



HAL
open science

Imagerie multiparamétrique en échographie de contraste ultrasonore (DCE-US) pour caractériser la vascularisation tumorale : de la modélisation numérique à l'expérimentation préclinique

Laure Boyer

► To cite this version:

Laure Boyer. Imagerie multiparamétrique en échographie de contraste ultrasonore (DCE-US) pour caractériser la vascularisation tumorale : de la modélisation numérique à l'expérimentation préclinique. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS161 . tel-02487369

HAL Id: tel-02487369

<https://theses.hal.science/tel-02487369>

Submitted on 24 Nov 2021

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.

NNT : 2016SACLS161

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'UNIVERSITE PARIS-SUD - FACULTE DE
MEDECINE

ÉCOLE DOCTORALE N° 582
Cancérologie : Biologie - Médecine – Santé

Spécialité de doctorat : Recherche clinique, Innovation technologique, Santé publique

Par

Laure Boyer

Imagerie multiparamétrique en échographie de contraste ultrasonore (DCE-US) pour caractériser la vascularisation tumorale : de la modélisation numérique à l'expérimentation préclinique.

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 28 juin 2016 :

Composition du Jury :

Mme. Marie-France Bellin, PUPH, Université Paris-Sud, Présidente
Mme. Laure Fournier, MCU-PH, Université Paris Descartes, Rapporteur
M. Yannick Hoarau, Pr, Université de Strasbourg, Rapporteur
M. Didier Lucor, DR, Université Paris-Sud, Examineur
Mme. Nathalie Lassau, PH, Université Paris-Sud, Directrice de thèse
Mme. Stéphanie Pitre-Champagnat, CR, Université Paris-Sud, Co-directrice de thèse



Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mes directrices de thèse. Je remercie Nathalie Lassau pour m'avoir acceptée dans son équipe et également pour sa disponibilité et son soutien réconfortant. Je remercie Stéphanie Pitre-Champagnat pour ses attentions et son dévouement. J'ai beaucoup apprécié sa créativité, son immense disponibilité et la confiance qu'elle m'a témoignée.

Je remercie Marie-France Bellin d'avoir accepté de présider le jury de thèse. Je remercie chaleureusement Laure Fournier et Yannick Hoarau d'avoir rapporté mon travail de thèse. Mes remerciements vont également à Didier Lucor d'avoir participé à ce jury de thèse.

Je souhaite remercier Luc Darrasse, le directeur de l'IR4M pour son accueil dans le laboratoire et également pour sa disponibilité et ses conseils.

Je remercie Ingrid Leguerney pour la correction méticuleuse de nombreuses parties de mon manuscrit ainsi que pour son investissement et ses connaissances lors des expérimentations.

Merci à Sandra Robin pour sa bonne humeur et son humour lors des journées de manips.

Merci à Albine Pinseel, à Cyrille Brigitte et à Béatrice Fiet pour leur gentillesse et leur efficacité dans les démarches administratives.

A Baya Benatsou et à Bénédicte Coiffier, merci pour leur disponibilité et leur efficacité. Merci à Georges Willoquet pour sa précieuse aide notamment pour avoir sauvé mon ordinateur. Merci à Laurène Jourdain pour les relectures et remarques pertinentes de mon manuscrit.

Merci à Ludovic de Rochefort pour son aide sur Matlab.

Merci à Dima Rodriguez et à Jean-Christophe Ginefri pour leur conseil et pour leur accompagnement pour le monitorat.

Merci à Paule Opolon, à Olivia Bawa et à Karine Ser-Le Roux pour s'être toujours rendues disponible pour répondre à mes questions.

Merci aux stagiaires qui ont participé à ce travail Pauline Le Nôtre, Imane Belladjou et Julien Salvadori.

Je tiens à remercier également Véronique Maison, Geneviève Guillot, Marie Poirier-Quinot, Mélanie Polrot, Randy Thomas, Yohann Loriot, Estelle Daudigeos, Marie-Christine Duluc, Jean-Pierre Ruaud, Marianne Gauthier, Xavier Maître, Rose-Marie Dubuisson et à Zoé Mokhtari pour leur participation à mon travail, leurs suggestions, leurs conseils et leur disponibilité pour répondre à mes questions. Leur aide a été précieuse.

Merci aux doctorants de l'IR4M de m'avoir accompagnée durant ces années : Khaoula, Michel, Hongchen, Sajad, Nicolas, Virginie, Marion, Khalil, Zhoujian, Hanadi, Felicia, Pablo, Maya, Kim, Roberta, Florent, Jinlong ...

Je remercie également toutes les personnes qui sont passées par l'IR4M et qui ont contribué à la bonne ambiance qui règne au sein du laboratoire.

Je remercie mes parents pour leur amour inconditionnel.

Mon oncle, je te suis profondément reconnaissante pour ce que tu as fait pour moi.

Merci à mes frères, mes nièces et ma belle-sœur pour leur présence constante à mes côtés et à l'ensemble de ma famille pour son appui permanent et son affection.

Je remercie mes amis de m'avoir aidée lorsque j'en avais besoin et pour les bons moments passés ensemble. Ma thèse n'aurait pas été la même sans vous.

Table des matières

Liste des abréviations.....	7
Introduction.....	9
Chapitre 1 : La vascularisation tumorale : de son évaluation par l'imagerie médicale à sa modélisation numérique.....	11
1.1. La vascularisation tumorale.....	12
1.1.1. Les anomalies vasculaires des tissus et vaisseaux tumoraux.....	12
1.1.2. L'évaluation clinique de la vascularisation tumorale.....	13
1.1.2.1. L'analyse histopathologique de la vascularisation tumorale.....	13
1.1.2.2. Les différentes modalités d'imagerie dynamique fonctionnelle.....	14
1.2. L'échographie de contraste ultrasonore pour évaluer la vascularisation tumorale.....	18
1.2.1. Les agents de contraste.....	18
1.2.2. Mode de détection des agents de contraste ultrasonore.....	22
1.2.3. L'échographie de contraste vers une routine clinique.....	26
1.3. Quantification de la vascularisation tumorale en échographie de contraste ultrasonore....	28
1.3.1. Imagerie DCE-US avec l'injection des agents de contraste en continue.....	28
1.3.1.1. Approche destruction-remplissage.....	28
1.3.1.2. Imagerie durant la phase de destruction (CODIM, Contrast burst depletion imaging). 30	
1.3.2. Imagerie DCE-US avec l'injection des microbulles en bolus.....	32
1.3.2.1. Méthodes semi-quantitatives.....	33
1.3.2.2. Méthodes quantitatives.....	36
1.4. Modélisation numérique de la vascularisation tumorale : État de l'art.....	40
1.4.1. Cardiovasculaire.....	40
1.4.2. Cancérologie.....	41
1.5. Conclusion.....	42
1.6. Annexe : L'échographie.....	43
1.6.1. Principes physiques de l'échographie.....	43
1.6.1.1. Propagation d'une onde de pression dans un milieu équivalent fluide.....	43

1.6.1.2.	Interaction de l'onde ultrasonore avec le milieu.....	46
1.6.2.	De la détection du signal ultrasonore à la formation de l'image.	48
1.6.2.1.	Détection du signal ultrasonore.....	48
1.6.2.2.	Formation de l'image ultrasonore.	49
1.6.2.3.	Résolution spatiale de l'image ultrasonore.	49
1.6.3.	Les modes d'imagerie classiques : le mode B et le mode Doppler.....	49
Chapitre 2 : Modélisation numérique de l'écoulement des agents de contraste ultrasonore dans des réseaux vasculaires.		51
2.1.	Outil de modélisation numérique CFD pour le suivi du parcours des microbulles : Le logiciel Fluent. 52	
2.1.1.	Principes physiques de modélisation de la dynamique des fluides.....	52
2.1.2.	Modélisation Euler Lagrange de l'écoulement des agents de contraste ultrasonore. ...	54
2.1.3.	Système biologique modélisé sous Fluent.	58
2.2.	Méthodologie et paramètres pour la modélisation CFD du système.....	63
2.2.1.	Modélisation de la distribution en concentration des agents de contraste.....	63
2.2.2.	Géométries des fantômes numériques.....	65
2.2.3.	Maillage des fantômes numériques.....	67
2.2.4.	Données extraites et leurs analyses.....	69
2.3.	Validation de la simulation numérique.	71
2.3.1.	Méthodes expérimentales.	71
2.3.2.	Résultats et discussion sur l'étude comparative.....	79
2.4.	Conclusion.	83
2.5.	Annexe.....	84
Chapitre 3 : Étude comparative des méthodes de quantification par la modélisation numérique de l'écoulement des agents de contraste dans les réseaux vasculaires.		87
3.1.	Méthode de l'étude de sensibilité des méthodes de quantification par CFD.	88
3.1.1.	Modélisation de l'injection des agents de contraste.....	88
3.1.2.	Géométrie des fantômes numériques.	89
3.1.3.	Paramètres d'influence étudiés.	91
3.1.4.	Méthode d'analyse des données.	92

3.2.	Résultats.....	93
3.2.1.	Étude de l'influence du volume des réseaux sur les paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs.....	93
3.2.2.	Étude de l'influence de la vitesse du sang dans le réseau trois branches symétrique sur les paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs.....	97
3.3.	Discussion.....	102
3.4.	Conclusion.....	104
Chapitre 4 : Étude comparative <i>in vivo</i> des méthodes de quantification : Analyse de leurs sensibilités pour évaluer l'efficacité thérapeutique.		105
4.1.	Présentation et objectif de l'étude.....	106
4.2.	Matériels et méthodes.....	107
4.2.1.	Modèle tumoral et Animaux.....	107
4.2.2.	Le cabozantinib.....	107
4.2.3.	Déroulement du protocole d'étude.....	108
4.2.4.	Description des examens d'imagerie préclinique.....	109
4.2.4.1.	Échographie de contraste ultrasonore.....	109
4.2.4.2.	Imagerie par Résonance Magnétique.....	111
4.2.5.	Traitement et analyse des données.....	112
4.2.5.1.	Traitement des données issues de l'échographie de contraste ultrasonore.....	112
4.2.5.2.	Méthode semi-quantitative.....	113
4.2.5.3.	Méthode quantitative.....	113
4.2.5.4.	Traitement des données IRM.....	114
4.2.5.5.	Analyse immuno-histologique.....	115
4.2.5.6.	Analyse statistique.....	116
4.3.	Résultats.....	117
4.3.1.	Étude de l'efficacité du Cabozantinib à faible dose (10 mg.kg ⁻¹).....	117
4.3.1.1.	Évolution des volumes tumoraux.....	118
4.3.1.2.	Évolution de la vascularisation tumorale via le Doppler.....	119
4.3.1.3.	Quantification de la vascularisation par échographie de contraste ultrasonore.....	121
4.3.2.	Étude de l'efficacité du Cabozantinib à dose conventionnelle (30 mg.kg ⁻¹).....	124
4.3.2.1.	Évolution des volumes tumoraux.....	125

4.3.2.2.	Évolution de la vascularisation tumorale via le Doppler.	126
4.3.2.3.	Évaluation de la vascularisation tumorale par échographie de contraste.	127
4.3.3.	Quantification de la vascularisation en IRM.	130
4.3.4.	Analyse immuno-histologique.	132
4.4.	Discussion.	134
4.5.	Conclusion.	137
	Conclusion	138
	Références	140
	Table des figures	146
	Table des tableaux	149
	Liste des congrès/publication/prix	150

Liste des abréviations

AUC : Area Under the Curve

CFD : Computational Fluid Dynamics

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CODIM : COntrast burst Depletion Imaging

CT : Computed Tomography

DCE-MRI : Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging

DCE-US : Dynamic Contrast-Enhanced UltraSonography

DPM : Discrete Phase Model

FDA : Food and Drug Administration

¹⁸FDG : ¹⁸Fluro-déoxyglucose

FEP : Fluorinated Ethylene Propylene

FGF : Fibroblast Growth Factor

FS : Flux Sanguin

Gd : Gadolinium

GIST : Gastro Intestinal Stromal Tumor

HES : Hématoxyline Erythrosine Safran

HGFR : Hepatocyte Growth Factor Receptor

HIF : Hypoxia-Inducible Factor

IM : Index Mécanique

INCA : Institut National Du Cancer

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

MFCS : Microfluidic Flow Control System

MTT : Mean Transit Time (pour la méthode quantitative)

MVD : MicroVascular Density

P : Pente de la courbe de rehaussement

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PI : Pic d'Intensité maximal

PZT : Plomb Zirconate de Titane

RECIST : Response Evaluation Criteria In Solid Tumors

ROI : Région d'Intérêt

TDM : TomoDensitoMétrie

TEP : Tomographie par Emission de Positons

T_m : Temps de montée de la courbe de rehaussement

TSVD : Truncated Singular Value Deconvolution

TT : Temps de transit pour la méthode semi-quantitative

UDF : User-Defined Function

US : UltraSonore

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

VRI : Vascular Recognition Imaging

VS : Volume Sanguin

Introduction

L'imagerie fonctionnelle a connu un essor important en cancérologie ces dernières années. L'échographie dite de contraste ultrasonore présente l'avantage d'être une technique non ionisante (caractéristique essentielle pour multiplier les examens), peu coûteuse, facile d'accès et en temps réel. Au-delà de son intérêt diagnostique dans le cas des cancers hépatiques, l'échographie de contraste a démontré son potentiel pour l'évaluation des traitements anti-angiogéniques qui visent à limiter la formation de nouveaux vaisseaux dans la tumeur. Si la détermination de l'efficacité des traitements repose sur des critères morphologiques de la tumeur (RECIST1.1), l'imagerie fonctionnelle de la vascularisation tumorale offre l'avantage d'une détection plus précoce avec une évaluation fine des modifications vasculaires. Dans ce contexte, une étude clinique multicentrique a montré l'efficacité de l'échographie de contraste ultrasonore pour évaluer les traitements anti-angiogéniques au cours du temps afin d'adapter la stratégie thérapeutique si nécessaire. Cette modalité d'imagerie de contraste reste néanmoins une modalité particulièrement récente et aujourd'hui les travaux de recherche expérimentale et clinique révèlent l'existence de sources de variabilité sur les paramètres de la microvascularisation tumorale avec diverses interprétations. C'est en particulier le cas lorsqu'il s'agit de prévoir l'évolution de ces paramètres au cours du développement tumoral. Il apparaît donc essentiel de maîtriser la variabilité des méthodes de quantification de la perfusion tumorale pour accéder à une évaluation précoce des traitements anti-angiogéniques.

Cette thèse se situe dans ce contexte et vise à étudier l'imagerie multiparamétrique de la vascularisation tumorale, de la modélisation numérique à l'expérimentation *in vivo*. L'objectif était donc d'évaluer la sensibilité de deux méthodes de quantification du signal ultrasonore :

i) La méthode dite « semi-quantitative » qui permet la détermination graphique des paramètres de la microvascularisation sur la courbe de prise de contraste en fonction du temps ;

ii) La méthode « quantitative » qui repose sur la déconvolution de la courbe de prise de contraste de la tumeur par le signal issu de l'entrée artérielle de la tumeur.

Pour cela, notre étude a été articulée autour de deux approches complémentaires. La première est originale dans le domaine de l'imagerie de contraste et réside dans le développement d'une modélisation numérique de l'écoulement du sang et des agents de contraste ultrasonore dans des réseaux vasculaires plus ou moins complexes. La seconde approche a consisté à mener une étude *in vivo* sur animaux pour évaluer les méthodes de quantification du signal ultrasonore au cours d'une thérapie anti-cancéreuse. Ce travail de thèse a été conduit au sein du laboratoire d'Imagerie par Résonance Magnétique Médicale et Multi-Modalités (IR4M - UMR8081, CNRS et Université Paris-Sud), dans l'équipe « Imagerie multimodale en cancérologie » située à Gustave Roussy (Villejuif).

Le premier chapitre fait l'objet d'un état de l'art du domaine nécessaire pour maîtriser tous les enjeux de la thèse. Ainsi, c'est après avoir énoncé brièvement les anomalies vasculaires des tissus et des vaisseaux tumoraux, que je détaillerai l'imagerie de la vascularisation tumorale et ses enjeux pour aboutir sur les méthodes de quantification du signal ultrasonore via l'obtention de paramètres caractérisant la vascularisation tumorale. Enfin, en dernier lieu, un état de l'art de la modélisation numérique de la vascularisation tumorale sera détaillé.

Le deuxième chapitre est axé sur le développement de la modélisation numérique, partie essentielle de mon travail de thèse. Le fonctionnement et les spécificités du logiciel de modélisation numérique en mécanique des fluides utilisés seront détaillés dans cette partie. En particulier, c'est dans ce chapitre que seront présentés et discutés les paramètres d'entrée de la modélisation numérique et les hypothèses faites pour modéliser le système biologique. La validation de ces hypothèses sera enfin étudiée avec la mise en place d'une expérimentation comparative *in vitro* sur des échelles millimétriques et micrométriques.

L'étude numérique de la sensibilité des méthodes de quantification des agents de contraste ultrasonores sera abordée dans le troisième chapitre. Plus précisément, il s'agira d'évaluer la variation des paramètres liés à la microvascularisation selon différentes conditions physiologiques que sont le volume du réseau vasculaire et le débit sanguin entrant.

Le dernier chapitre de cette thèse est consacré à l'évaluation *in vivo* des méthodes de quantification du signal ultrasonore via des expérimentations sur souris. Dans cette étude, la vascularisation des tumeurs a été déterminée par échographie de contraste ultrasonore, mais également par imagerie par résonance magnétique (IRM) de contraste.

Enfin, la conclusion présentera une synthèse des résultats pour identifier quelques pistes de recherche sur la poursuite de ces travaux dans l'évaluation des méthodes de quantification et plus largement sur le développement de la modélisation numérique et de ses enjeux.

Chapitre 1 : La vascularisation tumorale : de son évaluation par l'imagerie médicale à sa modélisation numérique.

Actuellement, on estime à 14,1 millions le nombre de nouveaux cas de cancer par an dans le monde et à 8,2 millions le nombre de décès. Les plus fréquents sont les cancers du poumon (avec 1,8 million de cas soit 13%), les cancers du sein (1,7 million de cas soit 11,9%) et les cancers colorectaux (1,4 million de cas soit 9,7%) [1].

L'exposition de l'organisme à des facteurs de risques dit oncogènes peut amener une cellule normale à devenir tumorale et ainsi conduire à la formation d'un amas de cellules cancéreuses. Jusqu'à une taille millimétrique, la tumeur ainsi formée va s'approvisionner en nutriments, en oxygène uniquement par diffusion passive. Au-delà de cette taille, la formation d'une néo-vascularisation à partir des vaisseaux préexistants est nécessaire pour assurer les besoins de la tumeur. Ce phénomène s'appelle l'angiogenèse [2]. Ce processus fut décrit pour la première fois par Folkman en 1971. A ce stade, la tumeur va alors présenter des modifications de la microvascularisation tumorale avant de présenter des répercussions morphologiques.

Un des enjeux en cancérologie est de développer des traitements qui stoppent la vascularisation tumorale. Dans ce contexte, le suivi thérapeutique des traitements anti-angiogéniques peut être réalisé grâce à l'évaluation de la microvascularisation tumorale. L'échographie de contraste ultrasonore est une des techniques proposées. Elle repose sur l'injection d'agents de contraste qui sont des microbulles rehaussant le signal ultrasonore. Cette technique est potentiellement intéressante car non ionisante, peu coûteuse et facile d'accès dans les services hospitaliers. L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a été précurseur dans le domaine de l'échographie de contraste pour évaluer le bénéfice d'un traitement anti-angiogénique mais également pour développer des méthodes de quantification du signal ultrasonore. Cette technique aujourd'hui brevetée est validée à l'échelle clinique et incluse dans les guidelines internationaux de 2012-2013 [3, 4]. Néanmoins certains points méthodologiques restent à approfondir ainsi, l'approche choisie a été de développer une modélisation numérique de l'écoulement du sang et des agents de contraste ultrasonores dans des réseaux vasculaires.

L'objectif de ce chapitre est de présenter le contexte de la thèse. Ainsi, les anomalies vasculaires des tissus et des vaisseaux tumoraux feront l'objet d'une première partie. Dans une deuxième partie, les méthodes d'imagerie permettant d'évaluer la vascularisation tumorale et plus particulièrement l'échographie de contraste ultrasonore seront présentées. Dans une troisième partie, nous détaillerons les méthodes de quantification du signal ultrasonore. Dans une dernière partie, nous aborderons l'état de l'art de ce qui se fait en modélisation numérique de la vascularisation.

1.1. La vascularisation tumorale.

Si la possibilité de traiter les cancers en visant le processus d'angiogenèse a été évoqué en 1971 par Judah Folkman [5], ce n'est que depuis les années 1990 que le développement de traitements ciblant la vascularisation a vu de façon plus importante le jour. Parmi les traitements ciblant la vascularisation tumorale, deux familles se distinguent : les anti-vasculaires et les anti-angiogéniques. Les anti-vasculaires visent la destruction des vaisseaux déjà existants alors que les anti-angiogéniques limitent, quant à eux, la formation de nouveaux vaisseaux par le processus d'angiogenèse. Ainsi, privée de nutriments et d'oxygène, la tumeur nécrose.

Dans cette partie, les anomalies vasculaires des tissus et des vaisseaux tumoraux seront introduites et suivies de l'évaluation clinique de la vascularisation tumorale.

1.1.1. Les anomalies vasculaires des tissus et vaisseaux tumoraux.

De manière générale, la vascularisation permet le transport, les échanges internes biochimiques puis l'acheminement des nutriments, de l'oxygène et des hormones aux cellules. Cependant, les anomalies de structure et de fonction des vaisseaux tumoraux ne leur permettent pas de réaliser efficacement ces fonctions. A l'échelle du vaisseau, les cellules endothéliales formant la paroi vasculaire ne sont pas jointes. Ce phénomène est responsable de la perméabilité des vaisseaux ce qui entraîne des lacs vasculaires et des zones hémorragiques [6]. Il est également possible que des cellules tumorales constituent également la paroi vasculaire [7]. De plus, les péricytes localisés sur la partie externe des capillaires sont lâches et forment plusieurs couches dans les vaisseaux tumoraux qui perdent leur fonction contractile nécessaire pour la régularisation du débit sanguin [8].

