (2016).
- [454] Zagon IS, Jaglowski JR, Verderame MF, et al. Combination chemotherapy with gemcitabine and biotherapy with opioid growth factor (OGF) enhances the growth inhibition of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. Nov;56(5):510-20 (2005).
- [455] Coleman MC, Asbury CR, Daniels D, et al. 2-deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med*. Feb 1;44(3):322-31 (2008).
- [456] A Mercalli, Sordi V, Formicola R, et al. A preclinical evaluation of pemetrexed and irinotecan combination as second-line chemotherapy in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. May7;96(9):1358-1367 (2007).
- [457] Huan M, Zhang B, Teng Z, et al. In vitro and in vivo antitumor activity of a novel pH-activated polymeric drug delivery system for doxorubicin. *PLoS ONE*. 7(9):e44116 (2012).
- [458] Gubernator J, Lipka D, Korycińska M, et al. Efficient Human Breast Cancer Xenograft Regression after a Single Treatment with a Novel Liposomal Formulation of Epirubicin Prepared Using the EDTA Ion Gradient Method. *PLoS ONE*. 9(3): e91487 (2014).
- [459] Proia DA, Zhang C, Sequeira M, et al. Preclinical activity profile and therapeutic efficacy of the HSP90 inhibitor ganetespib in triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. Jan15;20(2):413-24 (2014).
- [460] Liang S, Peng X, Li X, et al. Silencing of CXCR4 sensitizes triple-negative breast cancer cells to cisplatin. *Oncotarget*. Jan;6(2):1020-1030 (2015).

- [461] Volk LD, Flister MJ, Bivens CM, et al. Nab-paclitaxel Efficacy in the Orthotopic Model of Human Breast Cancer Is Significantly Enhanced By Concurrent Anti-Vascular Endothelial Growth Factor A Therapy. *Neoplasia*. Jun;10(6): 613-623 (2008).
- [462] Chougule MB, Patel A, Sachdeva P, et al. Enhanced Anticancer Activity of Gemcitabine in Combination with Noscipine via Antiangiogenic and Apoptotic Pathway against Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE*. 6(11):e27394 (2011).
- [463] Steiner P, Joynes C, Bassi R, et al. Tumor growth inhibition with cetuximab and chemotherapy in non-small cell lung cancer xenografts expressing wild-type and mutated epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*. Mar 1;13(5):1540-51 (2007).
- [464] Yamori T, Sato S, Chikazawa H, et al. Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts. *Jpn J Cancer Res*. Dec;88(12):1205-10 (1997).
- [465] Wang D, Jiang Z, Zhang L. Concurrent and sequential administration of sunitinib malate and docetaxel in human non-small cell lung cancer cells and xenografts. *Med Oncol*. Jun;29(2):600-6 (2012).
- [466] Vendetti FP, Topper M, Huang P, et al. Evaluation of azacitidine and entinostat as sensitization agents to cytotoxic chemotherapy in preclinical models of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. Jan;6(1):56-70 (2015).
- [467] Rathos MJ, Khanwalkar H, Joshi K, et al. Potentiation of in vitro and in vivo antitumor efficacy of doxorubicin by cyclin-dependent kinase inhibitor P276-00 in human non-small cell lung cancer cells. *BMC Cancer*. 13:29 (2013).
- [468] Tse K, Jeffers M, Pollack V et al. CR011, a fully human monoclonal antibody-auristatin E conjugate, for the treatment of melanoma. *Clin Cancer Res*. 12:1373-1382 (2006).
- [469] Seattle Genetics. ADCETRIS® (brentuximab vedotin) is an ADC designed to target cells expressing CD30 [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.adcetris.com/hcp/mechanism-of-action.php> (consulté le 11/09/13).
- [470] Palanca-Wessels MC, Czuczman M, Salles G, et al. Safety and activity of the anti-CD79B antibody-drug conjugate polatuzumab vedotin in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1 study. *Lancet Oncol*. Jun;16(6):704-15 (2015).

- [471] Challita-Eid PM, Satpayev D, Yang P, et al. Enfortumab Vedotin Antibody-Drug Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent in Multiple Preclinical Cancer Models. *Cancer Res.* May15;76(10):3003-13 (2016).
- [472] Wang Z, Guravaiah N, Ning C, et al. Antibody-Drug Conjugates: The Forefront of Targeted Chemotherapy for Cancer Treatment. *J Drug Des Res.* 2(3): 1016 (2015).
- [473] Xu H, Rice BW. In-vivo fluorescence imaging with a multivariate curve resolution spectral unmixing technique. *J Biomed Opt.* Nov-Dec;14(6):064011 (2009).
- [474] Morscher S, Glatz J, Deliolanis NC, et al. Blind spectral unmixing to identify molecular signatures of absorbers in multispectral optoacoustic tomography. *Proc. SPIE* 7899, Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing, 78993D (2011).
- [475] Xia W, West SJ, Nikitichev DI, et al. Interventional multispectral photoacoustic imaging with a clinical linear array ultrasound probe for guiding nerve blocks. *Proc. SPIE* 9708, Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing, 97080C (2016).
- [476] Paproski RJ, Heinmiller A, Wachowicz K, et al. Multi-wavelength photoacoustic imaging of inducible tyrosinase reporter gene expression in xenograft tumors. *Sci Rep.* Jun 17;4:5329 (2014).

Annexes

Annexe 1 : Sollicitations orales, posters et articles :

PUBLICATIONS :

F. Raes, J. Sobilo, M. Le Mée, S. Rétif, S. Natkunarajah, S. Lerondel, A. Le Pape. High Resolution Ultrasound and Photoacoustic Imaging of orthotopic lung cancer in mice: new perspectives for onco-pharmacology. *PLoS ONE*, 2016.

C. J. Arthuis, A. Novell, **F. Raes**, J-M. Escoffre, S. Lerondel, A. Le Pape, A. Bouakaz, F. Perrotin. Real-time monitoring of fetoplacental oxygenation with non-invasive photoacoustic imaging. *Article soumis*, 2016.

B. Renoux*, **F. Raes***, T. Legigan, E. Péraudeau, B. Eddhif, P. Poinot, I. Opalinski, J. Alsarraf, S. Lerondel, A. Le Pape, J. Clarhaut, S. Papot. Targeting β -Glucuronidase in Tumour Microenvironment for Efficient Cancer Chemotherapy. *Article soumis*, 2016

*** These authors contributed equally to this work.**

M. Badiane, **F. Raes**, J. Sobilo, S. Natkunarajah, S. Lerondel, A. Le Pape. Minimally invaded sentinel lymph node model for the development of intraoperative infrared fluorescence imaging. *Article soumis*, 2016.

A. Voissiere, V. Weber, Y. Gerard, F. Rédini, **F. Raes**, J-M. Chezal, F. Degoul, C. Peyrode, E. Miot- Noirault. Proteoglycan-targeting applied to Hypoxia-Activated Prodrugs therapy in chondrosarcoma: Preclinical proof of concept. *Article soumis*, 2016.

F. Raes, M. Badiane, B. Renoux, S. Papot, S. Lerondel, A. Le Pape. Multimodality imaging of complementary biomarkers in onco-pharmacology: Application to assessment of smart anticancer prodrugs. *Article en cours de rédaction*, 2016.

F. Raes, J. Sobilo, G. Collet, C. Kieda, S. Lerondel, A. Le Pape. Photoacoustic imaging coupled to high resolution echography for the study of tumor hypoxia: a fluorescence oximetry and Pimonidazole immunohistochemistry validation study. *Article en cours de rédaction*, 2016.

F. Raes*, **M. Badiane***, J. Abadie, N. Chouin, J. Sobilo, S. Lerondel, A. Le Pape. Sentinel lymph node exploration using multimodality imaging in the aged rabbit with spontaneous mammary tumors. *Article en cours de rédaction*, 2016. * **These authors contributed equally to this work.**

F. Raes, T. Barre, J. Jose, P. Trochet, S. Lerondel, A. Le Pape. Characterization of tumor hypoxia by photoacoustic imaging and limitations of bioluminescence imaging in a Mia PaCa2-luc orthotopic model of pancreatic carcinoma. *Cancer Res* October 1, 2014 74; 2048.

COMMUNICATIONS ORALES :

F. Raes, B Renoux, S Papot, S Lerondel, A Le Pape. Antitumor efficacy assessment in head and neck and lung cancer models in mice: A photoacoustic, ultrasound and bioluminescence imaging study. **11th Annual Meeting of the European Society for Molecular Imaging**, Utrecht, Pays bas, Mars 2016.

F. Raes, S. Lerondel, A. Le Pape. Imagerie PhotoAcoustique et Applications en oncologie expérimentale. **CNRS Formation Entreprises : Small Animal imaging : Evolution, Potential, Limits**. CIPA - CNRS Orléans, France, Novembre 2015.

F. Raes, B Renoux, S Papot, D Fuchs, P Trochet, S Lerondel, A Le Pape. Exploration of hypoxia by in vivo photoacoustic imaging to improve predictivity of oncopharmacological studies in orthotopic models of human tumors. **9th International workshop dedicated to young researchers, "New Advances in animal models and preclinical Imaging for translational Research in Cancerology"**, La Turballe, France, Sept-Oct 2015

F. Raes, B. Renoux, S. Papot, D. Fuchs, P. Trochet, S. Lerondel, A. Le Pape. Photoacoustic imaging of hypoxia during assessment of a new highly potent antitumor prodrug in mouse models of human tumors. **4th Translational Oncology Meeting ONCOTRANS**, Dijon, France, Juin 2015.

F. Raes, D. Fuchs, P. Trochet, A. Needles, S. Lerondel, A. Le Pape. Embedded Biophotonics, Photoacoustic & High resolution Ultrasound Imaging for multimodality imaging of complementary biomarkers in oncopharmacology. **10th Annual Meeting of the European Society for Molecular Imaging**, Tübingen, Allemagne, Mars 2015.

F. Raes, S. Lerondel, A. Le Pape. Ultrasound and Photoacoustic imaging on mice bearing orthotopic lung tumors. **Communication orale au CEPR (Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires)** - INSERM U1100 - CHU Tours, France, Décembre 2014.

F. Raes, S. Lerondel, A. Le Pape. Imagerie PhotoAcoustique et Applications en oncologie expérimentale. **CNRS Formation Entreprises Small Animal imaging: Evolution, Potential, Limits**. CIPA - CNRS Orléans, France, Novembre 2014.

F. Raes, S. Lerondel, A. Le Pape. Photoacoustic Imaging and Applications in Experimental Oncology. **Annual User Meeting Visualsonics**, Institut Cochin, Paris, France, Juin 2014.

F. Raes, G. Collet, J. Jose, P. Trochet, C. Kieda, S. Lerondel, A. Le Pape. Bimodal approach to assess early changes in intratumoral oxygenation: photoacoustic imaging coupled with oxygen partial pressure measurements. **9th Annual Meeting of the European Society for Molecular Imaging**, Anvers, Belgique, Juin 2014.

CONFERENCES INVITEES :

F. Raes, S. Lerondel, A. Le Pape. Development of new imaging strategies for preclinical oncology: A multimodal approach combining photoacoustic and echography with optical imaging. **Ludwig Institute for Cancer Research**, Lausanne, Suisse, Avril 2016.

F. Raes, S. Lerondel, A. Le Pape. Photoacoustic imaging in a multimodal onco-pharmacology approach. **Visualsonics Workshop**, Amsterdam, Pays Bas, Mars 2016.

F. Raes, S. Lerondel, A. Le Pape. High Resolution Ultrasound and Photoacoustic Imaging for experimental oncology. **EPIC seminar- ETH Zürich "Technology Development in Animal Experimentation"**, Zürich, Suisse, Juin 2015.

F. Raes, S. Lerondel, A. Le Pape. High Resolution Ultrasound and Photoacoustic Imaging for experimental oncology. **Imaging workshop - New trends in high resolution pre-clinical molecular imaging**, Pise, Italie, Juin 2015.

F. Raes, S. Lerondel, A. Le Pape. High Resolution Ultrasound and Photoacoustic Imaging for hypoxic tumors exploration. **PHENOCAN : 3rd technological Seminar**, Ecole Normale Supérieure ENS, Lyon, France, Mars 2015.

COMMUNICATIONS AFFICHEES :

F. Raes, J. Sobilo, S. Natkunarajah, D. Fuchs, P. Trochet, S. Lerondel, A. Le Pape. Novel imaging strategy to assess the antitumor efficacy of treatments in an orthotopic mouse lung cancer model using ultrasound and photoacoustic imaging. **107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research**, New Orleans, Etats-Unis, Avril 2016.

F. Raes, J. Sobilo, S. Natkunarajah, D. Fuchs, P. Trochet, S. Lerondel, A. Le Pape. First in mice ultrasound and photoacoustic imaging of orthotopic lung cancer: Novel onco-pharmacology approach. **11th Annual Meeting of the European Society for Molecular Imaging**, Utrecht, Pays bas, Mars 2016.

F. Raes, J. Sobilo, S. Natkunarajah, S. Lerondel, A. Le Pape. Development of an in vivo multimodal imaging device combining Ultrasounds, Photoacoustic and Biophotonics for oncopharmacology studies. **9th International workshop dedicated to young researchers, "New Advances in animal models and preclinical Imaging for translational Research in Cancerology"**, La Turballe, France, Sept-Oct 2015.

F. Raes, J. Sobilo, J. Jose, P. Trochet, S. Lerondel, A. Le Pape. Tumor hypoxia results in severe limitations about relevance of bioluminescence imaging: confrontation of bioluminescence, echography and photoacoustic during the follow up of human pancreatic and breast adenocarcinoma orthotopic models in mice. **9th International workshop dedicated to young researchers, "New Advances in animal models and preclinical Imaging for translational Research in Cancerology"**, La Turballe, France, Sept-Oct 2015.

S. M. Badiane, **F. Raes**, S. Natkunarajah, A. Needles, D. Fuchs, P. Trochet, A. Le Pape, S. Lerondel. Investigation on a minimally invaded sentinel lymph node model by high resolution ultrasound coupled to PA imaging with spectral unmixing and NIRF imaging. **WMIC 2015**, Honolulu, Etats-Unis, Septembre 2015.

F. Raes, J. Sobilo, J. Jose, P. Trochet, S. Lerondel, A. Le Pape. Limits of bioluminescence imaging highlighted by High Resolution Ultrasound and Photoacoustic imaging on orthotopic mice models of hypoxic cancers. **WMIC 2015**, Honolulu, Etats-Unis, Septembre 2015.

F. Raes, G. Collet, J. Jose, P. Trochet, C. Kieda, S. Lerondel, A. Le Pape. Dual assessment of early tumor hypoxia: oxygen partial pressure measurement coupled to photoacoustic imaging in breast carcinoma models in mice. **WMIC 2015**, Honolulu, Etats-Unis, Septembre 2015.

F. Raes, D. Fuchs, P. Trochet, A. Needles, S. Lerondel, A. Le Pape. Novel multimodal embedded imaging platform dedicated to translational research in oncology: Ultrasound & Photoacoustic imaging associated with biophotonics. **WMIC 2015**, Honolulu, Etats-Unis, Septembre 2015.

F. Raes, B. Renoux, S. Papot, D. Fuchs, P. Trochet, S. Lerondel, A. Le Pape. Hypoxia monitoring by photoacoustic imaging during assessment of antitumor effects in pancreatic and breast carcinoma orthotopic mouse models. **10th Annual Meeting of the European Society for Molecular Imaging**, Tübingen, Allemagne, Mars 2015.

F. Raes, G. Collet, C. Kieda, S. Lerondel, A. Le Pape. Early changes in intra-tumoral oxygenation : Photoacoustic Imaging coupled with Oxygen partial pressure measurements. **27^{ème} Colloque Biotechnocentre**, Domaine de Seillac, France, Octobre 2014.

F. Raes, S. Lerondel, A. Le Pape. Presentation of the imaging platform “Advanced imaging technologies for functional explorations and therapeutic innovation” and Multimodality Imaging dedicated to Brain Tumors. **4th Annual Brain Metastases Research and Emerging Therapy Conference**, Marseille, France, Septembre 2014.

F. Raes, P. Trochet, S. Lerondel, A. Le Pape. Tumor hypoxia: Exploration by Photoacoustic Imaging and Limits of Bioluminescence Imaging; Application to an Orthotopic Pancreatic Tumor Model. **8^{èmes} Journées Du Cancéropôle Grand Ouest**, Les Sables D’Olonne, France, Juin 2014.

→ Prix du Cancéropôle Grand Ouest pour la qualité du poster et de la présentation.

F. Raes, T. Barre, J. Jose, P. Trochet, S. Lerondel, A. Le Pape. Highlighting the limits of bioluminescence during growth of hypoxic tumors thanks to photoacoustic imaging; application to Mia PaCa2-luc orthotopic model of pancreatic carcinoma. **9th Annual Meeting of the European Society for Molecular Imaging**, Anvers, Belgique, Juin 2014.

PARTICIPATION A DES COLLOQUES, SYMPOSIA, CONGRES :

107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, New Orleans, Etats-Unis, Avril 2016.

11th Annual Meeting of the European Society for Molecular Imaging, Utrecht, Pays bas, Mars 2016.

1^{er} Congrès National d'Imagerie du Vivant, Paris, France, Février 2016.

9th International workshop dedicated to young researchers, "New Advances in animal models and preclinical Imaging for translational Research in Cancerology", La Turballe, France, Sept-Oct 2015

WMIC 2015, Honolulu, Etats Unis, Septembre 2015.

4th Translational Oncology Meeting ONCOTRANS, Dijon, France, Juin 2015.

Imaging workshop - New trends in high resolution pre-clinical molecular imaging, Pise, Italie, Juin 2015.

Annual User Meeting 2015 Visualsonics, Strasbourg, France, Juin 2015.

10th Annual Meeting of the European Society for Molecular Imaging, Tübingen, Allemagne, Mars 2015.

PHENOCAN : 3rd technological Seminar, "Phenotyping at the cellular or organism level - Highlight on High Resolution Ultrasound and Photoacoustic Imaging, Ecole Normale Supérieure, Lyon, France, Mars 2015.

Atelier FLI : Biomarqueurs d'imagerie pour les applications en métabolisme-cardiovasculaire, Lyon, France, Novembre 2014.

Séminaire Ultrasons – Infrastructure France Life Imaging, Paris, France, Novembre 2014.

27^{ème} Colloque Biotechnocentre, Domaine de Seillac, France, October 9-10, 2014.

4th Annual Brain Metastases Research and Emerging Therapy Conference, Marseille, France September 19-20, 2014.

Annual User Meeting 2014 Visualsonics, Paris, France, Juin 2014.

8^{èmes} Journées Du Cancéropôle Grand Ouest, Les Sables D'Olonne, France, Juin 2014.

9th Annual Meeting of the European Society for Molecular Imaging, Anvers, Belgique, Juin 2014.

Le Tours de Microbulles - Targeted Ultrasound Contrast Imaging and Drug Delivery, Tours, France, Mai 2014.

105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego, Etats-Unis, Avril 2014.

Annual User Meeting 2013 Visualsonics, Orléans, France, Juin 2013.

Annexe 2 : Considérations éthiques :

Considérations éthiques primordiales pour l'imagerie *in vivo* suivant la règle des 3R :

Le concept des 3R a été progressivement adopté pour fixer des lignes de conduite en expérimentation animale. Il comprend les points suivants : Réduire, Raffiner, Remplacer. Le développement de la recherche en imagerie biomédicale sur des petits animaux a ouvert de nouvelles perspectives pour l'étude des processus biologiques chez les animaux vivants. L'imagerie *in vivo* est une approche non invasive qui permet d'obtenir autant d'informations anatomiques et fonctionnelles que nécessaire. Il s'agit d'une stratégie internationalement reconnue pour l'innovation et le développement pharmaceutique sans avoir à sacrifier des animaux à différents intervalles de temps. Dans le domaine de l'oncopharmacologie *in vivo*, l'imagerie permet de mesurer des paramètres inaccessibles par les méthodes conventionnelles, telles que la mesure du volume d'une tumeur située profondément dans le corps de l'animal. L'imagerie permet d'identifier et de caractériser au fil du temps l'activité *in vivo* de nouveaux agents anticancéreux, l'étude de la biodistribution et de la micro-biodistribution des molécules, ou des cellules tumorales préalablement marquées au sein d'un organisme, ainsi que la visualisation ou la quantification des événements au sein du même animal. Comme toutes les techniques d'imagerie qui ont été mises en œuvre au cours de ce travail de thèse sont des techniques non-invasives, la croissance tumorale ainsi que les paramètres associés tels que l'hypoxie ont pu être contrôlés à plusieurs reprises et longitudinalement chez le même animal, qui est son propre contrôle, augmentant ainsi la précision de l'expérience. Cette procédure accélère ainsi l'obtention de résultats, en réduisant le nombre d'animaux de la cohorte requis. L'imagerie est donc une méthode plus éthique en expérimentation animale et s'intègre parfaitement avec la règle des 3R. Au cours des différentes études réalisées, des anesthésiques appropriés et des régimes analgésiques pour soulager la douleur ont été utilisés. L'hébergement et l'enrichissement de l'environnement, qui répondent aux besoins comportementaux, ont également été respectés. La cage des souris est un raffinement en lui-même, en effet, il permet les comportements naturels des souris tels que la nidification et l'escalade, ou permet aux animaux de se cacher, ce qui est très important pour leur bien-être. Les cages sont construites avec des parois transparentes, permettant aux scientifiques de voir les souris à tout moment et d'effectuer les contrôles quotidiens sans les déranger.

Le projet visant à tester la Prodrogue 1 sur le modèle sous-cutané de tumeurs de la tête et du cou KB, ainsi qu'à évaluer le potentiel cytotoxique de la prodrogue sur un modèle

d'inflammation aigüe pulmonaire a été soumis au Comité d'éthique en expérimentation animale Campus CNRS d'Orléans C2EA-03 sous le numéro 1065.

Le projet visant à tester la Prodrogue 1 sur le modèle orthotopique de tumeurs pancréatiques Mia-PaCa2, a été soumis au Comité d'éthique en expérimentation animale Campus CNRS d'Orléans C2EA-03 sous le numéro 1070.

Le projet visant à tester la Prodrogue 1 sur le modèle orthotopique de tumeurs mammaires MDA-MB-231 ainsi que sur le modèle orthotopique de tumeurs pulmonaires NCI-H460, a été soumis au Comité d'éthique en expérimentation animale Campus CNRS d'Orléans C2EA-03 sous le numéro 1031.

Le projet visant à valider l'utilisation de l'imagerie photoacoustique pour la mesure de l'hypoxie tumorale, ainsi que la validation de cette technique avec des techniques dites de référence, a été soumis au Comité d'éthique en expérimentation animale Campus CNRS d'Orléans C2EA-03 sous le numéro 1050.

Le projet visant à mettre en place et d'étudier le développement tumoral dans un modèle de ganglion sentinelle envahi par imagerie de fluorescence, photoacoustique et bioluminescence, a été soumis au Comité d'éthique en expérimentation animale Campus CNRS d'Orléans C2EA-03 sous le numéro 1086.

Le projet visant à valider l'utilisation de l'imagerie photoacoustique pour la mesure et l'exploration de tumeurs orthotopiques pulmonaires chez la souris, associée à d'autres mesures échographiques, a été soumis au Comité d'éthique en expérimentation animale Campus CNRS d'Orléans C2EA-03 sous le numéro 1097.

Le projet visant à valider l'utilisation de l'imagerie photoacoustique pour la mesure et l'exploration de fœtus et l'exploration placentaire chez la rate, associée à des mesures de perfusion, a été soumis au Comité d'éthique en expérimentation animale Campus CNRS d'Orléans C2EA-03 sous le numéro 1037.

Par ailleurs, Le CIPA est certifié ISO 9001 et subit des audits de surveillance et des visites de renouvellement du certificat de deux établissements différents : Le Lloyd Register Quality Assurance (LRQA), qui est un organisme leader spécialisé mondial dans la certification de qualité selon des critères bien spécifiques, l'accréditation ISO 9001 par le LRQA étant la référence internationale en matière de qualité. Le Comité Français d'Accréditation, COFRAC, est chargé de traiter les demandes d'évaluation de la conformité conformément aux BPL.

Annexe 3 : Précisions sur le « Spectral Unmixing » en NIRF :

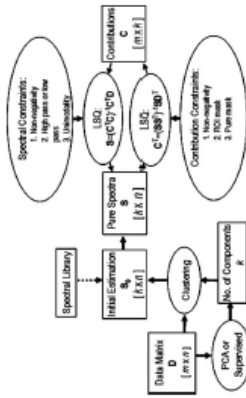


Fig. 2 Flowchart of MCR-ALS for *in-vivo* fluorescence imaging

2.2 Multivariate Curve Resolution Algorithm

2.2.1 General Multivariate Curve Resolution Alternating Least-Square Scheme

The basic framework of MCR-ALS is shown in Fig. 2. Initially the number of spectral components (number of fluorophores) k is specified to determine the size of the bilinear problem, and an initial estimate for either C or S in Eq. (1) is made. We then employ an iterative method for solving two alternating least-square problems, i.e., minimization of Eq. (2) over S for given C , and minimization of Eq. (2) over C for given S . To help converge to a unique and realistic solution, additional constraints can be added during iterations. These constraints come from knowledge about the spectra such as nonnegativity or low and high pass filters to force the spectra to zero at certain wavelengths. Constraints reduce the solution space by enforcing some boundaries and help solve the rotation and scaling ambiguity inherent in the bilinear model. Here, the rotation and scaling ambiguity refers to the fact that any arbitrary k by k orthogonal matrix Q ($Q^T Q = I$, where I is identity matrix) can result in another suitable solution CQ^T and QS for the bilinear model. A special case of such an orthogonal matrix Q is a diagonal matrix often known as the intensity ambiguity. Usually this cannot be solved by setting the constraints, and thus a normalization procedure should be enforced on either C or S throughout the iteration. The convergence is achieved when the absolute change of the residual norm e^2 is below a threshold (typically 0.1%). After convergence, both C and S are determined.

minimize the dark current and the associated thermal noise. The CCD has high quantum efficiency in the range of 400 to 950 nm and thus covers the visible (VIS) and near-infrared (NIR) range of interest of optical imaging. Light collection is accomplished with an $f/1$ lens with 6X zoom capability. The minimum detectable radiance for the system is specified at less than 70 photons/sec/cm²/sr, enabling detection of weak signals from deep tissue.

For fluorescence imaging, the instrument uses a 150-W quartz tungsten halogen lamp with broadband emission from 400 to 1000 nm. The lamp output is delivered to a 12-position excitation filter wheel using a fiber optic bundle. The excitation wheel includes ten 30-nm bandpass filters spaced every 35 nm from 430 to 745 nm. The emission light is focused on the CCD through the lens system with an integrated 24-position emission filter wheel. The emission wheel is installed with 18 20-nm bandpass filters spaced every 20 nm from 500 to 840 nm. The spacing and bandwidth of excitation and emission filters are chosen at a medium level to achieve a reasonable spectral resolvability without sacrificing signal per channel and spectral range. More than one hundred excitation and emission filter combinations are available in the VIS and NIR range for spectral unmixing.

For fluorescence imaging, the instrument can switch between reflectance and transillumination modes by rotating a mirror, as illustrated in Fig. 1. Reflectance mode refers to the conventional modality (epifluorescence mode) that the excitation light is projected to the top surface of the object, where the emitted fluorescence light is collected. Reflectance mode favors the reporters near the surface, since the relative strong autofluorescence background generated from the top surface can overwhelm the fluorescent signals of the deeper reporters. In transillumination mode, the excitation light is delivered to an $x-y$ translation assembly under the stage and focused to the bottom side of the object. An anodized aluminum plate with a 5-mm grid of 2-mm holes is used to hold the object and guide the light through. The autofluorescence contribution is often reduced, since most autofluorescence is generated from the bottom surface and is absorbed as it travels to the top surface. When imaging a fluorophore located at the center of the subject, illuminating from the bottom would create the same amount of fluorophore signal to the detector as illuminating from the top, generating much less autofluorescence contribution. Therefore, the transillumination mode offers improved access to the deep fluorophores during *in-vivo* imaging.