A l'échelle du réseau vasculaire, l'architecture en est également modifiée, en effet, les vaisseaux normaux sont caractérisés par des bifurcations hiérarchisées, alors que les vaisseaux tumoraux ont un réseau vasculaire anarchique présentant des multiples bifurcations et une perte de hiérarchie rendant difficile la différenciation entre les artérioles, les veinules et les capillaires [8-10]. De plus, les diamètres des vaisseaux sont irréguliers, alternant ainsi des zones de rétrécissement et des zones de dilatations avec des diamètres de vaisseaux allant de 20 à 250 μm [8, 11, 12]. Les vaisseaux présentent également des tortuosités et des sans-issus [13]. Ainsi, la densité vasculaire est alors hétérogène au sein des tumeurs [8].

Toutes ces anomalies induisent un flux sanguin hétérogène, spatialement et temporairement [14]. Mais plus précisément, dans un même vaisseau, le débit du sang n'est pas constant en valeur mais également en direction. En raison de cela, certaines zones de la tumeur ne sont pas perfusées.

1.1.2. L'évaluation clinique de la vascularisation tumorale.

L'évaluation de la vascularisation tumorale permet de caractériser la tumeur et son pouvoir métastatique mais également d'évaluer l'évolution de la vascularisation tumorale au cours du temps ; ceci dans le but d'étudier l'efficacité des thérapies médicamenteuses anti-angiogéniques. En effet, outre leurs coûts élevés, ces traitements présentent de nombreux effets secondaires importants comme l'hypertension artérielle, les atteintes rénales et les thromboses.

Dans cette partie, nous présenterons tout d'abord la méthode d'analyse d'histologie qui permet une étude directe du tissu néoplasique pour caractériser la tumeur. Les méthodes d'imagerie anatomique et fonctionnelle seront également exposées pour évaluer la microvascularisation tumorale en vue de rechercher une efficacité thérapeutique.

1.1.2.1. L'analyse histopathologique de la vascularisation tumorale.

Depuis les années 90, il a été montré que la croissance tumorale, l'envahissement métastatique et le pronostic de la maladie étaient corrélés à la densité vasculaire dans les zones où la néovascularisation était importante [13]. Ainsi, il est essentiel d'avoir recours à des techniques permettant de mesurer le niveau de vascularisation d'une tumeur. L'examen de référence est l'examen anatomopathologique qui consiste à analyser, par microscopie, une tranche de quelques microns d'épaisseur d'un fragment de tissu pour en étudier sa structure et sa fonction. Cet examen est le gold standard en clinique puisqu'il assure un diagnostic fiable quant à la présence d'un cancer et précise son type.

Plus précisément, l'examen d'anatomopathologie consiste en deux étapes, tout d'abord la coloration de la coupe histologique dans le but de renseigner sur la répartition, l'architecture et la structure des cellules, puis un examen d'immunohistochimie visant à la détection d'antigènes au moyen d'anticorps. Ainsi, la coloration permet de détecter des anomalies caractéristiques des cellules tumorales comme la présence de plusieurs noyaux au sein d'une même cellule, des noyaux de tailles plus importantes que ceux des cellules normales, d'une membrane nucléaire plus épaisse que celles des cellules normales, de contour et de taille de noyaux irréguliers. L'examen d'immunohistochimie permet de détecter les marqueurs moléculaires de certains événements caractéristiques des cancers ou de l'efficacité d'un traitement telles que la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'hypoxie ou l'angiogenèse tumorale, etc.

Les marquages principalement utilisés sont le CD31 et le CD34. Ils mettent en évidence la présence de cellules endothéliales. C'est ensuite un examen plus approfondi qui permet d'établir la densité vasculaire, soit sur un champ de microscopie de 0,74 mm², soit sur une zone élargie jusqu'à l'ensemble du tissu [13]. Les ordres de grandeurs de MVD sont en général entre 10 à 300 microvaisseaux par mm². Cette valeur de MVD n'indique cependant pas la fonctionnalité des vaisseaux. Dans ce cas, il est possible d'associer un marquage d'actine lisse pour mettre en évidence la présence de péricytes et donc suggérer l'existence d'une circulation sanguine fonctionnelle.

1.1.2.2. Les différentes modalités d'imagerie dynamique fonctionnelle.

L'introduction des nouvelles thérapies anti-angiogéniques a conduit les radiologues à se tourner vers de nouvelles techniques d'imagerie dynamiques fonctionnelles sensibles aux modifications physiologiques ou métaboliques de la tumeur qui apparaissent préalablement aux modifications anatomiques. Ces dernières étaient jusqu'alors prises en compte selon les critères RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) pour évaluer l'efficacité des traitements anti-angiogéniques [15]. L'imagerie dynamique fonctionnelle de la vascularisation tumorale repose sur l'étude de la cinétique de rehaussement du signal vasculaire après l'injection d'un produit de contraste. Selon les techniques d'imagerie fonctionnelle, différents paramètres caractérisant la vascularisation tumorale peuvent être obtenus (Tableau 1).

Techniques d'imagerie fonctionnelle	Paramètres obtenus
Imagerie par résonance magnétique de contraste	<ul style="list-style-type: none">- Flux sanguin tissulaire,- Volume sanguin tissulaire,- Temps de transit moyen,- Perméabilité capillaire. [16, 17]
Imagerie par résonance magnétique de susceptibilité	<ul style="list-style-type: none">- Flux sanguin tissulaire,- Volume sanguin tissulaire,- Temps de transit moyen. [16, 18]
Tomodensitométrie de contraste	<ul style="list-style-type: none">- Flux sanguin tissulaire,- Volume sanguin tissulaire,- Temps de transit moyen,- Perméabilité capillaire. [17]
Échographie de contraste ultrasonore	<ul style="list-style-type: none">- Flux sanguin tissulaire,- Volume sanguin tissulaire,- Vascularité. [17]

Tableau 1 : Paramètres caractérisant la vascularisation tumorale obtenus par les différentes techniques d'imagerie fonctionnelles.

Les modalités d'imagerie fonctionnelles permettant l'évaluation de la microvascularisation tumorale vont être à présent décrites.

- **La tomодensitométrie de contraste.**

La tomодensitométrie (TDM) est une technique d'imagerie reposant sur le principe de l'émission et de la détection des rayons X après leur passage à travers le corps humain. En effet, la densité des tissus constituant le corps humain, leur épaisseur ainsi que leur composition atomique entraînent une absorption différente des rayons X (énergie comprise entre 25 et 130 keV). Cet examen donne une image en 3D du corps humain codé en 256 niveaux de gris correspondant à des niveaux d'absorption des rayons X différents. Ainsi, l'imagerie par TDM procure une image anatomique selon les coefficients d'atténuation des rayonnements.

Dans le cas particulier de l'imagerie de la perfusion, la TDM de contraste consiste en l'injection intraveineuse d'un agent de contraste à base d'iode permettant d'améliorer le contraste grâce à son numéro atomique élevé ($Z=53$). Ainsi, injecté par voie intraveineuse, l'agent de contraste permet de rehausser les structures vasculaires via une distribution à la fois intra-vasculaire et extravasculaire. Il est alors possible d'accéder via une analyse de la variation de l'intensité des voxels aux paramètres fonctionnels de la perfusion vasculaire et de la perméabilité capillaire (Tableau 1). L'intensité des voxels est directement proportionnelle à la quantité de produit de contraste injecté, contrairement à l'IRM où la relation est plus complexe et est non linéaire. Ceci rend la TDM particulièrement fiable pour la quantification de la microvascularisation et fait d'elle une référence dans le domaine [19-21]. Néanmoins, il apparaît certaines limitations à son utilisation. La première est inhérente à la technique avec l'absorption de radiations par le patient qui limite la répétition excessive de l'examen. La seconde concerne l'agent de contraste iodé lui-même mal toléré dans le cas d'insuffisance rénale ou d'allergies.

- **L'Imagerie par Résonance Magnétique de contraste.**

L'imagerie par résonance magnétique consiste à observer le retour à l'équilibre du moment magnétique des atomes d'hydrogène de l'eau présents dans le corps humain suite à l'application d'un champ magnétique extérieur. En effet, le signal recueilli par voxel dépendra de la densité des atomes d'hydrogène de l'eau dans le voxel considéré. Ainsi cet examen donne une image de la densité d'atome d'hydrogène de l'eau dans le corps humain de concentrations différentes dans les tissus sains et malades.

L'IRM dynamique de contraste repose sur l'injection d'un produit de contraste paramagnétique de faible poids moléculaire à base de gadolinium (Gd). Cet agent de contraste a la particularité de diffuser dans le milieu extravasculaire en raison de sa taille nanométrique. Il existe de nombreux modèles mathématiques pour extraire des paramètres fonctionnels tels le débit, le volume sanguin tissulaire et la perméabilité capillaire à partir du signal IRM rehaussé (Tableau 1) [16]. Lorsque le rehaussement du signal est positif avec un effet T_1 , on parle d'imagerie dynamique (Dynamic Contrast Enhanced MRI). La DCE-MRI est particulièrement utilisée en cancérologie pour le suivi thérapeutique des cancers ORL, du sein et de la prostate [22].

Lorsqu'il s'agit d'analyser une diminution du signal (rehaussement négatif) suite aux effets de susceptibilité induits par le premier passage du bolus d'agents de contraste, la méthode d'imagerie est dite de susceptibilité (Dynamic Susceptibility Contrast MRI) (séquences d'IRM T_2/T_2^*). Cette dernière approche est principalement mise en œuvre pour l'imagerie cérébrale et en particulier pour différencier les tumeurs cérébrales primitives des métastases secondaires [23]. La principale limitation de l'IRM reste la variabilité des résultats.

Par rapport aux autres modalités, l'intérêt principal de la TDM et de l'IRM de contraste est de pouvoir accéder à la perméabilité capillaire de par le passage des agents de contraste dans l'espace extravasculaire. De plus, ces deux méthodes permettent d'accéder à des paramètres quantifiés dans l'ensemble du volume tumoral contrairement à l'échographie de contraste.

- **La Tomographie par Emission de Positons (TEP).**

La tomographie par émission de positons (TEP) repose sur la détection de rayonnements gamma émis par des radiopharmaceutiques préalablement injectés par voie intraveineuse. Ces radiopharmaceutiques sont constitués d'un traceur sensible au métabolisme du cancer associé à un atome radioactif émetteur de positons. Le traceur va donc se fixer dans l'organisme aux endroits où il est métabolisé et l'atome radioactif permettra de localiser le traceur via sa détection par un TEP. Cet examen donne accès aux informations métaboliques des tissus.

Le radiopharmaceutique le plus couramment utilisé est le ^{18}F Fluoro-déoxyglucose (^{18}F FDG) dont l'atome radioactif, émetteur de positons est le Fluor 18. Le FDG est un analogue du glucose qui s'accumule dans le cytoplasme de la cellule à cause d'un métabolisme différent de celui du glucose. Ainsi, les cellules cancéreuses qui ont une consommation anormalement élevée de glucose vont présenter une accumulation de Fluor 18 qui pourra être repérée par la caméra TEP.

D'autres radiopharmaceutiques donnent accès à des informations sur l'angiogenèse en se fixant sur des marqueurs de l'angiogenèse comme le VEGF, l'HIF. Ainsi, ils permettent de donner indirectement des informations sur la microvascularisation [24, 25]. De plus, le radiopharmaceutique ^{15}O H_2O permet de mesurer la perfusion sanguine. Néanmoins ce dernier doit être produit sur place en raison de sa courte période de 2 minutes et son analyse nécessite l'accès à la fonction d'entrée artérielle. En association avec un traceur ^{18}F FDG et un traceur de l'hypoxie, le ^{18}F -MISO, le ^{15}O H_2O permet de donner des informations sur la biologie de la tumeur et son pronostic [26]. De plus, il a été montré que ce marqueur était très performant pour mesurer le flux sanguin *in vivo* [27]. L'avantage de cette technique d'imagerie est qu'elle est sensible et spécifique. Ses inconvénients sont qu'elle est coûteuse, ionisante et qu'elle donne une résolution spatiale faible qui est d'environ 5 mm. Cette technique contrairement au CT et à l'IRM n'est pas incluse dans la routine pour la mesure de la perfusion dans le cas du suivi de l'efficacité thérapeutique d'un anti-angiogénique.

- **L'échographie de contraste ultrasonore.**

Enfin, la dernière modalité disponible est l'échographie reposant sur le principe de l'émission et de la détection d'ondes ultrasonores suite à leur passage à travers le corps humain. En effet, la densité des tissus constituant le corps humain ainsi que leurs impédances et leurs épaisseurs entraînent une réflexion différente des ondes ultrasonores (fréquences comprises en 1 MHz et 15 MHz).

Cet examen permet d'obtenir une image en 2D codée en 256 niveaux de gris correspondant à des niveaux d'intensité du signal ultrasonore selon les différentes réflexions au niveau du corps humain. Ainsi, l'échographie procure une image anatomique selon les niveaux de réflexion des structures.

L'échographie de contraste consiste en l'injection intraveineuse d'un agent de contraste. Celui-ci est constitué de gaz contenu dans une membrane micro-sphérique permettant d'améliorer le contraste de par son fort pouvoir de réflexion et sa capacité de variation volumique. Ainsi, injecté par voie intraveineuse, il permet de rehausser les structures vasculaires donnant ainsi accès à la perfusion vasculaire et donc à des informations fonctionnelles sur la vascularisation tumorale. Cette méthode est récente et a été validée à l'échelle clinique en 2014 en particulier par des études cliniques menées par l'équipe [3, 4]. De plus, cette technique est depuis peu détaillée dans différents guidelines européens et internationaux. Cette nouvelle modalité reste pour l'instant peu développée dans les services de radiologie malgré ses avantages qui sont d'être non ionisante, peu coûteuse et facile d'accès.

Cette dernière modalité d'imagerie faisant l'objet de ma thèse va être détaillée dans la partie suivante.

1.2. L'échographie de contraste ultrasonore pour évaluer la vascularisation tumorale.

L'échographie de contraste est une modalité introduite dans les années 2000 avec le développement des agents de contraste ultrasonores. Si l'échographie de contraste ultrasonore tout comme le Doppler permet d'accéder à la vascularisation tumorale, ce dernier ne permet pas d'accéder à des vaisseaux de diamètre inférieur à 100 μm en raison de la limite de la résolution spatiale [28]. L'échographie de contraste ultrasonore permet de descendre au-delà de cette limite avec la détection de vaisseaux jusqu'à 40 μm ce qui est essentiel pour étudier la microvascularisation tumorale [29].

Comme cette modalité d'imagerie ultrasonore repose sur le développement d'agents de contraste, leurs propriétés physico-chimiques et leurs principes de fonctionnement seront en premier lieu abordés. C'est donc dans un second temps que les modes de détection des agents de contraste seront expliqués.

1.2.1. Les agents de contraste.

A 2 MHz, en l'absence d'agents de contraste, le signal ultrasonore provenant du sang est presque 40 dB en-dessous de celui des tissus environnants. Le principal objectif des agents de contraste ultrasonore est donc de rehausser le signal vasculaire afin d'améliorer le contraste entre le sang et les tissus environnants.

Les premiers agents de contraste ultrasonores ont été mis en évidence fortuitement pour la première fois en 1968 par Gramiak et Shah [30]. À la suite de l'injection d'un colorant vert d'indocyanine en intracardiaque, un signal d'une intensité importante a été détecté par la présence probable de bulles d'air dans la solution.

Depuis cette découverte, un grand nombre d'agents de contraste ultrasonores ont été développés avec des propriétés physico-chimiques particulières permettant une interaction avec le champ ultrasonore selon deux types de rétrodiffusion :

- La première dite passive qui repose sur la différence d'impédance acoustique entre l'agent de contraste et le milieu environnant, ceci favorise ainsi l'intensité du signal alors rétrodiffusée selon la loi de Rayleigh avec une augmentation proportionnelle au rayon de l'agent de contraste (R^6) et à la fréquence (f^4).
- La seconde dite active où l'agent ultrasonore est flexible et devient lui-même une source d'ultrasons selon les variations de pression acoustique.

Avant de détailler les modes de rétrodiffusion, nous allons présenter les propriétés physico-chimiques de ces nouveaux agents de contraste ultrasonore.

Aujourd'hui, les agents de contraste ultrasonore sont des microbulles d'un diamètre allant de 1 à 8 μm constituées de gaz et enveloppées d'une capsule permettant entre autres de contrôler la taille des microbulles. Leur diamètre micrométrique leur permet de traverser la circulation pulmonaire et la circulation capillaire (le diamètre interne des capillaires étant de 8 à 10 μm) tout en restant intra-vasculaire et en permettant une bonne réponse acoustique. Puisque les microbulles sont intra-vasculaires et qu'elles suivent la vitesse et le flux sanguin, elles peuvent être utilisées comme un traceur du débit du sang.

Concernant le gaz, celui-ci est choisi pour être très compressible pour permettre un fort pouvoir de rétrodiffusion, mais également pour offrir une bonne stabilité temporelle avant une dissolution. Pour cela des gaz à haut poids moléculaire avec un bas coefficient de diffusion et une faible solubilité dans le sang et l'eau sont choisis. Les gaz ayant ces caractéristiques sont les perfluorocarbones et en particulier l'hexafluorure de soufre, le decafluorobutane et l'octafluoropropane.

La nature de la coque est quant à elle déterminée en vue d'aboutir à une bonne flexibilité pour permettre une meilleure rétrodiffusion active et une bonne stabilité temporelle avec une grande résistance à la diffusion du gaz. La coque des microbulles peut être réalisée en plusieurs matériaux : en lipides, en protéines et en polymères. Les capsules en polymères étant les plus rigides des trois. Les capsules en protéines sont plus rigides que les capsules en lipides. Plus la capsule est rigide, plus elle limite l'oscillation des microbulles et donc l'intensité rétrodiffusée. L'épaisseur des coques qui est de 1 à 200 nm résulte également de ce compromis entre flexibilité et stabilité dans le temps.

Après injection, les microbulles restent dans la circulation générale pendant 10 à 15 minutes avant d'être éliminées. Le gaz se dissout et est expiré via les poumons. La capsule est filtrée par les reins puis éliminée par le foie via un processus métabolique [31].

Les principaux agents de contraste commercialisés dans le monde ainsi que leurs propriétés sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 2).

Agents de contraste	Index mécanique d'utilisation	Stabilité de la solution après l'ouverture	Diamètre moyen des microbulles	Disponibilité
Definity® (Lantheus)	Inférieur à 0,8	12 heures	1,1-3,3 μm	USA.
Optison® (GE Healthcare)	Environ 0,6	30 minutes	3-4,5 μm	USA, Europe.
PESDA® (Radiology Laboratory of the FMUSP)	Inférieur à 0,4	–	4,7 μm	Chine, Amérique du Sud.
SonoVue® (Bracco)	Environ 0,1	6 heures	2,5 μm	Europe, Asie, USA (sauf le Japon).
Sonazoid® (GE Healthcare)	Entre 0,7 et 1,2	2 heures	2,3-2,9 μm	Japon.

Tableau 2 : Agents de contraste ultrasonore commercialisés dans le monde.

Lorsqu'une microbulle de gaz est excitée sous un champ ultrasonore, sa coque entre en oscillations volumétriques forcées et diffuse dans toutes les directions (Figure 1). Dans ce cas, la microbulle est assimilée à une source ponctuelle dont la réponse dépend de la fréquence de l'onde incidente et de sa taille. Comme pour tout système oscillant, la fréquence propre ou fréquence de résonance varie inversement proportionnellement avec la taille de la microbulle. Ainsi, les microbulles de 2 μm de diamètre ont une fréquence de résonance d'environ 2 MHz qui tend vers 10 MHz pour des microbulles de 0,5 μm de diamètre (Figure 2). Dans la pratique, à la fréquence de résonance des microbulles, leurs oscillations sont maximales et le signal ultrasonore collecté est maximal.

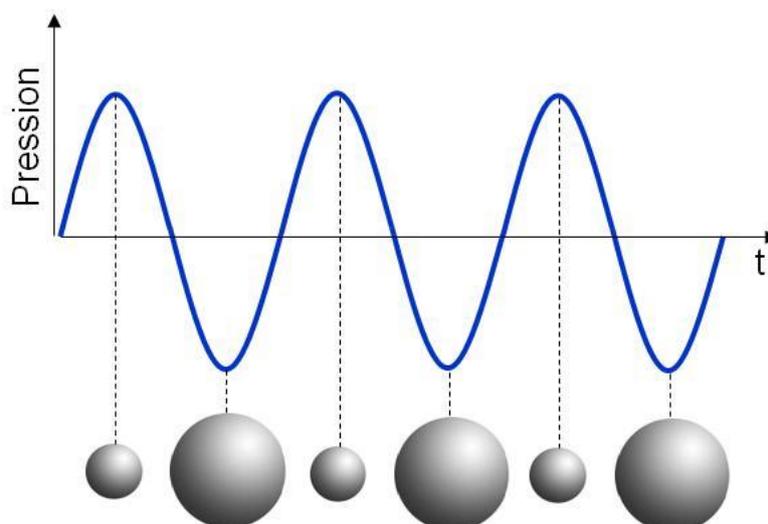


Figure 1 : Oscillations volumétriques de la microbulle en fonction de la pression appliquée.

Lorsqu'une microbulle de gaz est excitée sous un champ ultrasonore de pression P , sa coque entre en oscillations volumétriques forcées et diffuse dans toutes les directions.

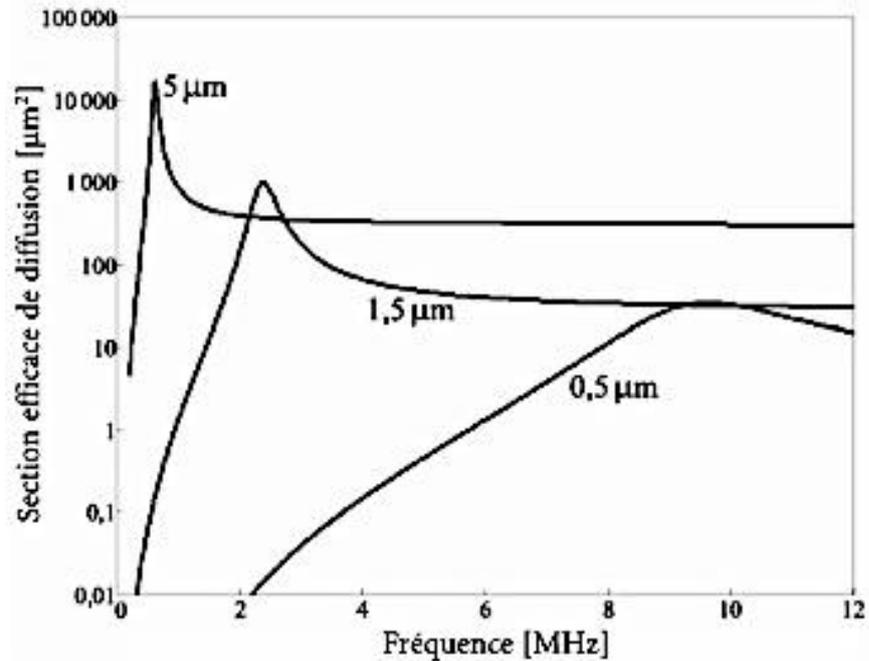


Figure 2 : Section efficace de diffusion en fonction de la fréquence pour trois microbulles de tailles différentes.

On remarque que les microbulles de 2 μm de diamètre ont une fréquence de résonance (maximum de la courbe) d'environ 2 MHz qui tend vers 10 MHz pour des microbulles de 0,5 μm de diamètre. La fréquence propre ou fréquence de résonance varie inversement proportionnellement avec la taille de la microbulle [32].

Par ailleurs, en fonction de la pression acoustique, trois régimes de réponse des agents de contraste sont possibles. Les limites entre ces trois régimes sont définies en fonction de l'index mécanique :

- A faible index mécanique ($<0,1$), les oscillations des microbulles sont linéaires et synchrones avec l'onde ultrasonore et les microbulles se déforment peu. Les microbulles réémettent un signal de fréquence égale à la fréquence d'émission. Ce régime est dit linéaire.

- Entre 0,1 et 0,7, les oscillations des microbulles deviennent non linéaires avec des réponses acoustiques qui varient non linéairement avec l'amplitude de l'onde incidente. Cette non-linéarité dépend fortement de la taille de la microbulle, de la pression incidente et des caractéristiques du fluide. Le spectre fréquentiel de la réponse non linéaire d'une microbulle contient alors, en plus de la composante fondamentale à la fréquence d'émission, des composantes non linéaires qui se produisent à des fréquences multiples et en particulier la composante harmonique qui est à deux fois la fréquence émise. Il s'agit de ce régime qui est utilisé en échographie de contraste pour la détection des microbulles. Plus précisément, c'est l'exploitation des composantes non linéaires du signal issu des microbulles qui permet de s'affranchir du signal provenant des tissus environnants qui est majoritairement linéaire. On parlera dans ce cas d'imagerie harmonique, décrite dans le paragraphe suivant.
- A des index mécaniques supérieurs à 0,7, les microbulles sont détruites avec une libération du gaz qu'elles contenaient. Cette rupture produit un fort et bref signal dû à la libération de composantes harmoniques transitoires. Les microbulles peuvent également se fragmenter en plusieurs microbulles.

Les limites entre les différents régimes dépendent des propriétés physico-chimiques des agents de contraste, de la viscosité du milieu entourant la microbulle et de l'atténuation de l'onde entre le point d'émission et les microbulles.

1.2.2. Mode de détection des agents de contraste ultrasonore.

Si la détection des microbulles fonctionnant sur le régime linéaire (index mécanique inférieur à 0,1) a été utilisée avec les modes d'échographie conventionnelle (le mode B et le mode Doppler) [29], ce mode de détection des microbulles n'est pas suffisamment sensible en raison de la contribution du signal acoustique des tissus.

La détection des microbulles fonctionnant sur le régime destructif (index mécanique supérieur à 0,7) consiste à détecter les microbulles lors de leur destruction où elles produisent un bref et intense signal [33, 34]. Ce mode d'imagerie est très sensible et est utilisé en cardiologie pour l'estimation des perfusions myocardiques. En cancérologie, de nombreuses études soulèvent les risques de lésions des vaisseaux lors de l'éclatement des agents de contraste [35].

Enfin la détection des microbulles en régime non linéaire (index mécanique entre 0,1 et 0,7) repose sur les propriétés multifréquentielles de l'onde rétrodiffusée, non seulement à la fréquence d'excitation f_0 mais également à des fréquences multiples entières de la fréquence f_0 . L'imagerie harmonique de contraste repose sur cette signature acoustique où la deuxième composante fréquentielle $2f_0$, appelée second harmonique, est utilisée pour établir l'image échographique de contraste. Cette méthode permet une plus grande sensibilité de détection en s'affranchissant de la contribution fréquentielle des tissus à f_0 .

De manière générale, cette méthode de contraste est optimale lorsque les signaux transmis possèdent des bandes fréquentielles à la fois étroites pour limiter le chevauchement et suffisamment séparées pour assurer un filtrage fréquentiel autour de $2f_0$. D'un point de vue de détection, l'imagerie harmonique impose alors un compromis entre la résolution spatiale axiale (dépendante de la largeur de bande) et le contraste de l'image. Pour y pallier, plusieurs techniques d'imagerie harmonique ont été développées et reposent sur l'inversion de phase du signal, sur la modulation d'amplitude ou bien sur les deux. D'autres approches mettent en œuvre des fréquences subharmoniques (inférieures à $2f_0$) ou bien super-harmoniques (supérieures à $2f_0$).

L'imagerie par inversion de phase est la technique la plus utilisée [36-38]. Elle consiste en l'émission de deux impulsions de formes identiques mais de phases inversées (Figure 3). La somme des deux impulsions issues de structures aux comportements linéaires est nulle, contrairement à la somme des impulsions issues des structures aux comportements non-linéaires comme les microbulles. Ainsi, la contribution des signaux provenant des tissus est amplifiée. Si la principale limite de cette technique est la diminution de la cadence image, celle-ci reste très élevée, comparée aux autres modalités d'imagerie de contraste avec une résolution temporelle de l'ordre de 200ms (en IRM et en TEP, elle est de l'ordre de la minute et en CT, elle est de l'ordre de 100ms).

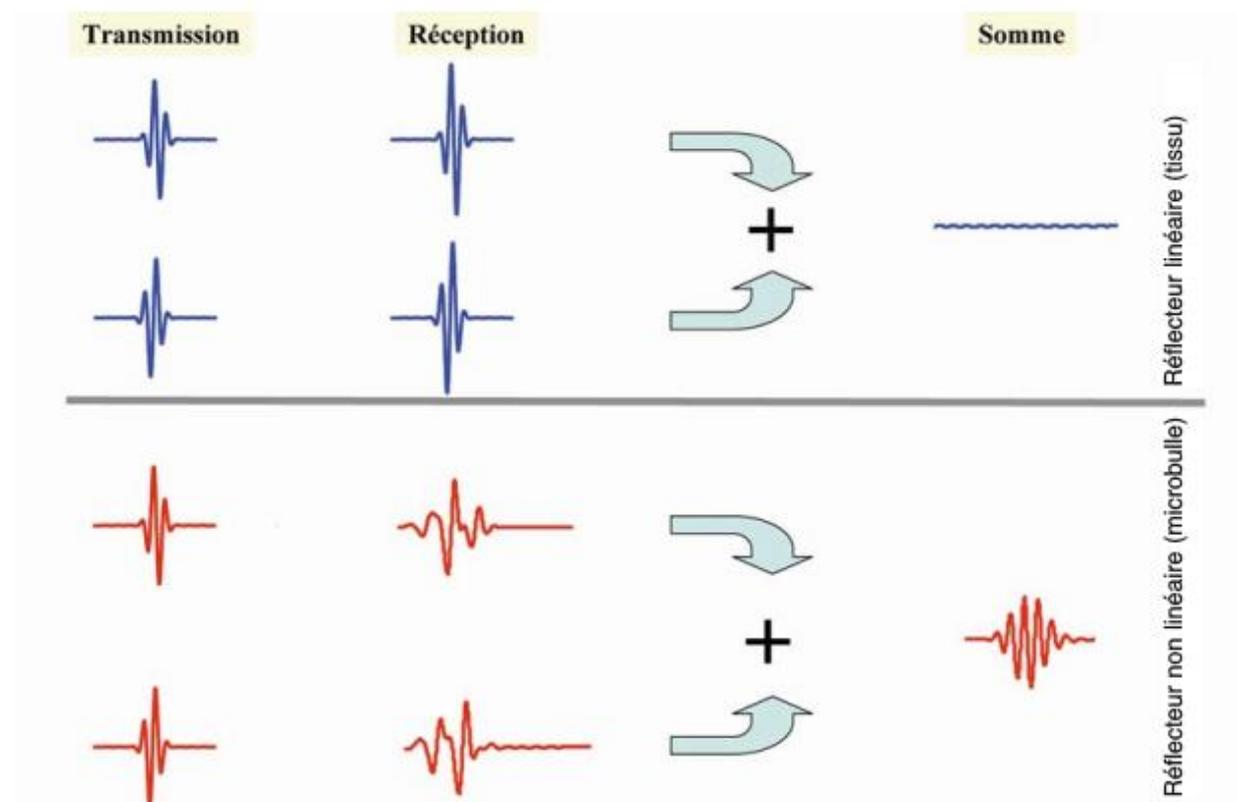


Figure 3 : Principe de l'imagerie par inversion de phase.

Elle consiste en l'émission de deux impulsions de formes identiques mais de phases inversées (courbes à gauche). La somme des deux impulsions issues de structures aux comportements linéaires est nulle (en bleu à droite), contrairement à la somme des impulsions issues des structures aux comportements non-linéaires comme les microbulles (en rouge à droite) [32].

L'imagerie par modulation d'amplitude consiste en l'émission de deux ondes ayant des amplitudes différentes. Dans le cas où il y a un rapport de deux entre les amplitudes à la transmission, une amplitude électronique est appliquée à la réception pour égaliser les amplitudes. Dans ce cas, la soustraction des échos annule les signaux de composantes linéaires comme les tissus et préserve les contributions non linéaires des microbulles (Figure 4).

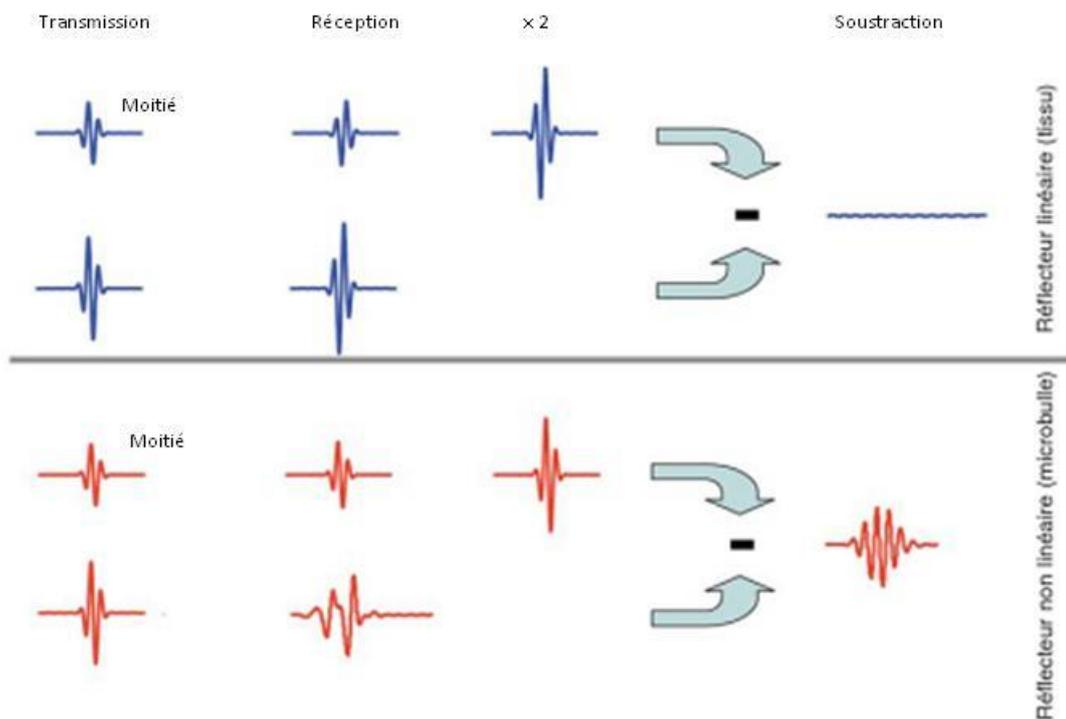


Figure 4 : Principe de l'imagerie par modulation d'amplitude.

L'imagerie par modulation d'amplitude consiste en l'émission de deux ondes ayant des amplitudes différentes correspondant aux courbes à gauche. Dans le cas où il y a un rapport de deux entre les amplitudes à la transmission, une amplitude électronique est appliquée à la réception pour égaliser les amplitudes. Dans ce cas, la soustraction des échos annule les signaux de composantes linéaires comme les tissus (en bleu à droite) et préserve les contributions non linéaires des microbulles (en rouge à droite) [32].

L'imagerie Contrast Pulse Sequence (CPS) est une combinaison de l'imagerie par inversion de phase et par modulation d'amplitude de manière à prendre en compte la composante fondamentale non linéaire des microbulles. Cette méthode consiste en l'émission de deux impulsions ayant des phases différentes et des amplitudes différentes d'un facteur deux (Figure 5). Pour les microbulles, l'écho de l'onde ayant l'amplitude la plus grande présentera des composantes harmoniques non linéaires. Ces dernières seront responsables d'une perte d'énergie dans le signal recueilli et se traduira par la présence d'un signal non linéaire à la fréquence fondamentale. L'écho provenant de l'onde d'amplitude la plus petite est amplifiée d'un facteur deux.

Pour les microbulles, la somme de l'onde amplifiée et de l'onde non amplifiée prendra donc en compte un signal fondamental et un signal harmonique non linéaire alors que pour les tissus la somme sera nulle. Cette technique permet d'augmenter l'amplitude des signaux recueillis par rapport aux deux premières techniques. Cependant, cette technique est également sensible aux mouvements des tissus.

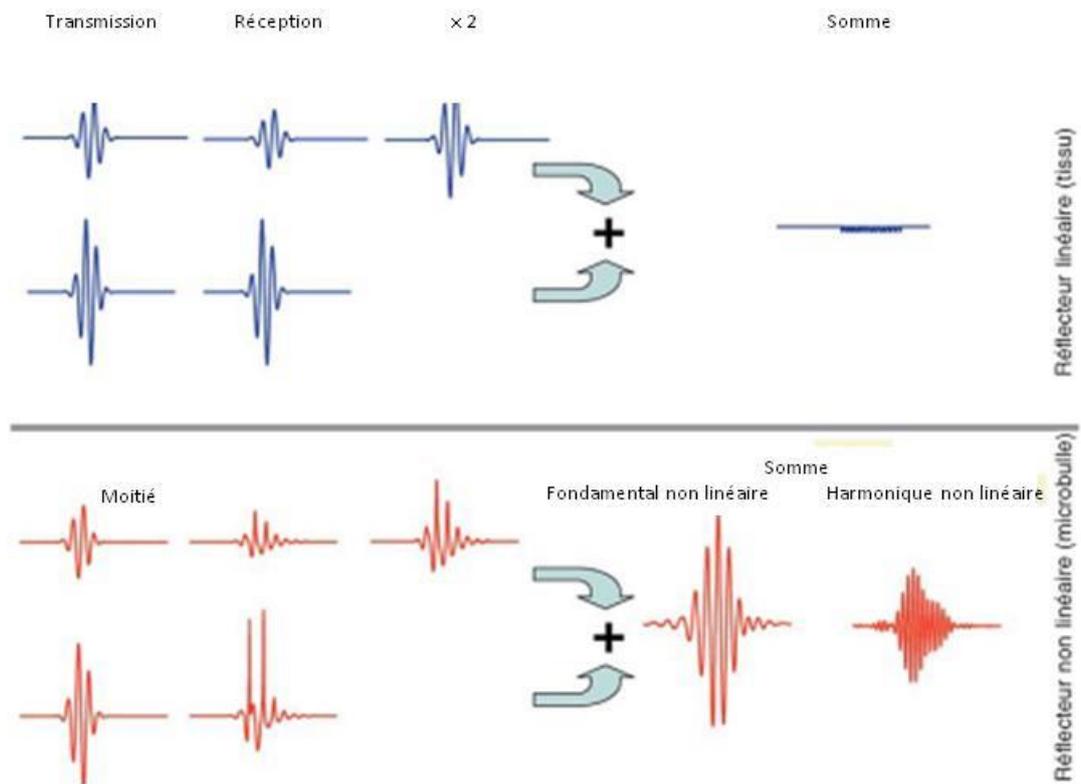


Figure 5 : Principe de l'imagerie par modulation d'amplitude et de phase.

L'imagerie Contrast Pulse Sequence (CPS) est une combinaison de l'imagerie par inversion de phase et par modulation d'amplitude de manière à prendre en compte la composante fondamentale non linéaire des microbulles. Cette méthode consiste en l'émission de deux impulsions ayant des phases différentes et des amplitudes différentes d'un facteur deux correspond aux courbes à gauche. Pour les microbulles, l'écho de l'onde ayant l'amplitude la plus grande présentera des composantes harmoniques non linéaires. L'écho provenant de l'onde d'amplitude la plus petite est amplifiée d'un facteur deux. Pour les microbulles, la somme de l'onde amplifiée et de l'onde non amplifiée prendra donc en compte un signal fondamental et un signal harmonique non linéaire (en rouge à droite) alors que pour les tissus la somme sera nulle (en bleu à droite) [32].

Enfin, d'autres techniques d'imagerie sont à l'étude, en particulier celles qui mettent en œuvre des composantes ou des combinaisons de la fréquence harmonique qui visent à diminuer la contribution linéaire des tissus environnants [39].

Le mode utilisé dans le cadre de cette thèse repose sur le mode VRI (Vascular Recognition Imaging) proposé par le constructeur Toshiba Medical System (Japan). Il permet un triple affichage simultané avec le mode B pour accéder aux informations anatomiques, le mode Doppler pour renseigner sur la microvascularisation environnante de la région explorée et enfin l'imagerie harmonique de contraste.

1.2.3. L'échographie de contraste vers une routine clinique.

La combinaison de l'imagerie harmonique avec les agents de contraste de seconde génération, associés à des logiciels de traitements du signal a permis à l'échographie de contraste de se développer dans les services cliniques. Les applications cliniques concernent principalement deux domaines : la cardiologie et la cancérologie. Dans le premier cas, l'examen fait en routine permet la recherche d'un shunt droite-gauche et, plus récemment, vise à déterminer l'état de perfusion du muscle cardiaque.

Dans le second cas, en cancérologie, les applications de l'échographie de contraste sont croissantes depuis les années 2000. Dans le cadre des atteintes du foie, la vascularisation des lésions peut être observée selon différentes phases qu'elles soient artérielles, portales, tardives. De manière générale, il s'agit essentiellement d'observer la rapidité et la distribution spatiale de la vascularisation. Ainsi et comme il est décrit dans les guidelines internationaux de 2004 à aujourd'hui, l'échographie permet de caractériser les lésions focales du foie, bénignes ou malignes, de guider les biopsies et de suivre l'évolution vasculaire dans le temps [40].

Au-delà de la caractérisation tumorale, l'échographie de contraste permet de suivre l'efficacité des thérapies ciblant l'angiogenèse. Cette technique est adaptée à tous les types de tumeurs vascularisées accessibles aux ultrasons. Les premières études mono-centriques réalisées chez des patients porteurs de GIST (Gastro Intestinal Stromal Tumor) [41] ou de cancers du rein métastatiques [42] ont été publiées dès 2005. Avec seulement une analyse qualitative de la prise de contraste ces études ont montré une diminution significative de la perfusion dès le septième jour de traitement chez les bons répondeurs. Le développement d'une méthode semi-quantitative a permis de calculer des paramètres reliés au volume et au flux vasculaires. Quatre études mono-centriques ont été réalisées chez des patients porteurs de CHC [43], cancer du rein métastatique [44], GIST [45] et dans une phase 1 [46] traités respectivement par bevacizumab, sunitinib, masatinib et sorafenib. Toutes ont démontré que l'AUC était significativement corrélée à la réponse du critère RECIST. Enfin l'étude multicentrique STIC DCE-US (INCA) incluant 539 patients dans 19 centres a confirmé qu'une diminution de plus de 40% de l'AUC à un mois était significativement corrélée à la survie sans progression ($p=0,005$) et à la survie globale ($p=0,05$) [4]. Outre l'aspect quantitatif de cette modalité d'imagerie avec l'existence d'un biomarqueur, la sensibilité de la technique est également à souligner. En effet, dans une étude comparative avec la tomodensitométrie de contraste, sur des patients atteints de carcinome hépatocellulaire métastasé, seule l'échographie de contraste permet de différencier après un mois de traitement les bons des mauvais répondeurs [47].

Aujourd'hui des guidelines européens et internationaux permettent de proposer une nouvelle utilisation de l'échographie de contraste en cancérologie, en définissant les indicateurs pathologiques validés, mais également les méthodologies à respecter [40, 48, 49]. Si ce travail de la communauté médicale est nécessaire pour valider et étendre la méthode, il n'est malheureusement pas suffisant pour une utilisation en routine clinique à l'échelle internationale. A cela deux limitations s'ajoutent. La première concerne le déploiement limité des agents de contraste et en particulier en Amérique du Nord. Ainsi le SonoVue, produit développé par la société Bracco, a obtenu l'accord de la Food and Drug Administration des Etats-Unis seulement cette année en 2015 sous le nom commercial du Lumason. Cette nouvelle devrait vraisemblablement favoriser le développement de la technique. La seconde limitation concerne l'absence d'homogénéisation des caractéristiques des échographes en mode harmonique.

Cet aspect implique une véritable difficulté à mener des études multicentriques obligeant chaque service à disposer du même échographe avec les mêmes réglages. L'équipe développe actuellement des méthodes originales pour faciliter la calibration d'appareils quelles que soient leurs références.

1.3. Quantification de la vascularisation tumorale en échographie de contraste ultrasonore.

La mesure quantitative en imagerie fonctionnelle et métabolique est un enjeu récent dans le domaine de la cancérologie. Son développement s'est accru dans les années 90 avec l'introduction des examens TEP dans les services de médecine nucléaire où la mesure de la quantité d'un radiopharmaceutique participe à caractériser en partie la malignité et la radiorésistance de la tumeur.