To provide a consistent measurement against different imaging conditions so that signals are traceable over time and on different instruments, the imaging system is absolutely calibrated for spectral radiance traceable to the National Institute of Standards and Technology (NIST).²³ This calibration provides the conversion of CCD electron counts to isotropic radiance on the object surface by taking into account losses through the optics and aperture (f -stop), field of view (FOV), and camera settings. For epifluorescence imaging particularly, the power and distribution of the excitation light are recorded so that measurements can be normalized to the incident excitation intensity profile to report how efficiently the target yields the fluorescence. Instrument calibration is critical to the quantification of images with different imaging conditions, as is typically encountered during longitudinal studies.

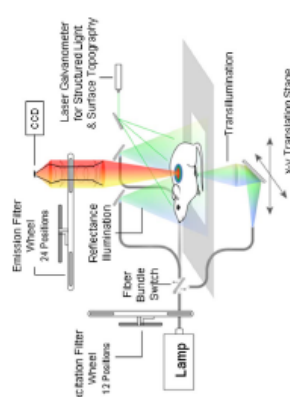


Fig. 1 Illustration of the IVIS Spectrum imaging system.

diffusion model, but our purpose in this work is to develop a significantly improved spectral unmixing relative to using the measured *in-vivo* spectra based on a first-order 2-D approximation to the complex, 3-D problem. Such an algorithm should not rely on *a-priori* knowledge of *in-vivo* spectra, but ideally would automatically solve for the *in-vivo* spectral components as well as the signal distribution for each fluorophore.

Spectral unmixing methods have been successfully used for *in-vivo* fluorescence imaging⁶ by Mansfield et al. using liquid crystal tunable filters, but details of the unmixing algorithm are unpublished to the best of our knowledge. Recent progress in chemometrics suggests that a method called the multivariate curve resolution alternating least-square method (MCR-ALS) would be suitable for our purpose. It was developed to extract simultaneously pure concentration and spectral profiles from spectroscopic data gathered during chemical process monitoring,^{30,31} and has been successfully applied to other applications that are based on the same bilinear model described in Eq. (1), such as microarray technology³² and imaging spectroscopy.³⁰

We present our spectral unmixing algorithm for *in-vivo* imaging based on MCR-ALS, including the general MCR-ALS framework and the necessary adaptation to fit the *in-vivo* imaging application. The image acquisition system used for the study is described, which operates in both reflectance and transillumination geometries. Experimental results are presented to examine the performance of the algorithm. Data were collected on a mouse phantom and live mouse models with varying depth and concentration of fluorescent labels such as dyes and nanoparticles.

2 Methods and Materials

2.1 Multispectral Imaging System

The images in this study were acquired using an IVIS[®] Spectrum Imaging System (Caliper Life Sciences/Xenogen, Alameda, California) as shown in Fig. 1. It supports *in-vivo* spectral imaging for both fluorescent and bioluminescent probes. This instrument uses a 2048x2048 pixel, 26-mm-wide, high-sensitivity back-thinned charge coupled device (CCD) camera thermoelectrically cooled to -90 °C to

Linear unmixing is the most commonly used method to analyze the image with mixed contributions from colocalized labels. A fundamental assumption for linear unmixing is that the spectroscopic measurement in a pixel $D(\lambda)$ is the linear combination of individual fluorophores' pure spectra $S(\lambda)$ scaled by the concentration C in that pixel plus some residue $E(\lambda)$, i.e., $D(\lambda) = \sum C S(\lambda) + E(\lambda)$.

Consider a multispectral imaging problem that can be discretized to a matrix form

$$D = CS + R, \quad (1)$$

where D is the spectral data matrix with m rows corresponding to m pixels in the image and n columns corresponding to n different wavelengths (i.e., bandpass filters); C is the m by k concentration profile where each row represents the composition of the mixed fluorophores at the corresponding pixel; S is the k by n spectra matrix where each row is the pure spectrum of the corresponding fluorophore measured at these wavelengths; and R is the m by n matrix of residual not explained by the model, and ideally should be close to the experimental error. Equation (1) is often recognized as a bilinear model, where D is a linear function of both C and S . To accurately solve for the concentration profile, several criteria have to be met. First, fluorophores considered in the model have to account for all the significant signals present in the scene. Secondly, the number of wavelengths should be at least equal the number of fluorophores required to resolve, i.e., $n \geq k$. Lastly, the pure spectra S of those fluorophores should be *a-priori* determined, either measured individually or interactively picked from a pure pixel with signal from only one fluorophore. Finally, C can be determined by solving a least-square problem that minimizes:

$$e^2 = \|D - CS\|^2. \quad (2)$$

Non-negativity constraints are commonly applied, since the contribution of fluorophores cannot be physically negative.

While this approach works well for microscopy, is not ideal for *in-vivo* fluorescence imaging due to the inherent differences in the two imaging techniques. In fluorescence microscopy, samples are diluted in a thin transparent solution or collected directly from a very thin focus plane; *in-vivo* imaging measures the diffuse radiance from the surface of scattering animal tissue, and thus a fluorophore might make a significant contribution to a cloud of surrounding pixels instead of only the pixel geometrically associated with it. Thus, the quantity C in Eq. (1) has to be considered as the signal distribution of fluorophores instead of the concentrations of fluorophores in the pixel. Furthermore, photons from a fluorophore located inside the animal may be heavily attenuated before reaching the surface due to light scattering and absorption. Such attenuation varies with depth, tissue type, and wavelength, so the emitted fluorescence spectrum can be considerably shifted relative to the *in-vivo* spectrum. Exact modeling of the spatial distribution of fluorophores and the spectral response of light in tissue requires a rigorous 3-D

Précisions sur le « Spectral Unmixing » utilisé en NIRF, d'après [473].

Annexe 4 : « Spectral Unmixing » en PA :

En imagerie photoacoustique, il est possible de réaliser, a posteriori, un traitement des images afin d'extraire le signal d'un composé d'intérêt du signal total mesuré.

Ce traitement des images intervient lorsque les acquisitions ont été réalisées avec plusieurs longueurs d'onde, grâce au « Spectro-Mode ». Lors de l'acquisition, le système balaye un intervalle défini de longueurs d'onde (situé entre 680 et 970nm, avec un pas entre chaque longueur d'onde défini en fonction de la précision et de la rapidité d'acquisition voulue).

Les spectres PA acquis sont ainsi comparés à une librairie de spectres préalablement enregistrés correspondant à chacun des composants dont on veut mettre en évidence la présence (ICG, BPV, IR-Dye800, HbO₂, Hb, ...)

Calcul pour le « spectral unmixing » en PA :

Pour chacun des pixels, le signal PA à chaque longueur d'onde est évalué en comparaison avec le bruit de fond afin de déterminer si le signal est « réel ».

Toutes les longueurs d'ondes qui sont déterminées pour avoir un signal « réel » sont utilisées dans l'algorithme pseudo-inversé pour résoudre l'équation $M=WS$, où M représente un vecteur de signal PA (connu). W représente une matrice de coefficients connus pour chaque composant, à chaque longueur d'onde (enregistrés dans la librairie de spectres disponible pour chaque composant). S représente la concentration relative de chacun des composants que l'on veut « unmixer » (inconnu). Un algorithme pseudo-inversé est utilisé pour calculer S .

Pour la quantification, les valeurs obtenues après « spectral unmixing » représentent le signal d'intensité moyen de chaque composant « unmixé » à l'intérieur de la région d'intérêt.

De nombreuses équipes ont publié le détail mathématique de la procédure de « spectral unmixing » en PA ^[474-476].

1.2 Unmixing

In order to spectrally unmix and decompose the reconstructed optoacoustic images into image components that identify the biodistribution of substances that give spectral contrast, three different approaches were examined and are described below. Generally speaking, the term unmixing means finding a solution for the unknown right hand side of the equation

$$M = WS,$$

where M is the measured data $m \times n$ array that consists of measurements at m different wavelengths, each containing a total of n pixels. The number of sources or components the acquired images are to be split into is c and usually equals m . Components are characterized by their distinct absorption spectrum across the measured wavelengths in the weighting $m \times c$ matrix W , and their spatial distribution in the $c \times n$ matrix S . In order to maintain algebraic correctness the residual error is to be minimized so that the original data can be re-mixed using the resulting matrices.

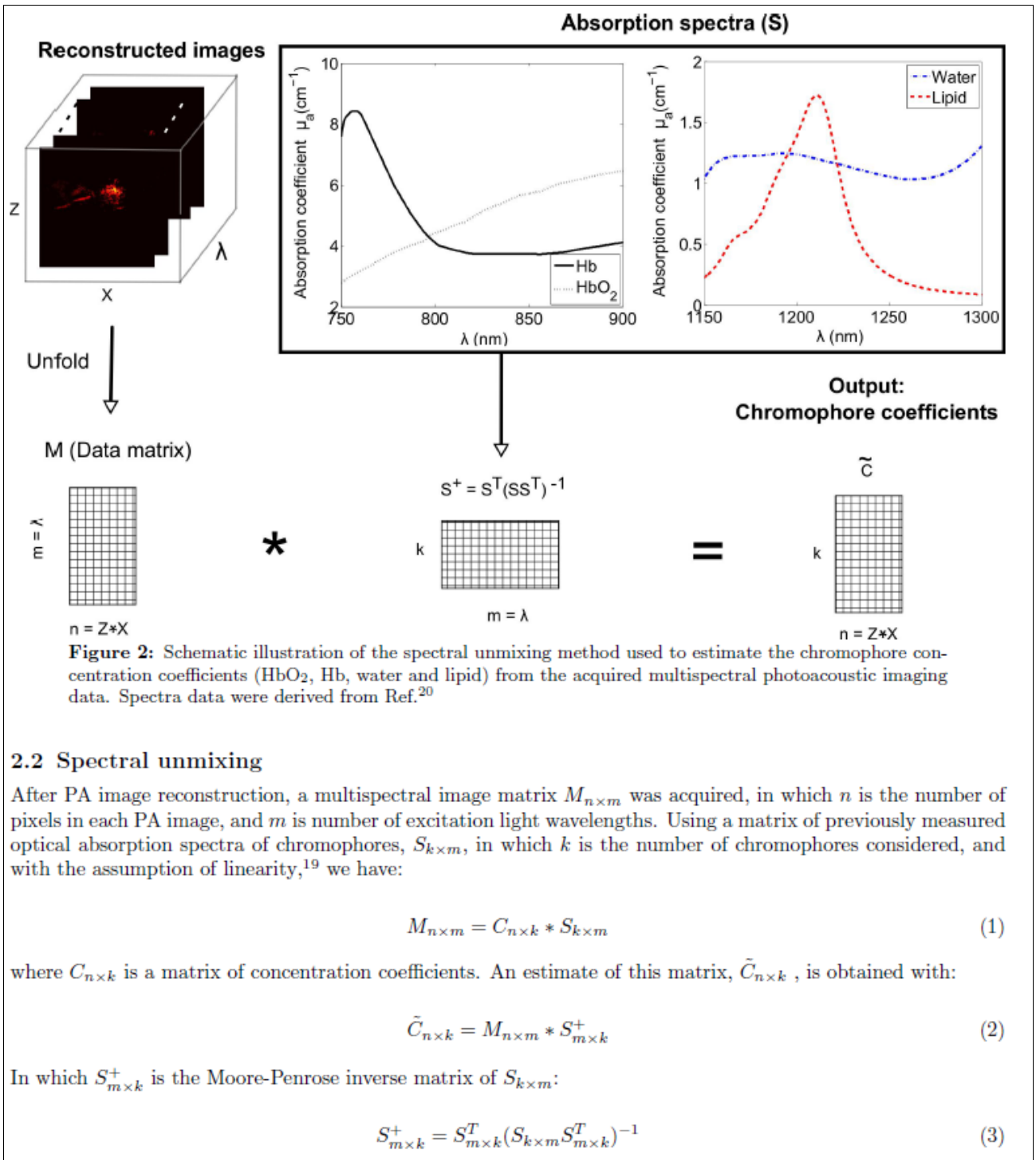
Spectral fitting is a simple and straightforward approach to pursue spectral unmixing using a set of measured absorption spectra of components contained in the measured sample. The spectra in W are inverted by means of the Moore-Penrose inverse^{19, 20} and multiplied from the right with the measurements in M to extract the sources S . A number of other, more complex algorithms for matrix factorization and multivariate data analysis have been suggested in literature²¹⁻²³.

Other approaches do not use any a-priori knowledge and are thus referred to as "Blind Source Separation". Instead of known spectra they use constraints that are implied in the measured data to enable splitting information into two parts that in this case contain spectra and component information. Two of the most promising methods in this field are Principal Component Analysis (PCA)²³ and Independent Component Analysis (ICA)²², where both apply statistical constraints to the separation of the measured datasets.

PCA on the one hand decomposes data into components that are statistically uncorrelated and thus orthogonal. This can be mathematically computed either by a singular value decomposition or an eigenvalue decomposition of the covariance matrix of the data. Implementations of the algorithm are available for all common computational tools. Components are sorted according to their eigen value (or singular value respectively), which is equivalent to the variance that is represented by the component. Components with smaller variance are ranked lowest and mostly contain noise and can thus often be neglected, additionally promoting PCA as a simple means of noise or dimension reduction in signal preprocessing before the actual step of unmixing.

ICA on the other hand pursues a similar approach based on statistical independence rather than the weaker criterion of uncorrelatedness, thus usually providing more accurate separation results. We use the FastICA algorithm²⁴ in the MATLAB implementation provided on the homepage of the authors. According to the central limit theorem²⁵ a mixture of signals is always more gaussian than the individual signals, so separating measurement data trying to maximize the non-Gaussianity using kurtosis gives a set of statistically independent source components. Because a way to measure the importance of the component is not available with the results from ICA, the components will appear in random order. As this can make evaluation of results tedious and time consuming with an increasing number of wavelengths, an initial guess of the spectral profiles of components expected to be contained in the sample can be supplied to the algorithm to influence the sorting of components.

« Spectral Unmixing » utilisé en PA, d'après [475].



2.2 Spectral unmixing

After PA image reconstruction, a multispectral image matrix $M_{n \times m}$ was acquired, in which n is the number of pixels in each PA image, and m is number of excitation light wavelengths. Using a matrix of previously measured optical absorption spectra of chromophores, $S_{k \times m}$, in which k is the number of chromophores considered, and with the assumption of linearity,¹⁹ we have:

$$M_{n \times m} = C_{n \times k} * S_{k \times m} \quad (1)$$

where $C_{n \times k}$ is a matrix of concentration coefficients. An estimate of this matrix, $\tilde{C}_{n \times k}$, is obtained with:

$$\tilde{C}_{n \times k} = M_{n \times m} * S_{m \times k}^+ \quad (2)$$

In which $S_{m \times k}^+$ is the Moore-Penrose inverse matrix of $S_{k \times m}$:

$$S_{m \times k}^+ = S_{m \times k}^T (S_{k \times m} S_{m \times k}^T)^{-1} \quad (3)$$

« Spectral Unmixing » utilisé en PA, d'après [475].

Annexe 5 : Immuno-marquage fluorescent du pimonidazole :

Immuno-marquage fluorescent du pimonidazole pour mise en évidence des plages hypoxiques

Principe :

Marquage des protéines par immuno-histochimie sur des coupes tumeurs incluses en paraffine

Textes de référence :

Protocole issu de la notice du kit Hypoxyprobe-1 kit

Mode opératoire :

Etapes	Procédures	Tps (min)	T °C	Réactifs
1	Ramollir la paraffine	20	45 °C	Etuve sèche
2	Déparaffinage	3	TA	Xylène
3	Déparaffinage	2	TA	Xylène
4	Nettoyage du Xylène	2	TA	100% Ethanol
5	Hydratation du tissu	1	TA	95% Ethanol
6	Hydratation du tissu	1	TA	70% Ethanol
7	Hydratation du tissu	2	TA	Eau distillée
8	Tampon de rinçage	2	TA	1X TBS + 0.1% Tween 20
10	Démasquage antigénique	20	90 °C	10 mM Citrate de sodium, pH6

11	Tampon de rinçage	2	TA	1X TBS + 0.1% Tween 20
12	Blocage des sites non spécifiques	5	TA	1X-TBS + 1% BSA
13	Tampon de rinçage	2	TA	1X TBS + 0.1% Tween 20
14	Application Anticorps primaire	30	TA	Dilué dans 1X TBS + 1% BSA
15	Tampon de rinçage	2	TA	1X TBS + 0.1% Tween 20
16	Application Anticorps secondaire	30	TA	Dilué dans 1X TBS + 1% BSA
17	Tampon de rinçage	2	TA	1X TBS + 0.1% Tween 20
23	Déshydratation et lavages	1	TA	4 bains éthanol 100% + 3 bains de xylène
24	Montage de la lamelle	NA	TA	Mettre une goutte de milieu de montage (avec DAPI) + lamelle

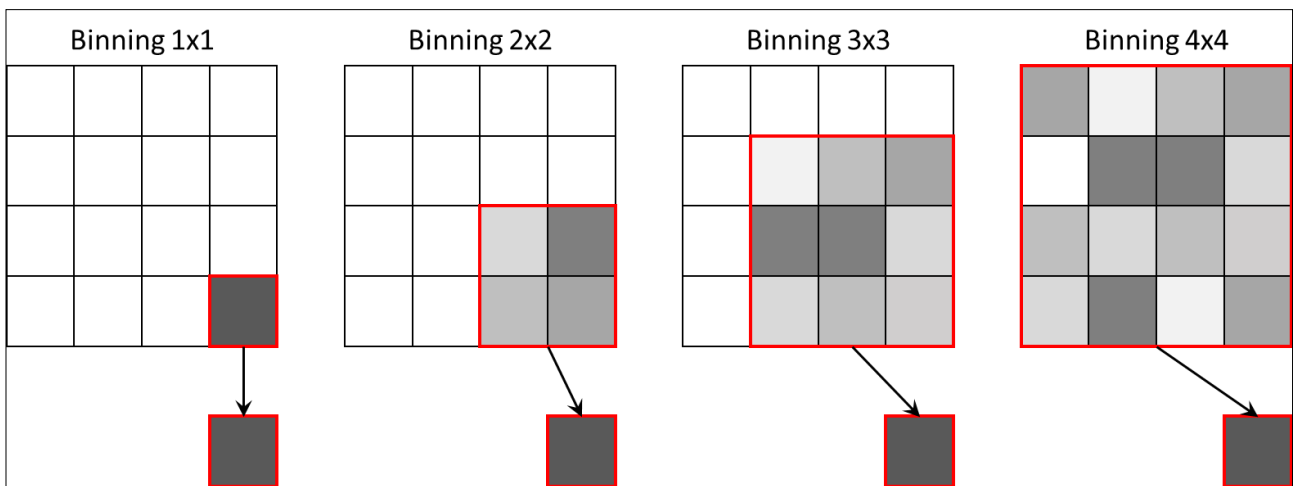
Annexe 6 : Précisions sur le « Binning » en imagerie optique

Le « Binning » est un paramètre important à considérer en imagerie optique en 2 dimensions. Il correspond à un processus de regroupement de la valeur de pixels adjacents afin d'obtenir un pixel de dimension plus importante.

Ce regroupement de valeurs de pixels permet d'augmenter la sensibilité de l'acquisition, puisque les nouveaux pixels (de plus grande taille) contiennent un signal plus important que le pixel original de petite taille. Cependant, plus on augmente le binning, moins la résolution de l'image est importante.

Cette technique d'augmentation du binning est donc appliquée lorsqu'il est nécessaire d'augmenter le rapport signal/bruit, par exemple lors d'une acquisition où le signal d'intérêt est très faible.

Lors d'une acquisition classique, le binning est de 1x1, c'est-à-dire que chaque pixel se voit allouer une valeur nominale. Un regroupement de 4 pixels correspond à binning 2x2. Un regroupement de 9 pixels correspond à un binning 3x3. Un regroupement de 16 pixels correspond à un binning 4x4.



RESEARCH ARTICLE

High Resolution Ultrasound and Photoacoustic Imaging of Orthotopic Lung Cancer in Mice: New Perspectives for Oncopharmacology

Florian Raes^{1*}, Julien Sobilo¹, Marilyne Le Mée¹, Stéphanie Réthif¹, Sharuja Naitkunarajah¹, Stéphanie Lerondel¹, Alain Le Pape^{1,2}

1 PHENOMIN-TAMM-LUPS44, CIPA (Centre d'Imagerie du Petit Animal), CNRS Orléans, France, **2** INSERM U1100, CEPR, University of Tours, France

* florian.raes@cnrs-orleans.fr



OPEN ACCESS

Citation: Raes F, Sobilo J, Le Mée M, Réthif S, Naitkunarajah S, Lerondel S, et al. (2016) High Resolution Ultrasound and Photoacoustic Imaging of Orthotopic Lung Cancer in Mice: New Perspectives for Oncopharmacology. PLOS ONE 11(4): e0153532. doi:10.1371/journal.pone.0153532

Editor: Bernhard Ryfel, French National Centre for Scientific Research, FRANCE

Received: February 2, 2016

Accepted: March 30, 2016

Published: April 12, 2016

Copyright: © 2016 Raes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Objectives

We have developed a relevant preclinical model associated with a specific imaging protocol dedicated to onco-pharmacology studies in mice.

Materials and Methods

We optimized both the animal model and an ultrasound imaging procedure to follow up longitudinally the lung tumor growth in mice. Moreover we proposed to measure by photoacoustic imaging the intratumoral hypoxia, which is a crucial parameter responsible for resistance to therapies. Finally, we compared ultrasound data to x-ray micro computed tomography and volumetric measurements to validate the relevance of this approach on the NCI-H460 human orthotopic lung tumor.

Results

This study demonstrates the ability of ultrasound imaging to detect and monitor the *in vivo* orthotopic lung tumor growth by high resolution ultrasound imaging. This approach enabled us to characterize key biological parameters such as oxygenation, perfusion status and vascularization of tumors.

Conclusion

Such an experimental approach has never been reported previously and it would provide a nonradiative tool for assessment of anticancer therapeutic efficacy in mice. Considering the absence of ultrasound propagation through the lung parenchyma, this strategy requires the implantation of tumors strictly located in the superficial posterior part of the lung.

1. Introduction

Because lung cancer still remains the leading cause of cancer-related death, there is a need to develop more accurate and predictive preclinical protocols and relevant cancer models. Orthotopic lung cancer models have the advantage of being more predictive regarding clinical relevance, including the ability of primary tumors to develop spontaneous metastasis but also more predictive regarding the therapeutic response. The implementation and exploration of such orthotopic models allows us to improve our understanding of the biology of cancer to interpret preclinical *in vivo* results in humans, especially for the potential therapeutic response of anticancer agents. Studies taking into account more representative parameters from clinical situations, particularly hypoxia, are of great interest to boost innovation for new anticancer treatments [1–3].

One important parameter in oncology is tumor volume assessment before but also during treatments [4]. In a clinical setting, the pulmonary tumor measurements are predominantly performed with X-ray computed tomography (CT) imaging [5]. For pulmonary preclinical oncology, imaging objectives are to improve the accuracy for determining volumes, without irradiation effects or interferences with the anti-tumor response.

Thanks to technological developments for both X-ray sources and detectors, CT dedicated to small animal imaging provides a sub-millimetric resolution making this tool efficient for the characterization of lung tumor volumes. However, the radiation dose delivered to tumors remains a limitation, especially when a study requires repeated exams [6].

Bioluminescence imaging (BLI) brought about a revolution in preclinical oncology research but this method provides quantitative information about tumor proliferation without any possible sizing. Moreover, since BLI is dependent upon metabolism, it is not reliable when tumors become hypoxic [7].

In clinical practices, lung ultrasound (US) has been gaining in popularity among clinicians and has become an essential tool in critically ill management [8,9]. However regarding human pulmonary oncology, there is no possible use of US except for invasive endoscopy of cancer nodules and lymph nodes [10,11]. The main limitation of endoscopy and ultrasound is the detection of these nodules if proximity with the probe is not close enough. This access limitation is due to the absence of US propagation through the lung parenchyma because of air.

On the contrary, preclinical high resolution US and photoacoustic imaging (PAI) are promising modalities to investigate lung tumor progression and hypoxia respectively but considering the specific constraints of US, the implantation of tumors in the superficial posterior lung region is required.

The large cell NCI-H460 orthotopic lung carcinoma model that we chose to improve, is based on a study by Gagnadoux *et al.* [12], leading to the growth of a solitary intrapulmonary nodule located near the posterior diaphragmatic surface.

Here we recommend refining such an onco-pharmacology protocol in a translational approach while overcoming physical US limitations allowing lung tumor exploration. In this longitudinal study we assessed orthotopic lung tumor volumes in mice by *in vivo* 3D US and also hypoxic tumor status by PAI. Furthermore, we compared our data to different imaging methods with the aim to validate this new approach.

2. Materials and Methods

2.1 Ethics Statement

All procedures on animals were performed in accordance with European ethical guidelines (European directives 2010/63/EU) and were approved by the Regional Committee for Animal

Care and Ethics in Animal Experiments (C2EA-03 Comité d'éthique en expérimentation animale Campus CNRS d'Orléans).

2.2 Cell Culture

The NCI-H460-luc2 human lung cancer cell line was obtained from Perkin Elmer (France). This cancer cell line was maintained according to the supplier's instructions.

2.3 Animals

Pathogen-free 6 to 8 week-old female nude Balb/c mice were purchased from Charles River Laboratories (France). Mice were acclimated for 7 days in the laboratory before experimentation and were maintained in sterilized filter-stopped cages inside a controlled ventilated rack (USA) with access to food and water *ad libitum*. They were examined daily for clinical signs, distress, decreased physical activity and weighed 3 times a week.

2.4 Subcutaneous and Intra-Bronchial Cell Xenograft

Human lung cancer xenografts from NCI-H460-luc2 cells were established in Balb/c nude mice. We first performed subcutaneous implantation in order to get reference data from measurement techniques on standard conditions, so that 10 mice were anesthetized by inhalation of 1.5% isoflurane with air (Isoflo[®], AXIENCE S.A.S, France) and inoculated by different tumor burdens (either 1×10^5 to 2.5×10^6 tumor cells in 100 μ l PBS) in the dorsal flank. For orthotopic implantation, 24 mice were inoculated (1.25×10^5 or 2.5×10^5 tumor cells in 25 μ l PBS) using a 1.9F \times 50cm blunt-end silicon catheter inserted into the bronchus via a laryngoscope (SIA Fig). This delicate procedure to get superficial cell deposition into a posterior part of a lower lobe via a main bronchus requires interventional imaging. The position of the radio-opaque catheter is checked by planar radiography (Faxitron MX20, Faxitron X-ray corp, USA) (S1B Fig) then actual deposition of ^{99m}Tc -labelled tumor cells is controlled by Single Photon Emission Computed Tomography (Nano Spect CT, Mediso, Hungary). (S1C Fig).

2.5 Computed Tomography

Mice were anesthetized by 1.5% isoflurane and placed on a bed in prone position. For tumor measurements, computed tomography was performed using a small animal imager (eXplore CT 120, Trifol Imaging, USA) with an external respiratory gating device (Biovet, USA). Some mice received an intravenous injection of the vascular contrast agent eXIA160[®] (Binito Biomedical, Canada). Tumor volumes were obtained by manually delineating margins of tumors from sagittal sections of CT images using Microview analysis+ 2.3 software.

2.6 Bioluminescence Imaging

BLI was performed once a week until the end of the study (Day 28) using an IVIS-Lumina II (Perkin Elmer, France) generating a pseudo-colored image representing light intensity and superimposed over a greyscale reference image. Each mouse was IP injected with 100mg/kg luciferin potassium salt (Promega, France). Mice anesthetized by 1.5% isoflurane were placed on a thermostatically controlled heating pad (37°C) during imaging. Acquisition binning and duration were set depending on tumor activity. Signal intensity was quantified as the total flux (photons/seconds) within ROIs drawn manually around the tumor area using Living Image 4.0 software (Perkin Elmer, France). The sum of signals from the prone and supine positions was considered for each mouse.