Dans le cadre de l'imagerie de la vascularisation tumorale, l'approche quantitative est essentielle pour évaluer l'évolution du processus d'angiogénèse au cours du temps via les paramètres associés (débit et volume vasculaire). A ce jour, deux familles de méthode de quantification coexistent et se distinguent selon deux modes d'injection des agents de contraste : en continue ou en un seul coup dit en bolus. Pour ces deux méthodes, des séquences d'imagerie différentes sont appliquées permettant suite à une modélisation du signal ultrasonore d'accéder au volume sanguin et au débit sanguin. Ces méthodes supposent que l'intensité du signal ultrasonore est proportionnelle à la quantité de microbulles dans la région imagée. Elles sont détaillées successivement dans cette partie.

1.3.1. Imagerie DCE-US avec l'injection des agents de contraste en continue.

Pour ce mode d'injection, les agents de contraste sont injectés en continue durant 10 à 15 minutes avec un débit constant. Deux types d'imagerie sont basés sur cette manière d'injecter les agents de contraste : l'approche destruction-remplissage et l'approche réalisant une imagerie durant la phase de destruction.

1.3.1.1. Approche destruction-remplissage.

Cette approche appelée également « replenishment » fut mise au point par l'équipe de Wei [34]. Une impulsion ultrasonore d'index mécanique élevé est appliquée pour détruire les microbulles dans la zone imagée. Suite à cette impulsion, les microbulles remplissent la région qui avait été initialement libérée des agents de contraste. Ce remplissage est imagé avec un index mécanique bas pour ne pas détruire les microbulles.

Cette approche peut être exploitée pour extraire des informations sur le volume vasculaire et sur la vitesse de la microvascularisation [34, 50]. Elle consiste à considérer un volume vasculaire avec une entrée et une sortie dans lequel circulent les microbulles. Au temps t_0 , le volume d'étude V_f ne présente pas de microbulles (car elles viennent d'être détruites par l'impulsion ultrasonore). Elles entrent dans le volume vasculaire V_f avec une concentration C_0 et en sortent au cours du temps avec une concentration $C(t)$.

La relation entre ces concentrations est la suivante :

$$\frac{dC(t)}{dt} = C_0 \frac{Q}{V_f} - C(t) \frac{Q}{V_f} \quad \text{Équation I.1}$$

La solution de cette équation avec comme condition initiale $C(t)=0$ à $t=0$ est :

$$C(t) = C_0 \left(1 - e^{-\frac{Q}{V_f}t} \right) \quad \text{Équation I.2}$$

Q est le débit moyen du sang dans la région imagée.

Dans ce modèle, la pente de la courbe temps-intensité à l'origine correspond au débit sanguin alors que la valeur de l'asymptote au temps tardif correspond au volume sanguin.

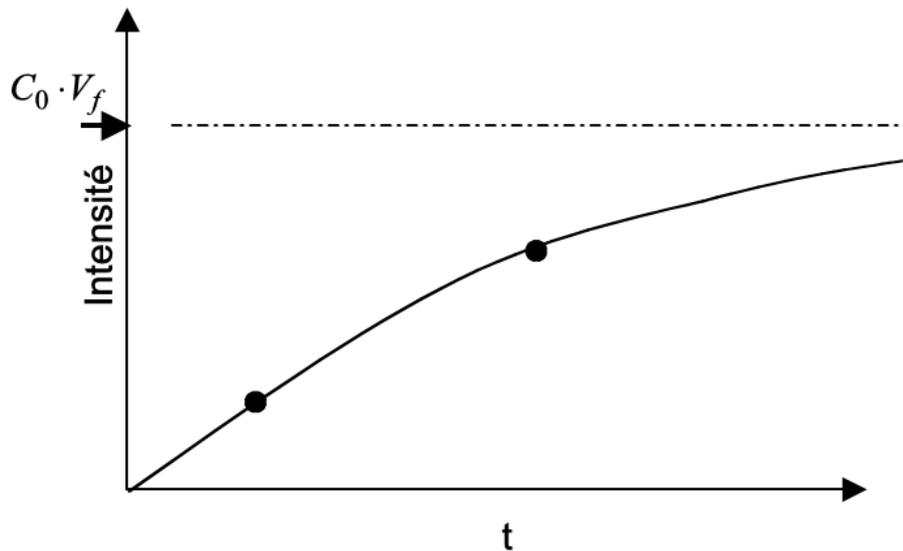


Figure 6 : Courbe de l'intensité de contraste en fonction du temps pour l'approche « replenishment ».

Une impulsion ultrasonore d'index mécanique élevé est appliquée pour détruire les microbulles dans la zone imagée correspond au temps zéro sur la courbe et qui donne bien une intensité nulle. Suite à cette impulsion, les microbulles remplissent la région qui avait été initialement libérée des agents de contraste. Ce remplissage est imagé avec un index mécanique bas pour ne pas détruire les microbulles. La pente de la croissance linéaire est proportionnelle au débit sanguin. L'amplitude du plateau est proportionnelle au volume sanguin [32].

1.3.1.2. Imagerie durant la phase de destruction (CODIM, Contrast burst depletion imaging).

Un autre mode est possible, le mode destructif développé par l'équipe d'Eyding [51]. Ce mode exploite la manière dont les agents de contraste sont détruits sous l'effet d'une série d'impulsions. Suite à l'injection des microbulles en continue, la séquence utilisée pour ce type d'imagerie est la suivante : une acquisition de la tumeur complètement remplie de microbulles est réalisée. Puis, une série d'impulsion de puissance acoustique moyenne à intervalle régulier est appliquée pour détruire une fraction des microbulles jusqu'à ce que l'intensité des microbulles atteigne une valeur constante en fonction du temps. Cette valeur d'intensité constante correspond à l'équilibre entre les microbulles rentrant de la zone imagée et celles détruites et sortant de la zone imagée.

La concentration $C(t)$ des microbulles en fonction du temps dans la zone imagée s'exprime selon la formule suivante :

$$C(n + 1) = C_0 \cdot \left(1 - e^{-\frac{Q}{V_f} \Delta t} \right) + C(n) \cdot e^{-\frac{Q}{V_f} \Delta t} \cdot e^{-d} \quad \text{Équation I.3}$$

Dans cette équation :

- C_0 : concentration au temps $t=0$ quand les microbulles remplissent la région imagée,
- n : nombre d'images acquises,
- Q : débit moyen du sang dans le volume imagé,
- d : destruction des microbulles par les impulsions ultrasonores,
- V_f : volume sanguin dans la région imagée.

L'ordonnée à l'origine de la courbe permet d'en déduire la fraction du volume vasculaire et la pente de la courbe permet d'interpréter le débit vasculaire.

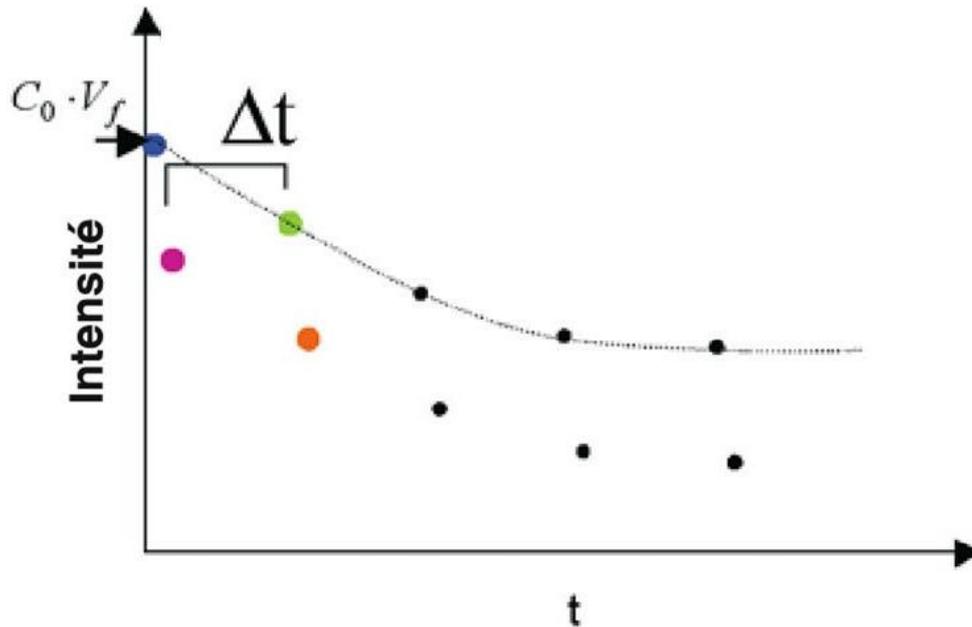


Figure 7 : Courbe de l'intensité de contraste en fonction du temps pour l'Imagerie durant la phase de destruction. Δt est l'intervalle entre deux impulsions acoustiques.

Suite à l'injection des microbulles en continue, la séquence utilisée pour ce type d'imagerie est la suivante : une acquisition de la tumeur complètement remplie de microbulles est réalisée correspondant au temps zéro. Puis, une série d'impulsion de puissance acoustique moyenne à intervalle régulier est appliquée pour détruire une fraction des microbulles jusqu'à ce que l'intensité des microbulles atteigne une valeur constante en fonction du temps. L'ordonnée à l'origine permet d'en déduire le volume vasculaire et la pente de la courbe permet d'en déduire le débit sanguin [32].

Ce modèle présente l'avantage de prendre en compte la destruction ultrasonore des microbulles par les impulsions ultrasonores. Ainsi, la mesure de la perfusion n'est pas faussée par la destruction des microbulles. De plus, plusieurs études ont montré que les mesures de débit sanguin avec ce modèle sont indépendantes de l'index mécanique appliqué dans la phase de remplissage [50-52].

De manière générale, la méthode d'injection en continue des agents de contraste ultrasonore avec une destruction initiale dans la région d'intérêt offre l'avantage de s'affranchir de toute variabilité possible lors de l'administration des microbulles. A l'inverse, cette méthode s'accompagne d'un faible rapport signal sur bruit malgré la quantité souvent plus importante de produit à injecter.

Enfin, la mise en place d'un pousse-seringue associé à un temps d'acquisition long est un frein essentiel à la technique dans les services cliniques [53]. Dans ce contexte la technique d'injection par bolus apparaît comme une alternative séduisante et est donc largement utilisée au sein de l'équipe de recherche. Cette méthode est à présent détaillée.

1.3.2. Imagerie DCE-US avec l'injection des microbulles en bolus.

Lorsque l'injection des agents de contraste se fait par bolus, cela signifie que ces derniers sont administrés manuellement dans un laps de temps quasi instantané. Cette méthode permet une étude de la variation des intensités ultrasonores au cours du temps pendant la phase de remplissage et d'élimination du bolus, au sein de la région tumorale imagée. La durée de l'acquisition est d'environ trois minutes. L'estimation de la microvascularisation est alors obtenue à partir de la courbe de rehaussement du signal ultrasonore en fonction du temps. Plus précisément s'il est possible de modéliser cette courbe et d'en extraire plusieurs paramètres graphiques liés à cette microvascularisation.

La modélisation mathématique de la courbe est un des aspects fondamentaux pour la quantification des agents de contraste avec un triple enjeu :

- Rendre exploitables toutes les courbes de rehaussement du signal ultrasonore même celles présentant des fluctuations importantes,
- S'affranchir du phénomène de recirculation des agents de contraste ultrasonore dans l'organisme. Dans ce cas, un second rehaussement d'amplitude réduite peut apparaître sur la courbe,
- Assurer la robustesse de la quantification en imposant un modèle pour extraire les paramètres graphiques.

S'il existe plusieurs modélisations mathématiques décrites dans la littérature [53, 54], l'équipe a été précurseur dans ce domaine avec le développement et la validation d'un modèle [3] qui a fait l'objet d'un brevet international [55]. Il est basé sur la minimisation par les moindres carrés entre les données linéaires brutes issues de l'échographe et les coefficients de l'équation polynomiale suivante :

$$I(t) = a_0 + (a_1 - a_0) \times \frac{(A + (\frac{t}{a_2})^p)}{(B + (\frac{t}{a_2})^q)} \quad \text{Équation I.4}$$

Dans cette équation :

- $I(t)$: intensité du signal ultrasonore en fonction du temps exprimée en unité arbitraire,
- a_0 : valeur de l'intensité à $t=0$, avant l'arrivée des agents de contraste,
- a_1 : valeur maximale de l'intensité,
- a_2 : temps de montée correspondant à la valeur maximale de l'intensité,
- p lié à la pente du wash-in,
- q lié à la pente du wash-out,
- A et B sont des paramètres arbitraires.

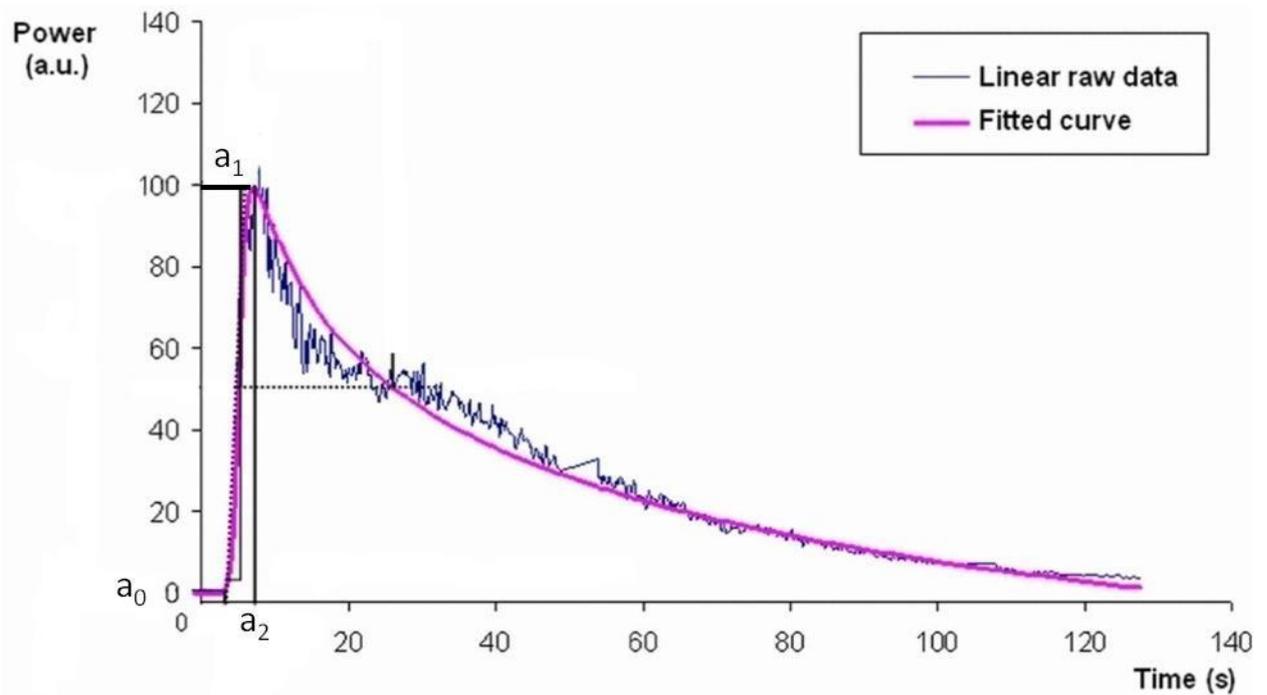


Figure 8 : Courbe représentant l'intensité ultrasonore des microbulles en fonction du temps pour une injection de microbulles en continu.

Cette courbe est ensuite modélisée par la courbe violette pour en déduire des paramètres graphiques.

Enfin dans le cadre de l'injection des agents de contraste par bolus, la plage des valeurs des intensités est très large sur un intervalle de temps très court. Dans ce cas particulier, la compression logarithmique conventionnelle des données (permettant un codage de 12 à 8 bits) qui réduit la dynamique des valeurs est une source importante de perte d'informations. Dans ce contexte, il a été obtenu par Peronneau et al. une meilleure sensibilité de la méthode de quantification pour évaluer l'évolution temporelle de la microvascularisation en utilisant des données brutes. Ceci garantit une parfaite correspondance avec la mesure des intensités réflexives [56]. Cette méthodologie est aujourd'hui précisée dans les guidelines [40, 49].

C'est donc à partir de la modélisation mathématique, qu'il est possible d'extraire des paramètres semi-quantitatifs ou quantitatifs de la microvascularisation tumorale.

1.3.2.1. Méthodes semi-quantitatives.

La méthode semi-quantitative qui est aujourd'hui la seule largement utilisée dans les services cliniques repose sur l'extraction de paramètres graphiques à partir de la courbe de rehaussement modélisée.

Ainsi, il est possible de déterminer sept paramètres :

- Le rehaussement maximal (PI : Peak Intensity) est l'amplitude maximale atteinte par la courbe de prise de contraste : Il s'agit de $I_{\max}=I(T_{\max})$,
- Le temps de montée (T_{PI} : Time to PI) est le temps requis par le produit de contraste pour atteindre le rehaussement maximal. Mathématiquement parlant, il est défini comme étant égal à la différence entre le temps de latence T_L (temps entre l'injection du produit de contraste et le début de la prise de contraste).
- L'aire sous la courbe (AUC : Area Under the Curve) est l'aire totale sous la courbe de prise de contraste,
- L'aire sous le Wash-In (AUWI : Area Under the Wash-In) est l'aire sous la partie croissante de la courbe de prise de contraste. Il s'agit de l'aire sous la courbe entre T_0 et T_{\max} ,
- L'aire sous le Wash-Out (AUWO : Area Under the Wash-Out) est l'aire sous la partie décroissante de la courbe de prise de contraste. Il s'agit de l'aire sous la courbe entre T_{\max} et T_{end} (associé au temps de fin d'acquisition),
- Le coefficient de la pente du wash-in est la pente de la tangente du wash-in de la courbe de prise de contraste à mi-hauteur,
- La largeur de la courbe de prise de contraste à mi-hauteur (FWHM : Full Width at Half Maximum) est associée en première approximation au temps de transit moyen (MTT : Mean Transit Time).

C'est la théorie de l'indicateur dilué ou traceur qui permet, en partie, de lier les paramètres graphiques à la physiologie de la tumeur. Le système décrit par Hamilton et al. considère une entrée artérielle, un ensemble de capillaires irrigant le tissu et une sortie veineuse. Ce modèle s'appuie sur plusieurs hypothèses dont l'aspect intravasculaire du traceur (ce qui est le cas avec les agents de contraste ultrasonore), son faible volume et son injection sur une courte durée. A $t=0$, q_0 moles de traceurs sont injectées dans le réseau capillaires via l'artère. La totalité du traceur injecté quittant le système, la concentration $c(F)$ peut être mesurée en sortie du système jusqu'à élimination complète.

$$dq = FC_v(t)dt \quad \text{Équation I.5}$$

$$\text{Soit : } q_0 = F \int_0^{\infty} C_2(t)dt \quad \text{Équation I.6}$$

$$\text{Il en découle : } \frac{q_0}{F} = AUC \quad \text{Équation I.7}$$

$$\text{Puis avec } \frac{V}{F} = MTT \quad \text{Équation I.8}$$

On en déduit le théorème du volume central.

Si cette théorie explique donc une partie des paramètres graphiques, il apparaît un certain désaccord de la communauté scientifique quant au lien de ces grandeurs selon le volume ou le débit sanguin. C'est en particulier le cas avec l'aire sous la courbe.

D'un point de vue mathématique, il est possible d'écrire dans le cadre de la méthode de dilution :

$$F = \frac{V}{\Delta t} \quad \text{Équation I.9}$$

et

$$q = C^0 V \quad \text{Équation I.10}$$

$$\text{Donc : } F = \frac{V}{\Delta t} = \frac{q}{C^0 \Delta t} = \frac{q}{AUC} \quad \text{Équation I.11}$$

Donc l'AUC dépend de F^{-1} et de V^{-1} .

Ainsi, l'aire sous la courbe est *a priori* à la fois liée au débit sanguin et au volume sanguin, deux grandeurs généralement opposées dans la littérature. Krix et al. montrent dans une étude préclinique l'absence de corrélation entre le volume sanguin et l'AUC et le PI [57], contrairement à ce qu'indique Cosgrove en 2001 [58]. La corrélation de l'AUC et du PI a été observée avec le débit sanguin sur des études *in vitro* [59] et non confirmée par Claudon avec une corrélation pas clairement significative (probabilité évaluée à 0,05).

Au regard de cette absence de consensus sur la corrélation réelle entre les paramètres graphiques et la physiologie de la tumeur, il apparaît essentiel aujourd'hui d'apporter une réponse scientifique fiable. C'est donc dans ce contexte que s'inscrit ce sujet de thèse où un des enjeux était d'étudier la correspondance entre le modèle mathématique graphique et les caractéristiques physiologiques de la tumeur.

La faisabilité de cette méthode semi-quantitative par injection des agents de contraste en bolus a été validée à l'échelle clinique sur 19 centres en France avec 65 radiologues par N. Lassau [3]. Cette étude a porté sur 2062 examens d'échographie de contraste et était basée sur l'attribution d'un score de qualité de 0 à 5 (0 étant la plus mauvaise qualité) à six critères susceptibles d'être liés à la précision de l'évaluation. Ces critères étaient la taille et le mouvement de la lésion, la perte de la lésion et la distinction de ces limites, l'acquisition totale du wash-in et la taille de la fenêtre d'acquisition par rapport à la lésion. L'étude a montré que seul 3% des examens étaient de qualité 0 liée essentiellement aux mouvements respiratoires. Cette étude clinique est fondatrice dans le domaine car au-delà de ses aspects méthodologiques, elle a été évaluée sur toutes les tumeurs avancées (les cancers métastatiques du rein, du sein, les mélanomes, les cancers du colon et les cancers gastro-intestinaux) traitées par différents anti-angiogéniques. Comme indiqué précédemment, il en ressort que l'AUC est un biomarqueur fiable avec un seuil de 40% au-delà duquel le patient est un bon répondeur au traitement.

Malgré ce succès, il est en général rapporté, dans la littérature, la très grande variabilité de cette méthode évaluée par notre équipe à 15% pour le paramètre de l'AUC [60]. Trois principales raisons sont à l'origine de cette variabilité :

- Le mode d'injection manuelle qui dépend de l'opérateur,
- Le positionnement de la sonde ultrasonore selon le plus grand axe de la tumeur (où de la métastase) qui dépend également de l'opérateur.

Concernant les deux autres sources de variabilité, il est possible de s'en affranchir en considérant le signal ultrasonore issu dans l'entrée artérielle de la tumeur. Cette méthode développée au sein de l'équipe dans le cadre des travaux de thèse de Marianne Gauthier va être à présent détaillée [61].

1.3.2.2. Méthodes quantitatives.

Les méthodes quantitatives de la microvascularisation tumorale pour mesurer les paramètres de manière dite « absolue » reposent toutes sur la déconvolution du signal tissulaire de la région tumorale avec le signal provenant de l'artère nourricière de la tumeur, appelé également fonction d'entrée artérielle. Il existe de nombreuses méthodes mathématiques pour déconvoluer la concentration tissulaire de la concentration artérielle.

La méthode quantitative mise en œuvre dans cette thèse est de type boîte noire, c'est-à-dire qu'elle se base sur la détermination de la quantité d'agents de contraste empruntant un chemin donné avec un temps donné et d'en extraire des données physiologiques. Les hypothèses alors nécessaires sont la proportionnalité entre le signal détecté et la quantité d'agents de contraste injectés et l'invariance du signal mesuré au cours du temps.

L'expression de la concentration tissulaire des agents de contraste $C_t(t)$ mesurée dans la région d'intérêt considérée peut s'écrire sous la forme d'un produit de convolution de la concentration artérielle des agents de contraste $C_a(t)$ avec la réponse impulsionnelle $R(t)$ du système.

$$c_t(t) = \alpha * (c_a(t) \otimes R(t)) \quad \text{Équation I.12}$$

α est une constante.

La réponse impulsionnelle $R(t)$ correspond au signal obtenu dans la tumeur après une injection de type impulsionnelle. La fonction d'entrée est alors considérée comme une distribution de Dirac.

La déconvolution permet ainsi de déterminer la contribution réelle dans la tumeur $C_t(t)$ alors affranchie de toutes variabilités externes à savoir l'injection manuelle du bolus, les conditions hémodynamiques du patient ou bien encore la quantité d'agents de contraste présents. Comme une déconvolution est un problème inverse mal posé où le bruit entraîne une résolution instable et pour laquelle plusieurs solutions sont possibles, il est nécessaire d'appliquer une contrainte ayant pour effet de limiter le nombre de liberté de la réponse impulsionnelle pour la stabiliser.

Il existe principalement deux méthodes algébriques de déconvolution qui permettent d'appliquer une contrainte excluant ainsi les oscillations de la solution : la méthode de Tikhonov et la méthode par décomposition en valeurs singulières (SVD). Ces deux méthodes sont basées sur une reformulation algébrique du produit de convolution entre le signal de l'entrée artérielle et celui de la tumeur où $C_t(t)$ et $C_a(t)$ sont mesurés à des intervalles de temps réguliers avec t_i pour i allant de 1 à n , les temps auxquels sont effectuées les mesures.

L'équation de convolution discrétisée s'écrit sous la forme :

$$C_t(t) = \alpha \int_0^{t_i} C_a(t) \cdot R(t - \tau) d\tau \quad \text{Équation I.13}$$

Cette équation se simplifie sous la forme :

$$A \cdot X = B \quad \text{Équation I.14}$$

Dans le cadre de la méthode de décomposition en valeurs singulières tronquées (Truncated SVD), il s'agit de reformuler la matrice A pour extraire la réponse impulsionnelle $R(t)$ [62] :

$$A = U \Sigma V^T \quad \text{Équation I.15}$$

Où U et V sont des matrices orthogonales composées de valeurs singulières. L'approche habituelle pour résoudre l'équation I.15 est d'introduire un indice de troncature de telle sorte que les plus petites valeurs singulières soient négligées. Physiquement, ces faibles valeurs correspondent au bruit de mesure. La valeur de ce seuil est fixée en fonction du nombre d'échantillons de mesures de $C_a(t)$ et du rapport signal sur bruit des mesures. Ce type de régularisation mathématique permet de limiter le nombre de degrés de liberté de la réponse impulsionnelle et ainsi aboutir à une solution unique et stable.

La méthode de Tikhonov consiste à résoudre l'équation 14 en déterminant la matrice X via une minimisation de la norme euclidienne de $\|AX - B\|_2$ et à ajouter une contrainte pour limiter le phénomène d'oscillations.

Cette contrainte est basée sur la fixation d'un paramètre de régularisation μ exploitant la formulation suivante [63] :

$$\min_x \{ \|AX - B\|_2^2 + \mu^2 \|X\|_2^2 \} \quad \text{Équation I.16}$$

La détermination du paramètre μ repose sur une lecture graphique d'un point de courbure en reportant l'écart aux données $\|AX_\mu - B\|_2$ en fonction de la solution $\|X_\mu\|_2$ (on parle de la courbure de « L »).

Une fois la réponse impulsionnelle déterminée par l'une des deux méthodes, TSVD ou Tikhonov, la courbe déconvoluée $R(t)$ est analysée pour extraire 3 paramètres physiologiques :

- Le flux sanguin tissulaire (FS) qui est le rehaussement maximal,
- Le volume sanguin tissulaire (VS) qui est l'aire sous la courbe,
- Le temps de transit moyen (MTT) qui est déterminé à partir du théorème du volume central.

$$MTT = \frac{V_S}{F_S} \quad \text{Équation I.17}$$

Dans le cadre de cette thèse, la déconvolution a été réalisée avec la méthode de décomposition en valeurs singulières tronquées (Truncated SVD) en raison de la stabilité des courbes déconvoluées obtenues par cette méthode par rapport à celles obtenues par la méthode de Tikhonov qui présentaient souvent des instabilités (Figure 9).

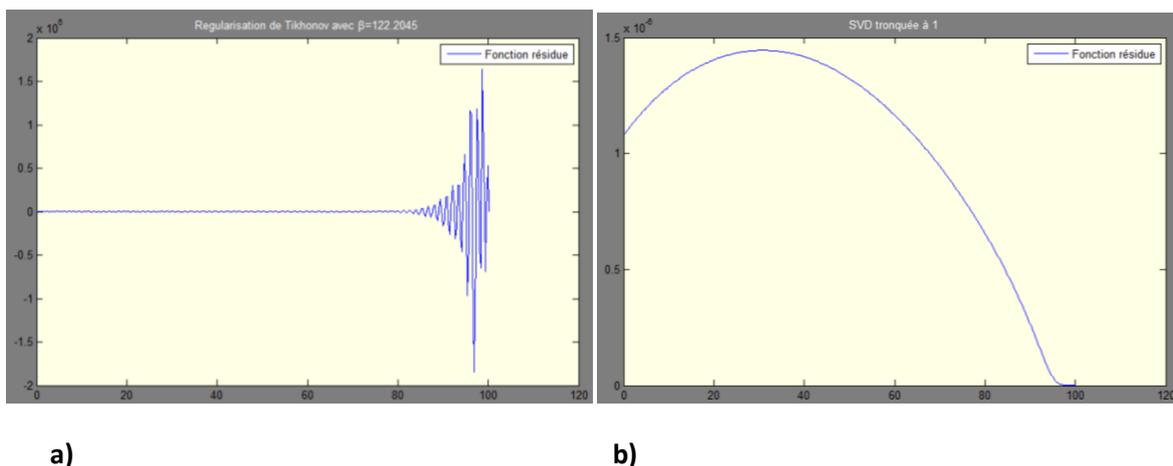


Figure 9 : Fonction résidue ou courbes déconvoluées pour les méthodes de Tikhonov a) et Truncated SVD b).

On remarque que la courbe obtenue par la méthode de Tikhonov présente des instabilités alors que la courbe issue de la méthode de décomposition en valeurs singulières tronquées (Truncated SVD) n'en présentent pas.

La thèse de sciences de Marianne Gauthier effectuée au sein de l'équipe avait pour objectif d'introduire et d'évaluer pour la première fois la méthode de déconvolution en échographie de contraste [61]. Les deux méthodes de régularisation TSVD et Tikhonov ont alors été implémentées sous Matlab puis mises en œuvre pour une double approche *in vitro* et *in vivo*.

Des études comparatives des méthodes quantitatives avec celles semi-quantitatives utilisées en routine ont permis d'identifier la variabilité des méthodes avec la contribution imputable au système de mesure, ou bien à l'opérateur. Les résultats ont permis de mettre en évidence une variabilité inférieure à 30% dans le cadre de la méthodologie de routine utilisée à Gustave Roussy et inférieure à 13% dans le cadre de la déconvolution de Tikhonov [64].

C'est dans le prolongement direct de cette étude que se situe mon sujet de thèse où l'enjeu est d'évaluer la sensibilité des deux méthodes de quantifications pour évaluer des modifications précoces de l'angiogenèse tumorale.

Pour cela, l'objectif de ma thèse était de développer de nouveaux outils méthodologiques issus de la physique que sont les fantômes expérimentaux, objets simulant des structures vasculaires et leur modélisation. Dans le cadre des fantômes, il s'agissait de concevoir des modèles expérimentaux permettant d'explorer des échelles micrométriques en introduisant des bancs d'expérimentations microfluidiques.

La modélisation numérique concerne quant à elle l'écoulement de l'agent de contraste dans un réseau vasculaire. Cette approche vise à explorer la fiabilité des méthodes mathématiques semi-quantitatives et quantitatives et à évaluer la concentration d'agents de contraste dans un réseau vasculaire à géométrie variable. Comme nous allons à présent l'aborder dans la partie suivante, la modélisation numérique de dynamique des fluides est une approche largement utilisée pour étudier l'écoulement des fluides biologiques. En revanche, cette méthode n'a jamais été mise en œuvre pour explorer le parcours des agents de contraste.

1.4. Modélisation numérique de la vascularisation tumorale : État de l'art.

De manière générale, la modélisation numérique de l'écoulement du sang est essentielle pour aborder les multiples problématiques liées à l'appareil circulatoire d'un patient et prendre en compte à la fois les nombreux paramètres physiologiques en jeu et les anatomies complexes. Dans la pratique, deux approches existent :

i) L'approche analytique basée sur l'exploitation de modèles mathématiques simplifiant la dynamique d'écoulement

ii) L'approche CFD (Computational Fluid Dynamics) élaborée sur la résolution des équations de Navier-Stokes.

Si la CFD permet d'implémenter des géométries anatomiques d'une grande finesse et d'obtenir des résultats précis, elle nécessite néanmoins un environnement de puissance de calcul important. En revanche, l'approche analytique permet sous certaines hypothèses d'appréhender des phénomènes physiques complexes. Aujourd'hui, ces approches de modélisation numérique de l'écoulement du sang sont largement utilisées en cardiologie et plus récemment en cancérologie.

1.4.1. Cardiovasculaire.

Dans le domaine de la recherche cardiovasculaire, de nombreuses études sont menées à partir de l'approche analytique pour modéliser l'écoulement du sang mais également le parcours de globules rouges de manière individuelle. Ainsi plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à la circulation des globules rouges au niveau des bifurcations capillaires en prenant en compte ou non la forme non sphérique des hématies [65, 66]. D'autres études ont porté sur la modélisation des débits vasculaires en tous points du réseau sanguin [67] et pouvant intégrer le comportement non Newtonien du sang par la résolution d'états stationnaires distincts [68]. Dans le cadre des études menées par CFD, il existe un très grand nombre de codes industriels et open source (Fluent, STAR-CD, Comsol, OpenFOAM, FLOW-3D) qui diffèrent par les modèles physiques considérés, leurs capacités à implémenter des géométries complexes et enfin leurs aptitudes à les mailler finement. Dans le domaine médical, il est alors possible d'intégrer des clichés d'imagerie médicale pour définir le système cardiovasculaire à modéliser. La modélisation numérique vasculaire devient alors personnalisée pour chaque patient pour lequel on vise à prédire des pathologies et des effets secondaires, à la suite de la pose de dispositifs médicaux implantables. Aujourd'hui les principaux accidents vasculaires que la communauté médicale cherche à prédire sont :

i) La dissection aortique où l'enjeu est de déterminer le point de rupture avant la déchirure de l'artère [69],

ii) Les facteurs hémodynamiques nécessaires au décollement de plaques d'athéromes sur une sténose carotidienne [70-72],

iii) Les conditions vasculaires sont également étudiées dans le cadre de la formation de l'anévrisme cérébral et de celui de l'aorte abdominale et

iv) Enfin l'efficacité d'une chirurgie réparatrice à la suite d'une coarctation¹ de l'aorte a également été étudiée.

¹ Une coarctation de l'aorte est un rétrécissement de l'aorte.

Au-delà de la prédiction pathologique, la CFD permet aujourd'hui d'optimiser la pose de dispositifs médicaux implantables en étudiant leurs impacts sur l'écoulement vasculaire [73-75], la formation de plaquettes dans le cas d'une valve cardiaque [76, 77] et enfin sur leur positionnement et leur géométrie adaptées à la conformation anatomique [78, 79].

1.4.2. Cancérologie.

Dans le domaine de la cancérologie, seules des approches analytiques sont menées pour modéliser la vascularisation tumorale. En amont des études de perfusion, la modélisation numérique analytique de microréseaux vasculaires réalistes ont permis d'étudier leurs influences sur la progression cellulaire tumorale et des protéines VEGF [80] et sur l'optimisation de l'absorption d'une chimiothérapie [81]. Dans le cadre de l'évaluation de la perfusion tumorale, un des paramètres clef mesuré par IRM est la perméabilité vasculaire envisagée comme biomarqueur de la progression de l'angiogenèse. Dans ce contexte, l'équipe de Padhani a développé des modèles mathématiques 2D et 3D pour simuler des écoulements intra et extra vasculaires et ainsi évaluer l'intérêt de la perméabilité vasculaire pour suivre l'efficacité d'une thérapie anti-angiogénique [82, 83]. Certaines équipes se sont également intéressées à l'étude de la pertinence de certains paramètres décrivant la perfusion pour différencier des réseaux vasculaires. Ainsi, il a été possible de différencier des réseaux tumoraux en introduisant un paramètre de densité vasculaire [84].

Une étude similaire a également été conduite dans le domaine de l'échographie de contraste pour mettre en évidence l'existence d'une différence significative du temps de transit moyen de l'agent de contraste selon la structure organisée ou non d'un réseau suggérant une différenciation entre un tissu tumoral et un tissu sain [85]. Enfin et plus généralement, l'équipe de Delorme s'est intéressée à étudier la fiabilité des méthodes de quantification des agents de contraste à travers un réseau numérique fixé par le code MMID4 constitué de 20 chemins vasculaires symétriques. Cette étude a porté sur des méthodes propres au domaine d'imagerie de contraste du CT et de l'IRM [86].

Concernant les approches par CFD, il n'apparaît pas à ce jour d'études publiées dans la littérature. Et c'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse qui ont pour objectif d'évaluer les performances des méthodes de quantification de l'agent de contraste ultrasonore sur des réseaux vasculaires plus ou moins complexes.

1.5. Conclusion.

La cancérologie connaît des avancées majeures ces dernières années avec le développement de nouveaux traitements en particulier ceux ciblant le processus d'angiogenèse tumorale pour limiter la vascularisation du tissu cancéreux. L'émergence de ces nouvelles thérapies motive le développement de l'imagerie fonctionnelle de la vascularisation tumorale pour évaluer précocement l'efficacité thérapeutique. Cette modalité regroupant les différentes techniques d'imagerie de contraste que sont l'IRM, le CT, la TEP et l'échographie de contraste visent à détecter l'évolution de la microvascularisation préalable aux modifications du volume tumoral.

L'équipe a été précurseur dans le domaine de l'échographie de contraste pour évaluer le bénéfice d'un traitement anti-angiogénique mais également pour développer une modélisation de la prise de contraste tumorale permettant ainsi l'évaluation semi-quantitative des paramètres de la vascularisation. Cette technique est aujourd'hui validée à l'échelle clinique et incluse dans les guidelines internationaux de 2012-2013. L'imagerie DCE-US reste néanmoins une modalité particulièrement récente et aujourd'hui les travaux de recherches expérimentaux et cliniques relèvent l'existence de sources de variabilité sur les paramètres de la microvascularisation tumorale avec diverses interprétations et des contributions non quantifiées. C'est en particulier le cas lorsqu'il s'agit de prévoir l'évolution de ces paramètres au cours du développement tumoral. Il apparaît donc essentiel de maîtriser la variabilité des méthodes de quantification de la perfusion tumorale pour accéder à une évaluation précoce des traitements anti-angiogéniques.

C'est dans la continuité de la thèse de Marianne Gauthier avec le développement d'une méthode quantitative du signal ultrasonore que j'ai conduit ma thèse avec l'introduction d'une approche originale basée sur la modélisation numérique de l'écoulement du sang et des agents de contraste ultrasonore [61]. Cette modélisation associée à des études *in vitro* et *in vivo* a pour objectif d'étudier la sensibilité des deux méthodes de quantification du signal ultrasonore avec la technique d'injection par bolus (la méthode quantitative et la méthode semi-quantitative) mais également de mieux comprendre la correspondance des paramètres graphiques de la courbe de rehaussement avec la physiologie de la tumeur.

1.6. Annexe : L'échographie.

Dans cette annexe, les principes physiques de l'échographie de contraste seront rappelés ainsi que la formation de l'image ultrasonore. La présentation des modes d'imagerie conventionnelle fera l'objet de la dernière partie.

1.6.1. Principes physiques de l'échographie.

Dans cette partie, avant de présenter les interactions de l'onde ultrasonore avec le milieu de propagation, les grandeurs permettant de caractériser la propagation de l'onde ultrasonore dans le milieu seront détaillées.

1.6.1.1. Propagation d'une onde de pression dans un milieu équivalent fluide.

De manière générale, une onde ultrasonore se propage avec le transport d'énergie mais sans transport de matière. Lors de son passage dans le milieu, elle va créer des surpressions et des dépressions par rapport à la pression d'équilibre du milieu. Une onde peut être longitudinale ou transversale. Une onde longitudinale est une onde pour laquelle la déformation du milieu se fait dans la même direction que la propagation alors qu'une onde transversale est une onde pour laquelle la déformation du milieu est perpendiculaire à la direction de propagation de l'onde. Aux fréquences ultrasonores utilisées en applications médicales (entre 1 MHz et 100 MHz), les ondes transversales sont atténuées contrairement aux ondes longitudinales qui se propagent.

L'équation d'onde permettant de caractériser la propagation de l'onde est une équation aux dérivées partielles de second ordre appelée également équation d'Alembert dont l'expression est la suivante :

$$\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} - \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} = 0 \quad \text{Équation I.18}$$

Dans cette équation v est la vitesse de propagation de l'onde. L'expression de u est la suivante :

$$u(x, t) = u_0 \sin(\omega t - kx + \varphi) \quad \text{Équation I.19}$$

Dans cette équation :

- u_0 est à l'amplitude de l'onde (sans unité),
- W est la pulsation de l'onde (m^{-1}),
- k est le vecteur d'onde (s^{-1}),
- φ est la phase à l'origine (sans unité).

L'onde de pression ultrasonore est caractérisée par une fréquence, une longueur d'onde, une célérité et une pression. Le milieu matériel de propagation est caractérisé par une impédance acoustique.

- La célérité de l'onde ultrasonore

La célérité de l'onde ultrasonore exprimée en mètre par seconde, dépend uniquement des propriétés du milieu de propagation, de la masse volumique, de la température et de la pression du milieu. Elle s'exprime de la manière suivante :

$$c = \lambda \times f$$

Équation I.20

Dans cette équation :

- λ est la longueur d'onde de l'onde ultrasonore (m),
- c est la célérité de l'onde ultrasonore ($m.s^{-1}$),
- f est la fréquence de l'onde ultrasonore (Hz).

Le tableau suivant indique les célérités dans les milieux biologiques les plus courants (Tableau 3).

Tissu considéré	Célérité ($m.s^{-1}$)
eau	1480
air	330
sang	1560
graisse	1480
muscle	1620
os	4080

Tableau 3 : Célérité pour différents tissus considérés.

Pour estimer le temps de parcours moyen des ondes ultrasonores dans les tissus, les échographes fonctionnent en considérant une vitesse moyenne des ultrasons dans le corps humain de 1540 m.s^{-1} .

- L'impédance acoustique du milieu de propagation

L'impédance acoustique traduit la capacité de pénétration de l'onde dans le milieu considéré. Elle dépend ainsi de la masse volumique et de la compressibilité du milieu qui correspond à la variation relative de volume du milieu sous l'effet d'une pression appliquée.

Elle s'exprime en Rayleigh ($\text{kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Son expression est la suivante :

$$Z = \rho \times c \quad \text{Équation I.21}$$

Où ρ est la masse volumique du milieu.

Le tableau suivant donne les impédances acoustiques des milieux biologiques les plus courants (Tableau 4).

Tissu considéré	Impédance acoustique (MRayl)
eau	1,48
air	$4,4.10^{-4}$
sang	1,66
graisse	1,35
muscle	1,7
os	7

Tableau 4 : Impédance acoustique pour différents tissus considérés.

- La pression et l'intensité de l'onde ultrasonore

La pression acoustique correspond à la dépression ou à la surpression créée par le passage de l'onde ultrasonore par rapport à la pression d'équilibre du milieu. Ainsi, au passage d'une onde ultrasonore, une énergie et donc une intensité est délivrée par l'onde aux tissus. Cette intensité est définie en fonction de la pression acoustique et de l'impédance du milieu par la formule suivante. Elle s'exprime en W.cm^{-2} .

$$I = \frac{P^2}{2Z} \quad \text{Équation I.22}$$

Dans cette équation :

- P est la pression acoustique délivrée au milieu par l'onde ultrasonore (Pa),
- Z est l'impédance du milieu (MRayl).

- L'index mécanique de l'onde ultrasonore

Un autre paramètre permettant de caractériser l'onde ultrasonore est l'index mécanique (IM). Il s'exprime en fonction de la pression maximale négative et de la fréquence de l'onde. Ce paramètre a été défini par l'organisme américain d'habilitation FDA (Food and Drug Administration) par mesure de sécurité et a été imposé aux constructeurs d'échographes. Les recommandations fixent un index mécanique entre 0 et 1,9 pour les applications médicales. Son expression est la suivante :

$$IM = \frac{P^-}{\sqrt{f}} \quad \text{Équation I.23}$$

Dans cette équation :

- P^- est la pression maximale négative de l'onde (Pa),
- f est la fréquence de l'onde (Hz).