2.7 Ultrasound and Photoacoustic Imaging

Mice anesthetized by 1.5% isoflurane were placed on a thermostatically controlled heating pad in prone position with the paws taped over the ECG electrodes attached to the table. Respiratory gating was derived from ECG. A colorless aqueous warmed ultrasonic gel (Supragel[®], LCH, France) without any air bubbles was applied between the skin and the transducer. Tumors were imaged with the VisualSonics Vevo[®] LAZR System (FUJIFILM VisualSonics Inc, Canada). 3D scans of US image being recorded digitally. The tumor area in coronal planes was measured by manually delineating margins using Vevo[®] LAB 1.7.2 software. The software then calculated the corresponding volume of each coronal slice. For hypoxia assessments, tumors were investigated by PAI with OxyHemo-Mode so that average values of SO₂ were determined and corresponding hypoxic volumes documented. Tumor perfusion status and VEGFR2 expression were assessed by contrast enhanced ultrasound (CEUS) imaging following IV injection (tail vein) of Vevo MicroMarker[™] and Target-Ready MicroMarker[™] coupled with either anti-VEGFR2 or isotype control antibodies (eBioscience, USA). Imaging protocols were performed with the destruction-replenishment sequences. Data were processed with the VevoCQ[™] software. A key parameter that should be respected for accurate 3D US acquisition is the positioning of the transducer (S2A Fig). The US beam has to be directed towards the lung tumor with the best angle possible, so that the entire tumor can be detected during the acquisition. Despite the presence of artifacts and shadows due to the ribs, when changing the angle of the transducer it is possible to select the most efficient positioning for the transducer that allows detection. The minimal size of tumors that can be detected is 1mm in diameter, however the bigger the tumor size, the fewer artifacts from the ribs impact tumor detection. Transducers with central frequency at 21MHz and 40MHz, were used for B-Mode imaging of large and small tumors respectively. PAI was performed with the 21MHz transducer.

2.8 Sacrifice and Organ Removal

Mice under anesthesia were sacrificed by cervical dislocation and tumors were collected from each animal for immediate *ex vivo* assessments. In order to assess the accuracy of *in vivo* US measurements, tumors were collected at the end of the study (Day 28) and were imaged *ex vivo* with 3D US. The dedicated plate filled with ultrasonic gel allowed us to measure tumor volumes accurately, avoiding any motion of collected tissues due to the movement of the US transducer during the 3D acquisition (S2B Fig).

2.9 Volumetric Measurements

Tumors were carefully dissected then immersed in suitable graduated cylinders filled with water. Volumes were assessed by measuring the weight of water removed from the cylinder to make the concave meniscus adjusted to the upper edge of the baseline graduation mark (S2C Fig). These measurements were performed in triplicate.

2.10 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad, USA). Correlation graphs and R squared coefficients were obtained by nonlinear regression.

3. Results

3.1 Validation of Techniques for Tumor Volume Measurements on Subcutaneous Models

To assess the intrinsic accuracy of each modality to determine tumor volumes, the subcutaneous tumor model allows us to avoid disrupting contributions such as respiratory movements and well-known problems associated with US chest exams. Comparison of results was achieved from subcutaneous tumors with sizes ranging from 15 to 700mm³. Correlation analysis between US measurements achieved *in vivo* Vs *ex vivo* ($R^2 = 0.94$), Vs CT ($R^2 = 0.93$), or tumor weight ($R^2 = 0.98$) and volumetric assessments ($R^2 = 0.96$) clearly validated the ability of US and CT protocols to achieve accurate determination of tumor volumes (Fig 1).

3.2 Control of the Tumor Cell Implantation

For subcutaneous tumors, all the 10 xenografted animals were enrolled for assessment of the tumor sizes when determined by the various measurement methods. For orthotopic lung tumors, seven days after engraftment the tumor growth was confirmed by BLI (SID Fig), either in the left or right lung. Based on BLI intensity, 12 mice with tumor activity ranging from 7.45x10⁵ to 8.55x10⁷ Photons/sec were selected for the study.

3.3 Assessment of Tumor Volumes in Lung by *In Vivo* US Imaging

As in human lung US, we observed artifacts from the pleural line due its echogenicity. As pointed out by the white arrows (Fig 2A), the pleural line appears bright, as it is an increased ultrasound reflection at the interface between pleura and healthy lung. We noticed motionless regularly spaced hypercholeogenic lines, named A lines, which are repetition artifacts of the pleural line. The break in the pleural and A lines allowed us to identify the lung tumor with certainty, even at early stages (Fig 2B). A typical artifact observed below the lung tumor, such as a bright shadow corresponding to the meeting point between tumor and healthy pulmonary parenchyma, enabled us to identify tumor margins. This posterior enhancement is explained by the difference in ultrasound velocity between tumor and lung parenchyma.

Positioning the transducer with an appropriate angle made it possible to record successive 2D images with a stepper motor for 3D acquisitions. Processed volumes were displayed as a red grid (Fig 2C).

When compared to US tumor volumes in the two different groups of lung tumors, BLI exhibited very different patterns of evolution (Fig 2D). In the first group (1.25x10⁶ cells), BLI

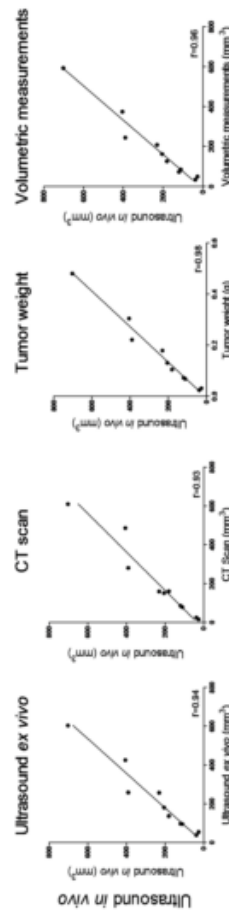


Fig 1. Correlation analysis between different methods for tumor volume assessment. Nonlinear regression of data points collected from orthotopic subcutaneous tumors ($n = 10$ animals). The correlation coefficient R^2 squared is provided in the lower right hand of each graph.

doi:10.1371/journal.pone.0153532.g001

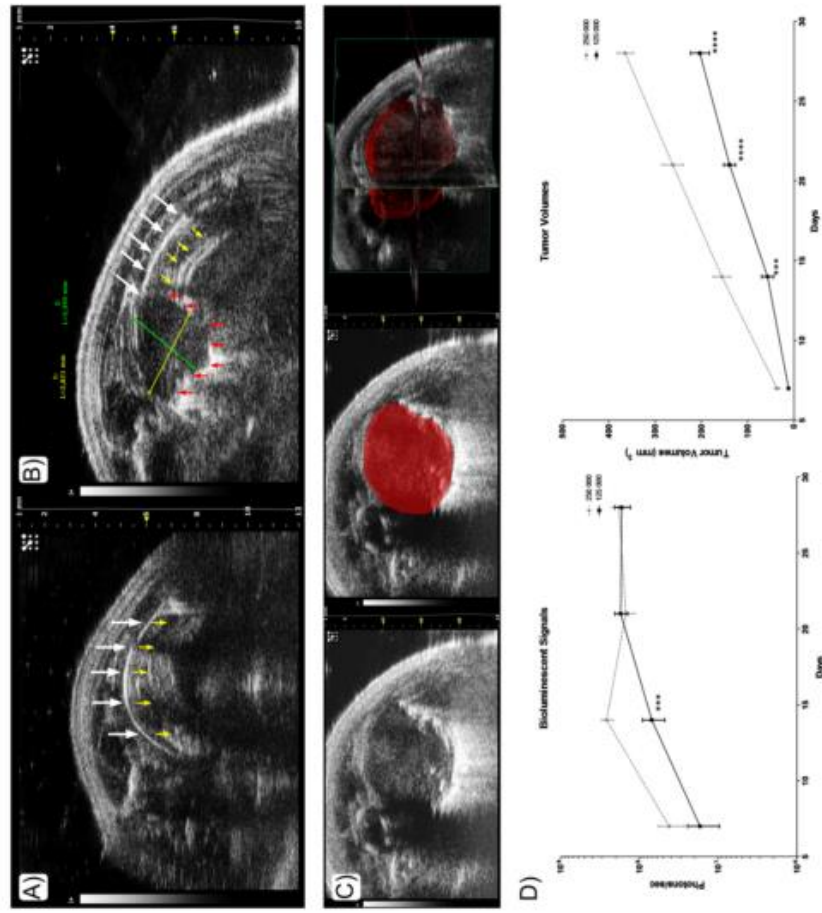


Fig 2. In vivo identification and monitoring of orthotopic lung tumors. (A) & (B) Detection of lung tumors by High Resolution Ultrasound Imaging. (A) 2D B-Mode acquisition of a healthy lung in mice. Vertical white arrows point out the pleural line. Vertical yellow arrows correspond to A lines, representing reverberations of the pleural line. (B) On 2D B-Mode Ultrasound imaging of a lung bearing an orthotopic NC3-H460Luc tumor (2.8mmx2.4mm), vertical red arrows point out the margins of the tumor, highlighted by the typical bright shadow artifact. We also remark white and yellow arrows indicating the pleural line and A lines respectively. (C) From 2D to 3D Ultrasound B-Mode imaging of a lung tumor in mouse. The red area corresponds to the lung tumor, the thoracic cavity of the mouse. The red grid corresponds to the tumor volume obtained by image weights on each 2D B-Mode slices from the 3D acquisition. (D) Assessing tumor burden by Bioluminescent Signals and US (right), data are presented as mean \pm SEM and statistically analyzed. A two-way repeated-measure analysis of variance followed by Bonferroni post-tests was used for the data of over time course. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Left: Signal intensity from *in vivo* longitudinal monitoring of tumor proliferation by BLI following the deposition of 1.5×10^6 or 2.5×10^6 tumor cells (Photons/sec). Right: *In vivo* tumor volumes measured by US imaging using a transducer mounted on a 3D motor, comparing the tumor grown between 2 different tumor burdens (mm³). Results represent mean \pm SEM ($n = 5$ animals per group). (***) $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

doi:10.1371/journal.pone.0153532.g002

increased progressively until day 21 then remained unchanged whereas US determined volumes increased during the entire study. In the second group (2.5×10^6 cells), constant increased volumes determined by US was quite different from the BLI pattern exhibiting pronounced regression from day 14 to day 21, then stagnation. *In vivo* US follow up of lung tumors allowed us to measure tumor volumes precisely and highlighted the significant differences between growth curves from the two initial tumor burdens.

3.4 Comparison of Techniques for Tumor Volume Measurements in Lungs

At the end of the study (Day 28), non-contrast enhanced CT was performed with the aim to compare data from US and CT. The 3D reconstituted volumes of healthy lungs and tumors were processed (Fig 3). Isosurfaces of healthy lungs were obtained with an automated segmentation whereas tumor volumes required manual delineation on 2D slices.

The correlation analysis of data obtained by each method on orthotopic lung tumors is reported in Fig 4. We compared tumors with different sizes, data obtained from *in vivo* and *ex vivo* US, CT, volumetric measurements and weights. CT scan provides an accurate estimation of tumor volumes compared to *ex vivo* US ($R^2 = 0.87$), tumor weight ($R^2 = 0.98$) and volumetric measurements ($R^2 = 0.80$).

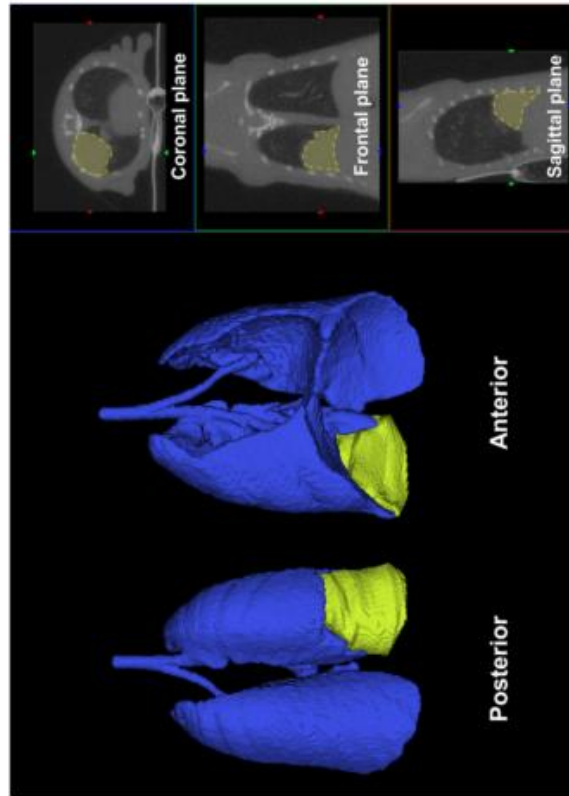


Fig 3. Assessment of tumor volumes with micro Computed Tomography. 3D rendering of CT scan anterior and posterior reconstructions, after processing the tumor delineation on 2D slices from coronal, frontal or sagittal plane. Healthy lung parenchyma is blue whereas tumor is highlighted in yellow. doi:10.1371/journal.pone.0153532.g003

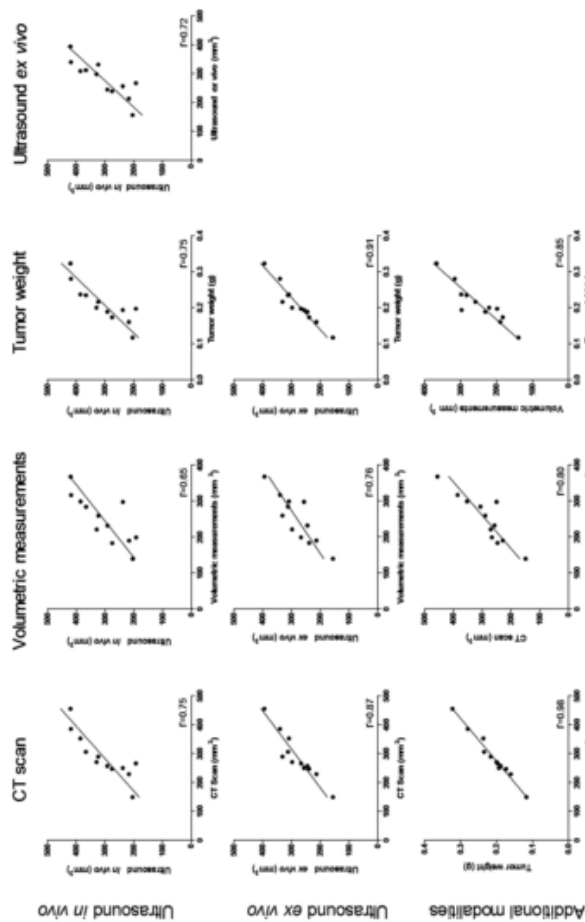


Fig 4. Correlation analysis between different modalities for tumor volume assessment. Nonlinear regression of data points collected from orthotopic lung tumors ($n = 12$ animals). These graphs compare the correlation between 3D US imaging *in vivo* and *ex vivo*, *in vivo* 3D CT scans, *ex vivo* volumetric measurements and tumor weight. doi:10.1371/journal.pone.0153532.g004

For *in vivo* measurements, results clearly indicate gross correlation of volumes processed with *in vivo* US, CT and tumor weight ($R^2 = 0.75$). These results do not reflect an overestimation of tumor volumes measured by US or CT as compared to the tumor weight. Such a correlation is also observed with *ex vivo* US and volumetric measurements ($R^2 = 0.72$ and $R^2 = 0.65$ respectively).

3.5 Contrast Enhanced Ultrasound, Power Doppler and Photoacoustic Imaging

Since it was possible to perform *in vivo* US B-Mode imaging, the ability to measure different US and PAI parameters was investigated. Interestingly we noticed that micro US imaging enabled the visualization of tumor perfusion status after the injection of MicroMarker[®] contrast agent (Fig 5A). We noticed a well enhanced signal through contrasted enhancement demonstrating an efficient perfusion status. CEUS imaging was more efficient and sensitive in highlighting vascularization parameters than Power Doppler. Thanks to Power Doppler (no injection of contrast agent required), we were able to observe the larger vessels. Due to the tiny size of other vessels and contribution of parameters such as slow blood flow motion, heartbeats

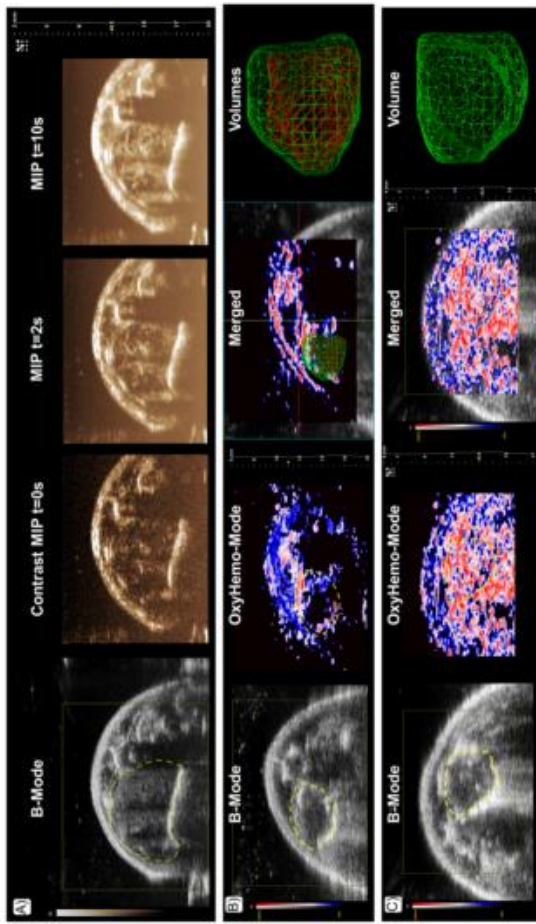


Fig 5. Contrast enhanced ultrasound imaging and photoacoustic imaging of hypoxia in orthotopic lung tumors in mice. (A) B-mode image of a lung tumor with corresponding contrast image before IV injection of Vevo MicroMarker™. Maximum Intensity Projection after injection of MicroMarker™. (B) B-mode image of a hypoxic lung tumor with corresponding OxyHemo photoacoustic images. With the OxyHemo-Mode, red areas indicate well oxygenated parts of the tumor whereas blue and dark areas indicate the presence of hypoxia. Regarding the 3D volumes, the red grid corresponds to the hypoxic region of tumor and green grid corresponds to the entire tumor. (C) B-mode image of a well oxygenated lung tumor with corresponding OxyHemo photoacoustic images showing absence of any hypoxic core.

doi:10.1371/journal.pone.0153532.g005

and breathing, the visualization of small blood flows is challenging, even with ECG and breathing gating (data not shown).

Regarding PAI, we obtained information on the oxygenation status of tumors and it was possible to reveal the presence of hypoxia inside tumors noninvasively (Fig 5B). We noticed oxygenated areas in the periphery of the tumor as compared to the hypoxic core. 3D acquisitions allowed quantification of hypoxia and volumes for both regions ($V_{\text{tumor}} = 29.4\text{mm}^3$, $\text{SO}_{2,\text{tumor}} = 11.4\%$; $V_{\text{hypoxia}} = 10.2\text{mm}^3$, $\text{SO}_{2,\text{hypoxia}} = 0.4\%$, all numbers given as single values for the tumor shown here) (Fig 5B). It is important to observe that some mice with comparable total tumor volumes exhibited a well oxygenated tumor ($V_{\text{tumor}} = 47.3\text{mm}^3$, $\text{SO}_{2,\text{tumor}} = 51.7\%$, all numbers given as single values for the tumor shown here) (Fig 5C).

Targeted CEUS allowed us to assess the relative VEGFR2 expression in lung tumors. The VevoCQ software calculated the differential Targeted Enhancement (dTE) values for each region of interest, the same analysis was completed for both the VEGFR2 and isotype control antibody conjugated contrast agents. From parametric images the spatial distribution of the bound contrast agent can clearly be seen (Fig 6A and 6C). Comparison of dTE between microbubbles labeled with VEGFR2 and isotype control antibodies was significant (Fig 6D). Moreover, hypoxic areas determined by PAI matched the spatial distribution of VEGFR2 (Fig 6E).

PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0153532 April 12, 2016

9 / 16

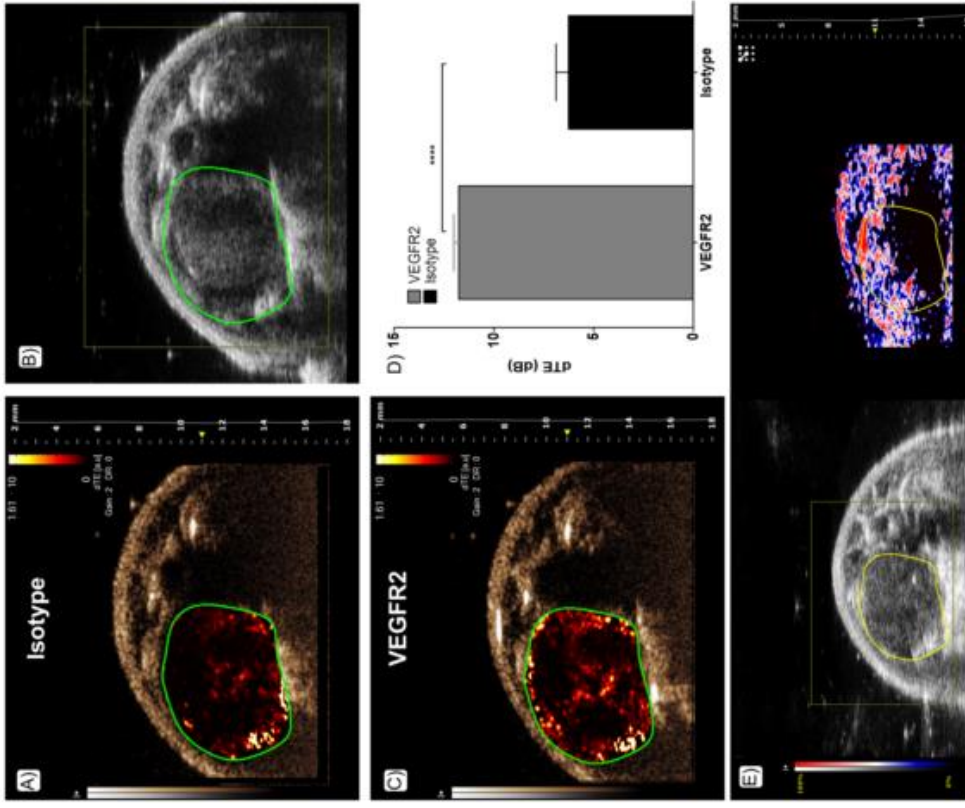


Fig 6. Molecular imaging of VEGFR2 by Targeted Contrast Enhanced Ultrasound Imaging. (A) & (C) Parametric images of the spatial distribution of contrast agent bubbles. (A) Isotype control conjugated microbubbles. (C) VEGFR2 conjugated microbubbles. (Target Ready Vevo MicroMarker™). (B) Corresponding B-Mode image of the tumor. (D) Differential Targeted Enhancement of VEGFR2 and isotype control conjugated microbubbles (dTE) corresponds to the difference between the echo power from both targeted and free bubbles, and the echo power from free bubbles only. Statistical analysis was performed with the Student's unpaired t test ($n = 4$ animals per group). (**** $p < 0.0001$). (E) Corresponding PA image highlighting hypoxic areas where VEGFR2 is mainly expressed.

doi:10.1371/journal.pone.0153532.g006

PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0153532 April 12, 2016

10 / 16

3.6 Limitations of Imaging Modalities

CT images performed following vascular contrast agent injection allowed clear delineation of the tumor from surrounding tissues (more specifically the liver) (Fig 7A). On the contrary, non-contrast enhanced CT performed on this orthotopic lung cancer model was more difficult to analyze especially for large tumors, resulting in less accurate determination of tumor volume (Fig 7B).

Fig 7C corresponds to the evolution of BLI signals within the same animal over time. These results demonstrate that BLI signals from the lung tumor were disrupted during the tumor growth since an increase in BLI was observed up to day 21 then regression was observed whereas the tumor volume was still increasing (Fig 2D).

4. Discussion

The use of preclinical tumor models allows us to follow biological parameters or tumor growth and test the efficacy of therapeutic agents. The experiments described here have proven their utility in providing researchers a new competitive technique to assess orthotopic lung tumor growth by US imaging *in vivo*, allowing non-invasive and non-radiation based investigations.

Each of the imaging modalities used during this study has advantages and disadvantages. CT is relevant to image the respiratory system owing to the low density within the lung space [14]. Regarding lung cancer detection, CT has been proven to be useful in detecting lung tumors located in the apex and hilar area but less efficient for tumors located near the diaphragmatic surface [14], because the lack of contrast with the underlying tissue makes it difficult to measure larger tumor volumes and requires extensive knowledge of both CT imaging and contrast agents with animal anatomy. The use of CT vascular contrast agents, such as eXIA[®], was necessary to perform accurate measurements of tumor volume even if tumors were small and growing around the periphery of the lungs. Unfortunately, repeated use of contrast agent is not recommended in onco-pharmacological studies due to potential effects on tumor growth or therapies. The main limitation of CT imaging is the radiation dose delivered to the tumor. Indeed in this radiosensitive tumor model, the impact of repeated imaging examinations (1 per week versus 1 per 2 weeks, with a conventional chest CT scan delivering 38.9±3.9 Gy) on tumor growth is significant. The influence of doses on tumor proliferation and strong risk of potentiation of an anti-tumor effect may affect the relevance of data about efficacy assessment of anticancer agents [6,15,16].

Although BLI is a quantitative technique exploited routinely to assess tumor proliferation, it is strictly dependent upon metabolic conditions, namely the presence of ATP and O₂. As shown in Fig 7C, the initial tumor burden in these mice was small (1.25×10^5 cells), nevertheless leading to the formation of a hypoxic core and to the decrease of the bioluminescent signal. These tumor hypoxic conditions are a critical point to be considered to ensure the relevance of obtained data [7,17,18]. Because both BLI and US are non-invasive, measurements were performed longitudinally in the same animal. Results confirmed that quantification of BLI signals from the lung is delicate, and obtained data should be used with caution regarding the tumor growth. Nevertheless BLI still remains a great resource in the early stage of studies to control induction of lung tumors and for allocation of animals into homogenous groups.