1.6.1.2. Interaction de l'onde ultrasonore avec le milieu.

L'interaction d'une onde ultrasonore avec le milieu se traduit par une perte d'énergie au profit du milieu considéré. Dans le cas d'un milieu homogène, il s'agira d'une absorption de l'énergie de l'onde et dans un milieu non homogène, l'onde subira des phénomènes de réflexion, de réfraction et de diffusion. Nous allons rappeler brièvement ces deux types d'interaction.

A l'interface entre deux milieux ayant des impédances acoustiques différentes, l'onde ultrasonore subit une réflexion qui peut être spéculaire ou diffuse.

La réflexion se produit lorsque l'interface entre les deux milieux d'impédances différentes est de dimension supérieure à la longueur d'onde de l'onde ultrasonore. A la traversée de l'interface, l'onde incidente donne lieu à une onde transmise et une onde réfléchie. L'intensité de l'onde incidente se répartit entre l'onde transmise et l'onde réfléchie et l'intensité de ces dernières dépend des impédances acoustiques des milieux traversés (Figure 10).

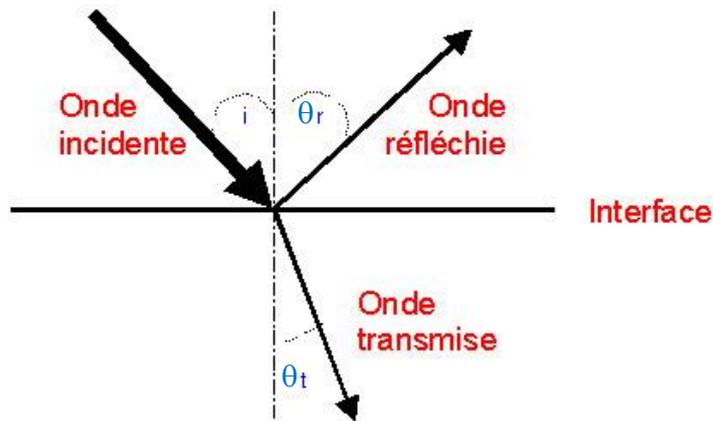


Figure 10 : Réflexion spéculaire à l'interface entre deux milieux d'impédances différentes.

Une onde incidente arrive sur une interface avec angle θ_i avec la normale. À la suite de cette interaction deux ondes sont produites ; une onde réfléchi et une onde transmise formant respectivement un angle θ_r et θ_t avec la normale.

Dans la Figure 10, θ_i , θ_r et θ_t représentent respectivement l'angle d'incidence, l'angle de réflexion et l'angle de transmission de l'onde. La relation entre ces trois angles est la suivante :

$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_t \quad \text{Équation I.24}$$

$$\theta_i = \theta_r \quad \text{Équation I.25}$$

Dans cette équation :

- n_1 est l'indice du milieu d'incidence (sans unité),
- θ_i est l'angle d'incidence (sans unité),
- n_2 est l'indice du milieu de transmission (sans unité),
- θ_t est l'angle de transmission (sans unité),
- θ_r est l'angle de réflexion (sans unité).

La diffusion se produit lorsque l'interface de l'élément diffuseur est de plus petite taille que la longueur d'onde de l'onde ultrasonore impliquant des réflexions multiples dans toutes les directions de l'espace. La diffusion est également responsable du bruit sur les images en donnant un aspect granuleux. Ce phénomène est appelé le speckle et est dû aux interférences entre les ondes suite à la diffusion de ces dernières. Ce phénomène est rencontré en particulier lors de l'interaction d'une onde avec des globules rouges.

Enfin, il se produit une absorption de l'énergie de l'onde ultrasonore par le milieu, lors du passage d'une onde ultrasonore dans un milieu homogène, ceci étant en partie dû aux mécanismes de conduction thermique et visqueux.

L'intensité de l'onde ultrasonore dans le milieu absorbant décroît exponentiellement avec la profondeur x d'exploration selon la formule suivante :

$$I(x) = I(0)e^{-\alpha x} \qquad \text{Équation I.26}$$

Dans cette équation :

- $I(0)$ est l'intensité de l'onde à l'origine ($W.m^2$),
- α est le coefficient d'absorption du milieu (cm^{-1}).

Il est à noter que ce phénomène d'absorption est favorisé aux fréquences élevées, ce qui implique d'importantes vibrations responsables de transfert d'énergie. Ainsi pour explorer les régions anatomiques situées en profondeur dans les tissus, il est nécessaire de mettre en œuvre des basses fréquences. Néanmoins, ce choix se fait au détriment de la résolution spatiale du dispositif qui est inversement proportionnelle à la fréquence.

Ayant présenté les phénomènes physiques à l'origine de l'échographie, la détection du signal ultrasonore ainsi que la formation de l'image ultrasonore vont maintenant être expliquées.

1.6.2. De la détection du signal ultrasonore à la formation de l'image.

Dans cette partie, avant de présenter les étapes permettant la formation de l'image ultrasonore, les mécanismes à l'origine du signal ultrasonore seront expliqués. Les présentations des différentes résolutions spatiales de l'image ultrasonore feront l'objet de la dernière partie.

1.6.2.1. Détection du signal ultrasonore.

Le fonctionnement des sondes ultrasonores repose sur le principe de piézoélectricité qui correspond à la capacité d'un matériau à se déformer lorsqu'est appliquée une différence de potentiel à leurs surfaces. Le matériau piézoélectrique entre ainsi en vibration entraînant la formation d'ondes ultrasonores. De manière réciproque, un matériau piézoélectrique est également utilisé pour réceptionner les ondes ultrasonores.

Le matériau piézoélectrique constituant les sondes ultrasonores est principalement le Plomb Zirconate de Titane (PZT). Les sondes ultrasonores sont constituées d'un ensemble d'éléments transducteurs piézoélectriques généralement au nombre de 128 positionnés en ligne et excitables indépendamment par l'application d'impulsions électriques.

1.6.2.2. Formation de l'image ultrasonore.

Comme indiqué précédemment, les sondes d'échographie fonctionnent à la fois en émission et en réception. Dans ce dernier cas, il s'agit de collecter les signaux réfléchis par les tissus observés. L'image obtenue correspond à une coupe de tissu, la position de la coupe est déterminée par le plan de balayage du faisceau ultrasonore et son épaisseur est liée à la largeur du faisceau. L'image est alors formée (c'est-à-dire les positions x , y , z) et les amplitudes d'intensité de chaque point sont déterminées à partir des résultats de l'interaction entre l'onde incidente et les tissus imagés. Par ailleurs, la profondeur des tissus est obtenue à partir du calcul du temps de parcours de l'onde en considérant une célérité moyenne dans les tissus de 1540 m.s^{-1} .

Pour s'affranchir de l'atténuation des ondes ultrasonores, une amplitude compensatrice est appliquée au signal.

1.6.2.3. Résolution spatiale de l'image ultrasonore.

La résolution axiale représente la capacité à distinguer des structures dans l'axe du faisceau. Elle est de l'ordre du millimètre et dépend de la longueur d'onde qui est sa limite théorique et de la durée de l'impulsion.

La résolution latérale représente la capacité à distinguer des structures dans le plan perpendiculaire à l'axe du faisceau ultrasonore. Cette résolution est donnée par le diamètre du faisceau et la densité des lignes ultrasonores dans le plan perpendiculaire à l'axe du faisceau ultrasonore. Cette résolution est limitée par la profondeur d'exploration et par la résolution temporelle de l'image. Elle est plus dégradée que la résolution axiale.

Enfin, la résolution transversale correspond à l'épaisseur de la coupe de tissu imagée. Cette épaisseur dépend de la focalisation transversale du faisceau ultrasonore.

1.6.3. Les modes d'imagerie classiques : le mode B et le mode Doppler.

Le mode B également appelé mode brillance correspond au mode d'imagerie anatomique ultrasonore standard. Avec ce mode, l'intensité du signal est représentée grâce à une échelle de gris de 256 niveaux. Plus le point de l'image est blanc plus l'intensité réfléchie à cet endroit est importante.

Le mode Doppler permet de mesurer des vitesses d'écoulements sanguins. L'effet Doppler caractérise le phénomène de décalage en fréquence de l'onde perçue par un observateur fixe dans l'espace se produisant lors du déplacement du point d'émission de l'onde. Ce phénomène est rencontré lors du déplacement des globules rouges dans le sang. La fréquence perçue par l'observateur augmente quand la distance entre l'observateur et le point d'émission augmente et elle diminue dans le cas opposé.

Le décalage en fréquence de l'onde est donné par la formule suivante :

$$\Delta f = \frac{v}{c} f_0 \cos \varphi \quad \text{Équation I.27}$$

Dans cette équation :

- v est la vitesse de déplacement du point d'émission (des globules rouges) (m.s^{-1}),
- c est la vitesse de propagation des ultrasons dans le milieu (le sang) (m.s^{-1}),
- f_0 est la fréquence émise par la sonde (Hz),
- φ est l'angle entre la direction du faisceau incident et la direction de déplacement du point d'émission (des globules rouges) (sans unité).

Il existe trois types de Doppler, le Doppler à émission pulsée, le Doppler couleur et le Doppler puissance. Ces deux derniers types fonctionnent en émission continue.

Le Doppler pulsé donne accès à un graphique représentant la vitesse dans la région sélectionnée en fonction du temps et donc en fonction du cycle cardiaque. Le Doppler à émission pulsée présente l'avantage par rapport aux autres Doppler à émission continue d'avoir une résolution spatiale. Le Doppler couleur donne accès à la vitesse du flux et à sa direction dans les vaisseaux sanguins alors que le Doppler puissance renseigne uniquement sur la vitesse du flux. Le Doppler puissance est plus sensible que le Doppler couleur dans la détection des flux.

Chapitre 2 : Modélisation numérique de l'écoulement des agents de contraste ultrasonore dans des réseaux vasculaires.

Le premier chapitre a relevé l'intérêt de l'échographie de contraste ultrasonore pour suivre l'efficacité des traitements anti-angiogéniques. Cependant, cette technique en cours de développement dans les services cliniques soulève un certain nombre d'interrogations ; tout d'abord en ce qui concerne la fiabilité des paramètres semi-quantitatifs obtenus et leurs niveaux de correspondance avec les paramètres physiologiques de la tumeur, puis, en ce qui concerne l'obtention des paramètres quantitatifs, leurs correspondances avec les paramètres physiologiques.

Dans ce contexte et pour répondre à ces questions, l'objectif de ce travail de thèse était de développer la première modélisation numérique de l'écoulement des agents de contraste dans des réseaux vasculaires plus ou moins complexes pour étudier les divers paramètres de la microvascularisation tumorale. Cette approche particulièrement originale dans le domaine de la DCE-US est essentielle pour aborder une problématique aux échelles difficilement accessibles par l'expérimentation et pour mener une étude multiparamétrique. Dans un premier temps, une étude de validation de la modélisation numérique a été réalisée. Cette étude fera l'objet de ce chapitre.

Après avoir défini les principes physiques mis en œuvre pour la modélisation numérique de mécanique du fluide, nous présenterons l'approche choisie pour la modélisation du sang et des microbulles, pour l'injection et enfin pour les géométries des réseaux vasculaires et leurs maillages. Nous détaillerons par la suite l'approche expérimentale pour la validation de cette modélisation numérique de l'écoulement des agents de contraste.

2.1. Outil de modélisation numérique CFD pour le suivi du parcours des microbulles : Le logiciel Fluent.

Pour modéliser l'écoulement du sang et des agents de contraste ultrasonore dans un réseau vasculaire tumoral, le logiciel de simulation de dynamique des fluides mis en œuvre était Fluent version 15.0 (ANSYS, France). Ce dernier est aujourd'hui le seul à notre connaissance parmi les nombreux outils de CFD (Computational Fluid Dynamics) à permettre la modélisation d'une distribution de concentration maîtrisée. Ce logiciel principalement utilisé dans l'industrie aéronautique mais également dans les industries pétrolières et gazières (www.ansys.com) s'adapte à d'autres domaines d'applications comme la biologie et la médecine, en particulier de nombreuses applications sont décrites en cardiologie.

Dans la pratique, le logiciel Fluent est un environnement de travail complet permettant de définir des géométries de vaisseaux complexes, leurs maillages, le calcul d'écoulement des fluides avec un accès aux réglages des paramètres décrivant la physique et enfin d'en extraire des données définies au préalable.

Dans cette partie, après avoir rappelé le principe physique de la modélisation en CFD avec en particulier le logiciel Fluent et l'approche multiphasique Euler-Lagrange choisie, nous présenterons le système biologique modélisé incluant le sang, les agents de contraste ultrasonore et les réseaux vasculaires avec les hypothèses considérées.

2.1.1. Principes physiques de modélisation de la dynamique des fluides.

De manière générale, les logiciels de CFD calculent numériquement les équations physiques régissant les écoulements de fluides dans des systèmes physiques prédéfinis. Ainsi, Fluent fonctionne sur le principe de la résolution d'équations de Navier-Stokes permettant ainsi de prédire les mouvements des fluides, les transferts de masse et de chaleur, les réactions chimiques et les phénomènes reliés. Fluent est basé sur la méthode des volumes finis. Les équations de conservation de la masse et de la quantité de mouvement sont alors résolues dans un domaine de calcul discrétisé en un nombre fini de petits éléments de volume. Le découpage de la géométrie en volumes finis, appelé également maillage est un processus essentiel et délicat en mécanique des fluides puisqu'il conditionne la qualité des résultats numériques. La méthode de calcul CFD consiste donc à résoudre dans chaque volume fini (maille), les équations aux dérivées partielles que sont les équations de conservation de la masse et de la quantité de mouvement.

Voici les équations de conservation de la masse et de la quantité de mouvement :

Équation de conservation de la masse :

$$\frac{d\rho}{dt} + \vec{\nabla}(\rho\vec{v}) = 0 \quad \text{Équation II.1}$$

Équation de conservation de la quantité de mouvement :

$$\rho \frac{d(\vec{v})}{dt} = -\vec{\nabla}p + \eta\Delta\vec{v} + \rho\vec{f}$$

Équation II.2

Dans ces équations :

- t : le temps (s),
- ρ : la masse volumique du fluide en (kg.m⁻³),
- \vec{v} : la vitesse eulérienne d'une particule fluide (m.s⁻¹),
- p : la pression (Pa),
- \vec{f} : la résultante des forces massives s'exerçant dans le fluide (N.kg⁻¹),
- η est la viscosité dynamique du fluide (kg.m⁻¹.s⁻¹).

Remarque :

$$\frac{D}{Dt} = \frac{\partial}{\partial t} + \vec{v} \cdot \vec{\nabla} \text{ Description Lagrangienne}$$

Équation II.3

$$\frac{\partial}{\partial t} \text{ Dérivée partielle – Description Eulérienne}$$

Équation II.4

En visant à adimensionner l'équation de Navier-Stokes (Équation II.2.), des changements de variables caractéristiques peuvent être effectués pour permettre de simplifier son écriture en introduisant le nombre de Reynolds R_e .

$$\frac{\partial \vec{v}'}{\partial t} = R_e (\vec{v}' \cdot \vec{\nabla}' \vec{v}') = -\vec{\nabla}' p' + \Delta' \vec{v}' + f$$

Équation II.5

$$\text{Avec : } R_e = \left| \frac{\vec{v} \cdot \vec{\nabla} \vec{v}}{\eta \Delta \vec{v}} \right| \sim \frac{\rho V L}{\eta}$$

Équation II.6

Avec :

- L est la dimension caractéristique du fluide (m),
- V est la vitesse de l'obstacle par rapport à celle du fluide (m.s⁻¹),

Ce nombre de Reynolds R_e permet de caractériser l'écoulement du fluide. Lorsque ce dernier est élevé (supérieur à 2000 dans le cas d'un écoulement en canal cylindrique) les forces d'inertie (la dérivée temporelle et la partie non linéaire) dominant ; l'écoulement est alors turbulent. Dans le cas contraire, les forces visqueuses priment et l'écoulement devient laminaire. Dans notre cas, à l'échelle micrométrique, avec des vitesses d'écoulements inférieures à 30 mm.s^{-1} , l'écoulement physiologique du sang est laminaire avec un nombre de Reynolds extrêmement bas puisqu'aux alentours de 10. Dans ce cas particulier, il est alors possible de simplifier l'équation de Navier-Stokes où les faibles vitesses d'écoulement mises en jeu impliquent une prépondérance des effets visqueux sur les effets d'inertie du fluide. L'expression $\vec{v} \cdot \nabla \vec{v}$ peut être alors négligée dans l'équation. De plus, en supposant l'écoulement stationnaire, on a $\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = \vec{0}$ et avec un fluide incompressible, $\text{div } \vec{v} = \vec{0}$.

L'équation simplifiée pour décrire l'écoulement laminaire d'un fluide est alors connue sous le nom d'équation de Stokes :

$$-\vec{\nabla} p + \eta \nabla^2 \vec{v} + \rho \vec{f} = \vec{0} \quad \text{Équation II.7}$$

Enfin comme les forces surfaciques de pression et les forces de viscosité sont dominantes devant les forces volumiques de gravité, on peut écrire :

$$\vec{\nabla} p = \eta \Delta \vec{v} \quad \text{Équation II.8}$$

Bien que le Reynolds soit faible, c'est l'équation de Navier-Stokes (Équation II.2.) qui est résolue par le logiciel Fluent à chaque élément de volume pour modéliser l'écoulement du sang.

Le parcours des agents de contraste est également pris en charge par Fluent et nous allons rappeler les principes physiques qui gouvernent leurs écoulements dans les capillaires.

2.1.2. Modélisation Euler Lagrange de l'écoulement des agents de contraste ultrasonore.

L'objectif de l'étude vise à modéliser l'injection puis l'écoulement des microbulles dans un réseau vasculaire. L'introduction des agents de contraste en bolus a conditionné le choix d'une approche multiphasique possible sous Fluent. Il s'agit du modèle DPM (Discrete Phase Model) qui traite une phase continue, le sang, et une phase discrète, les microbulles. Ces deux phases sont modélisées de manière indépendante par résolution de deux systèmes d'équations différentes.

Dans la pratique, les calculs sont réalisés en deux temps : tout d'abord il s'agit de simuler l'écoulement du sang via une description eulérienne des vitesses au sein de la géométrie qui est stable, stationnaire et symétrique par rapport à l'axe du vaisseau. Puis, à partir des champs de vitesse du sang établis, la trajectoire des particules est alors calculée où les positions et les vitesses sont déterminées à chaque pas de temps au sein d'une phase fluide (description Lagrangienne).

Pour utiliser ce modèle de type Euler-Lagrange, deux hypothèses fortes ont été établies. La première repose sur la propriété des agents de contraste ultrasonore à être d'excellents traceurs de l'écoulement du sang. Pour cela, un nombre sans dimension est introduit en mécanique des fluides, le nombre de Stokes St défini ainsi :

$$St = \frac{\rho_p d_p^2 v}{\eta L_c} \quad \text{Équation II.9}$$

Dans cette expression :

- ρ_p : la masse volumique de la particule (kg),
- d_p : la longueur caractéristique de la particule (m),
- v : la vitesse du fluide (m.s⁻¹),
- η : la viscosité dynamique du fluide (Pa.s),
- L_c : la longueur caractéristique du système (m).

Ce nombre définit le rapport entre le temps de réponse de la particule sur le temps caractéristique du fluide. Le temps de réponse de la particule correspond au temps au bout duquel la particule introduite dans l'écoulement est emportée par celui-ci. Ce nombre donne une mesure de la corrélation temporelle entre la vitesse de la particule et celle du fluide. Dans le cadre de notre système à modéliser, le nombre de Stokes est d'environ 10⁻⁵. Ainsi la première hypothèse est validée avec des particules suivant l'écoulement du sang. La seconde hypothèse porte sur la validité de l'approche Euler-Lagrange sous Fluent conditionnée par un volume d'occupation de la phase dispersée inférieure à 10% du volume total.

Dans le système modélisé, cette hypothèse est également vérifiée puisque les microbulles occupent au maximum 0,1% du volume du réseau vasculaire modélisé (calcul effectué dans la configuration la plus défavorable avec un nombre maximum de microbulles dans le réseau de plus petit volume).

Concernant le calcul de la trajectoire des microbulles, Fluent intègre le bilan des forces subies par les particules dans un repère Lagrangien permettant ainsi de suivre les particules le long de leur trajectoire dans l'écoulement. Il s'agit d'un suivi individuel des particules.

L'équation résolue pour la trajectoire des particules est la suivante :

$$m_p \frac{d\mathbf{u}_p}{dt} = \mathbf{F}_{trainée} + \mathbf{F}_{pression} + \mathbf{F}_{masse virtuelle} + \mathbf{F}_{gravité} + \mathbf{F}_{saffman}$$

Équation II.10

Dans cette équation :

- m_p : masse de la particule (kg),
- \mathbf{u}_p : vitesse de la particule (m.s⁻¹).

La force de trainée $\mathbf{F}_{trainée}$ rend compte de la viscosité et les forces d'inertie qui s'opposent au mouvement d'un corps dans un liquide ou un gaz.

$$\mathbf{F}_{trainée} = \frac{\rho A_p}{2} C_D (\mathbf{u} - \mathbf{u}_p) = \frac{3}{4} m_p \frac{\rho}{\rho_p} \frac{C_D}{d_p} \quad \text{Équation II.11}$$

Dans cette équation :

- ρ : masse volumique du fluide (kg.m⁻³),
- A_p : projection de la surface de la particule dans la direction du flux (m²),
- C_D : coefficient de la force de trainée (sans unité),
- \mathbf{u} : vitesse du fluide (m.s⁻¹),
- ρ_p : masse volumique de la particule (kg.m³),
- d_p : diamètre de la particule (m).

Le coefficient C_D de la force de trainée a l'expression suivante :

$$C_D = \frac{d_p}{\frac{1}{2} \rho A_p |\mathbf{u} - \mathbf{u}_p|^2} \quad \text{Équation II.12}$$

Le coefficient C_D de la force de trainée dépend non-linéairement du nombre de Reynolds (Re), et selon sa valeur, plusieurs régimes sont possibles :

- Pour $0 < Re < 0,2$, la force de trainée est entièrement due à la viscosité. C'est le régime de Stokes.
- Pour $0,2 < Re < 1000$, la force de trainée est due aux forces de viscosité et aux forces d'inertie. On parle alors de régime de transition, régime dans lequel se situe notre système.
- Pour $1000 < Re < 10^5$, la force de trainée est entièrement due aux forces d'inertie, est donc indépendante du nombre de Reynolds. C'est le régime de Newton.
- Pour $Re > 10^5$, l'écoulement qui était laminaire devient turbulent entraînant donc une réduction de la force de trainée. Le régime critique est alors atteint.

La force de pression $\mathbf{F}_{pression}$ est la force correspondant à l'ensemble des forces de pression exercées par le fluide sur les particules. Son expression est la suivante :

$$\mathbf{F}_{pression} = \int_A -p d\mathbf{A} = \int_V -\nabla p dV = -\frac{m_p}{\rho_p} \nabla p \quad \text{Équation II.13}$$

Dans cette équation p est la pression du fluide (Pa).

La force de masse virtuelle $\mathbf{F}_{masse virtuelle}$ prend en compte la force due au volume d'eau déplacé. Elle correspond à la poussée d'Archimède.

$$\mathbf{F}_{masse virtuelle} = \frac{m_p}{2} \frac{\rho}{\rho_p} \frac{d(\mathbf{u} - \mathbf{u}_p)}{dt} \quad \text{Équation II.14}$$

La force de gravité est la force due au poids des particules.

$$\mathbf{F}_{gravité} = m_p \frac{(\rho_p - \rho)}{\rho_p} \mathbf{g} \quad \text{Équation II.15}$$

Dans cette équation \mathbf{g} est la gravité ($m.s^{-2}$).

La force de Saffman $\mathbf{F}_{saffman}$ ou force de portance est une force perpendiculaire à la direction du flux.

$$\mathbf{F}_{saffman} = 1,615 \rho \nu^{\frac{1}{2}} d_p^2 (\mathbf{u} - \mathbf{u}_p) \dot{\gamma} \quad \text{Équation II.16}$$

Dans cette équation :

- ν est la viscosité cinématique du fluide ($m^2.s^{-1}$),
- $\dot{\gamma}$ est la contrainte de cisaillement ($N.m^{-2}$).

Dans notre étude, nous avons considéré que la force de traînée et la force de Saffman étaient négligeables puisqu'elles dépendent de la différence de vitesses entre le fluide et les particules, la vitesse étant estimée équivalente pour les deux phases, fluide et particules (cf. Nombre de Stokes).

De plus, les échanges de chaleur entre les microbulles et le sang n'ont pas été pris en compte. Les microbulles sont injectées à la température de l'air ambiant (20 °C) et le sang a une température de 37 °C. L'énergie pour réchauffer une microbulle est de $14 \cdot 10^{-14}$ J alors que l'énergie totale du sang est de $4 \cdot 10^8$ J. Ainsi, le transfert de chaleur entre le sang et les microbulles a été négligé. Les collisions entre les microbulles n'ont pas non plus été considérées du fait de leur rareté. En effet, la distance moyenne entre les microbulles est de 30 μm soit une grandeur dix fois supérieure à leur taille. En revanche, la simulation numérique tient compte des collisions des microbulles sur les parois des vaisseaux via des rebonds.

2.1.3. Système biologique modélisé sous Fluent.

- **La phase sanguine.**

Les caractéristiques d'écoulement du sang sont conditionnées par la viscosité de ce dernier. Ainsi après avoir rappelé la composition de la phase sanguine, nous rappellerons les propriétés de la viscosité. Les hypothèses faites pour la modélisation sous Fluent seront indiquées et discutées en fin de cette partie.

Le sang est un fluide complexe constitué à la fois du plasma et de cellules. Le plasma est formé à 90% d'eau, à 7% de protéines et d'une petite quantité de molécules organiques et inorganiques. Les cellules suspendues dans le plasma sont les globules rouges contenant l'hémoglobine et transportant l'oxygène dans le corps, les plaquettes et les globules blancs. La première hypothèse faite sur la phase sanguine est son homogénéité sans considérer les différents types de cellules présentes dans le volume sanguin.

L'écoulement du sang dépend de sa viscosité, propriété dynamique essentielle qui représente la résistance à l'écoulement sous l'action des forces de frottement entre les différentes couches du fluide.

Plus précisément, un coefficient de viscosité dynamique η ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) du fluide est le rapport entre la contrainte de cisaillement (la force appliquée) F (Pa.s) et le taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) en normalisant par la surface S (m^2) de chaque couche selon la formule ci-dessous :

$$\eta = \frac{F}{S \cdot \dot{\gamma}}$$

Équation II.17

Lorsque la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ et la contrainte de cisaillement F sont directement proportionnelles, le fluide est considéré comme Newtonien, ce qui est le cas du plasma. Dans le cas contraire, le fluide est considéré comme étant non-Newtonien, propriété du sang en raison de la présence des globules rouges. Sa viscosité varie alors en fonction du taux de cisaillement auquel il est soumis. On distingue alors deux types de fluide non Newtonien (Figure 11). Le fluide peut être rhéofluidifiant ou rhéoépaississant. Les fluides rhéofluidifiants comme le sang ont une viscosité qui diminue lorsque la vitesse de cisaillement augmente. Pour des valeurs de vitesses de cisaillement extrêmes, la viscosité est proportionnelle à la vitesse de cisaillement. Le fluide est alors considéré comme Newtonien. Les fluides rhéoépaississants ont une viscosité qui augmente avec la vitesse de cisaillement comme certains miels, l'empois, les suspensions très concentrées de fécule de maïs, etc.

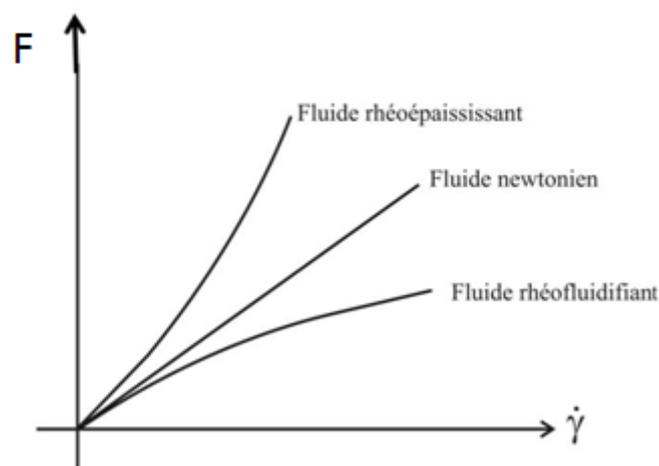


Figure 11 : Variations de la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement pour les fluides rhéoépaississants, les fluides Newtoniens et les fluides rhéofluidifiants.

On remarque que les fluides Newtoniens ont une contrainte de cisaillement proportionnelle la vitesse de cisaillement.

De manière générale, la viscosité du sang est principalement influencée par cinq paramètres que sont :

- i) La viscosité constante du plasma,
- ii) Le pourcentage de globules rouges dans le sang (hématocrite),
- iii) La déformabilité des globules rouges sous l'effet des forces de cisaillement,
- iv) L'agrégation des globules rouges à faible vitesse de cisaillement et
- v) La température.

Par ailleurs, de par sa définition, la viscosité du sang dépend du diamètre des vaisseaux, alors responsable des contraintes de cisaillement variables. Ainsi, Fahraeus et Lindquist ont montré dans les années 1930 une diminution de la viscosité avec le diamètre du tube allant de 8 μm à 1 mm de diamètre [87].

Ce phénomène s'interprète par le positionnement des globules rouges sur l'axe central permettant alors au plasma d'occuper un volume plus important et en particulier au contact des parois [88, 89].

Dans le cadre de la modélisation de l'écoulement des agents de contraste dans un réseau vasculaire tumoral, le logiciel de CFD, Fluent, résout les équations de Navier-Stokes pour les fluides Newtonien. Nous avons donc considéré le sang ayant un comportement newtonien avec une valeur fixe de la viscosité pour une échelle restreinte de diamètre de vaisseaux proche de la centaine de micromètre.

Comme décrit dans la partie suivante, deux valeurs de viscosités ont été fixées selon les deux échelles de vaisseaux différentes à la fois dans le cadre de la modélisation numérique des écoulements et l'expérimentation *in vitro* (cf. partie « réseaux vasculaires »). Dans le premier cas, il s'agit d'un diamètre de 2 mm pour lequel la viscosité prise en compte est de $0,0036 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Pour les simulations sur des vaisseaux de $500 \mu\text{m}$ de diamètre, la viscosité est de $0,0023 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (Tableau 5). Ces valeurs de viscosité sont issues de l'étude de Fahraeus et Lindqvist [87]. Par ailleurs, lors des études menées durant ma thèse, les vitesses d'écoulement du sang ont été adaptées selon les diamètres des vaisseaux considérés. Dans le cas d'un diamètre de 2 mm, les vitesses varient entre 10 et $30 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui correspond à des débits de 26 à $56 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Ces grandeurs sont loin de celles mises en jeu dans le cas de la microvascularisation mais elles sont usuellement considérées pour limiter les phénomènes de flottaison et d'agrégation des microbulles sur les parois des vaisseaux aux échelles millimétriques. Dans le cas d'un diamètre de $500 \mu\text{m}$, les vitesses d'écoulement alors explorées sont comprises entre 0,01 et $0,05 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (débit de 0,1 à $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) et correspondent à celles indiquées dans la littérature pour décrire la microcirculation (Tableau 5). Enfin, la vitesse du sang est fixée à l'entrée du réseau vasculaire comme condition aux limites. La différence de pression entre l'entrée et la sortie du réseau vasculaire est calculée par le logiciel en prenant en compte la géométrie du réseau et donc sa résistance microfluidique.

- Les agents de contrastes ultrasonores.

Les agents de contrastes étant d'excellents traceurs de l'écoulement du sang (Nombre de Stokes de 10^5), leur dynamique est également conditionnée par la viscosité de ce dernier. Dans le cadre de la modélisation numérique, l'oscillation volumique des microbulles n'a pas été prise en compte, considérant que le signal ultrasonore du second harmonique était directement proportionnel au nombre des agents de contraste présents dans la région d'intérêt. Ainsi les microbulles ont été considérées comme des sphères de diamètre fixe de $3 \mu\text{m}$ renfermant du gaz d'hexafluorure de soufre (SF_6) avec une densité volumique de $3,16 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

- Les réseaux vasculaires.

Comme cela a été présenté dans le chapitre précédent, l'angiogenèse tumorale s'accompagne de la formation d'un réseau vasculaire anarchique associée à des anomalies fonctionnelles, avec en particulier, la porosité des vaisseaux due aux cellules endothéliales non jointives. L'avantage de mettre en œuvre des codes CFD comme Fluent est la possibilité d'introduire des géométries de réseaux vasculaires d'une grande complexité allant jusqu'à l'implémentation d'images biomédicales de structures *in vivo*.

C'est dans cette optique que nous avons choisi cette approche numérique, la présente étude visait à établir la faisabilité de la CFD sur des géométries simplifiées de réseaux vasculaires. Ainsi les fantômes² numériques développés représentaient des réseaux vasculaires de 1 à 4 branches symétriques, c'est à dire avec des rapports d'embranchements symétriques selon la loi de Murray [90], et des vaisseaux droits sans porosité ou bourgeons sur les parois. Ainsi, dans la pratique de la modélisation numérique, les vaisseaux sont simulés par des tubes de rayons uniformes entre deux embranchements et sans parois physiques puisque les interactions avec le fluide sont négligeables. Concernant les dimensions des réseaux vasculaires, deux échelles ont été considérées.

La première est millimétrique avec des vaisseaux de 2 mm de diamètre interne. Cette géométrie n'est bien évidemment pas réaliste mais permet en revanche, d'établir les premières comparaisons entre la modélisation numérique et l'expérimentation avec une mise en œuvre expérimentale facilitée. En effet, la très grande majorité des études *in vitro* en échographie de contraste est conduite sur des tubes en silicone de 2 mm de diamètre interne. La seconde échelle est micrométrique avec des tubes de 500 μm de diamètre (Tableau 5). Cette échelle est un intermédiaire entre les dimensions des vaisseaux néoformés de 10 à 100 μm de diamètres et les dimensions suffisantes pour recueillir expérimentalement un signal ultrasonore exploitable. C'est donc à cette échelle micrométrique que nous avons conduit l'étude de la sensibilité des méthodes de quantification au volume et au débit sanguin. La géométrie précise de chacun des fantômes numériques alors développés est détaillée dans la partie 2.2.2. de ce chapitre pour les réseaux millimétriques et dans la partie 3.1.2. du chapitre 3 pour les réseaux micrométriques.

	Vitesse du sang	Viscosité du sang	Diamètre des vaisseaux
Echelle millimétrique	10 et 30 cm.s^{-1}	0,0036 $\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$	2 mm
Echelle micrométrique	1 et 5 cm.s^{-1}	0,0023 $\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$	0,5 mm

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des grandeurs prises en compte pour les deux échelles étudiées.

² Fantôme¹ : Modèle simpliste représentant un système physique

En résumé, la modélisation numérique sous Fluent prend en compte :

- i) L'écoulement de la phase sanguine en régime laminaire avec la résolution des équations de Navier-Stokes,
- ii) L'écoulement des agents de contraste en suivi individuel car ils sont considérés comme une phase discrète distinguée du sang, et enfin
- iii) Un réseau vasculaire.

Nous allons à présent détailler la méthode spécifique de notre simulation pour l'injection des agents de contraste.

2.2. Méthodologie et paramètres pour la modélisation CFD du système.

Dans cette partie sont reportées les méthodes mises en œuvre pour modéliser l'écoulement des agents de contraste dans les réseaux vasculaires. En particulier nous détaillerons l'approche choisie et développée durant cette thèse pour modéliser la distribution en bolus des agents de contrastes arrivant à l'entrée de la tumeur. La géométrie et le maillage des fantômes numériques représentant le réseau vasculaire seront ensuite présentés.

2.2.1. Modélisation de la distribution en concentration des agents de contraste.

La modélisation de l'écoulement des agents de contraste dans un réseau vasculaire tumoral vise à s'approcher au mieux des conditions réalistes rencontrées lors des expérimentations qu'elles soient indifféremment cliniques ou précliniques. Dans notre cas, le point critique concerne le mode d'injection des agents de contraste en bolus (cf chapitre 1) largement utilisé pour des raisons de facilité de mise en œuvre sans nuire à la robustesse des données [60]. C'est dans ce contexte que Fluent est apparu comme le seul logiciel de CFD permettant de maîtriser l'injection de particules selon une distribution de concentration variable. Néanmoins cette approche n'a jamais été mise en application par les développeurs de Fluent. Ainsi, le travail mené et présenté dans cette partie revête un caractère original et innovant. Plus précisément, l'objectif était de simuler l'arrivée des microbulles au sein du réseau vasculaire avec une distribution de concentration réaliste. Pour cela, nous avons expérimentalement mesuré le rehaussement du signal ultrasonore à l'entrée du réseau étudié puisqu'il est directement proportionnel aux nombres d'agents de contraste dans la région d'intérêt (ROI), ce qui revient à considérer une distribution de concentration des microbulles. Deux cas de figures ont été considérés :

- L'étude numérique vise une comparaison avec l'expérimentation pour valider les hypothèses faites,
- L'étude numérique a pour objectif d'évaluer la sensibilité des méthodes de quantification ultrasonore.

Dans cette partie, nous présenterons le premier cas de figure, le second sera détaillé dans le chapitre suivant.

Ainsi, dans le cas où la modélisation numérique vise à être comparée à l'expérience pour sa validation, un signal ultrasonore rehaussé a été recueilli à proximité du site d'injection, en plaçant la sonde au plus proche (3 cm) de l'injecteur automatique de microbulles, dispositif décrit dans la partie expérimentale de ce chapitre. Le signal ainsi collecté a été considéré comme la distribution de l'arrivée des bulles au niveau du site d'injection, coïncidant avec celui de la position de la sonde (Figure 12). Une moyenne de cinq courbes de rehaussement expérimentales (cinq injections successives de microbulles) obtenues au regard du site d'injection a été faite pour modéliser la courbe de la distribution en concentration des agents de contraste.

Une fois la courbe de rehaussement moyenne du signal ultrasonore obtenue, son implémentation numérique a nécessité deux étapes distinctes : la modélisation mathématique de la courbe d'injection expérimentale puis sa discrétisation. En raison de la forme symétrique de la courbe *in vitro* et des temps très courts mis en jeu, il a été impossible de traiter ces données selon le modèle polynomial développé par l'équipe (cf. Chapitre 1, partie 1.3.1.). Ainsi, la modélisation mathématique de cette courbe (cf. Figure 12) a été faite sous Matlab (Mathworks, Etats-Unis) selon une régression gaussienne.

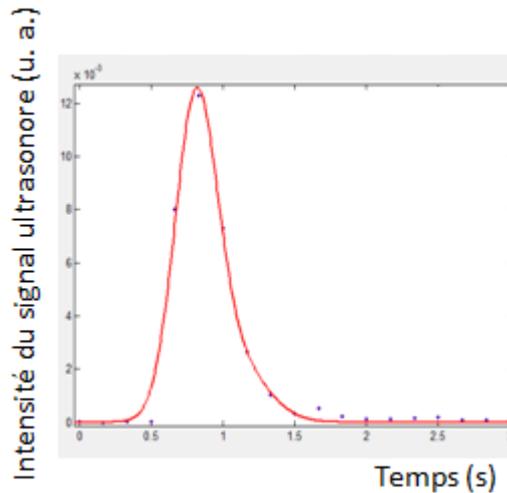


Figure 12 : Courbe de rehaussement du signal ultrasonore obtenue *in vitro* avec le montage expérimental décrit partie 1.3.1. de ce chapitre.

L'équation mathématique alors correspondante à la distribution de la courbe ci-dessus et implémentée sous Fluent est la suivante :

$$I(t) = 0,011 e^{-\left(\frac{(t-0,8091)}{0,2061}\right)^2} + 0,0024 e^{-\left(\frac{(t-1,045)}{0,3213}\right)^2} \quad \text{Équation II.18}$$

$I(t)$ représente l'intensité du signal ultrasonore en fonction du temps.

La seconde étape pour modéliser l'injection des agents de contraste résidait dans la discrétisation temporelle de la courbe, laquelle correspond sous Fluent à un nombre de microbulles en fonction du temps. Il n'est pas possible de considérer dans le modèle Euler-Lagrange de Fluent une discrétisation uniforme des pas de temps avec un nombre variable de microbulles. Le problème a donc été inversé. Ainsi, le raisonnement a porté sur l'ajustement du pas de temps avec un nombre identique de microbulles. Pour optimiser la précision dans la résolution des équations de Navier-Stokes, le pas de temps a été déterminé de manière à ce que les agents de contrastes parcourent une unique maille par pas de temps. Les valeurs des pas de temps successifs ont été déterminées sous Matlab pour résoudre l'égalité suivante qui revient à considérer que le débit de microbulles $F(dt)$ est constant sur les intervalles de pas de temps dt .

$$F(t + dt) = \frac{n}{dt} \text{ et } F(dt) = F(t + dt) \quad \text{Équation II.19}$$

Par ailleurs, la discrétisation fine de la courbe a été obtenue en fixant un nombre n unitaire de microbulles par pas de temps ($n=1$).

Après avoir modélisé la distribution temporelle des agents de contraste, nous avons cherché également à introduire une distribution spatiale réaliste. Ainsi nous avons considéré un tirage aléatoire de chaque microbulle au sein d'une distribution spatiale uniforme au sein de la section du vaisseau. Les figures 13a) et 13b) illustrent la bonne répartition spatiale des microbulles lors de l'injection. Notons que nous avons délibérément établi une région interdite en proche paroi des vaisseaux pour limiter les effets de particules statiques en particulier après les bifurcations. Ainsi une bande interdite de 10% du diamètre du vaisseau a été considérée en périphérie externe.

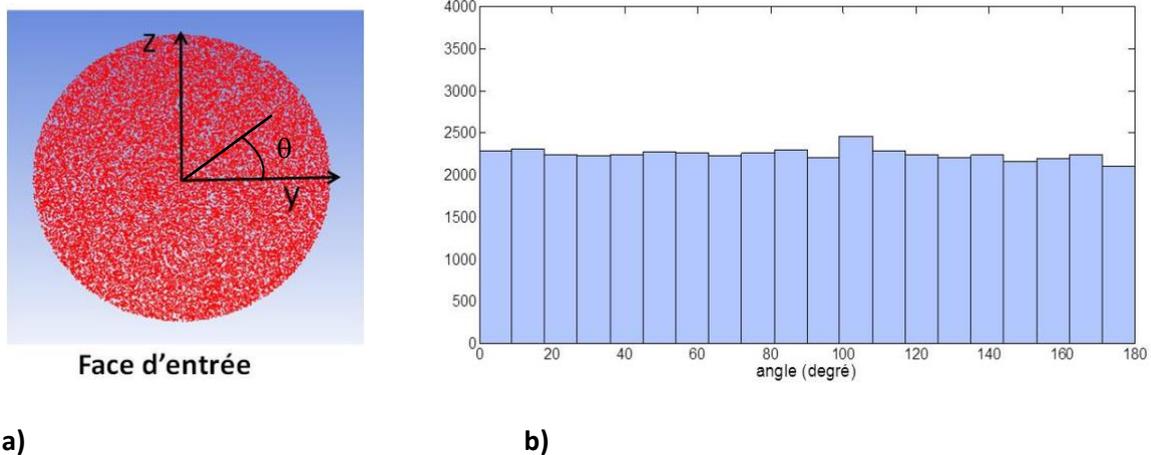


Figure 13 : Répartition des microbulles sur la face d'entrée de la géométrie a).

On remarque que la répartition est homogène sur la surface où les microbulles sont représentées par des points rouges. Ceci est vérifié par l'histogramme b) qui présente le nombre de microbulles dans les fractions du disque d'angles identiques.

Les programmes de la modélisation de l'injection des agents de contraste sont en annexe de ce chapitre et ont été implémentés sous forme d'une User-Defined Function (UDF) dans Fluent.

2.2.2. Géométries des fantômes numériques.

Deux dimensions de fantômes numériques ont été modélisées sous Fluent. Les premières à l'échelle millimétrique visent à reproduire les conditions expérimentales des premiers fantômes étudiés *in vitro* pour une validation du code CFD. La seconde est à l'échelle micrométrique et a pour objectif à la fois la validation de l'écoulement du fluide à ces dimensions et l'étude multiparamétrique des méthodes de quantification ultrasonore présentée dans le chapitre 3.