Among other available imaging modalities, US is noninvasive, non-radiating, does not necessarily require contrast agents and thus offers the advantage of being fast, cheap and with minimal impact on the investigated process. Moreover, this method is not subject to disruption due to the appearance of hypoxia. Given that the shape of tumors is not ellipsoid 3D acquisitions were necessary to accurately measure volumes. Combined with high resolution US imaging, PAI is a real-time noninvasive and quantitative imaging modality for the study of tumor

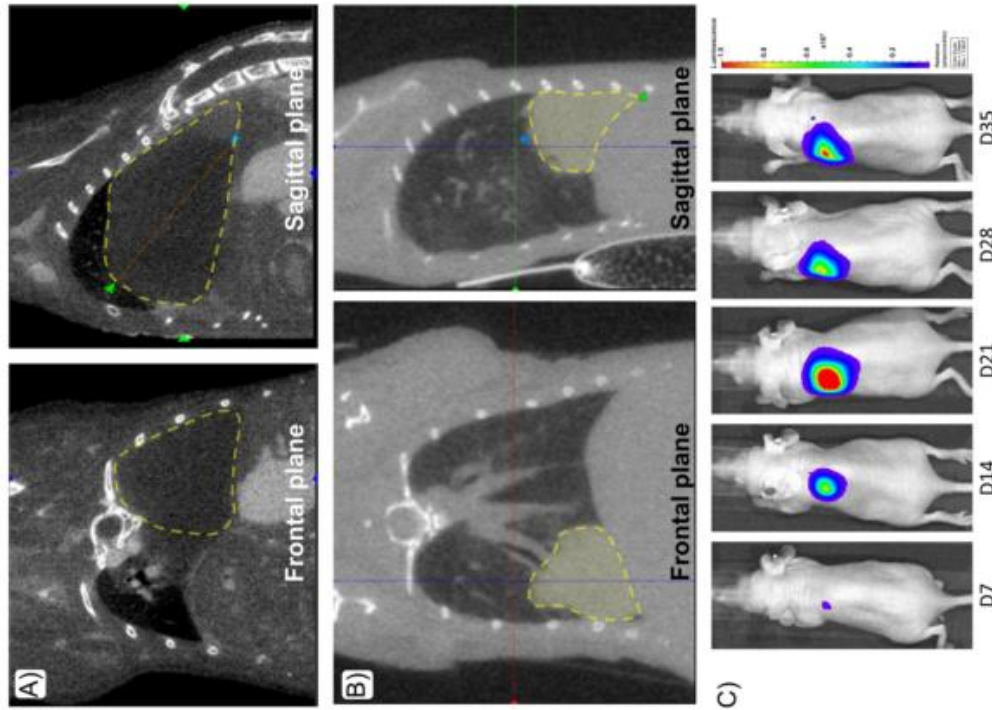


Fig 7. CT scans and bioluminescence signals of mice bearing orthotopic lung tumors. (A) 2D CT scan of a mouse bearing a lung tumor, after IV injection with 100µL of a mix with PBS and eXIA 160, a iodinated vascular contrast agent. Delineation of the tumor is visible on both planes with a yellow dashed line. (B) CT scan obtained without contrast agent injection. Delineation of the tumor is visible on both planes with a yellow dashed line. (C) Longitudinal BLI study on a mouse bearing a lung tumor between day 7 and day 35 (Photos:sec/cm²/steradian), after implantation of 1.25×10^5 tumor cells. doi:10.1371/journal.pone.0153532.g007

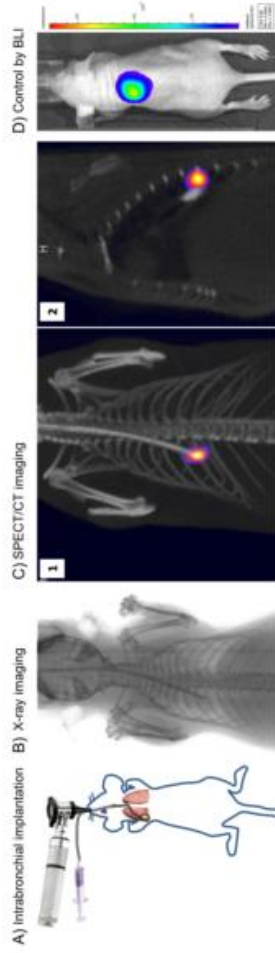
hypoxia and heterogeneity. SO_2 mapping can be performed thanks to the existing differences in optical absorption between oxygenated and deoxygenated hemoglobin [19]. PAI, combining high optical absorption contrast with ultrasound high resolution, provides both anatomical and functional data. In oncology, numerous parameters have to be assessed on tumors, therefore this multimodality is quite relevant to monitor therapeutic response or disease burden. However, due to the limitation of US propagation through the lung parenchyma, the translation to clinical investigations cannot be considered.

Thanks to ultrasound molecular imaging, it was possible to assess the expression and spatial distribution of VEGFR2-targeted microbubbles as compared with microbubbles labeled with isotope control antibodies. Differences in acoustical echoes between free bubbles and those linked to the molecular target are the key feature to facilitate discrimination [20]. This opens up interesting perspectives to characterize changes at a molecular level [21] and for investigations on targeted therapies [22], more especially anti-angiogenic strategies based on anti-VEGFR treatments [23].

In conclusion, we described for the first time a Photoacoustic and Ultrasound imaging strategy to investigate orthotopic lung tumor growth and assess key biomarkers such as hypoxia or VEGFR2 expression *in vivo*. Hypoxia is a major parameter involved in lung tumor resistance towards radio and chemotherapies. For personalized medicine, hypoxia can be assessed by PET tracers labelled with ^{18}F fluorine [24,25] and chemotherapies dedicated to hypoxic tumors have already been included in phase III clinical trials [26,27]. This medium/high throughput validated imaging resource would be of great interest to longitudinally follow both tumor growth and hypoxic status in animals when testing the efficacy of new anticancer therapies. This avoids any risk of disruption of tumor progression compared to other imaging methods such as BLI and CT.

Considering its ability to provide high resolution molecular imaging, it is feasible to imagine an additional potent application of PAI for intra-tumoral micro-biodistribution of therapeutic agents such as monoclonal antibodies [28].

Supporting Information



S1 Fig. Orthotopic lung tumor implantation and assessment of the engraftment. (A) The diagram represents the route of inoculation. The catheter is inserted in the deep bronchus through the trachea, so that the tumor grows in the lower lobes of the lungs, near the posterior diaphragm surface. (B) The *in vivo* control of the catheter positioning by planar X-ray is performed in order to avoid the implantation in the wrong site. (C) Control of the accuracy of cell deposition into the deep bronchus by SPECT/CT imaging of ^{99}Tc -labeled cells. (C2) Sagittal view demonstrating the suitable location, at the posterior part of the lung. (D) Tumor growth is confirmed by BLI on day 7.



S2 Fig. In vivo and ex vivo measurement methods to determine the lung tumor volumes.

(1) Transducer positioning allowing for the conduction of ultrasound through the tumor parenchyma (delineated yellow area). (2) Set up for *ex vivo* 3D US acquisitions. An excavated plate is filled with ultrasound conductive gel around the tumor tissue in order to avoid any movement, and the transducer is positioned above. (3) Volumetric determination by immersing the tumor in a graduated cylinder filled with water. The water is removed from the graduated cylinder to adjust the concave meniscus at the upper edge of the baseline graduation mark and then weighed.

Acknowledgments

We particularly thank Dieter Fuchs, Philippe Trochet and Jithin Jose from FUJIFILM VisualSonics for assistance in ultrasound imaging analysis and expert advice for photoacoustics.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FR SL ALP. Performed the experiments: FR. Analyzed the data: FR JS SN SL ALP. Contributed reagents/materials/analysis tools: FR JS MLM SF SN SL ALP. Wrote the paper: FR JS MLM SR SN SL ALP.

References

- Walsh JC, Lebedev A, Aien E, Medjani K, Manciano L, Kolb HC. The clinical importance of assessing tumor hypoxia: relationship of tumor hypoxia to prognosis and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21(10): 1516–1554. doi: [10.1089/ars.2013.5372](https://doi.org/10.1089/ars.2013.5372) PMID: [25512403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25512403/)
- Graves E, Villalta M, Cecic IK, Eifer JT, Tran PT, Felsher D, et al. Hypoxia in models of lung cancer: Implications for targeted therapeutics. *Clin Cancer Res* 2010; 16(19): 4843–4852. doi: [10.1158/1078-0432.CCR.10-1206](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR.10-1206) PMID: [20358837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20358837/)
- Le OT, Chen E, Salim A, Cao H, Kong CS, Whyte R, et al. An evaluation of tumor oxygenation and hypoxia in patients with early stage non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2006; 12(5): 1507–1514. PMID: [16553773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16553773/)
- Foster FS, Hossack J, Adamson SL. Micro-ultrasound for preclinical imaging. *Interface Focus* 2011; 1(4): 576–601. doi: [10.1098/rsfs.2011.0037](https://doi.org/10.1098/rsfs.2011.0037) PMID: [22869232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22869232/)
- Fuehishi H, Miyoshi S, Noda A, Murakami Y, Sasaki H, Utsunaka M, et al. Pre-clinical validation of orthotopically-implanted pulmonary tumor by imaging ¹⁸F-fluorothymidine-positron emission tomography/computed tomography. *Anticancer Research* 2013; 33(4): 4741–4750. PMID: [24224108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24224108/)
- Andouard S, Guilhem MT, Le Rouzic G, Sobilo J, Le Pape A, Lerondel S. Impact of radiation dose delivered by repeated CTscan examinations on tumor growth in preclinical model of lung cancer. *Personal Communication* 2011.
- Khalil AA, Jameson MJ, Braddock WC, Lin PC, Dowse SM, Golding SE, et al. The influence of hypoxia and pH on bioluminescence imaging of luciferase-transfected tumor cells and hemoglobin. *Int J Mol Imaging* 2013; 207687. doi: [10.1155/2013/207687](https://doi.org/10.1155/2013/207687) PMID: [23836647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23836647/)
- Lichtenstein DA. Lung ultrasound in the critically ill. *Ann Intensive Care* 2014; 4(1). doi: [10.1186/2110-5820-4-1](https://doi.org/10.1186/2110-5820-4-1) PMID: [24501153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24501153/)
- Gargani L. Lung ultrasound: a new tool for the cardiologist. *Cardiovasc Ultrasound* 2011; 9(6). doi: [10.1186/14767120-9-6](https://doi.org/10.1186/14767120-9-6) PMID: [21332576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21332576/)
- Wallace MB, Pascual JMS, Raimondo M, Woodward T, McComb BL, Crook JE, et al. Minimally invasive endoscopic staging of suspected lung cancer. *J Am Med Assoc* 2008; 299(5):540–546.
- Colella C, Vilmar P, Konge L, Clementsen PF. Endoscopic ultrasound in the diagnosis and staging of lung cancer. *Endosc Ultrasound* 2014; 3(4):205–212. doi: [10.4103/2203-3027.144510](https://doi.org/10.4103/2203-3027.144510) PMID: [2548526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2548526/)
- Gagnatoux F, Le Pape A, Lemasle E, Lerondel S, Valo I, Lablanc Y, et al. Aerosol delivery of chemotherapy in an orthotopic model of lung cancer. *Eur Respir J* 2005; 26:657–6. PMID: [15920597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15920597/)
- Walshen CA, Fojt N, Averiamaite T, Miramontes B, Chagman SE, Sasser TA, et al. In vivo X-ray computed tomographic imaging of soft tissue with native, intravenous, or oral contrast. *Sensors* 2013; 13(6): 6957–6980. doi: [10.3390/s130606957](https://doi.org/10.3390/s130606957) PMID: [23711461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23711461/)
- Paubus MJ, Gleason SS, Kimmel SJ, Hunsicker PR, Johnson DK. High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia* 2000; 2:62–70. PMID: [10933069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10933069/)
- Willekens I, Buls N, Lahaute T, Baryens L, Vanhove C, Cavalliers Y, et al. Evaluation of the radiation dose in micro-CT with optimization of the scan protocol. *Contrast Media Mol Imaging* 2010; 4(1):201–7.
- Kagada G, Loukos G, Katsaros K, Langer SG, Nikitovic GC. In vivo small animal imaging: Current status and future prospects. *Med Phys* 2010; 37(12):6421–6442. PMID: [21592732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21592732/)
- Lerondel S, Le Pape A. Bioluminescence imaging in rodents: When light illuminates research. *Curr Mol Imaging* 2013; 2:18–25.
- Boule L, Vandamme M, Riles D, Meinel E, Robert E, Lerondel S, et al. Effects of a non thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a MIA PkC2-lyu orthotopic pancreatic carcinoma model. *PLoS One* 2012; 7(12): e52653. doi: [10.1371/journal.pone.0052653](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052653) PMID: [23300726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23300726/)
- Neadles A, Heimiller A, Eprhat P, Bilan-Tracy C, Trujillo A, Theodoropoulos C, et al. Development of a combined photoacoustic micro-ultrasound system for estimating blood oxygenation. *IEEE Int Ultra-sound Symp Proc* 2010; 390–393.
- Rooji T, Daichin V, Skachkov I, De Jong N, Kooiman K. Targeted ultrasound contrast agents for ultrasound molecular imaging and therapy. *Int J Hyperthermia* 2015; 31(2):90–106. doi: [10.3109/02656726.2014.987809](https://doi.org/10.3109/02656726.2014.987809) PMID: [25707815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25707815/)
- Kaneko OF, Williams JK. Ultrasound for molecular imaging and therapy in cancer. *Quant Imaging Med Surg* 2012; 2(2):87–97. PMID: [23061038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23061038/)
- Hyvelin JM, Tardy J, Arbogast C, Costa MC, Emmel P, Helbert A, et al. Use of ultrasound contrast agents microbubbles in preclinical research. *Invest Radiol* 2013; 48(8):570–63. doi: [10.1097/RLI.0b013e31828954](https://doi.org/10.1097/RLI.0b013e31828954) PMID: [23511134](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23511134/)
- Jiang Y, Allen D, Karsanen, Devery AM, Bokobza S M, Smart Sean, et al. Acute vascular response to contrast treatment in human non-small-cell lung cancer xenografts with different tumour stromal architecture. *Lung cancer* 2015; 90:191–198. doi: [10.1016/j.lungcan.2015.08.002](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.08.002) PMID: [26383213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26383213/)
- Borad AM, Reddy S, Bahary N, Uronis H, Sigal D, Cohn A, et al. Randomized phase II trial of gemcitabine plus th-302 versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2014; 33(13):1475–81. doi: [10.1200/JCO.2014.55.7504](https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.7504) PMID: [25512461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25512461/)
- Chavakis S, Cramer L, Van Tine B, Raed D, Okuno S, Bulynski J, et al. Phase II Study of the safety and antitumor activity of the hypoxia-activated prodrug th-302 in combination with docetaxel in patients with advanced soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* 2014; 32(29):3299–306. doi: [10.1200/JCO.2013.54.5650](https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.5650) PMID: [25185907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25185907/)
- Zegers C, van Elmpt W, Reymen B, Even A, Troost E, Ollers M, et al. In vivo quantification of hypoxic and metabolic status of nsc tumors using ¹⁸F-FHX4 and ¹⁸F-FDG-PET/CT imaging. *Clin Cancer Res* 2014; 20(24):6389–97. doi: [10.1158/1078-0432.CCR.14.1524](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR.14.1524) PMID: [25316821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25316821/)
- Pretorius S, Zegers C, Bismans R, Liewaas N, van Sliphout R, Yaromina A, et al. Th-302 in combination with radiotherapy enhances the therapeutic outcome and is associated with pretreatment [¹⁸F]FHX4 hypoxia imaging. *Clin Cancer Res* 2015; 21(13):2964–92. doi: [10.1158/1078-0432.CCR.15.0018](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR.15.0018) PMID: [25855600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25855600/)
- Maillet A, Guillemisult L, Lemasle E, Lerondel S, Azzopardi N, Morihan J, et al. The airways, a novel route for delivering monoclonal antibodies to treat lung tumors. *Pharm Res* 2011; 28:2147–2156. doi: [10.1007/s11095-011-0442-5](https://doi.org/10.1007/s11095-011-0442-5) PMID: [21481145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21481145/)

information) greatly improves the targeting of tumour-associated β -glucuronidase (Fig. 1).

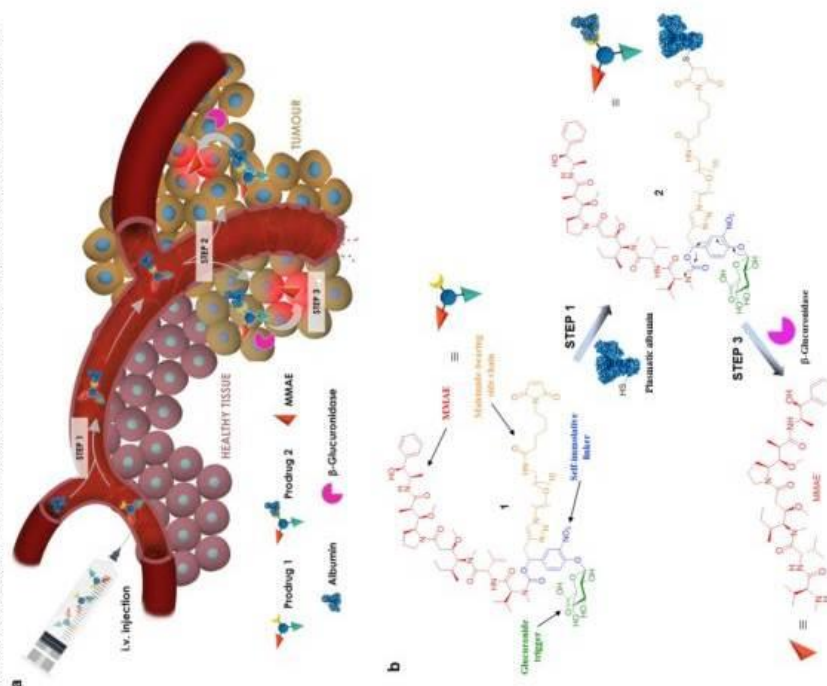


Figure 1 | The principle of tumour targeting with the β -glucuronidase-responsive drug delivery system 1. a. In the blood, prodrug 1 binds to circulating albumin (step 1). The resulting macromolecule 2 accumulates passively in malignant tissues (step 2) where the cleavage of the glucuronide by extracellular β -glucuronidase triggers the release of MMAE (step 3). b. The maleimide-bearing side chain of prodrug 1 reacts with the thiol at the cysteine 34 position of albumin through Michael addition (step 1). β -glucuronidase hydrolysis of the glucuronide trigger induces the release of MMAE via a 1,6-elimination mechanism followed by a spontaneous decarboxylation (step 3).

Targeting β -Glucuronidase in Tumour Microenvironment for Efficient Cancer Chemotherapy

Brigitte Renoux*, Florian Raes*, Thibaut Legigan, Elodie Péraudou, Balkis Eddhif, Pauline Poinot, Isabelle Tranoy-Opalinski, Jérôme Alsamraf, Stéphanie Lerondel, Alain Le Pape, Jonathan Clarhaut & Sébastien Papot

The controlled delivery of anticancer agents in malignant tissues is an emerging therapeutic strategy that reduces dose-limiting adverse effects associated with traditional chemotherapy. The vast majority of drug delivery systems have been designed to recognise a specific cell surface marker (e.g. antigens and receptors), penetrate inside cancer cells through endocytosis and trigger the release of highly toxic compounds in response to an intracellular biochemical stimulus^{1, 2}. Numerous internalising ligand- and antibody-drug conjugates have been assessed in human, leading recently to the marketing of brentuximab vedotin³ and trastuzumab emtansine⁴ for applications in oncology. However, the scope of such targeting devices is only restricted to the treatment of tumours expressing a high level of the targeted cell surface marker. Here we show that a non-internalising β -glucuronidase-responsive drug delivery system⁵⁻¹⁴ programmed to be selectively activated in the tumour microenvironment induces a remarkable anticancer activity on different animal models independently of the cancer cells surface hallmarks. After intravenous administration, our novel molecular assembly binds covalently to plasmatc albumin^{15, 16}, thereby enabling its passive accumulation in tumours^{17, 18} where extracellular β -glucuronidase^{7, 19-24} launches the selective release of monomethylauristatin E (MMAE)²⁵. By operating in this way, the targeting system mediates potent anticancer activities on orthotopic mammary and pancreatic models at low doses. Furthermore, it produces an unprecedented efficacy for the treatment of pancreatic xenografts with very large initial volumes. This study introduces an efficient therapeutic strategy based on the targeting of enzymatic features of the tumour microenvironment that could have significant impacts in the field of drug delivery for cancer chemotherapy.

The use of nontoxic prodrugs that can be activated by an enzyme present in the tumour microenvironment²⁶ has been proposed as an attractive alternative to internalising ligand- and antibody-drug conjugates for the selective delivery of anticancer agents. In this approach, the active drug is released in the extracellular space following a catalytic process and can then enter surrounding cancer cells whatever their membrane specificities, thus offering substantial advantages due to the high heterogeneity of cells in malignant tissues²⁷. β -Glucuronidase is selectively accumulated in the microenvironment of numerous solid tumours^{7, 19-24}, while this enzyme is essentially located inside the cells in healthy tissues. Many glucuronide prodrugs^{5, 6}, possessing a poor ability to cross cell membranes, have been designed to target this malignant specificity for the delivery of anticancer drugs. The potential of this targeting strategy was evaluated *in vivo* on various tumour models, showing the selective activation of the prodrugs at the tumour site²⁸⁻³¹. However, owing to their rapid renal clearance and/or the too low potency of the targeted drug, the glucuronide prodrugs developed so far have to be administered at very high doses to achieve a significant anticancer activity, hampering their transfer to the clinic.

By combining a glucuronide trigger, a self-immolative linker³², the potent MMAE and a maleimide-bearing side chain in a single entity, the molecular assembly 1 (supplementary

Once in the blood stream, prodrug **1** binds selectively to the thiol at the cysteine 34 position of circulating albumin through Michael addition^{15,16}. The presence of albumin on the resulting drug carrier **2** prevents rapid renal elimination while ensuring passive accumulation and retention in malignant tissues due to the anatomical and pathophysiological characteristics of tumour blood vessels^{17,18}. β -Glucuronidase-catalysed hydrolysis of the glycosidic bond triggers the release of the drug via the self-immolative mechanism depicted in Fig. 1. Through this mode of action, the prodrug **1** delivers a potent concentration of MMAE in the tumour microenvironment, thereby producing high antitumour activity without damaging normal tissues.

Since enzymatic hydrolysis of the glucuronide moiety is the key step in the process of drug release, our first aim was to ascertain whether the carbohydrate trigger was still accessible to β -glucuronidase once bound to albumin. For this purpose, glucuronide **1** was incubated with human serum albumin (HSA) at 37°C in order to form the macromolecular assembly **2**. Under these conditions, more than 90 % of **1** were converted in two hours as the result of its rapid binding with the protein (Fig. 2a). Trypsin digestion followed by HPLC/HRMS analysis confirmed the formation of the coupling product **2** with the detection of the HSA peptide fragment including the cysteine 34 linked to **1** (m/z 856.6519 [M+5H]⁺, supplementary information). In the presence of β -glucuronidase, prodrug **2** led to the full release of MMAE in 50 minutes indicating that the glucuronide was readily substrate for the activating enzyme even with the proximity of the bulky albumin (Fig. 2b).

We then examined the antiproliferative activity of glucuronide **1** against human KB, A549, MDA-MB-231 and MIA-PaCa2 tumour cell lines. As a general statement, when incubated in the absence of β -glucuronidase, the prodrug was drastically less toxic than MMAE (Fig. 2c), letting anticipating a better tolerability of **1** compared to the free drug *in vivo*. On the other hand, addition of the enzyme in the culture medium induced a dramatic cytotoxicity which was similar to that recorded for MMAE. As expected, extracellular enzymatic hydrolysis of the glucuronide triggered the efficient release of MMAE that subsequently penetrated through cell membranes to exert its antimitotic action by blocking tubulin polymerisation²⁵.

To confirm the reduced toxicity of our prodrug *in vivo*, we conducted a tolerability study in tumour free Balb/c mice that received a single *i.v.* injection of **1** at doses ranging from 1 to 12 mg/kg. The body weights as well as clinical signs of toxicity were monitored regularly for fifteen days (Fig. 2d). These assays demonstrated that glucuronide **1** was well tolerated up to doses of 8 mg/kg (contains 3.1 mg/kg of MMAE). In contrast, a 0.75 mg/kg dose of MMAE was highly toxic inducing a high rate of death in the animals, consistently with the previous data reported in the literature²⁵. Therefore, the derivatisation of MMAE in the form of prodrug **1** markedly lowered its toxicity allowing at least the 4-fold administration of the lethal dose for the free drug.

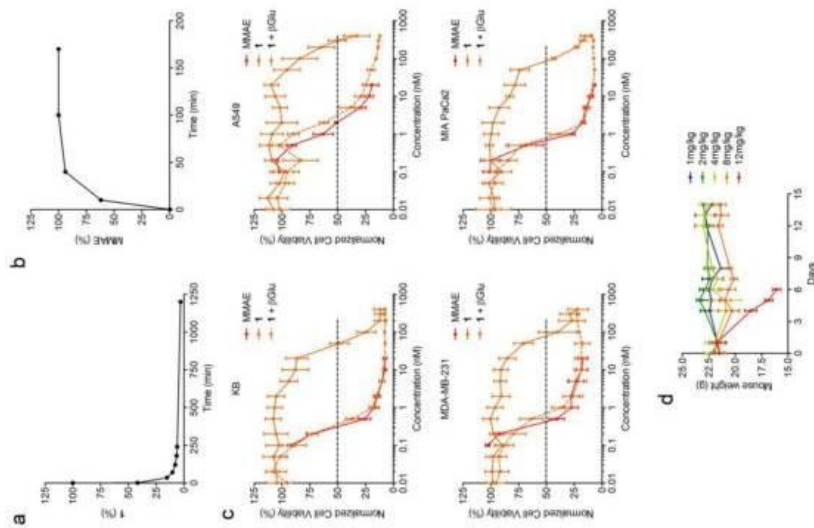


Figure 2 | The glucuronide prodrug **1 binds covalently with HSA and releases efficiently the MMAE in the presence of β -glucuronidase. a.** Disappearance of **1** over the time when placed in the presence of HSA at 37°C. **b.** Kinetics of MMAE release from **2** in the presence of β -glucuronidase. **c.** Antiproliferative activities of MMAE and **1** with or without β -glucuronidase after 3 days of treatment. Each point shows mean \pm s.e.m. from 3 independent experiments in triplicate. **d.** Mean body weights of mice treated with a single *i.v.* injection of **1** at 1, 2, 4, 8 or 12 mg/kg (day 0). Each point shows mean \pm s.e.m. from 3 mice.

(scale bar: 5 mm) of KB xenografts at days 7, 14, 21, and 28 post-implantation when treated with vehicle, MMAE, **1**, **3** and **4** (*i.v.* injection at days 7, 14, 28 and 35). **d**, Tumour growth over the time under therapy with vehicle, MMAE, **1**, **3** and **4**. Each point shows mean \pm s.e.m. from 8 tumour volumes. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$; two-way analysis of variance with Bonferroni post-test. **e**, Mean body weights of each group of mice. Each point shows mean \pm s.e.m. from 8 mice.

We next assessed the antitumour activity of prodrug **1** in Balb/c athymic mice bearing subcutaneous KB mouth epidermal carcinoma xenografts. Indeed, as KB cells overexpressed the folate receptor (FR), this tumour model is highly responsive to folate-conjugates². Thus, it was possible to compare the efficacy of the β -glucuronidase-catalysed drug delivery process in the tumour microenvironment with a well-established internalising approach using the drug delivery system **3**²⁹ (Fig. 3a). Additionally, we tested the glucuronide analogue **4**² that did not include a maleimide functional group with the aim to evaluate the impact of the binding to plasmatic albumin on the efficacy of the tumour targeting. In the initial experiment, the animals received two doses of compounds **1**, **3** or **4** which correspond to the administration of 0.77 mg/kg/injection of MMAE (days 7 and 14 after tumour implantation). The free MMAE was also investigated, while administered at 0.50 mg/kg/injection, corresponding to the maximal dose avoiding a lethal toxicity. On day 21, mice were euthanized and the relative concentration of MMAE released in the tumour from each drug delivery system was quantified. As shown in Fig. 3b, the amount of drug delivered at the tumour site was 3.6, 6 and 25-fold higher following the administration of prodrug **1** than that of MMAE, **3** and **4** respectively. In a second trial on the same animal model, each compound was injected once a week during four weeks and tumour progression was monitored by echography (Fig. 3c). The successive *i.v.* administrations of **1** (0.77 mg/kg/injection MMAE equivalents) were well tolerated without any body weight loss (Fig. 3e) or detectable side effect (supplementary information). Furthermore, treatment with prodrug **1** produced a significant antitumour response which was notably better than that observed with the other tested molecules (Fig. 3d). In accordance with the difference observed for the β -glucuronidase-mediated deposition of MMAE in the tumour (Fig. 3b), prodrug **1** was by far more efficient than the glucuronide analogue **4** that cannot bind covalently to circulating albumin, thus confirming the benefits brought by the linkage to the plasmatic protein. Prodrug **1** also led to superior antitumour efficacy than the folate-drug conjugate **3** while KB xenograft is the tumour model that expresses the highest level of the FR. As the targeting of FR-expressing tumours is of clinical relevance³, this result suggested that the use of β -glucuronidase-responsive albumin-binding prodrugs could be an advantageous alternative to folate-drug conjugates.

As extracellular β -glucuronidase is a hallmark of a wide range of cancers in human^{7,18}, we pursued our investigations by evaluating the therapeutic efficacy of **1** on two different orthotopic tumour models with the aim to verify the versatility of our targeting strategy. To this end, we focused on breast and pancreatic cancers that are two major causes of death worldwide.

Triple-negative breast cancer (TNBC) is a clinically aggressive disease for which there is no targeted chemotherapy available. To explore the potential of prodrug **1** for the treatment of such a malignancy, human mammary MDA-MB-231 TNBC cells were orthotopically (mammary fat pad) transplanted in mice. The animals received *i.v.* injections of glucuronide **1** at 4 mg/kg (1.54 mg/kg equivalents MMAE) weekly for five weeks. Following this protocol, an impressive reduction of tumour volume was observed in all treated animals (Fig. 4a). Moreover, 50% of mice treated with **1** exhibited complete

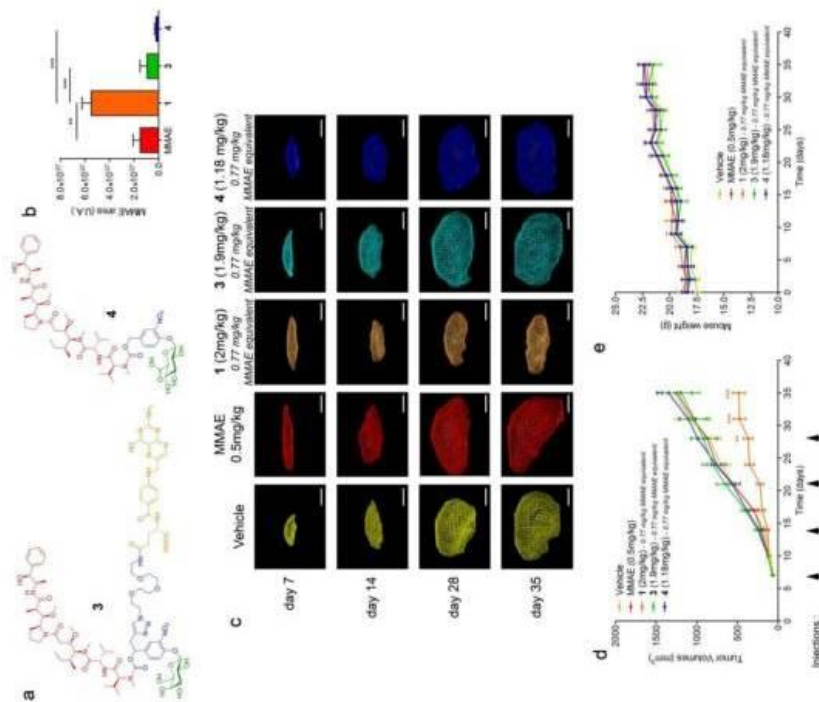


Figure 3 | Antitumour activity of the β -glucuronidase-responsive albumin-binding prodrug **1 in mice with subcutaneous KB xenografts. **a**, Structures of the β -galactosidase-responsive folate-MMAE conjugate **3** and the glucuronide prodrug MMAE **4**. **b**, Relative quantities of MMAE measured at day 21 in KB tumours of mice treated with two *i.v.* injections (days 7 and 14) of free MMAE (0.50 mg/kg/injection), **1**, **3** and **4** (0.77 mg/kg/injection MMAE equivalents). Each bar shows mean \pm s.e.m. from 4 independent tumours. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$; one-way analysis of variance with Bonferroni post-test. **c**, Representative volumes determined by 3D echography imaging**

remission at day 50, as assessed both by echography and bioluminescence imaging (Fig. 4b), without any body weight loss or signs of toxicity (Fig. 4c). In contrast, five systemic administrations of MMAE at 0.5 mg/kg produced a moderate therapeutic effect.

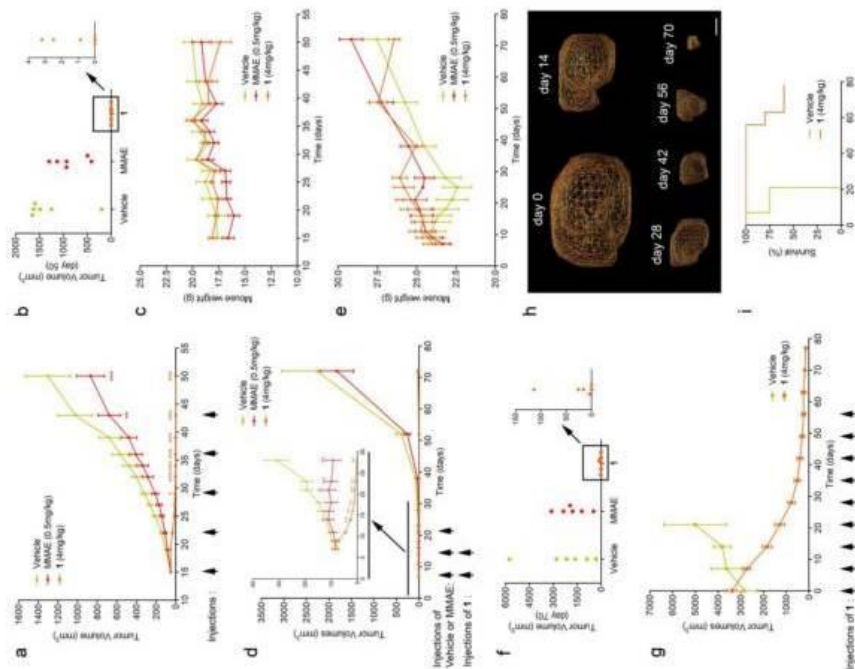


Figure 4 | Antitumour activity of prodrug 1 on MDA-MB-231 and MIA PaCa2 orthotopic models. a, MDA-MB-231 tumour growth inhibition under therapy with vehicle, MMAE and 1. Each point shows mean \pm s.e.m. from 6 tumour volumes. $P < 0.01$ and $***P < 0.001$; two-way analysis of variance with Bonferroni post-test. b, Tumour**

volumes at day 50 of mice bearing MDA-MB-231 xenografts treated with vehicle, MMAE and 1. c, Mean body weights of each group of mice bearing MDA-MB-231 xenografts. Each point shows mean \pm s.e.m. from 6 mice. d, MIA PaCa2 tumour growth inhibition under therapy with vehicle, MMAE and 1. Each point shows mean \pm s.e.m. from 6 tumour volumes. $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$; two-way analysis of variance with Bonferroni post-test. e, Mean body weights of each group of mice bearing MIA PaCa2 xenografts. Each point shows mean \pm s.e.m. from 6 mice. f, Tumour volumes at day 70 of mice bearing MIA PaCa2 xenografts treated with vehicle, MMAE and 1. g, Tumour volumes assessment on highly hypoxic MIA PaCa2 xenografts in mice treated with vehicle and 1. h, Representative volumes determined by 3D echography imaging (scale bar: 5 mm) of highly hypoxic MIA PaCa2 xenografts in mice treated with 1. Each point shows mean \pm s.e.m. from 5 tumour volumes. i, Survival study comparing mice with 2.5-3.5 cm³ orthotopic MIA PaCa2 tumours treated with prodrug 1 or untreated.

We next considered prodrug 1 for the therapy of pancreatic cancer that is the gastrointestinal malignancy with the worst prognosis and a 5-year survival rate of less than 5%. To date, chemotherapy is ineffective against this disease prompting the need of new therapeutic approaches. Within this framework, human MIA PaCa2 cells exhibiting the four most common mutations for pancreatic adenocarcinoma³⁰ were injected in the pancreas of nude mice and tumour growth was examined by 3D echography. Mice bearing intra-pancreatic tumours were treated with two 4 mg/kg doses of the glucuronide prodrug 1. As soon as the first dose was given, tumours started to regress in all animals that received 1 whereas treatment with MMAE (3 x 0.5 mg/kg) only resulted in retardation of tumour growth (Fig. 4d and 4e). Tumour regression continued several days after the second administration of 1 and, outstandingly, 33% of mice were tumour free at day 70 post-implantation as assessed both by echography and bioluminescence imaging (Fig. 4f).

Since pancreatic cancers in human are usually detected at a late stage and characterised by severe tumour hypoxia rendering malignant cells resistant to chemotherapy, we conducted a new trial on mice bearing MIA PaCa2 orthotopic xenografts with sizes ranging from 2.5 to 3.5 cm³. As determined by photoacoustic imaging these tumours displayed strong hypoxia making therefore this model more predictive (supplementary information). In this experiment, mice were treated with prodrug 1 at 4 mg/kg administered weekly for nine weeks. This therapy induced a remarkable antitumour activity with a dramatic reduction of the initial tumour volumes (Fig. 4g and 4h). Survival time was also considerably increased versus untreated mice for which tumour growth led rapidly to death (Fig. 4i). All these data indicate that prodrug 1 is the most efficient therapeutic molecule reported until now for the treatment of pancreatic tumours in relevant preclinical models.

Overall, this study demonstrates that the targeting of the tumour microenvironment by the mean of the β -glucuronidase-responsive albumin-binding prodrug 1 is a selective, efficient and versatile therapeutic strategy. We believe that this approach could be easily adapted to the selective release of other highly potent anticancer agents and employed in combination with internalising drug delivery systems in a targeted poly-chemotherapy. The efficacy observed in pre-clinical models offers a new hope for the chemotherapy of solid tumours, especially for the treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma for which there is an urgent need of novel therapeutic strategies.

1. Chari, R. V. J., Miller, M. L. & Widdison W. C. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 3796-3827 (2014).

- with thiol-binding doxorubicin derivatives: improved efficacy of an acid-sensitive doxorubicin derivative with specific albumin-binding properties compared to that of the parent compound. *J. Med. Chem.* **45**, 5523-5533 (2002).
17. Elsadck, B. & Kratz, F. Impact of albumin on drug delivery – New applications on the horizon. *J. Control. Release* **157**, 4-28 (2012).
18. Fang, J., Nakamura, H. & Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Delivery Rev.* **63**, 136-151 (2011).
19. Fishman, W. H. & Anlyan A. J. Comparison of the beta-glucuronidase activity of normal, tumor, and lymph node tissues of surgical patients. *Science* **106**, 66-67 (1947).
20. Boyland, E., Wallace, D. M. & Williams D. C. The activity of the enzymes sulphatase and β -glucuronidase in the urine, serum and bladder tissue. *Br. J. Cancer* **9**, 62-79 (1955).
21. Albin, N., Massaad, L., Toussaint, C., Mathieu, M. C., Morizet, J., Parise, O., Gouyette, A. & Chabot, G. G. Main drug-metabolizing enzyme-systems in human breast-tumors and peritumoral tissues. *Cancer Res.* **53**, 3541-3546 (1993).
22. Sperker, B., Werner, U., Mürdler, T. E., Tekkaya, C., Fritz, P., Wacke, R., Adam, U., Gerken, M., Drewelow, B. & Kroemer, H. K. Expression and function of β -glucuronidase in pancreatic cancer: potential role in drug targeting. *Nanogy Schmiedelebergs Arch. Pharmacol.* **362**, 110-115 (2000).
23. Nygren, C., von Holst, H., Mansson, J. E. & Fredman, P. Increased activity of lysosomal glycohydrolases in glioma tissue and surrounding areas from human brain. *Acta Neurochir.* **139**, 146-150 (1997).
24. Bosslet, K., Czech, J. & Hoffmann, D. A novel one-step tumor-selective prodrug activation system. *Tumor Targeting* **1**, 45-50 (1995).
25. Doronina, S. O., Toki, B. E., Torgov, M. Y., Mendelsohn, B. A., Cerveny, C. G., Chace, D. F., DeBlanc, R. L., Gearing, R. P., Bovee, T. D., Siegall, C. B., Francisco, J. A., Wahl, A. F., Meyer, D. L. & Senter, P. D. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat. Biotechnol.* **21**, 778-784 (2003).
26. Rooseboom, M., Commandeur, J. N. M. & Vermeulen, N. P. E. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharm. Rev.* **56**, 53-102 (2004).
27. Marusyk, A., Almendro, V. & Polyak, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* **12**, 323-334 (2012).
28. Alouane, A., Labuère, R., Le Saux, T., Schmidt, F. & Jullien, L. Self-immolative spacers: kinetics aspects, structure-property relationships, and applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 7492-7509 (2015).
29. Legigan, T., Clarhaut, J., Tranoy-Opalinski, I., Monvoisin, A., Renoux, B., Thomas, M., Le Pape, A., Lerondel S. & Papot S. The first generation of β -galactosidase-responsive prodrugs designed for the selective treatment of solid tumors in prodrug monotherapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 11606-11610 (2012).
30. Deer, E. L., González-Hernández, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Seafie, C. L., Firpo, M. A. & Mulvihill, S. J. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* **39**, 425-435 (2010).
2. Srinivasaro, M., Galliford, C. V. & Low P. S. Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 203-219 (2015).
3. Senter, P. D. & Stevers, E. L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphomas. *Nat. Biotechnol.* **30**, 631-637 (2012).
4. Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I. E., Welslau, M., Baselga, J., Pegram, M., Oh, D.-Y., Déras, V., Guardino, E., Fang, L., Lu, M. W., Olsen, S. & Blackwell, K. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1783-1791 (2012).
5. de Graaf, M., Boven, E., Scheeren, H. W., Haisma, H. J. & Pinedo H. M. Beta-glucuronidase-mediated drug release. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 1391-1403 (2002).
6. Tranoy-Opalinski, I., Legigan, T., Barat, R., Clarhaut, J., Thomas, M., Renoux, B. & Papot, S. β -Glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: an update. *Eur. J. Med. Chem.* **74**, 302-313 (2014).
7. Bosslet, K., Straub, R., Blumrich, M., Czech, J., Gerken, M., Sperker, B., Kroemer, H., K., Gesson, J.-P., Koch, M. & Mommeret, C. Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. *Cancer Res.* **58**, 1195-1201 (1998).
8. Houba, P. H., Boven, E., van der Meulen-Mulleman, I. H., Leenders, R. G., Scheeren, J. W., Pinedo, H. M. & Haisma, H. J. A novel doxorubicin-glucuronide prodrug DOX-GA3 for tumour-selective chemotherapy: distribution and efficacy in experimental human ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **84**, 550-557 (2001).
9. Prijovich, Z. M., Chen, B., Leu, Y. L., Chern, J. W. & Roffler, S. R. Anti-tumour activity and toxicity of the new prodrug 9-aminocamptothecin glucuronide (9ACG) in mice. *Br. J. Cancer* **86**, 1634-1638 (2002).
10. Juan, T. Y., Roffler, S. R., Hou, H. S., Huang, S. M., Chen, K. C., Leu, Y. L., Prijovich, Z. M., Yu, C. P., Wu, C. C., Sun, G. H. & Cha, T. L. Antitangiogenesis targeting tumor microenvironment synergizes glucuronide prodrug antitumor activity. *Clin. Cancer Res.* **15**, 4600-4611 (2009).
11. Chen, K. C., Schmueck, K., Tietze, L. F. & Roffler, S. R. Selective cancer therapy by extracellular activation of a highly potent glycosidic doxorubicin analogue. *Mol. Pharmacol.* **10**, 1773-1782 (2013).
12. Legigan, T., Clarhaut, J., Renoux, B., Tranoy-Opalinski, I., Monvoisin, A., Jayle, C., Alsaraaf, J., Thomas, M. & Papot, S. Synthesis and biological evaluations of a monomethylauristatin E glucuronide prodrug for selective cancer chemotherapy. *Eur. J. Med. Chem.* **67**, 75-80 (2013).
13. Balbous, A., Renoux, B., Cortes, U., Milin, S., Guilloteau, K., Legigan, T., Rivet, P., Boissonnade, O., Martin, S., Triptana, C., Wager, M., Bensadoun, R.-J., Papot, S. & Karayan-Tapon, L. Selective release of a cyclophosphamide glucuronide prodrug towards stem-like cancer cell inhibition in glioblastoma. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 2159-2169 (2014).
14. Legigan, T., Clarhaut, J., Renoux, B., Tranoy-Opalinski, I., Monvoisin, A., Berjeaud, J.-M., Guilhot, F. & Papot, S. Synthesis and antitumor efficacy of a β -glucuronidase-responsive albumin-binding prodrug of doxorubicin. *J. Med. Chem.* **55**, 4516-4520 (2012).
15. Kratz, F., Müller-Driver, R., Hofmann, I., Dreves, J. & Unger, C. A novel macromolecular prodrug concept exploiting endogenous serum albumin as a drug carrier for cancer chemotherapy. *J. Med. Chem.* **43**, 1253-1256 (2000).
16. Kratz, F., Warnecke, A., Scheuermann, K., Stockmar, C., Schwab, J., Lazar, P., Drückes, P., Esser, N., Dreves, J., Rognan, D., Bissantz, C., Hinderling, C., Folkers, G., Fichtner I. & Unger, C. Probing the cysteine-34 position of endogenous serum albumin

METHODS

Chemicals: Prodrug **1** was synthesized following a multistep procedure, characterized by NMR and HRMS, and purified by preparative-reverse phase HPLC (Supplementary Information). Prodrugs **3**, **39** and **41** were prepared according to the literature. Monomethylauristatin E (MMAE) was purchased from ChiralStar.

Trypsin-digestion experiments: Prodrug **1** (0.33 mg mL^{-1}) was incubated at 37°C in Human Serum Albumin (HSA) 5 % solution (purchased from Octapharma). After 3 hours under these conditions, the mixture was diluted 1:3 using an aqueous solution of 50 mM of ammonium bicarbonate and 10 mM of *tris*-(hydroxymethyl)aminomethane (pH 8.5). The resulting solution was successively treated with 10 μL of a 15.4 mg mL^{-1} DL-dithiothreitol solution at 60°C for 60 min and with 10 μL of a 44.4 mg mL^{-1} iodoacetamide solution at room temperature for 45 min in the dark. The mixture was then digested overnight using a 1:6 (w/w) trypsin-to-protein ratio. Digestion was stopped with formic acid at 0.4% final concentration and sample was analyzed by HPLC/HRMS.

Enzymatic hydrolysis: Prodrug **1** (0.33 mg mL^{-1}) was incubated at 37°C in Human Serum Albumin (HSA) 5 % solution (purchased from Octapharma) for 3 hours to form compound **2**. The mixture was diluted 1:3 using 0.02 M phosphate buffer (pH 7) and *Escherichia coli* β -glucuronidase (133 U/mL; purchased from Sigma Aldrich) was added at 37°C . The release of MMAE along the time was followed by HPLC/HRMS.

Cells: MDA-MB-231-luc (D3H2LN) human breast cancer cell line was obtained from Perkin Elmer. MIA PaCa2-human pancreatic cell line was obtained from the American Type Culture Collection and stably transfected to express luciferase gene by Trichet's team, INSERM Nantes, France. A549 human lung carcinoma and KB human oral epithelial cancer cell lines were obtained from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). KB cells were stably transfected to express luciferase gene as previously described⁴⁶. All cells were grown in RPMI 1640-Glutamax supplemented by 10 % foetal bovine serum and 1 % Penicillin/Streptomycin in a humidified incubator at 37°C and 5 % CO_2 .

Cell viability: The Cell Proliferation Kit II XTT was used to measure cell viability. 2×10^3 MDA-MB-231-luc or A549 and 4×10^3 KB-luc or MIA PaCa2-luc cells/well were seeded in a 96-well plate, in RPMI 1640-Glutamax supplemented by 10 % foetal bovine serum and 1 % Penicillin/Streptomycin. Twenty-four hours later, cells were exposed to MMAE or **1** in presence or absence of *Escherichia coli* β -glucuronidase (40u/well). After 3 days of treatment, 25 μL of the XTT labelling mixture were added per well. After additional 4 h of incubation, absorbance was determined at 490 nm on a Berthold Mithras 96-well microplate reader. Experiments were performed 3 times in triplicate. Data were analysed with GraphPad software. For each compound, inhibitory concentration values (IC_{50}) were determined by the software for A549, KB-luc, MIA PaCa2-luc and MDA-MB-231-luc cells.

Experimental in vivo procedures: Female, 6 to 8 week-old Nude mice were purchased from Charles River Laboratories. Mice were acclimated for 7 days in the laboratory before experimentation and were maintained in sterilized filter-stopped cages inside a controlled ventilated rack and had access to food and water *ad libitum*. All experimental procedures involving animals ($n^{\circ}1031$ for MDA-MB-231-luc, $n^{\circ}1065$ for KB-luc and 1070 for MIA PaCa2-luc) were validated by the regional ethical comity (CECCO $n^{\circ}3$) and carried out in accordance with the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry (decree 2013-118) and of the European Communities Council Directive (2010/63/UE). All along the studies, mice were examined at least 3 times a week for clinical signs, distress, decreased physical activity and body weight as indicators of the health status.

Maximal Tolerated Dose studies (MTD): MTD studies were performed on BALB/c Nude mice ($n = 3$). A single administration of prodrug **1** (1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, 8 mg/kg or 12 mg/kg) was performed by intravenous injection. Toxicity of **1** was evaluated by the maximum weight loss or gain, expressed as a percentage of the initial weight of the animals. A dose was considered as toxic if the relative weight loss was greater than 20 % of initial weight.

Bioluminescence imaging (BLI): BLI of mice was performed before the first treatment only to constitute homogenous groups of animals. Since this modality is strictly dependent upon ATP and oxygen, it cannot be used for assessment of proliferation in hypoxic tumours. So only ultrasound imaging was relevant for such a purpose. However, since BLI is the most sensitive modality to detect tumour cells *in vivo*, it was implemented at the end of studies to confirm the actual remission when tumour volumes became undetectable by echography. BLI images were obtained from an IVIS-Lumina II imaging system (Perkin Elmer) generating a pseudocoloured image representing light intensity and superimposed over a greyscale reference image. Each mouse was intraperitoneally injected with luciferin potassium salt at a dose of 100 mg/kg (purchased from Promega). Mice anesthetized by 1.5 % isoflurane were placed on a thermostatically controlled heating pad (37°C) during imaging. Acquisition binning and duration were set depending on tumour activity. Signal intensity was quantified as the total flux (photons/seconds) within ROIs drawn manually around the tumour area using Living Image 4.4 software (Perkin Elmer). For pancreatic tumours imaging, mice were placed on their right flanks. For breast tumours imaging, mice were placed in a supine position. For KB tumours imaging, mice were placed in a prone position. The thresholds of *in vivo* detection were better than 10^3 cells for breast tumours and around $2 \cdot 10^4$ cells for pancreatic tumours respectively.

Ultrasound imaging: Mice were anesthetized by inhalation of 1.5 % isoflurane with air and placed on a thermostatically controlled heating pad with the paws taped over the ECG electrodes attached to the table. Respiratory gating, derived from ECG, allows avoiding artefacts due to respiratory movements of the animal. Temperature of the animals was recorded with an internal temperature probe. An aqueous warmed ultrasonic gel (purchased from Suprangel) was applied to the skin overlying the skin to optimize the visualization of internal organs. Tumours were imaged with the Vevo LAZR system (FUJIFILM Visualsonics Inc.). A transducer with central frequency at 40 MHz, providing axial resolution of 40 μm with a 1.4×15 mm field of view, was used for imaging of smaller tumours. A transducer with central frequency at 21 MHz, providing axial resolution of 75 μm with a 23.1×36 mm field of view, was used for larger tumour imaging. 3D scans of ultrasound image were recorded digitally and reviewed. The tumour area in a coronal plane was measured by manually delineating margins using Vevo LABI.7.2 software (FUJIFILM Visualsonics Inc.). The software then calculated the corresponding volume from each coronal slice, the threshold of detection ranging from 0.5 mm^3 to 1.5 mm^3 depending upon the tumour location.

Quantification of MMAE in KB xenografts: The relative quantity of MMAE was determined in KB tumour xenografts from mice ($n = 4$) treated with vehicle, MMAE (0.5 mg/kg), compound **1** (2 mg/kg), compound **3** (1.9 mg/kg or compound **4** (1.18 mg/kg). Vehicle treated mice were used as controls, 40 mg of tumours were lysed using a micropestle in 0.5 mL of 0.3 M sodium acetate and centrifuged for 5 min at 15000 xg. The supernatant was transferred in 1 mL of cold ethanol and incubated 1 h at -20°C . After centrifugation at 17000 xg and 4°C for 20 min, 0.5 mL of acetonitrile-methanol (2:1 v/v) were added to the supernatant and incubated 1 h at -20°C . The sample was then centrifuged for 5 min at 3000 xg. The supernatant was transferred to 2 mL microcentrifuge tubes and centrifuged again at

17 000 \times g and 4 °C for 20 min. Supernatants were analysed by HPLC/HRMS on an Accela HPLC system coupled to a hybrid high resolution mass spectrometer Q-Exactive. 1 mL of sample was injected and desalted by the mean of dual trap columns at a flow rate of 0.5 mL \cdot min⁻¹ for 2 min with water-0.1% formic acid as the loading eluent. Trapped analytes were then back flushed onto the analytical column (Acclaim C18 column, 250 x 4.6 mm, 5 μ m, 120 Å) at 30°C. They were separated using a linear gradient composed of A (0.1% formic acid in water) and B (0.1% formic acid in CH₃CN), starting from 20% of B and reaching 100% of B within 30 min. Target selected ion monitoring data dependent-MS/MS (t-SIM-ddMS/MS) (ESI⁺) was used to quantify MMAE in every extract. Targeted MS parameters were optimized as following: resolution of 70000 for precursor ion and 17500 for product ions, AGC target of 10⁵ (precursor ion) and 2.10⁵ (product ions), max IT of 100 ms (precursor ion) and 50 ms (product ions), MSX count 1, and isolation window of 2.0 m/z. The normalized collision energy was set at 35%. The precursor ion selected for MMAE identification was [M+H]⁺ m/z 718.509. The product ions m/z 86.097, 134.096 and 154.123 were selected to confirm MMAE identification. Peaks integration and MS spectra acquisition were performed with Thermo Xcalibur™ Qualitative Browser. A mass tolerance of 10 ppm was applied for the extraction of target product ions. The relative area of MMAE peak was determined in the chromatogram of every extract.

In vivo efficacy on subcutaneous oral epithelial tumours: Human oral cancer xenografts from the KB epithelial cancer cell line were established in BALB/c Nude mice by subcutaneous implantation (n = 6). Mice were anaesthetized by inhalation of 1.5% isoflurane with air. The inoculum (1x10⁶ tumor cells in 150 μ L of a 50:50 Matrigel/PBS mix) was injected in the dorsal flanks of animals. Mice received treatment 7 days after tumour inductions. Five groups were designed and received once a week intravenous injections of a 5% DMSO and 95% PBS mix (vehicle group), 0.5 mg/kg of free MMAE, 2 mg/kg of compound **1**, 1.9 mg/kg of compound **3** or 1.18 mg/kg of compound **4** during 4 weeks. Tumour volumes were determined by ultrasound imaging twice a week during 7 weeks after tumour implantation.

In vivo efficacy on orthotopic models: Considering the obvious ethical issues, evaluation of new therapies and the understanding of biological mechanisms must be obtained from animal models. These animal studies correspond to the stage of proof of concept for the molecules which could be tested in clinical phase I and II. A key step in this preclinical process is to use a suitable model taking into account the clinical reality. A lack of clinical reality leads to a significant lack of predictability and a risky extrapolation of the results obtained *in vivo* in humans. It is necessary, to evaluate the efficiency of anti-tumour therapies, to perform these studies on orthotopic models. Orthotopic models have the advantage of being more predictive of tumour development in humans. The tumours growing in the original primary tumour tissue, these models are much closer to clinical pathological situation. Given the complexity of the processes involved, including interactions with the tumour microenvironment, no reliable method of replacement is available.

In vivo efficacy on orthotopic breast tumours: Human breast cancer xenografts from the MDA-MB-231-luc breast cancer cell line were established in BALB/c Nude mice by orthotopic implantation. Mice were anaesthetized by inhalation of 1.5% isoflurane with air. The inoculum (2x10⁶ tumour cells in 100 μ L PBS) was injected in the mammary fat pads of animals. Mice received treatment 15 days after tumour implantations. Three groups were designed and received once a week intravenous injections of a 5% DMSO and 95% PBS mix (vehicle group), 0.5 mg/kg of free MMAE or 4 mg/kg of compound **1** during 5 weeks (n = 6).

Tumour volumes were determined by ultrasound imaging three times a week during 5 weeks after treatment initiation then weekly during 3 additional weeks.

In vivo efficacy on orthotopic pancreatic tumours: Human pancreatic cancer xenografts from the pancreatic cancer cell line MIA PaCa2-luc were established in Swiss Nude mice by orthotopic implantation. Mice were anaesthetized by inhalation of 1.5% isoflurane with air. Abdomens of mice were prepared with a solution of povidone iodine (Betadine). A small transverse incision was made in the left lateral flank through the skin and peritoneum. The tip of pancreatic tail was gently grasped and pancreas/spleen were externalized in a lateral direction to be fully exposed. The needle was inserted into the tail of pancreas and positioned in the pancreatic head region. The inoculum (2x10⁶ MIA PaCa2-luc cells in 10 μ L of PBS) was slowly injected using a 27-gauge needle of a Hamilton syringe. The spleen was then returned to the appropriate position in abdomen, peritoneum closed with 7-0 sutures and skin closed with 4-0 sutures.

Treatment of pancreatic tumours: Mice received treatment 7 days after orthotopic tumour xenografts. Four groups were designed and received once a week intravenous injections of a 5% DMSO and 95% PBS mix (vehicle group), 0.5 mg/kg of free MMAE during 3 weeks or 4 mg/kg of compound **1** during 2 weeks (n = 6). Tumour volumes were determined by ultrasound imaging three times a week during 3 weeks after treatment initiation then weekly during 7 additional weeks.

Treatment of pancreatic tumours with 2.5-3.5 cm³ initial volume: Mice received treatment 14 weeks after tumour xenografts. Intravenous injections were performed once a week during 9 weeks with a 4 mg/kg dose of compound **1** (n = 5). Tumour volumes were determined by ultrasound imaging weekly during 12 weeks after treatment initiation.

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors thank CNRS, La Ligue Nationale contre le Cancer (Comités Vienne and Deux-Sèvres), Sport et Collection and Agence Nationale de la Recherche (ARN), Programme Blanc-SIMI 7, ProTarget for financial support of this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS: B.R. synthesised, purified and characterised the glucuronide prodrugs and carried out enzymatic reactions. F.R. designed, conducted *in vivo* studies and analysed the data. T.L. and J.A. developed early versions of the glucuronide prodrugs. I.T.O. prepared the folate-drug conjugate. B.E. undertook trypsin-digestion experiments. P.P. conducted HPLC/HRMS experiments and analysed the data. S.L. and A.L.P. designed and supervised *in vivo* experiments. E.P. carried out *in vitro* biological experiments. J.C. supervised *in vitro* biological experiments and analysed the data. S.P. designed the study and wrote the manuscript.

* These authors contributed equally to this work.

AUTHOR AFFILIATIONS: Brigitte Renoux,^[a] Florian Raes,^[b] Thibaut Legigan,^[a] Elodie Péraudou,^[c, d] Balkis Eddih,^[e] Pauline Poinot,^[e] Isabelle Tranoy-Opalinski,^[a] Jérôme Alisarraf,^[a] Stéphanie Lerondel,^[b] Alain Le Pape,^[b] Jonathan Clarhaut,^[d, e] and Sébastien Papot.^[a]

^[a] Institut de Chimie des Milieux et des Matériaux de Poitiers (IC2MP), Université de Poitiers, CNRS, groupe "Systèmes Moléculaires Programmés", 4 rue Michel Brunet, TSA 51106, F-86073 Poitiers, France.

^[b] UPS n°44 PHENOMIN TADM-CIPA, CNRS, 3B rue de la Férolière, F-45071 Orléans, France.

^[c] Université de Poitiers, CNRS ERL 7368, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, F-86073 Poitiers, France.

^[d] CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, CS 90577, F-86021 Poitiers, France.

^[e] Institut de Chimie des Milieux et des Matériaux de Poitiers (IC2MP), Université de Poitiers, CNRS, Equipe Eau, Géochimie Organique, Santé (EGS), 4 rue Michel Brunet, TSA 51106, F-86073 Poitiers, France.

Annexe 9 : Référentiel de prise en charge du Ganglion Sentinelle

Indications

Dans les carcinomes canaux in situ

- La procédure sentinelle est proposée dans les situations suivantes :
 - en cas d'indication de mastectomie
 - en cas de présentation nodulaire
 - en cas de suspicion de microinfiltration à la biopsie préopératoire
 - en cas d'exérèse étendue nécessitant un geste d'oncoplastie.
- En cas d'échec d'identification du ganglion sentinelle dans les situations précédentes, s'abstenir de curage d'emblée.

Dans les cancers infiltrants

- La procédure sentinelle est indiquée en cas de cancer infiltrant, histologiquement prouvé, sans adénopathie axillaire palpable, ≤ 5 cm, unifocale.
- Les indications peuvent être élargies aux situations suivantes :
 - en cas de ganglion axillaire palpable mobile (N1) après une échographie axillaire éventuellement complétée par une cytoponction ou une microbiopsie ganglionnaire confirmant l'absence d'atteinte ganglionnaire
 - en cas de tumeurs bifocales bénéficiant d'un traitement conservateur (bifocaux de proximité)
 - en situation néo-adjuvante : ganglion sentinelle possible en pré-chimiothérapie et exclusivement dans le cadre d'essai contrôlé en post-chimiothérapie
 - après chirurgie tumorale préalable, par technique combinée avec injection de bleu sur le site opératoire.

Résultats pour les cancers infiltrants

- L'échec de détection du ganglion sentinelle impose l'indication d'un curage axillaire.
- Tout ganglion dur, suspect à la palpation systématique du creux axillaire doit être enlevé.
- Un curage axillaire doit être réalisé d'emblée dans les situations suivantes :
 - N1 sauf si une échographie axillaire complétée par une cytoponction ou une microbiopsie ganglionnaire négative confirme l'absence d'atteinte ganglionnaire
 - T3
 - T4
 - cancers du sein multifocaux (sauf si le risque ganglionnaire est très faible).
- L'examen extemporané est une option pendant la réalisation du ganglion sentinelle.

Pour les équipes réalisant un examen extemporané, un curage axillaire sera réalisé en cas de ganglion sentinelle positif.

Curage axillaire complémentaire

- En dehors de ces situations, l'indication d'un curage axillaire complémentaire peut être modulée en fonction du degré d'envahissement de ce GS :
 - en cas de **cellules isolées pN0(i+)** : pas de curage systématique après validation en RCP.
 - en cas de **GS micrométastatique pN1(mic)** : un curage axillaire complémentaire doit être évité si :
 - T1-2 et traitement conservateur *in sano* et pas plus de 2 GS micrométastatiques et pas de rupture capsulaire ni de conglomérat ganglionnaire et radiothérapie du sein et traitement adjuvant systémique (chimiothérapie et/ou hormonothérapie)
 - les informations obtenues par un curage axillaire complémentaire ne modifieraient pas les indications de traitements adjuvants
 - après validation par la RCP.

Une information éclairée de la patiente est nécessaire. Cette attitude doit être présentée à la patiente comme une alternative au curage complémentaire en l'informant des limites actuelles de nos connaissances.

- en cas de **GS macrométastatique** : un curage axillaire complémentaire reste aujourd'hui la règle, mais l'abstention peut se discuter si :
 - 1 seul GS macrométastatique et pas de rupture capsulaire ni de conglomérat ganglionnaire et ≥ 3 GS prélevés et traitement conservateur *in sano* du sein et traitement adjuvant systémique (chimiothérapie et/ou hormonothérapie) et radiothérapie
 - les informations obtenues par un curage axillaire complémentaire ne modifieraient pas les indications de traitements adjuvants
 - décision validée par la RCP.

Une information éclairée de la patiente est nécessaire. Cette attitude doit être présentée à la patiente comme une alternative au curage complémentaire en l'informant des limites actuelles de nos connaissances.

- en cas de **chimiothérapie néo-adjuvante** : curage systématique hors essai thérapeutique.

Surveillance

- Le creux axillaire doit être surveillé avec la même périodicité que le sein.

Dose :

- 50 Gy équivalent
- 1,8 à 2 Gy par séance, 5 séances par semaine
- photons et/ou électrons.

Aires ganglionnaires

- pN- et tumeur interne** : irradiation CMI et sus-claviculaire (Cf. ci-dessous) s'envisage uniquement si pT > 2 cm et au moins 1 des critères suivants sont présents :
 - âge < 40 ans
 - grade 3
 - présence d'embolies
 - tumeur triple négative.
- pN- et tumeur externe** : à proposer pour les T3 T4 et à discuter si multiples facteurs de risques.
- pN+ macrométastase** : irradiation CMI et sus-claviculaire.

Chaîne mammaire interne (CMI)

- 45 à 50 Gy équivalent.
- Mixage systématique alterné par photons et électrons.
- Les indications d'irradiation de la CMI restent débattues depuis de nombreuses années. Trois essais randomisés (français, de l'EOIRC et canadien) ont tenté de répondre à cette question. Un seul a été publié et les deux autres ont été présentés en communication orale. Les critères d'inclusion ne sont pas identiques pour les 3 essais. L'essai français a inclus 1334 patientes traitées par mastectomie, toutes pN+ ou pN0 mais avec une tumeur centrale ou interne. Les taux de survie à 10 ans ont été de 59,3 % pour les patientes non irradiées (mais traitées au niveau de la paroi et des régions sus- et sous-claviculaires) et de 62,6 % pour celles ayant reçu en plus une irradiation de la CMI ($p=0,8$). Cet essai n'a donc pas montré de bénéfice en survie, mais il était sous-dimensionné pour évaluer précisément ce point. Les essais de l'EOIRC et MA-20 (Canada) ont inclus respectivement 4004 et 1832 patientes et font apparaître pour les deux, un bénéfice de 1,6 % en survie globale.
- A l'heure actuelle, il est encore difficile de définir le sous-groupe de patientes pouvant bénéficier réellement de l'irradiation de la CMI. D'après la récente revue, il s'agirait des patientes avec envahissement ganglionnaire axillaire (en particulier pN > 3), et/ou avec une tumeur centrale avec des critères d'agressivité associés (femme jeune, grade SBR3, récepteurs négatifs, embolies vasculaires).
- Dans tous les cas, une dosimétrie optimisée est indispensable de sorte à minimiser la dose à l'aire cardiaque et éviter ainsi la toxicité cardiaque à long terme observée dans plusieurs études anciennes avec des techniques inappropriées.

Irradiation sus-claviculaire

- 45 à 50 Gy.
- Mixage photons et électrons ou photons seuls.

Champ plus ou moins large selon qu'on inclut ou pas le 3^{ème} étage de Berg (région sous-claviculaire/apex de l'aisselle) en fonction de l'atteinte ganglionnaire axillaire (et/ou du nombre de ganglions prélevés).

Irradiation axillaire

- 50 Gy équivalent, photons.
- Indications rares à discuter en RCP en cas d'absence de curage, de curage insuffisant ou d'envahissement massif de l'aisselle.
- Option : en cas de ganglion sentinelle positif, possibilité de ne pas faire de curage complémentaire au profit d'une irradiation : discussion en RCP.

Proposition de conduite à tenir après ganglion sentinelle positif

- pN0i+**
 - pas de curage
 - pas de radiothérapie ganglionnaire
 - pas de modifications des tangentiels.
- pNmic et curage réalisé**
 - si traitement conservateur :
 - radiothérapie par tangentiels standards
 - radiothérapie des aires ganglionnaires : à discuter en RCP si présence d'au moins 1 facteur : triple négative, embolies, grade 3, taille T > 2 cm, âge < 40 ans.
 - mastectomie totale : radiothérapie de la paroi et des aires ganglionnaires (sus-claviculaire, CMI \pm) selon la présence d'un facteur de risque (idem traitement conservateur).
 - si traitement conservateur :
 - radiothérapie par tangentiels « élargis »
 - + radiothérapie des aires ganglionnaires (CMI, sus-claviculaire \pm axillaire) si présence d'au moins 1 facteur : triple négative, embolies, grade 3, taille T > 2 cm, âge < 40 ans \pm ratio GS+/GS prélevés.
 - mastectomie totale : radiothérapie de la paroi et des aires ganglionnaires (sus-claviculaire, CMI \pm axillaire) selon la présence d'un facteur de risque (idem traitement conservateur).
- pN1 et curage** : radiothérapie standard (sein ou paroi) et aires ganglionnaires sus-claviculaire \pm CMI.
- pN1 et pas de curage** : radiothérapie axillo-sus-claviculaire \pm CMI.

Minimally invaded sentinel lymph node model for the development of intraoperative infrared fluorescence imaging

Badiane, Ségolène, Mousseau, Raes Florian¹, Sobilo Julien², Naskumarajah Shanuja², Lerondel Stéphanie², Le Pape Alain²

¹UPR des Sciences de la Santé, Université Gaston BERGER - Saint-Louis, Sénégal
²Centre for Small Animal Imaging, TAAM-CIPA, CNRS UPS44, Orléans, France

ABSTRACT

Background

In this study we implemented an axillary SLN invasion model to develop highly sensitive imaging strategies enabling detection of a very small amount of tumor cells. A highly diffusible molecular probe targeting $\alpha\beta 3$ and $\alpha\upsilon\beta 5$ integrins was investigated either via IV or loco-regional injections. We additionally documented the potential interferences of this Near Infrared Fluorescence Probe with Blue Patente V and ICG dyes routinely used to facilitate lymph node detection during surgery.

Methods

The human mammary adenocarcinoma MDA-MB-231-luc model was injected into the forepaw of nude female rats to obtain a controlled invasion of the axillary LN. Thanks to its high sensitivity, BU was selected to achieve *in vivo* quantitation of tumor cells in SLNs and determine eligible animals for the study. NIRF of integrins was performed at 680nm both *in vivo* and *ex vivo* using spectral unmixing to suppress auto-fluorescence signal and preserve sensitivity.

Results

In vivo BU was quite reliable in estimating discrete invasion by cancer cells in the LN with thresholds of detection and quantitation of about 500 and 1500 cells respectively. For fluorescence at 680nm, *in vivo* imaging is not suitable to detect micro-invasion, but *ex vivo* fluorescence with spectral unmixing of SLNs confirmed the presence of a tumor burden as low as 1500 cells expressing $\alpha\beta 3/\alpha\upsilon\beta 5$ integrins.

Conclusion

Targeting few tumor cells inside a micro-invaded sentinel lymph node by molecular probes is not sensitive enough to provide direct *in vivo* or peroperative imaging. At the time NIRF is performed on the excised specimen, high sensitivity imaging associated with spectral unmixing allowed such detection within less than 1 minute of examination.

Keywords

Sentinel Lymph Node; Near Infrared Fluorescence Imaging; Photoacoustic Imaging; Molecular Imaging

INTRODUCTION

From the primary tumor, at the time tumor cells disseminate via lymph ducts, they accumulate in the first drainage site which is named the Sentinel Lymph Node (SLN). The interest in exploring the sentinel lymph node is to obtain information on the tumor invasion stage [1], because the invasion of SLNs by metastatic tumor is the major prognostic factor for patients with malignant tumors of epithelial origin [2]. In the clinical practice, the pathological examination of the excised specimen remains the gold standard for cancer confirmation. Apart from expensive fast molecular biology tests [3-4], routine histopathology examinations require 4-7 days to detect minimal invasion and so does not allow the immediate assessment of the surgical outcome [5]. Positive micro-invasion of SLN in patients is relatively rare [6,7] and the management of positive SLN in breast cancer

has currently been revised. Most of the other SLN examinations are considered for gastric [8,9], cervical, head and neck cancers [10] and melanoma [1]. Imaging strategies could provide information on the tumor invasion status faster than histopathology techniques. Nowadays, many different imaging agents exist dedicated to the localization of LNs such as Blue Patente V (BPV) for visual direct observation or ICG (IndocyanineGreen) for fluorescence peroperative imaging [11,12]. For the imaging of invasion, labeled dedicated monoclonal antibodies (MAbs) and RGD mimetic agents for targeting $\alpha\beta 3$ and $\alpha\upsilon\beta 5$ integrins have been identified as efficient probes for *in vivo* imaging (PET, SPECT, MRI, NIRF). Targeting integrins from both tumor cells and tumor-related angiogenesis thanks to low molecular weight highly diffusible probes should theoretically contribute to significantly increase the detection's sensitivity [13]. Among imaging modalities for such probes, Near Infrared Fluorescence Imaging (NIRF) is used more and more to investigate real-time peroperative visualization of tumors and SLNs [10,14]. In this study, we performed preclinical investigations about assessment of tumor micro-invasion in a rat model of SLN. For such a purpose we considered Bioluminescence Imaging (BLI) thanks to its very high sensitivity detecting a tiny number of tumor cells in order to select animals with a predefined SLN micro-invasion status. We then explored the ability of integrins NIRF to determine the invasion stage both *in vivo* and *ex vivo* on excised specimens. Considering the routinely used dyes such as Blue Patente V (BPV) by surgeons to evidence the SLNs, we investigated its potential quenching effect on fluorescence intensities from both an integrin targeting probe and ICG.

MATERIALS AND METHODS

1.1. Ethics statement

All procedures on animals were performed in accordance with European ethical guidelines (European directives 2010/63/EU) and were approved by the Regional Committee for Animal Care and Ethics in Animal Experiments (CECCO n°3).

1.2. Cell Culture

The MDA-MB-231-luc-D3H2LN human breast adenocarcinoma cancer cell line was obtained from Perkin Elmer (France). The cancer cell line was maintained according to the supplier's instructions.

1.3. Animals

Pathogen-free 8 to 12 week-old female nude rats were purchased from Taconic (Germany). Rats were acclimated for 7 days in the laboratory before experimentation and were maintained in sterilized filter-stopped cages inside a controlled ventilated rack with access to food and water *ad libitum*. They were examined daily for clinical signs, distress, decreased physical activity and weighed 3 times a week.

1.4. Cell xenografts

Human breast cancer xenografts from MDA-MB-231-luc cells were established in NIH nude rats. We performed forepaw injection, so that 15 rats were anesthetized by inhalation of 1.5% isoflurane with air (Isoflo[®], AXIENCE S.A.S., France) and inoculated by 2×10^6 tumor cells in 10 μ L PBS into the forepaw. The rats received pre-treatment with 10mg/kg of busulfan 2 days before cell injection, so that immunodeficiency of rats was improved.

1.5. Bioluminescence Imaging

BU was performed twice a week until the end of the study (Day 28) using an IVIS-Lumina II (Perkin Elmer, France). Each rat was IP injected with 20mg luciferin potassium salt (Promega, France). Rats anesthetized by 1.5% isoflurane were placed on a thermostatically controlled heating pad (37°C) during imaging. Acquisition binning and duration were set depending on tumor activity. Signal intensity was quantified as the total flux (photons/seconds) within ROIs drawn manually around the tumor area using Living Image 4.4 software (Perkin Elmer, France).

1.6. Estimation of the number of tumor cells present in the SLN

A calibration curve was determined from known amounts of cells (500, 1000, 5000, 10000 & 50000 cells) either deposited on the skin or subcutaneously injected. The injected volume was 100µL of culture medium supplemented with luciferin potassium salt (300µg/mL). Immediately after luciferin addition, the cell suspension was deposited or injected, and then BLI was performed 5 minutes later.

1.7. Near Infrared Fluorescence Imaging

NIRF was performed *in vivo* and *ex vivo* on excised specimens using an IVIS-Lumina II (Perkin Elmer, France) operated according to the spectral unmixing mode. Rats selected from BLI were IV injected with 20nmol of IntegrinSense680 (Perkin Elmer, France). Animals anesthetized by 1.5% isoflurane were placed on a thermostatically controlled heating pad in supine or lateral position. Signal intensity was quantified as the total radiant efficiency (photons/seconds/µW.cm⁻¹) within ROIs drawn manually around LN area using Living Image 4.4 software (Perkin Elmer, France).

1.8. Assessment of fluorescence quenching

For these experiments, 50µL of Blue Patente V (0.5nmol, Guerbet, France), IntegrinSense680 (0.5nmol, Perkin Elmer, France), ICG (129nmol, SERB France), or 50 µL of a mix of the two dyes (BPV+IntegrinSense680 or BPV+ICG) were injected in the forepaw of the rat, and then axillary LNs were resected 15 min after injection, so that NIRF was performed on excised LNs.

1.9. Sacrifice and organ removal

Rats under anesthesia were sacrificed by lethal IV injection of pentobarbital (Ceva Santé Animale, Libourne, France) and LNs were collected from each animal for immediate *ex vivo* assessments.

1.10. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad, USA). Statistical analysis were performed with the Student's unpaired t test.

RESULTS

1.1. Assessments of the fluorescence quenching, and wash-out kinetics in lymph nodes from healthy rats:

There was no statistical difference in the fluorescence intensities quantified on *ex vivo* resected LNs after forepaw injection of IntegrinSense680 versus BPV+IntegrinSense680 (Fig 1A). There was no statistical difference in the fluorescence intensities quantified on *ex vivo* resected LNs after forepaw injection of ICG versus BPV+ICG (Fig 1B). Such an absence of quenching by BPV was also observed at the time a very low amount of IntegrinSense680 was injected.

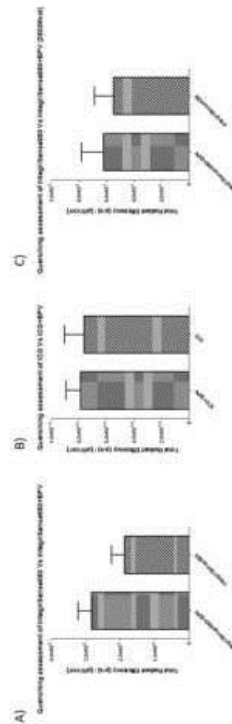


Fig 1. Quenching assessments. A) Assessment of the fluorescence quenching of IntegrinSense680 (0.5 nmol) by Patent Blue V (0.5 nmol). Quantifications performed by *ex vivo* NIRF on axillary LNs (n=6, LN per group). B) Assessment of the fluorescence quenching of Patent Blue V (0.5 nmol). Quantifications performed by *ex vivo* NIRF on axillary LNs (n=6, LN per group). C) Assessment of the fluorescence quenching of IntegrinSense680 injection at 2.0 nmol by Patent Blue V. Quantifications performed by *ex vivo* NIRF on axillary LNs (n=6, LN per group).

After forepaw injection of IntegrinSense680, the dye diffuses mainly through the lymphatic ducts, then reaches LNs where it accumulates momentarily before being eliminated (Fig 2A). The comparison between NIRF signals in axillary and brachial LNs highlighted that the retention of the dye is greater in axillary LNs than in brachial LNs, furthermore there were no differences in signal intensities between 5H30 and 19H for these two LNs (Fig 2B). Following locoregional injection, the limited clearance in healthy LNs compromises a high sensitivity of detection of tumor cells in SLNs since the residual activity is about 1 log higher than predicted fluorescence from 1000-2000 tumor cells. So, only a systemic route such as IV resulting in quasi negligible residual activity in a healthy LN can be considered.

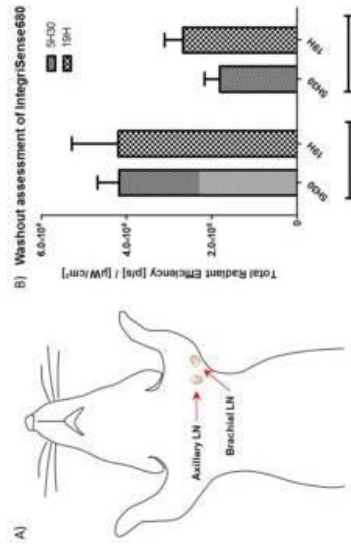


Fig. 2. Axillary and brachial lymph nodes. A) Scheme showing the location of axillary and brachial lymph nodes in the axillary area. B) Comparison of the IntegrinSense680 wash-in kinetics between axillary and brachial lymph nodes from rats by *ex vivo* NIRF quantification (n=6, LN per group).

1.2. Validation of BLI quantitation:

The minimal invasion status was determined thanks to *in vivo* calibration experiments by the quantification of known amounts of cancer cells suspended in a biological medium in the presence of luciferin. The bioluminescence signal was stable during at least 9 minutes following injection and attenuation of photons by skin was about 77% (Fig 3A). From the known number of SC injected cells, the calibration curve of bioluminescence activity corresponds to the following equation: $Y=348X-277556$ (Fig 3B) with a threshold of quantitation of about 500 cells (more than 5 times higher than background activity) (Fig 3C).

from 3 to 20 times higher than the control LNs. Fluorescence images from excised LNs were all in good correspondence with the *in vivo* bioluminescence patterns.

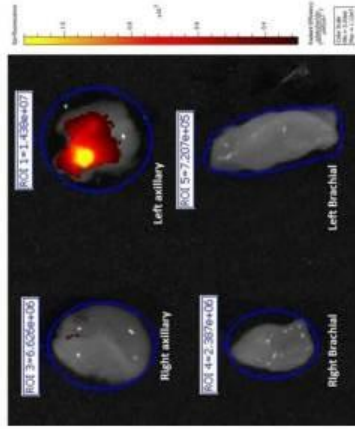


Fig. 8. Ex vivo NIRF identification of tumor micro-invasion in the left axillary LN after IV injection of IntegrinSense680 (20nmol). Quantifications were performed following spectral imaging.

DISCUSSION

In clinical practice, blue dyes injected in the vicinity of primary tumors stain SLNs, so that clinicians can easily identify SLNs with the naked eyes during surgery [1]. When possible, radiolabeled colloids are co-injected allowing for the detection of SLN location through the skin. Considering the technical and regulatory constraints associated with the use of radioisotopes, direct imaging of the SLNs via a fluorescent probe (i.e. ICG) should be a convenient and powerful alternative. To validate the use of infrared fluorescent probes at the same time as blue dyes, we assessed the potential quenching effect when either co-injected or injected alone. Our results demonstrate the absence of quenching by BPV towards fluorescence of ICG and Integrin targeting agents. So, fluorescence imaging is compatible with standard BPV-based surgery procedures.

When considering the simultaneous use of the two fluorescence probes (ICG_{excitation}=800nm ; ICG_{emission}=843nm and IntegrinSense680_{excitation}=675 ; IntegrinSense680_{emission}=693nm), optimized settings of excitation and emission filters allow for *in vivo* imaging of the SLN without reciprocal interferences. Due to the very low IntegrinSense680 fluorescence intensity present in micro-invaded SLNs as well as significant auto-fluorescence background, it is not possible to perform *in vivo* direct detection of IntegrinSense680. So, *ex vivo* examinations on excised SLNs were performed using the spectral unmixing mode to suppress auto-fluorescence and contribution of ICG. In these conditions, the high quantum yield of fluorescence from IntegrinSense680 is favorable for the level of detection requested and allows for evidencing of micro-invasion in SLNs as low as 1500 cells.

Fluorescent dyes with an emission of around 800nm are usually more suitable for intraoperative imaging due to decreased auto-fluorescence of tissues and compatibility with lighting in the operating room [15]. However, higher wavelength targeting probes suffer from a decreased quantum yield (10 to 30 times lower) resulting in insufficient intrinsic sensitivity which is no longer suitable to detect a few tumor cells even on excised specimens. Obviously it is not possible to simultaneously consider the use of ICG and a specific targeting probe emitting fluorescence in the same wavelength window. NIRF for surgical applications is a modality with great potential, helping the surgeon's vision by providing real-time acquisitions with high contrasts. Molecular targeting tumors, especially fluorescent MABs and FGD-derivatives would be promising to assess the tumor invasion stage [16].

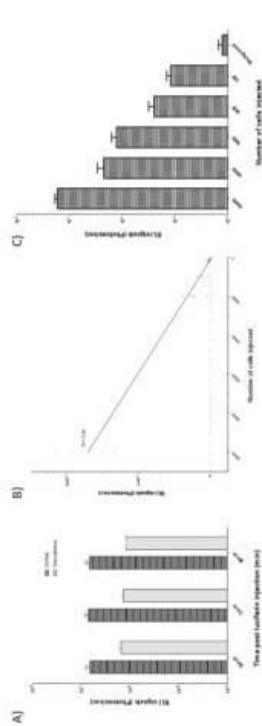


Fig. 3. Validation of BLU quantification. A) Comparison of *in vivo* BLU signals following subcutaneous injection or deposition of cells supplemented with substrate on the surface of the skin (n=2 per condition). B) Determination of the fitting curve for *in vivo* quantification of the number of cells (R²=0.94). C) Assessment of BLU signal with different cell numbers following subcutaneous injection of cells supplemented with substrate (1 cell per condition).

1.3. Sentinel Lymph Node invasion's model:

Thanks to BLU, it was possible to confirm the minimal invasion of tumor cells in both brachial and axillary LNs *in vivo* (Fig. 3A). However, we noticed that tumor cells more often tended to develop in the axillary LN as compared to the brachial LN. From the *in vivo* BLU calibration curve, estimation of the tumor burden was approximately 18700 cells for the rat A (Fig. 4A) with a brachial invaded LN whereas rat B presented about 1500 cells (Fig. 4B) in the axillary LN.

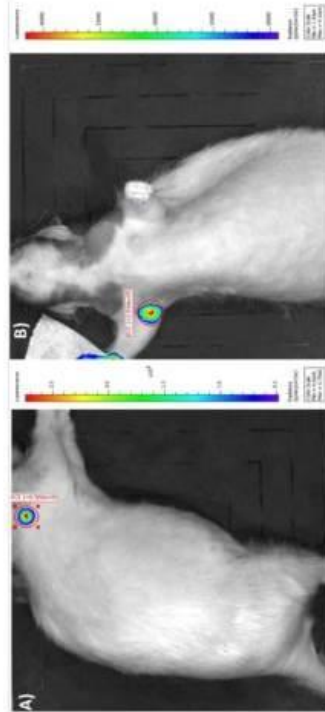


Fig. 4. BLU of rats. Minimally invaded LN by cancer cells. To achieve more accurate quantification, the best locations for BLU acquisitions were anterior face for axillary LN and lateral for brachial LN. A) BLU from right lateral side of rat A. B) BLU from anterior side of rat B.

1.4. αvβ3 and αvβ5 integrins targeting:

Since loco-regional injection of Integrin targeting probe IntegrinSense680 results in a non-complete clearance in healthy LN, this route cannot be used to detect minimal invasion. So, only IV injections of the fluorescent probe were considered. In animals with SLNs containing almost 2000 cells, based on quantitative BLU, NIRF did not allow detection of any significant fluorescent signals *in vivo*. However, after excision of the SLN, *ex vivo* NIRF associated with spectral unmixing to suppress auto-fluorescence, enables confirmation of the minimal invasion of left axillary LN by cancer cells (Fig4). Overall the fluorescence activity of the minimally invaded LN ranged

[15] Adams KE, Ke S, Kwon S, Liang F, Lu Y, Hirschi K et al. Comparison of visible and near-infrared wavelength-excitable fluorescent dyes for molecular imaging of cancer. *J Biomed Opt.* 2007 Mar-Apr;12(2):024037.

[16] Desrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2010 Jan;10 (1): 9-22.

In conclusion, BLI cannot be considered in humans but it is the most sensitive imaging modality to assess minimal tumor invasion (less than 1500 cells) for oncology research in animals. It was a valuable resource to acquire a relevant model with minimal invasion. NIRF of integrins targeted dyes in an invaded LN is possible *in vivo* or during surgery, but its sensitivity is not sufficient enough to demonstrate micro-invasion by a direct *in vivo* examination. When performed on an excised LN, *ex vivo* high sensitivity NIRF with spectral unmixing allows for detection of the micro-invasion.

CONFLICTS OF INTEREST

None reported.

REFERENCES

[1] Surman BM, Gao S, Zhu N, Liang R, Gruet V, Achillefu S. Real-time Fluorescence Image-Guided Oncologic Surgery. *Adv Cancer Res.* 2014; 124:171-211.

[2] S. David Nathanson. Insights into the Mechanisms of Lymph Node Metastasis. *Cancer.* 2003 Jul; 98(2): 413-423.

[3] Ohi Y, Umeikita Y, Sogawa Y, Bai Y, Yotsumoto D, Matsukata A et al. Whole sentinel lymph node analysis by a molecular assay predicts axillary node status in breast cancer. *Br J Cancer.* 2012 Oct 9;107(8):1239-43.

[4] Brambilla T, Fiamengo B, Tintieri C, Testori A, Grassi MM, Schiara A et al. One-Step Nucleic Acid Amplification in Breast Cancer Sentinel Lymph Node: A Single Institutional Experience and a Short Review. *Front Med (Lausanne).* 2015 Jun 4;2:37.

[5] Themelis G, Harlaar NJ, Kelder W, Bart J, Sarantopoulos A, Van Dam G et al. Enhancing Surgical Vision by Using Real-Time Imaging of αvβ3-Integrin Targeted Near-Infrared Fluorescent Agent. *Translational Research Ann Surg Oncol.* 2011 Nov; 18(12): 3506-3513.

[6] Lyman GH, Temin S, Edge SB, Newman LA, Turner RR, Weaver DL et al. Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients with Early-Stage Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2014 May;32(13):1365-1383.

[7] Gojon H, Fawcetti D, Valachi A. Sentinel lymph node biopsy in patients with micrometastatic breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2014 Jan;40(1): 5-11.

[8] Takeuchi H, Kitagawa Yuko. Sentinel Lymph Node Biopsy in Gastric Cancer. *Cancer J.* 2015 Feb;21 (1).

[9] Fujimura T, Fushida S, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Miyashita T et al. A new stage of sentinel node navigation surgery in early gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2015 Apr; 18 (2): 210-217.

[10] Handgraaf HJ, Boogerd LS, Verbeek FP, Tummers OR, Hardwick JC, Baeten CJ et al. Intraoperative fluorescence imaging to localize tumors and sentinel lymph nodes in rectal cancer. 2016 Feb;25(1):48-53.

[11] Niu G, Chen X. Lymphatic Imaging: Focus on Imaging Probes. *Theranostics.* 2015; 5(7): 686-697.

[12] Li L, Shiro Mori S, Sakamoto M, Takahashi S, Kodama T. Mouse Model of Lymph Node Metastasis via Afferent Lymphatic Vessels for Development of Imaging Modalities. *PLoS ONE.* 2013 Feb; 8(2).

[13] Bach-Gansmo T, Danielsson B, Saracco A, Wikscek B, Bøgegrud T, Fangberg A et al. Integrin receptor imaging of breast cancer: a proof-of-concept study to evaluate 99mTc-NC100692. *J Nucl Med.* 2006 Sep; 47(9):1434-9. Erratum in: *J Nucl Med.* 2007 Apr;48(4):567.

[14] Atallah I, Millet C, Quatre R, Henty M, Rey E, Coll JL et al. Role of near-infrared fluorescence imaging in the resection of metastatic lymph nodes in an optimized orthotopic animal model of HNSCC. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2015 Dec;132(6):337-42.



Proteoglycan-targeting applied to Hypoxia-Activated Prodrugs therapy in chondrosarcoma: Preclinical proof of concept.

Journal:	International Journal of Cancer
Manuscript ID	IJC-16-1352
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	14-Jul-2016
Complete List of Authors:	Voissiere, Aurélien; INSERM UMR 990, Team 2 Weber, Valérie; INSERM UMR 990, Team 1 Gerard, Yvain; INSERM UMR 990, Team 1 REDINI, Françoise; EA3822-ER17 INSERM, Physiopathologie de la Resorption osseuse Raes, Florian; Biogenescence et Archivage d'Animaux Modeles Chezal, Jean-Michel; INSERM UMR 990, Team 1 Degouil, Françoise; INSERM UMR 990, Team 2 Peyrode, Caroline; INSERM UMR 990, Team 2 Miot-Noirault, Elisabeth; INSERM UMR 990, Team 2
Key Words:	Chondrosarcoma, Proteoglycans, Hypoxia-activated prodrugs, Quaternary ammonium, Extracellular matrix

SCHOLARONE™ Manuscripts

John Wiley & Sons, Inc.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Proteoglycan-targeting applied to Hypoxia-Activated Prodrugs therapy in chondrosarcoma: Preclinical proof of concept.

Authors: Aurélien Voissiere^{1,2}, Valérie Weber^{1,2}, Yvain Gerard^{1,2}, Françoise Rédini³, Florian Raes⁴, Jean-Michel Chezal^{1,2}, Françoise Degouil^{1,2}, Caroline Peyrode^{1,2}, Elisabeth Miot-Noirault^{1,2}.

Affiliations:
¹ Clermont Université, Université d'Auvergne, Imagerie moléculaire et thérapie vectorisée, F-63000 Clermont-Ferrand, France
² INSERM, U990, F-63005 Clermont-Ferrand, France
³ UMR S957 Inserm - Nantes Atlantique Université, Faculté de médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes – France
⁴ PHENOMIN-TAAM-UPS44, CIPA (Centre d'Imagerie du Petit Animal), CNRS Orléans, France

What's new?
 Innovative therapies are needed as complements to surgery for patients with inoperable primary or recurrent chondrosarcoma. This study characterized the activity of novel hypoxia-activated prodrug, (HAP) designed on the conjugation of phosphoramidate with a quaternary ammonium vector for a selective delivery to the chondrogenic tumoral matrix. In a xenograft model, a higher tumor growth inhibition occurred (as DNA damages in hypoxic areas), with reduced side effects when HAP was addressed to chondrosarcoma matrix.

Short title: Chondrosarcoma proteoglycan-targeting applied to HAP

Five keywords: Chondrosarcoma, PG, HAP, Quaternary ammonium, ECM

Grant Support: Ligue contre le cancer;
 PRT-k, Translational Cancer Research: INCa-DGOS, D-TECT project reference R15066CC / RPT15003CCA

John Wiley & Sons, Inc.

Corresponding author:

Voissiere Aurélien, PhD,
UMR 990 Inserm / Université d'Auvergne
58 Rue Montalembert-BP184
63005 Clermont-Ferrand, Cedex 1
Email: aurelien.voissiere@inserm.fr
Phone: 0033 4 15 08 15 00

Disclosure of potential conflicts of interest: All authors declare no conflict of interest

Word Count: 4628

Total Number of Figures: 5

Total Number of Tables: 1

Acknowledgements:

Authors thank Cecile Polge, Romain Vivès and Lucie Tixier.

Abstract

Due to its abundant chondrogenic matrix and hypoxic tissue, chondrosarcoma (CHS) is chemo- and radio-resistant. This study characterized the antitumor efficacy of novel hypoxia-activated prodrugs (HAP) conjugated with a quaternary ammonium (QA) for targeting CHS. A QA-conjugated HAP, named as **8-QA**, was synthesized and evaluated respectively to its non-QA equivalent (named as **8**) and to a QA conjugated but non hypoxia activated derivative (named as **10-QA**). Their affinity for aggrecan was determined by surface plasmon resonance. *In vitro*, cytotoxic activity was evaluated on monolayer culture and spheroids of human HEMC-SS cells in normoxic (21% O₂) versus hypoxic (O₂<0.03%) conditions. *In vivo*, the antitumor activity and side effects of HAP derivatives were assessed on HEMC-SS xenograft model implanted on SCID mice. The localization of DNA damages induced by these HAP in hypoxic areas was determined by γH2AX and pimonidazole immunohistochemistry. QA derivatives of HAP **8-QA** and **10-QA**, showed specific binding to aggrecan. Cytotoxic activity of both hypoxia-activated derivatives **8-QA** and **8** was higher in hypoxia than normoxia on monolayer and spheroid cultures. *In vivo*, **8-QA** caused a significant tumor growth inhibition of 62.1%, while **8** and **10-QA** showed no activity. **8-QA** treatment induced an increase of DNA damages as measured by γH2AX predominantly found in pimonidazole-positive hypoxia areas. Contrary to **8-QA**, non QA derivative **8**, was associated with hematological side effects. Our preclinical results are the first to demonstrate the interest of addressing HAP selectively to PG of tumor: this offers promising therapeutic strategy in chondrosarcoma.



Real-time monitoring of placental oxygenation during maternal hypoxia and hyperoxygenation using photoacoustic imaging.

Journal:	Radiology
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research
Manuscript Categorization Terms:	Animal Studies < 1. SUBJECT MATTER, Ultrasound < 2. MODALITIES/TECHNIQUES, Optical Imaging < 2. MODALITIES/TECHNIQUES, Uterus < 5. STRUCTURES, Obstetrics < 6. TOPICS, Experimental Investigations < 7. METHODOLOGY

SCHOLARONE[®]
Manuscripts

Real-time monitoring of placental oxygenation during maternal hypoxia and hyperoxygenation using photoacoustic imaging.

ABSTRACT

Purpose: This preclinical study aimed to evaluate placental oxygenation in pregnant rats by real-time photoacoustic (PA) imaging on different days of gestation and to specify variations in placental oxygen saturation under conditions of maternal hypoxia and hyperoxygenation.

Material and methods: Placentas of fifteen Sprague-Dawley rats were examined on days 14, 17, and 20 of pregnancy with a PA imaging system coupled to high-resolution ultrasound imaging. Pregnant rats were successively exposed to hyperoxygenated and hypoxic conditions by changing the oxygen concentration in inhaled gas. Tissue oxygen saturation (SO₂) was quantitatively analyzed by real-time PA imaging in the skin and 3 regions of the placenta. All procedures were performed in accordance with applicable ethical guidelines and approved by the animal care committee.

Results: Maternal hypoxia was associated with significantly greater decrease in blood oxygen saturation (ΔSO₂) in the skin (70.74% ± 7.65) than in the mesometrial triangle (32.66% ± 5.75) or other placental areas (labyrinth: 18.58% ± 6.61; basal zone: 13.13% ± 5.72) on different days of pregnancy (P<0.001). ΔSO₂ did not differ significantly between the labyrinth, the basal zone, and the decidua. After the period of hypoxia, maternal hyperoxygenation led to a significant rise in SO₂, which returned to its initial values in the different placental regions (P<0.001).

Conclusions: PA imaging enables the variation of blood oxygen saturation to be monitored in the placenta during maternal hypoxia or hyperoxygenation. This first preclinical study suggests that the placenta plays an important role in protecting the fetus against maternal hypoxia.

1 **INTRODUCTION**

2 *In vivo*, fetal oxygenation results from transplacental oxygen transfer from the maternal to the

3 fetal vascular compartment. Impaired oxygen delivery to the fetus may be observed in

4 pathological conditions including placental insufficiency and maternal chronic hypoxia and

5 carries the risk of such severe fetal consequences during the prenatal period as intrauterine

6 growth restriction (IUGR) (1), metabolic acidosis, and fetal death (2). It is thus essential to be

7 able to evaluate the impairment of placental function and oxygenation in clinical practice,

8 especially in pathological situations. The reference methods today for placental insufficiency

9 screening and follow-up are Doppler ultrasound and fetal heart rate monitoring (3). However,

10 neither can be used to measure placental oxygen saturation in clinical practice. Although

11 cordocentesis allows an accurate and reliable measurement of fetal blood oxygenation, the

12 high morbidity associated with this invasive technique makes it useless in clinical practice for

13 placental insufficiency monitoring (4). More recently, magnetic resonance imaging (MRI)

14 and blood oxygen level-dependent (BOLD) magnetic resonance have been suggested to be

15 reliable tools for non-invasive exploration of placental perfusion and oxygenation (5–9).

16 These techniques, which use high power magnetic fields (4.7 T), are currently restricted to

17 animal research.

18 Photoacoustic (PA) imaging is a real-time noninvasive imaging method combining laser pulse

19 tissue excitation and ultrasonic detection of the tissue response (10-12). Typically, the

20 ultrasound image is obtained by irradiating tissue with a nanosecond pulsed laser. Optical

21 absorption induces rapid thermoelastic tissue expansion that generates a wideband ultrasound

22 wave detectable by an ultrasound transducer. The main advantage of this technology is that

23 the optical contrast is combined with the penetration of ultrasound able to detect a

24 backscattered signal at depths up to few centimeters. Indeed, the limitation in exploration

25 depth is associated with the wavelength used for the photoacoustic signal. *In vivo*, tissue

26 contains endogenous chromophores (e.g., hemoglobin, melanin, and lipids) that can generate

27 detectable PA signals. Depending on the wavelength, these endogenous chromophores may

28 have stronger absorption coefficients than other tissue constituents. PA imaging, which uses

29 hemoglobin signals, has been used mainly to image superficial tumors and the blood

30 vasculature (13–16). Furthermore, spectroscopic PA imaging allows *in vivo* assessment of

31 oxygen saturation (SO₂) of the blood by exploiting the differing optical absorption spectra of

32 deoxyhemoglobin (Hb) and oxyhemoglobin (HbO₂). Due to limited penetration depth related

33 to the wavelength used for chromophore excitation, PA is currently restricted to superficial

34 tissue exploration (16 mm) and can therefore be employed only in small laboratory animals

35 for preclinical applications. However, in a recent clinical study, PA approach has been

36 validated by comparing PA appearances of breast malignancies with MR images. Authors

37 reported an excellent spatial correspondence between the two imaging modalities, and a good

38 correlation between PA images and histopathology (17). To our knowledge, this technology

39 has never been applied to pregnancy and placental oxygenation saturation (SO₂)

40 measurement.

41 Our objectives in this study were to evaluate placental SO₂ in pregnant rats by real-time

42 photoacoustic (PA) imaging during the 3rd week of gestation and to specify the variations in

43 placental SO₂ during maternal hypoxia and hyperoxygenation.

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

51 **MATERIAL AND METHODS**

52 *Animal preparation*

53 All procedures were performed in accordance with French and international ethical guidelines

54 and were approved by the National Committee for Animal Care and Ethics in Animal

55 Experiments (No 1037 CECCO n°3). Fifteen pregnant (after timed mating, designated as

56 embryonic day 0) Sprague-Dawley rats (CERJ, Le Genest Saint-Isle, France) were housed in

57 a temperature-controlled room (23°C) with a 12:12-h light-dark cycle and food and water *ad*

58 *libitum*. PA imaging was performed on embryonic days 14, 17, and 20.

59 The rats were anesthetized with 1.5% isoflurane (Aerrane®, Baxter, France), administered

60 with 1.5 L/min of air via a facial oxygen mask. The anesthetic gas was administered for no

61 more than 1 h and a thermostatically controlled pad was used to maintain body temperature at

62 37°C. Before PA imaging began, rat abdomens were shaved and a warm, centrifuged

63 ultrasound gel was applied between the transducer and abdomen skin to enhance PA

64 transmission.

65

66 *Photoacoustic imaging procedure*

67 Transabdominal PA imaging of placentas was performed on days 14, 17, and 20 of gestation.

68 PA images were acquired with a 21 MHz probe (LZ-250; 75 µm axial resolution) connected

69 to the VevoLAZR PA imaging system (Fujifilm Visualsonics Inc., Toronto, Canada). For

70 each high-resolution scan, light from the laser (OPO pumped by doubled Nd:YAG, tunable

71 680-970 nm, 20 Hz repetition rate, 5 ns pulse width, 50 mJ pulse energy) was delivered to the

72 most superficial placentas, which were positioned at the optical focus between 10 and 15 mm.

73 The Vevo imaging station allows adjustment of the probe and imaging optimization to reduce

74 motion artifacts. The parametric images from which we estimated SO₂ levels were displayed

75 by collecting the data at wavelengths of 750 nm and 850 nm in the OxyHemo mode. Changing

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

76 the O₂ concentration in the gas supplied to the mother exposed the fetus successively to 2.5

77 min at 100% O₂ inhalation (hyperoxygenation), then 4 min at 5% O₂ inhalation (hypoxia),

78 and finally 4 min at 100% O₂ inhalation (hyperoxygenation) for each procedure. PA imaging

79 sequences were recorded at 0.8 frames per second to study tissue oxygenation (Fig.1). No

80 more than 2 procedures were performed per day per animal.

81 Placental PA imaging was performed in a sagittal plane. The plane of the skin was used as a

82 reference because the distance from the skin to the probe was chosen to be similar in each

83 measurement. This also enabled us to monitor maternal SO₂. Three distinct parts of each

84 placenta were analyzed: the mesometrial triangle, which connects the uterine horn and the

85 placenta; and two placental zones: the labyrinth, closer to the fetus (fetal part), and the basal

86 zone (maternal part). The labyrinth is the exchange zone of the placenta where nutrients and

87 gases are transferred between the mother and the fetus. The basal zone, also called the

88 trophospongium, is located close to the mesometrial triangle and corresponds to the junction

89 between the labyrinth and the decidua area. This zone is composed of trophoblast stem cells,

90 trophoblast giant cells, and glycogen cells.

91 After image acquisition, tissue SO₂ was quantitatively analyzed from the linear raw data with

92 VevoLAZR software (Fujifilm Visualsonics Inc., Toronto, Canada). Four regions of interest

93 (ROIs) (1.35 mm² diameter, about 11 mm in depth) were manually defined by a single

94 operator (C-J.A): skin, mesometrial triangle, basal zone, and the labyrinth (Fig.2). Time-

95 intensity curves for each ROI were computed with VevoLAZR software. Oxygenation

96 parameters, including SO₂ variation during hypoxia and hyperoxygenation sequences were

97 calculated for each ROI from the time-intensity curves. Rates of SO₂ decrease and SO₂ rise

98 were determined from the slope of the fitted curve. ΔSO₂ corresponded to the change in SO₂

99 between hyperoxygenated (100% O₂ supplied to mother) and hypoxic (5% O₂) conditions and

100 was defined as follows:

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

101 $\Delta SO_2 = SO_2_{\text{hyperoxygenation}} - SO_2_{\text{hypoxia}}$

102 On day 20, rats were euthanized by intravenous pentobarbital injection (150 mg/kg) after the

103 imaging procedure.

104

105 **Statistical analysis**

106 Statistical analysis was performed with R statistical software (version 3.1.2). Quantitative

107 variables are presented as means \pm standard deviations. When more than one placenta was

108 tested on the same rat, the mean value of these nested measurements was taken into account.

109 The paired Friedman test was used to compare the continuous variables between the four

110 ROIs, and the unpaired Kruskal-Wallis test to compare continuous variable between the three

111 gestational days. In cases of significant differences, pairwise comparisons were tested with

112 the Wilcoxon test. Because of the limited sample size, the analysis was restricted to the

113 pairwise combinations of relevant variables. A *P* value < 0.05 was considered to indicate a

114 significant difference.

115

116 **RESULTS**

117 The study included 15 rats: five for each day of gestation considered. A total of 9 placentas

118 were studied on days 14 and 17 of gestation, and 12 on day 20. PA imaging was performed on

119 all animals under hyperoxygenated and hypoxic conditions (Fig. 1). All time-intensity curves

120 were recorded for about 10 minutes: 30 seconds and allowed us to assess the variations in SO_2

121 in the skin and the placenta.

122 SO_2 variations observed in real-time during PA imaging were quantitatively analyzed with

123 LAZR software (Table 1) at a depth of up to 16 mm. During the procedure, variations in SO_2

124 could be clearly visualized according to the maternal oxygenation level.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

125 A few minutes after O_2 in the air supplied to the mother was reduced from 100% to 5%

126 (hypoxia), SO_2 decreased significantly in each ROI ($P < 0.001$). The effect of

127 hyperoxygenation from 5% to 100% inhaled O_2 was also well visualized by a significant SO_2

128 increase in all four ROIs ($P < 0.001$) (Fig.3). Over the course of gestation, from day 14 to day

129 20, the mean SO_2 values of the skin increased ($P = 0.007$) while it decreased in the labyrinth

130 zone ($P < 0.001$) and in the basal zone ($P = 0.02$). The rates of SO_2 variations during maternal

131 hypoxia and hyperoxygenation (i.e., the slopes of SO_2 decrease and rise corresponding to

132 hypoxia and hyperoxygenation conditions, respectively) were calculated from the raw data.

133 SO_2 rates fell to lower levels in the placenta than in the maternal skin and the mesometrial

134 triangle, and progressively decreased over the course of gestation from day 14 to day 20

135 (basal zone $P = 0.003$; labyrinth zone $P = 0.001$). On the other hand, we observed a rapid and

136 deep variation of the SO_2 level in the skin under both hypoxic and hyperoxygenated

137 conditions. After hypoxia, SO_2 returned to its initial value in about 1 min 20 sec for each ROI.

138 Our comparative study thus showed that hypoxia resulted in significant differences in ΔSO_2

139 between maternal skin and the other ROIs ($P < 0.001$) (Fig 4A), with ΔSO_2 higher in the skin

140 (e.g., $70.74\% \pm 7.65$ on day 17) than in the mesometrial triangle (e.g., $32.66\% \pm 5.75$ on day

141 17) or in the different areas of the placenta (e.g., labyrinth zone: $18.58\% \pm 6.61$; basal zone:

142 $13.13\% \pm 5.72$ on day 17) throughout gestation. In addition, ΔSO_2 decreased in the placenta

143 over the course of gestation ($23.34\% \pm 3.75$ on day 14 vs $10.10\% \pm 4.28$ on day 20 in the

144 labyrinth) ($P = 0.005$), at a rate not significantly different between the two placental layers

145 (Fig. 2). These results show that SO_2 variations differed significantly from one tissue to

146 another and depended on the day of pregnancy.

147 Additionally, in order to evaluate the influence of skin attenuation during the procedure, the

148 experiment was repeated after a small surgical incision of the skin that allowed us to image

149 the placenta directly. No significant difference was observed between the two experimental

1 the pregnancy has not previously been evaluated by PA imaging. We therefore compare our
 2 results with those of studies by functional MR imaging.
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60

175 the pregnancy has not previously been evaluated by PA imaging. We therefore compare our
 176 results with those of studies by functional MR imaging.
 177 Our results confirm that the placenta is sensitive to oxygen variations. Different regions
 178 within the placenta may be distinguished, according to the specific enhancements made in
 179 perfusion imaging and histological analyses (26). Published studies have found no difference
 180 of oxygenation in these different areas (5,22). Accordingly, we consider that the relatively
 181 small differences we observed between the basal zone and the labyrinth zone are not
 182 significant.
 183 Wedegartner *et al.* (21) used BOLD MRI to compare maternal oxygenation to that of the
 184 placenta and fetal organs of six ewes during hypoxia. Authors reported changes in placental
 185 saturation smaller than those observed on the skin of the mother, similar to the trends we
 186 observed here with PA imaging.
 187 PA imaging and BOLD MRI were recently compared with the use of a tissue-mimicking
 188 phantom in multiple oxygenation conditions (9). The authors found a good correlation
 189 between SO₂ derived from PA imaging, T2 signal intensity change on BOLD MRI, and PO₂
 190 measurements in phantoms. They also noted that the PA image was the most sensitive, with a
 191 signal increase approximately 25% greater than the changes observed in the BOLD MRI. The
 192 resolution of the PA imaging depends on the resolution of the US transducer. In contrast to
 193 MRI procedures, PA imaging allows real-time observation of blood oxygen saturation at
 194 different levels of oxygenation in the air supplied to the mother. Moreover, PA imaging is
 195 sensitive to both oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin, whereas BOLD MRI is sensitive
 196 only to deoxyhemoglobin.
 197 Our study nonetheless has some limitations. First of all, we do not compare PA values to PO₂
 198 measured in the labyrinth space blood sample. Indeed, the catheterization of these vessels was
 199 not possible. However, oxygen levels at the output of the respirator were controlled and

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60

200 oxygen variations were controlled by the skin signal. Furthermore, an important limitation of
 201 PA imaging lies in the reduced light penetration depth due to light attenuation, which hampers
 202 the exploration of deep tissues. In our study, the depth of exploration of our PA imaging
 203 platform was limited to about 16 mm. Therefore, our study focused on the placenta and not
 204 the fetal organs. Previous studies, however, have reported the ability of PA imaging to detect
 205 sentinel lymph nodes in rats at an imaging depth of 25 mm, without any signal averaging (27)
 206 and at an imaging depth of 31 mm using 50 times signal averaging (28). PA signals depend
 207 on optical fluence and absorption. Stronger optical fluence or lower resolution will enable PA
 208 imaging to detect placental oxygenation levels at even greater depths while maintaining a safe
 209 procedure and thus overcome the depth issue (29). Kruger *et al.* designed a clinical system to
 210 evaluate breast cancer, with exploration depths in tissues up to 50 mm and a resolution of
 211 0.42 mm (30). This depth can be of interest in clinical practice. The change in laser
 212 wavelength is one possible option to improve the depth of exploration. Indeed, a 10 cm
 213 imaging depth may be reached at 1064 nm wavelength (31). However, at this wavelength total
 214 hemoglobin could be determined but not the SO₂ based on the analysis of oxy- and deoxy-
 215 hemoglobins. Thus, the measurement of SO₂ using PA in a deep tissue is an ongoing
 216 challenge (32). In clinical practice, transvaginal or abdominal exploration of a part of the
 217 placenta may be conceivable only in the first trimester of the pregnancy to depict early
 218 oxygen changes. Indeed, mechanisms involved in placental development and the role of
 219 hypoxia on pathological situations at an early stage of the pregnancy are not clearly identified.
 220 PA imaging is currently being investigated in preclinical studies, and many studies show its
 221 potential applications in clinical practice (17,33,34). Otherwise, FDA clinically approves the
 222 use of lasers (Nd:YAG or Diode lasers) in fetal medicine for selective photocoagulation at a
 223 power setting of 30–45 W (35). Here, our procedure was performed with a 1000 times less
 224 output power, suggesting its safety.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

225 In conclusion, PA imaging is a real-time, noninvasive method that allowed us to evaluate
226 placental oxygenation without contrast agent injection. Our results demonstrating that
227 placenta is less affected than maternal tissue by the decline in SO_2 suggest that this organ may
228 play an important role in protecting the fetus against maternal hypoxia. Future studies are
229 needed to better understand the underlying mechanisms involved in the regulation of
230 placental oxygenation during situations of potential fetal hypoxia.

231
232

233 **Advances in knowledge**

234 - PA imaging is a non-invasive, real-time imaging modality that provides new opportunities
235 to analyze placental oxygen saturation during hypoxic conditions or on the first trimester of
236 the pregnancy.

237 - During maternal hypoxia, placental SO_2 decreases more slowly and to a lesser degree than
238 SO_2 in maternal tissue, especially the skin.

239
240

241 **Implication for patient care**

242 Our study results highlight the possible interest of PA imaging in first trimester screening
243 placental SO_2 in clinical situations at high risk of fetal hypoxia, such as placental
244 insufficiency, maternal hypoxia, and intrauterine growth restriction. Because PA imaging may
245 be able to map placental blood oxygen saturation, it may be useful for indicating the need for
246 fetal monitoring during high-risk pregnancies.

247
248
249

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

250 **Disclosures of Conflicts of Interest:** C-J.A No relevant conflicts of interest to disclose. A.N
251 No relevant conflicts of interest to disclose. F.R No relevant conflicts of interest to disclose.
252 **J-M.E** No relevant conflicts of interest to disclose. S.L No relevant conflicts of interest to
253 disclose. A.L.P No relevant conflicts of interest to disclose. A.B No relevant conflicts of
254 interest to disclose. F.P No relevant conflicts of interest to disclose.

255

256 **Authors' contributions**

257 C-J.A. and A.N. were responsible for the design and performed all experiments, analyzed the
258 data, and wrote the manuscript. J.M.E contributed to the design of experiments and the writing
259 of the manuscript. S.L, A.L.P, and F.R. assisted in PA imaging. F.P. and A.B. initiated the
260 project, reviewed the manuscript, and supervised this work.

261

262 **Funding**

263 This study was supported by a grant of "Société Française de Médecine Périnatale" and
264 AREFO-PERINAT funding for research and education.

265
266
267
268
269
270
271
272
273
274

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
- REFERENCES**
- 275 1- Mikolajczyk RT, Zhang J, Betran AP, Souza JP, Mori R, Gülmezoglu AM, Merriald M. A global reference for fetal-weight and birthweight percentiles. *Lancet*. 2011 May 28;377(9780):1855-61.
 - 276 2- Doctor BA, O'Riordan MA, Kirchner HL, Shah D, Hack M. Perinatal correlates and neonatal outcomes of small for gestational age infants born at term gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185: 652-59.
 - 277 3- Chauhan S.P, Rouse D.J, Ananth C.V, Magann E.F, Chang E, Dahlke J.D, *et al.* Screening for intrauterine growth restriction in uncomplicated pregnancies: time for action. *Am J Perinatol* 2013 ; 30 : 33-39.
 - 278 4- Nicolaidis KH, Economides DL, Soothill PW. Blood gases, pH, and lactate in appropriate and small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol*. 1989 Oct;161(4):996-1001.
 - 279 5- Chalouhi GE, Alison M, Deloison B, Thiam R, Aurret G, Balvay D, Cuenod CA, Clément O, Salomon LJ, Siauve N. Fetoplacental oxygenation in an intrauterine growth restriction rat model by using blood oxygen level-dependent MR imaging at 4.7 T. *Radiology*. 2013 Oct;269(1):122-9.
 - 280 6- Sørensen A, Pedersen M, Tietze A, Ottosen L, Daus L, Uldbjerg N. BOLD MRI in sheep fetuses: a non-invasive method for measuring changes in tissue oxygenation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;34(6):687-692.
 - 281 7- Scemple SJ, Wallis F, Haggarty P, *et al.* The measurement of fetal liver T1(*) (2) in utero before and after maternal oxygen breathing: progress towards a non-invasive measurement of fetal oxygenation and placental function. *Magn Reson Imaging* 2001;19(7):921-928.
 - 282 8- Morris DM, Ross JA, McVicar A, *et al.* Changes in foetal liver T2* measurements by MRI in response to maternal oxygen breathing: application to diagnosing foetal growth restriction. *Physiol Meas* 2010;31(9):1137-1146.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
- 300 9- Rich LJ, Seshadri M. Photoacoustic Imaging of Vascular Hemodynamics: Validation with Blood Oxygenation Level-Dependent MR Imaging. *Radiology*. 2015 Apr;275(1):110-8.
 - 301 10- Niederhauer JJ, Jaeger M, Lemor R, Weber P, Frenz M. Combined ultrasound and photoacoustic system for real-time high-contrast vascular imaging in vivo. *IEEE Trans Med Imaging*. 2005 Apr;24(4):436-40.
 - 302 11- Mehrmohammadi M, Yoon SJ, Yeager D, Emelianov SY. Photoacoustic Imaging for Cancer Detection and Staging. *Curr Mol Imaging*. 2013 Mar;2(1):89-105.
 - 303 12- Needles A, Heimmiller A, Sun J, Theodoropoulos C, Bates D, Hirson D, Yin M, Foster FS. Development and initial application of a fully integrated photoacoustic micro-ultrasound system. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2013 May;60(5):888-97.
 - 304 13- Ermilov SA, Khamapirad T, Comjuteau A, Leonard MH, Laceywell R, Mehta K, Miller T, Oravsky AA. Laser photoacoustic imaging system for detection of breast cancer. *J Biomed Opt*. 2009 Mar-Apr;14(2):024007.
 - 305 14- Longu GF, Li ML, Xie X, Wang LY, Stoica G. In vivo imaging and characterization of hypoxia-induced neovascularization and tumor invasion. *Int J Oncol*. 2007 Jan;30(1):45-54.
 - 306 15- Wang X, Pang Y, Ku G, Xie X, Stoica G, Wang LY. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat Biotechnol*. 2003 Jul;21(7):803-6.
 - 307 16- Brecht HP, Prough DS, Petrov YY, Patrikeev I, Petrova IY, Deyo DJ, Cicerone I, Essenlerv RO. In vivo monitoring of blood oxygenation in large veins with a triple-wavelength photoacoustic system. *Opt Express*. 2007 Nov 26;15(24):16261-9.
 - 308 17- Heijblom M, Prins D, Brinkhuis M, van Hespden JC, van den Engh FM, van der Schaaf M, Klaase JM, van Leeuwen TG, Steenbergen W, Manohar S. Photoacoustic image patterns of breast carcinoma and comparisons with Magnetic Resonance Imaging and vascular stained histopathology. *Sci Rep*. 2015 Jul 10;5:11778.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 325 18- Arthuis CJ, Novell A, Escoffre JM, Patat F, Bouakaz A, Perroin F. New insights into
326 uteroplacental perfusion: quantitative analysis using Doppler and contrast-enhanced
327 ultrasound imaging. *Placenta*. 2013 May;34(5):424-31.
- 328 19- Zijlstra WG, Buursma A, Meeuwssen-van der Roest WP. Absorption spectra of human
329 fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin.
330 *Clin Chem*. 1991 Sep;37(9):1633-8.
- 331 20- Wedegartner U, Tchirikov M, Koch M, Adam G, Schröder H. Functional magnetic
332 resonance imaging (fMRI) for fetal oxygenation during maternal hypoxia: initial results.
333 *Rofo*. 2002 Jun;174(6):700-3.
- 334 21- Wedegartner U, Tchirikov M, Schäfer S, Priest AN, Kooijman H, Adam G, Schröder HJ.
335 Functional MR imaging: comparison of BOLD signal intensity changes in fetal organs with
336 fetal and maternal oxyhemoglobin saturation during hypoxia in sheep. *Radiology*. 2006
337 Mar;238(3):872-80.
- 338 22- Bobek G, Stait-Gardner T, Surmon L, Makris A, Lind JM, Price WS, Hennessy A.
339 Magnetic resonance imaging detects placental hypoxia and acidosis in mouse models of
340 perturbed pregnancies. *PLoS One*. 2013;8(3):e59971.
- 341 23- Huen I, Morris DM, Wright C, Sibley CP, Naish JH, Johnstone ED. Absence of PO2
342 change in fetal brain despite PO2 increase in placenta in response to maternal oxygen
343 challenge. *BJOG*. 2014 Dec;121(13):1588-94.
- 344 24- Schoennagel BP, Yamamura J, Fischer R, Tavares de Sousa M, Weyhmiller M,
345 Birkelbach M, Kooijman H, Adam G, Wedegaertner U. BOLD MRI in the brain of fetal
346 sheep at 3T during experimental hypoxia. *J Magn Reson Imaging*. 2015 Jun;41(1):110-6.
- 347 25- Dogra VS, Chinni BK, Valluru KS, Moalem J, Giampoli EJ, Evans K, Rao NA.
348 Preliminary results of ex vivo multispectral photoacoustic imaging in the management of
349 thyroid cancer. *AJR Am J Roentgenol*. 2014 Jun;202(6):W552-8.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 350 26- Solomon E, Avni R, Hadas R, Raz T, Garbow JR, Bendel P, Frydman L, Neeman M.
351 Major mouse placental compartments revealed by diffusion-weighted MRI, contrast-enhanced
352 MRI, and fluorescence imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 15;111(28):10353-8.
- 353 27- Erpelting TN, Kim C, Pramank M, Jankovic L, Maslov K, Guo Z, Margenthaler JA,
354 Pashley MD, Wang LV. Sentinel lymph nodes in the rat: noninvasive photoacoustic and US
355 imaging with a clinical US system. *Radiology*. 2010;256(1):102-10.
- 356 28- Song KH, Stein EW, Margenthaler JA, Wang LV. Noninvasive photoacoustic
357 identification of sentinel lymph nodes containing methylene blue *in vivo* in a rat model. *J
358 Biomed Opt*. 2008 Sep-Oct;13(5):054033.
- 359 29- Mezrich R. Science to practice: Son et Lumiere--understanding tumor heterogeneity.
360 *Radiology*. 2012 May;263(2):313-5.
- 361 30- Kruger RA, Kuzniak CM, Lam RB, Reinecke DR, Del Rio SP, Steed D. Dedicated 3D
362 photoacoustic breast imaging. *Med Phys*. 2013 Nov;40(11):113301.
- 363 31- Wang LV, Hu S. Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs.
364 *Science*. 2012 Mar 23;335(6075):1458-62.
- 365 32- Xia J, Yao J, Wang LV. Photoacoustic tomography: principles and advances.
366 *Electromagn Waves (Camb)*. 2014;147:1-22.
- 367 33- Zackrisson S, van de Ven SM, Gambhir SS. Light in and sound out: emerging
368 translational strategies for photoacoustic imaging. *Cancer Res*. 2014 Feb 15;74(4):979-1004.
- 369 34- Stoffels I, Morscher S, Helfrich I, Hillen U, Leyh J, Burton NC, Sardella TC, Claussen J,
370 Poeppel TD, Bachmann HS, Roesch A, Griewank K, Schadendorf D, Günzer M, Klode J.
371 Metastatic status of sentinel lymph nodes in melanoma determined noninvasively with
372 multispectral optoacoustic imaging. *Sci Transl Med*. 2015 Dec 9;7(317):317ra199.
- 373 35- Ruano R, Rodo C, Peiro JL, Shamsirsaz AA, Haeri S, Nomura ML, Salustiano EM, de
374 Andrade KK, Sanga-Haghepykar H, Carreras E, Belfort MA. Fetoscopic laser ablation of

375 placental anastomoses in twin-twin transfusion syndrome using 'Solomon technique',
 376 Ultrasound Obstet Gynecol. 2013 Oct;42(4):434-9.
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60

398 **Table 1:** Quantitative analysis of oxygenation in the skin and the 3 ROIs of the placenta, on
 399 days 14, 17 and 20 of gestation (pooled data). Results are presented as mean \pm standard
 400 deviation.
 401

ROI	Day 14 (Mean \pm Standard Deviation)	Day 17 (Mean \pm Standard Deviation)	Day 20 (Mean \pm Standard Deviation)	P Value Between day 14 – 17	P Value Between day 17 – 20	P Value Between day 14 – 20
Skin						
SO ₂ maximal (%)	84.81 \pm 6.72	90.37 \pm 5.29	93.17 \pm 5.06	0.07	0.34	0.007
SO ₂ minimal (%)	18.55 \pm 2.22	19.63 \pm 5.88	24.63 \pm 6.44	0.86	0.09	0.007
Rate of SO ₂ decrease (%/s)	0.76 \pm 0.15	0.88 \pm 0.39	0.79 \pm 0.13	0.62	0.96	0.69
Rate of SO ₂ rise (%/s)	1.54 \pm 0.59	1.44 \pm 0.85	1.08 \pm 0.57	0.73	0.23	0.05
Mesometrial triangle						
SO ₂ maximal (%)	69.98 \pm 6.86	70.21 \pm 8.84	70.43 \pm 8.36	0.93	0.93	0.93
SO ₂ minimal (%)	39.23 \pm 6.35	37.55 \pm 5.44	54.11 \pm 5.25	0.66	0.003	0.39
Rate of SO ₂ decrease (%/s)	0.33 \pm 0.10	0.43 \pm 0.31	0.23 \pm 0.13	0.92	0.08	0.07
Rate of SO ₂ rise (%/s)	0.61 \pm 0.61	0.70 \pm 0.64	0.26 \pm 0.26	0.86	0.01	0.02

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(%/s)	0.24	0.26		
Labyrinth				
SO ₂ maximal (%)	76.78 ± 68.21 ± 65.78 ± 0.01	0.48	0.001	
	4.17	6.85	4.94	
SO ₂ minimal (%)	53.44 ± 54.63 ± 54.31 ± 0.54	0.93	0.796	
	1.58	3.32	4.25	
Rate of SO ₂ decrease (%/s)	0.28 ± 0.19 ± 0.13 ± 0.07	0.18	0.01	
	0.11	0.10		
Rate of SO ₂ rise (%/s)	0.57 ± 0.23 ± 0.23 ± 0.01	0.53	0.001	
	0.24	0.05		
Basal Zone				
SO ₂ maximal (%)	65.42 ± 54.80 ± 55.88 ± 0.03	0.66	0.024	
	10.42	5.88	3.59	
SO ₂ minimal (%)	38.57 ± 41.67 ± 44.05 ± 0.19	0.38	0.003	
	3.68	5.21	4.57	
Rate of SO ₂ decrease (%/s)	0.31 ± 0.18 ± 0.08 ± 0.03	0.01	0.001	
	0.09	0.03		
Rate of SO ₂ rise (%/s)	0.57 ± 0.18 ± 0.17 ± 0.06	0.14	0.003	
	0.24	0.04		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS

410 **Figure 1:** PA imaging of placental oxygenation on day 17 of gestation. From left to right: the
411 placenta in a sagittal plane (obtained by a B-mode ultrasound scan) and parametric images
412 created with the PA Oxyhemo mode making possible the evaluation of blood SO₂ during
413 variations in the oxygen levels supplied to the mother (5-100%).
414
415 **Figure 2:** ROIs placed on the skin (red), the mesometrial triangle (light blue), and the two
416 different zones of the placenta: the basal zone (green) and the labyrinth zone (dark blue).
417
418 **Figure 3A and B:** Changes in placental blood SO₂ signal from skin (red), mesometrial
419 triangle (light blue), basal zone (green), and labyrinth zone (dark blue) on day 20 of gestation,
420 during experimental sequence: hyperoxygenation (100% O₂, 2.5 min), hypoxia (5% O₂; 4
421 min), hyperoxygenation (100% O₂; 4 min). Part A corresponds to the acquisition of a placenta
422 on day 20 of gestation during the final hyperoxygenation. Part B represents the time-intensity
423 curves obtained during the experimental sequence of hyperoxygenation, hypoxia, and
424 hyperoxygenation on day 20 of gestation.
425
426 **Figure 4A and B:** A - Box-and-whisker plot showing the mean ΔSO₂ in maternal skin, the
427 mesometrial triangle, and the whole placenta on different days of gestation. B - Box-and-
428 whisker plot represents the different part of the placenta: the basal zone and the labyrinth
429 zone on different days of gestation. Data are mean values and 95% confidence intervals.
430 Comparisons between skin and utero-placental ROIs (mesometrial triangle and whole
431 placenta) at the same day of gestation are indicated by *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001.
432 Comparisons between mesometrial triangle and whole placenta at the same day of gestation
433 are indicated by #P<0.05 ## P<0.01 ### P<0.001.

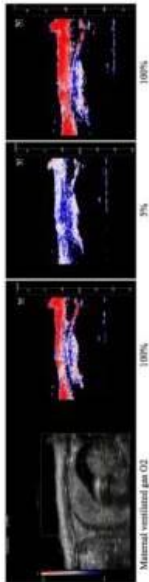


Figure 1: PA imaging of placental oxygenation on day 17 of gestation. From left to right: the placenta in a sagittal plane (obtained by a B-mode ultrasound scan) and parametric images created with the PA OxyHemo mode making possible the evaluation of blood SO2 during variations in the oxygen levels supplied to the mother (5-100%).

426x111mm (72 x 72 DPI)

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

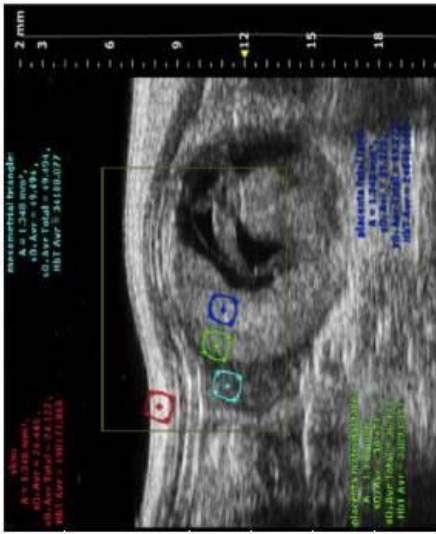


Figure 2: ROIs placed on the skin (red), the mesometrial triangle (light blue), and the two different zones of the placenta: the basal zone (green) and the labyrinth zone (dark blue).

254x190mm (72 x 72 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

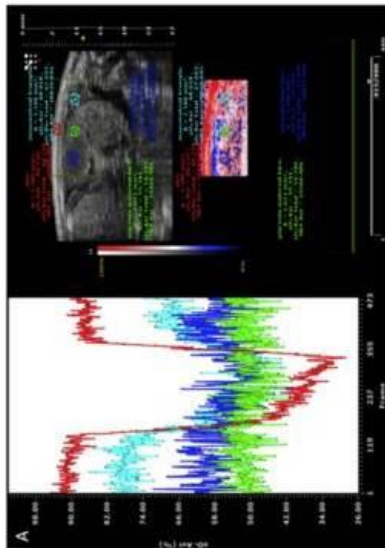


Figure 3A
Changes in placental blood SO2 signal from skin (red), mesometrial triangle (light blue), basal zone (green), and labyrinth zone (dark blue) on day 20 of gestation, during experimental sequence: hyperoxygenation (100% O2, 2.5 min), hypoxia (5% O2; 4 min), hyperoxygenation (100% O2, 4 min). Part A corresponds to the acquisition of a placenta on day 20 of gestation during the final hyperoxygenation.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

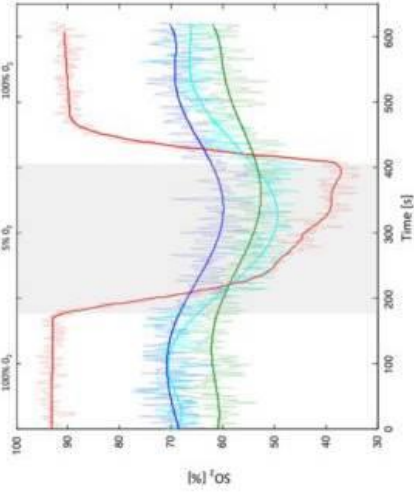


Figure 3B
Part B represents the time-intensity curves obtained during the experimental sequence of hyperoxygenation, hypoxia, and hyperoxygenation on day 20 of gestation.
254x190mm (72 x 72 DPI)

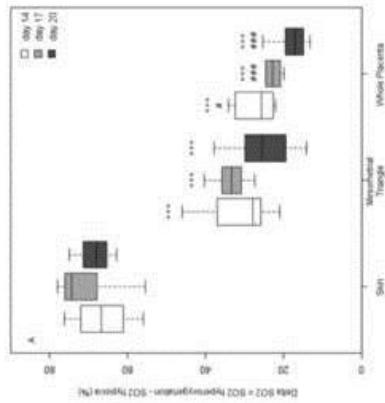


Figure 4A - Box-and-whisker plot showing the mean ΔSO_2 in maternal skin, the mesometrial triangle, and the whole placenta on different days of gestation. Comparisons between skin and utero-placental ROIs (mesometrial triangle and whole placenta) at the same day of gestation are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Comparisons between mesometrial triangle and whole placenta at the same day of gestation are indicated by # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, and ### $P < 0.001$.

254x190mm (72 x 72 DPI)

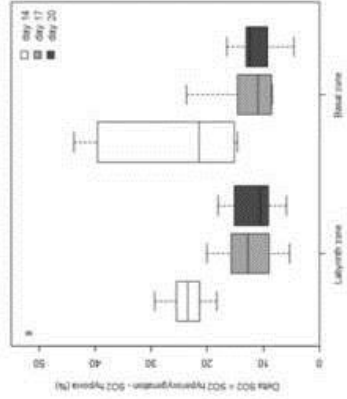


Figure 4B - Box-and-whisker plot represents the different part of the placenta: the basal zone and the labyrinth zone on different days of gestation. Data are mean values and 95% confidence intervals. Comparisons between skin and utero-placental ROIs (mesometrial triangle and whole placenta) at the same day of gestation are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. # Comparisons between mesometrial triangle and whole placenta at the same day of gestation are indicated by # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$.

254x190mm (72 x 72 DPI)

« On ne perçoit du monde que ce que l'on est préparé à en percevoir »

Bernard Werber, *L'Encyclopédie du savoir relatif et absolu*.

Florian RAES

Échographie Haute Résolution couplée à l'imagerie Photoacoustique et à la Fluorescence Infrarouge en oncologie préclinique translationnelle

Résumé :

L'imagerie préclinique est devenue une ressource incontournable pour l'évaluation de paramètres physiopathologiques, pour le suivi du développement tumoral ainsi que pour le développement de thérapies anticancéreuses. Les évolutions technologiques apparues ces dernières années ont conduit au développement de nouvelles modalités d'imagerie ayant un fort potentiel de translation vers la clinique.

Ce manuscrit présente diverses approches par imagerie échographique, photoacoustique et de fluorescence dans le proche infrarouge pour le suivi de la pathologie cancéreuse. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'hypoxie et son suivi au cours du temps dans différents modèles de cancers humains. Différentes stratégies d'imagerie multimodale ont ensuite été mises en œuvre pour évaluer l'efficacité d'une nouvelle prodrogue thérapeutique permettant la libération d'une molécule active dans le proche environnement tumoral sur des modèles humains de tumeurs pancréatiques, mammaires, pulmonaires. Enfin, dans un contexte de recherche translationnelle, nous avons exploré le potentiel de l'imagerie photoacoustique et de la fluorescence infrarouge pour la mise en évidence de l'invasion ganglionnaire tumorale en mettant en œuvre des modèles de ganglions sentinelles minimalement envahis.

Au cours de ce travail, nous avons montré l'intérêt du suivi de l'hypoxie tumorale en onco-pharmacologie et mis en évidence le fort potentiel de l'imagerie PA pour les approches translationnelles en oncologie. La principale limitation correspond à la profondeur relativement faible des régions explorables, mais ce point suscite actuellement de nombreux développements technologiques.

Les études de faisabilité réalisées ainsi que la validation de protocoles de preuves de concept permettront l'exploitation en routine de ces nouvelles modalités d'imagerie.

Mots clés : Imagerie préclinique, Photoacoustique, Fluorescence infrarouge, oncologie

High Resolution Ultrasound coupled to Photoacoustic Imaging and Near Infra-Red Fluorescence in translational preclinical oncology

Summary:

Preclinical imaging has become an unavoidable step for pathophysiological parameters assessments, for the follow up of tumor growth and for the anticancer therapies development. Technological improvements have emerged in recent years, allowing the emergence of new imaging modalities with a high potential for translation into clinical practice.

This manuscript presents several approaches by ultrasound imaging, photoacoustics and near infrared fluorescence in order to monitor the cancer pathology. Initially, we focused on the characterization of hypoxia and its longitudinal assessment in various preclinical models of human cancers. Various multimodal imaging strategies were implemented to assess the efficacy of a new therapeutic prodrug allowing the release of an active molecule in the tumor microenvironment on human models of pancreatic, breast and lung tumors. Finally, in a context of translational research, we explored the potential of photoacoustic and near infrared fluorescence imaging to highlight the lymph node invasion by cancer cells implementing minimally invaded sentinel lymph node models.

In this work, we have shown the interest in monitoring the tumor hypoxia in onco-pharmacology and highlighted the high potential of photoacoustic imaging for oncology translational approaches. The main limitation is the relatively shallow depth of regions that we can explore, but this point is currently subject to many technological developments.

Feasibility studies performed and validation of proof of concept protocols will enable routine exploitation of these new imaging modalities.

Keywords: Preclinical imaging, Photoacoustics, Near infrared fluorescence, Oncology



CIPA-TAAM CNRS UPS44
3B rue de la Férollerie
45071 ORLEANS