Géométrie des fantômes millimétriques :

Deux fantômes ont été considérés. Le premier modélise un vaisseau droit selon un tube de 2 mm de diamètre de 27,2 cm de long. Le second fantôme est également un vaisseau droit débouchant sur une bifurcation selon de 2 tubes également de 2 mm de diamètre et sur 27,5 cm de long.

Ces 2 fantômes sont à l'image de ceux développés expérimentalement et permettent d'étudier la dispersion du bolus des agents de contraste selon la distance et la bifurcation.

Par ailleurs, l'échelle millimétrique permet une mise en œuvre expérimentale facilitée et une faible variabilité des mesures en intégrant un grand volume d'intérêt dans le champ ultrasonore ($3,14 \text{ mm}^3$). Deux régions d'intérêt d'un millimètre d'épaisseur correspondant à la position de la sonde ultrasonore des expérimentations ont été prises en compte dans les simulations pour obtenir le nombre de microbulles dans cette zone en fonction du temps. Ces régions sont localisées par une flèche rouge sur la Figure 14. Elles sont distantes de 10 cm et de 31 cm du site d'injection respectivement pour un tube et les deux vaisseaux.

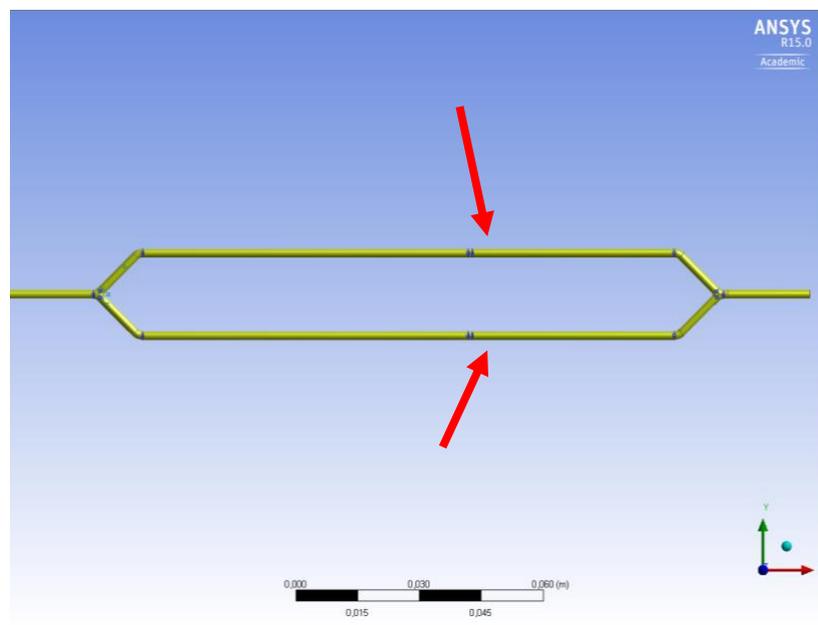


Figure 14 : Géométrie du fantôme numérique « bifurcation » de 2 mm de diamètre pour la validation de la modélisation numérique.

Géométrie du fantôme micrométrique :

Pour valider la simulation de l'écoulement des agents de contraste à l'échelle micrométrique, le fantôme numérique modélisait un vaisseau droit de 500 μm de diamètre sur 1 cm de long. La région d'intérêt a été considérée sur une longueur d'1 mm à l'image du champ de vue de la sonde US. Dans ce cas, un banc expérimental spécifiquement dédié aux écoulements microfluidiques a été développé au sein de l'équipe à cette occasion et est détaillé dans la partie 2.3.3. de ce chapitre.

2.2.3. Maillage des fantômes numériques.

Le maillage est une représentation discrète du domaine réel accueillant le fluide en mouvement. Il est destiné à utiliser la méthode des volumes finis pour modéliser l'écoulement d'un fluide. En effet, la méthode des volumes finis consiste à linéariser les équations de la mécanique des fluides dans chaque maille de la géométrie, qui sont résolues à chaque nœud du maillage et non en tout point de la géométrie. Cette méthode implique alors l'interpolation des valeurs entre chaque nœud du maillage.

Ainsi, une petite maille minimise l'écart entre la valeur réelle et la valeur interpolée. En revanche, diminuer la taille des mailles augmente considérablement la durée du calcul numérique. Un compromis sur la taille du maillage est alors nécessaire et est obtenu dans la pratique en affinant uniquement certaines régions affectées par des évolutions importantes de la solution. Il s'agit en général de configurations géométriques particulières comme les bifurcations avec des gradients de contraintes et de déformations importants. Après avoir arrondi les angles d'intersection pour supprimer toute singularité, le raffinement du maillage a été réalisé en respectant un accroissement de la taille d'une maille à l'autre inférieur à 20%.

Les différentes formes de mailles, tétraèdres, hexaèdres et prismes sont choisies selon la complexité de la géométrie à modéliser. Le maillage de Fluent est non-structuré. Pour notre étude, nous avons considéré que chaque vaisseau simulé conservait sur toute sa longueur le même diamètre. Deux types complémentaires de maillages ont été réalisés. Le maillage de type « sweep » permet de mailler une surface puis à projeter ce maillage sur toute la géométrie. Cet outil offre l'avantage de dimensionner la taille des mailles en fonction du sens de l'écoulement selon un taux d'accroissement optimisant ainsi le nombre d'éléments finis. Dans le cas d'un écoulement laminaire, les variations longitudinales sont en effet plus importantes. Le second type concerne le maillage par couche limite, approche essentielle dans le cas d'écoulement laminaire (Figure 16). Il consiste à positionner des mailles de taille progressivement plus petite dans des zones proches des parois. Sans la prise en compte de la couche limite, le parcours des agents de contraste proche des parois est nul, ce qui conduirait à un blocage des microbulles dans la géométrie. Bien évidemment, la qualité du maillage a été contrôlée selon les différents critères accessibles : Skewness (dissymétrie), Orthogonal Quality (qualité d'orthogonalité), Aspect Ratio (rapport d'aspect), Jacobean Ratio (rapport jacobien), Warping Factor (facteur de déformation), Parallel Deviation (déviation parallèle), Maximum Corner Angle (angularité maximale).

En plus de vérifier les critères de qualité, il a été nécessaire d'optimiser le raffinement local et global du maillage pour trouver un compromis entre précision de la résolution des équations de Navier-Stokes et le temps de calcul numérique (Figure 17). Pour cela, une étude de la convergence du maillage a été menée, c'est à dire la convergence d'un des paramètres pertinent en fonction du raffinement du maillage. Dans notre cas, nous avons retenu la variation du paramètre du pic d'intensité maximal (PI) de la courbe de rehaussement. Il est convenu que le maillage est considéré comme optimisé lorsque la variation du paramètre, ici PI, est inférieure à 5%. Cette étude a été conduite sur le fantôme numérique représentant un tube de 2 mm de diamètre et les résultats obtenus en fonction du nombre de mailles sont représentés dans la Figure 15. Une variation du PI inférieure à 5% est constatée à partir d'un maillage de 87882 mailles (mailles de $1,5 \cdot 10^{-4}$ m).

C'est donc cette valeur qui a été retenue et qui correspond à une durée de calcul numérique de 15min optimisée si l'on considère le maillage à 157 722 mailles (mailles de $0,75 \cdot 10^{-4}$ m) avec 20min.

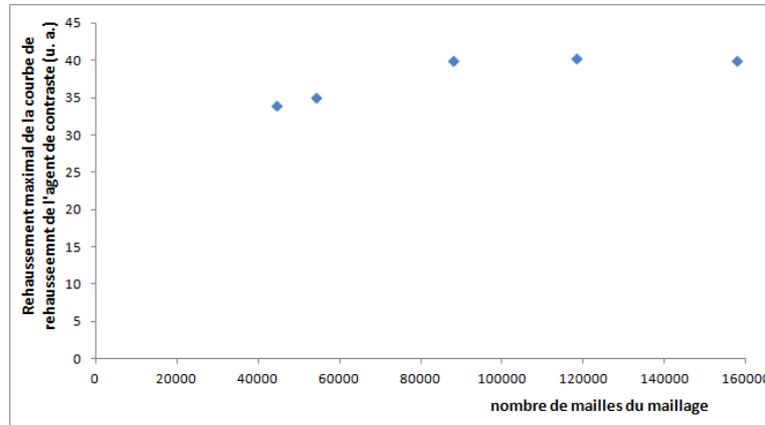


Figure 15 : Variation du PI en fonction du nombre de mailles de la géométrie du fantôme « un tube ».

Une variation du PI inférieure à 5% entre deux nombres de mailles consécutives est constatée à partir d'un maillage de 87882 mailles (mailles de $1,5 \cdot 10^{-4}$ m). C'est donc cette valeur qui a été retenue et qui correspond à une durée de calcul numérique de 15min optimisé si l'on considère le maillage à 157722 mailles (mailles de $0,75 \cdot 10^{-4}$ m) avec 20min.

Les caractéristiques des maillages des différents fantômes numériques sont résumées dans Tableau 6 ci-dessous.

Fantômes numériques	Types maillages	Tailles et nombres de mailles	Nb de mailles	Temps de calcul
Vaisseau droit : 1 branche 2 mm	tétraédriques à l'intérieur et hexaédriques sur les proches parois	100 μ m en couche limite 1 mm dans le sens de l'écoulement	87882	1h00
Vaisseau avec une bifurcation : 2 branches 2 mm	tétraédriques à l'intérieur et hexaédriques sur les proches parois	150 μ m en couche limite 1 mm dans le sens de l'écoulement	397177	2h00

Tableau 6 : Tableau représentant les différentes caractéristiques des maillages des différentes géométries des fantômes.

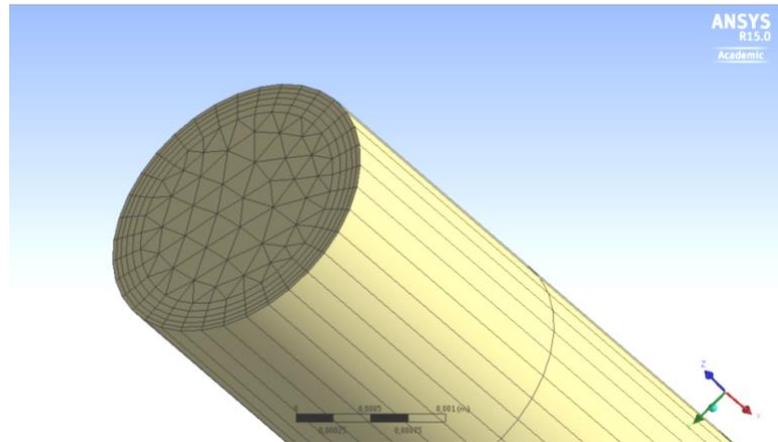


Figure 16 : Maillage couche limite : géométrie « vaisseau droit » et « bifurcation » de 2 mm.

On remarque bien que les mailles proches des parois sont progressivement plus petites.

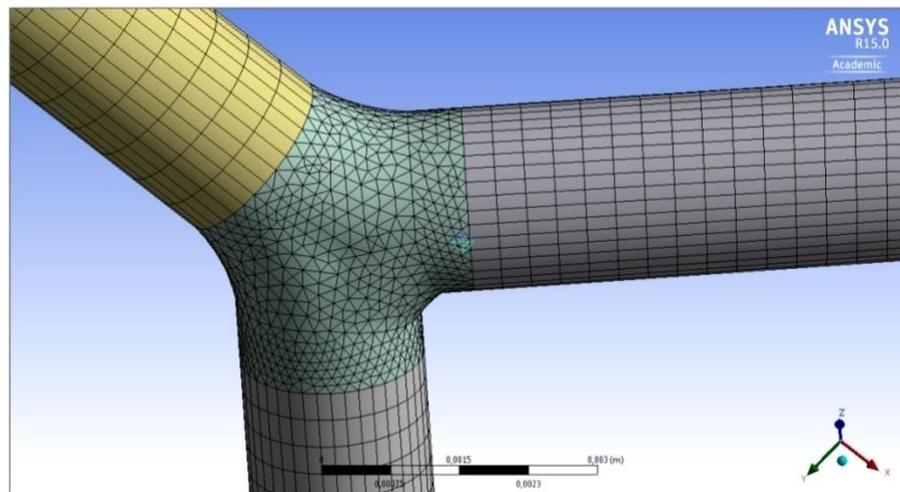


Figure 17 : Maillage raffiné de la bifurcation : géométrie « bifurcation » de 2 mm.

2.2.4. Données extraites et leurs analyses.

Comme l'objectif initial de la modélisation numérique de l'écoulement des microbulles était d'étudier les méthodes de quantification en échographie de contraste, nous avons cherché à obtenir des données numériques similaires à celles mesurées *in vivo*. Ainsi, sous Fluent, les valeurs extraites correspondent au nombre de microbulles par unité de temps présentes dans une région d'intérêt préalablement définie sur l'ensemble du réseau vasculaire. Il en résulte l'obtention de la courbe de rehaussement du signal ultrasonore, à un facteur multiplicatif près, celui du gain de l'échographe. Dans le cas de l'étude de la méthode de quantification par déconvolution, une seconde région d'intérêt était implémentée à l'entrée du réseau vasculaire, pour en extraire une fonction d'entrée numérique. Les méthodes semi-quantitative et quantitative ont ainsi été conduites sur des courbes de rehaussement numérique du nombre de microbulles par unité de temps.

En conclusion, dans cette partie, chaque élément essentiel à la modélisation de l'écoulement des agents de contraste a été présenté. En particulier, l'approche innovante de ce travail était de modéliser l'injection des microbulles en maîtrisant la distribution de la concentration en fonction du temps. Enfin, une attention particulière a été portée sur le maillage des géométries pour optimiser un temps de calcul raisonnable dans la limite de la pratique du laboratoire avec une seule machine dédiée. A présent, la validation de cette modélisation, et en particulier des hypothèses faites, va être détaillée dans le chapitre suivant.

2.3. Validation de la simulation numérique.

La modélisation numérique de l'écoulement des agents de contraste est une approche originale dans le domaine de l'échographie de contraste. Néanmoins, il est nécessaire de valider la simulation en s'assurant d'une part de la validation des hypothèses faites, en particulier sur le sang, et d'autre part de la bonne résolution numérique des équations de Navier-Stokes sous Fluent. Ainsi, uniquement la méthode semi-quantitative a été prise en compte dans cette étude, de manière à pouvoir comparer la forme des courbes par le biais des paramètres graphiques de la méthode semi-quantitative. Pour cela, plusieurs études expérimentales ont été menées et comparées aux simulations numériques correspondantes. Cette partie fait donc l'objet de l'étude de validation de la modélisation numérique dans laquelle sera détaillée la méthodologie expérimentale.

2.3.1. Méthodes expérimentales.

Il s'agissait de valider la modélisation numérique selon deux échelles de fantômes *in vitro*. Le premier est millimétrique et est exploité au sein de l'équipe depuis plusieurs années. Le second, à l'échelle micrométrique a été développé spécifiquement pour cette étude. Les deux bancs expérimentaux vont à présent être détaillés. Pour gagner en clarté, je vais décrire en premier lieu l'échographe et les sondes utilisées puis j'introduirai la méthode selon les deux échelles de fantômes le matériel et la méthode des deux échelles de fantômes avec en premier lieu, la description des appareils utilisés, puis la méthodologie choisie pour acquérir les données et enfin, le détail des expérimentations *in vitro*.

- L'échographe et la sonde

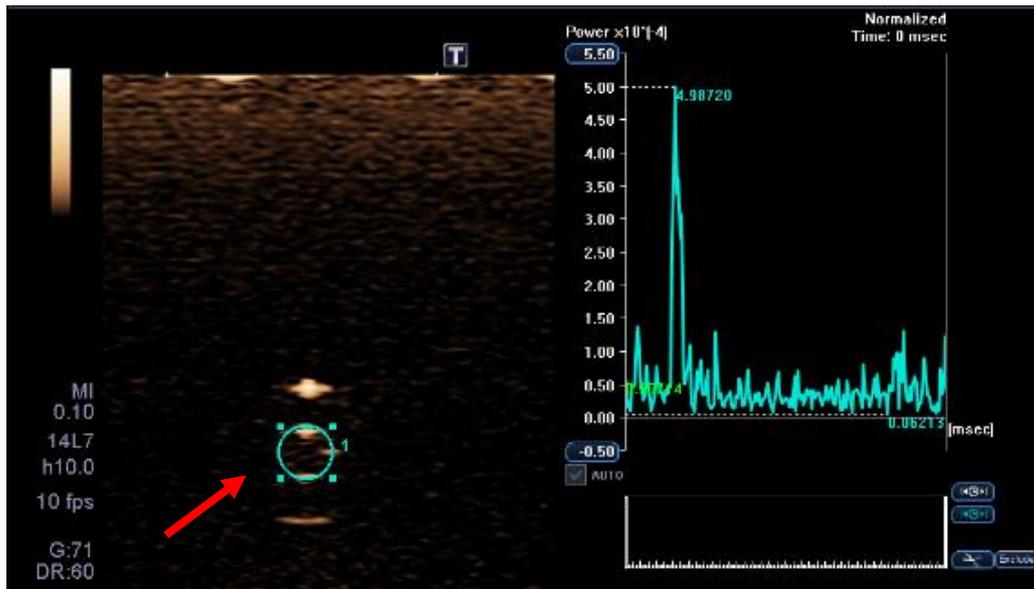


Figure 18 : Image d'une échographie de contraste ultrasonore du fantôme *in vitro* « un tube » et la courbe de rehaussement des agents de contraste correspondante.

L'image ultrasonore de la section du tube est représentée à gauche. Cette section a été sectionnée via le contourage en bleu pour obtenir la courbe de l'intensité du signal des microbulles en fonction du temps (à droite).

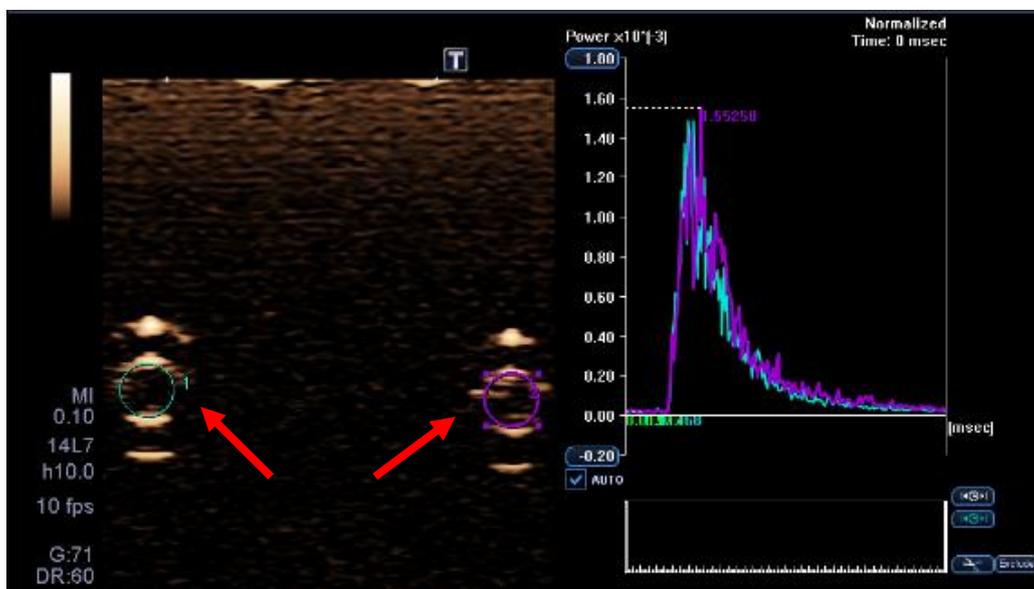


Figure 19 : Image d'une échographie de contraste ultrasonore du fantôme *in vitro* « deux tubes » et la courbe de rehaussement des agents de contraste correspondante.

L'image ultrasonore des deux sections du fantôme « deux tubes » est représentée à gauche. Ces sections ont été sectionnées via le contourage en bleu et violet pour obtenir les courbes de l'intensité du signal des microbulles dans chaque section en fonction du temps (à droite).

L'échographe utilisé pour les expériences des deux études est un Aplio500® (Toshiba, Japon) acquis en 2013 dans le service Échographie au sein du centre Gustave Roussy (Villejuif). La sonde utilisée est la PLT-1202S : elle permet les acquisitions mode B et Doppler à une fréquence de 12 MHz et assure une imagerie harmonique en mode inversion d'impulsion à la fréquence d'émission de 12 MHz, la fréquence de réception étant donc de 24 MHz.

Cette dernière fréquence assure une meilleure résolution des structures superficielles. La cadence image a été fixée à 5 images.s⁻¹ avec un index mécanique de 0,1. Le dispositif est associé à un programme de quantification propre à Toshiba (UltraExtend) permettant l'extraction des données linéaires brutes et l'obtention des courbes de rehaussement de contraste associées aux régions d'intérêt choisies. Celles-ci sont sélectionnées manuellement par l'opérateur et correspondent à la section transverse des fantômes (indiquées par une flèche rouge sur les Figure 18 et Figure 19. Les courbes de rehaussement obtenues sont ensuite traitées par un modèle mathématique développé par l'équipe et présentées dans la partie 1.3.1 du chapitre 1 pour en extraire les paramètres graphiques suivant : le Pic d'Intensité maximal (PI), le temps de montée, l'aire sous la courbe (AUC), le coefficient de la pente de la première partie de la courbe et la largeur à mi-hauteur de la courbe (MTT).

- Montage expérimental pour les fantômes millimétriques.

Fantômes expérimentaux.

Les fantômes expérimentaux mimant « un vaisseau unique » et une « bifurcation » ont été réalisés avec des tuyaux en silicone de 2 mm de diamètre interne et de 4 mm de diamètre externe. La bifurcation a été réalisée avec des connecteurs en forme d'Y en polyoxyméthylène. La longueur des géométries expérimentales est de 27,5 cm.

Les fantômes expérimentaux sont placés dans une cuve de 30 cm de long remplie d'eau pour optimiser la propagation des ondes ultrasonores dans le milieu. Notons que le fantôme constitué de deux branches avec la bifurcation a nécessité une mise en place délicate pour assurer une planéité parfaite des tubes, essentielle pour une dispersion symétrique des agents de contraste. Les parois de la cuve sont tapissées d'un revêtement absorbant les ondes ultrasonores pour limiter les réflexions parasites aux interfaces. La sonde a été placée au regard du fantôme de manière à ce que la zone imagée soit la même que la région sélectionnée sous Fluent comme région d'intérêt.

Pour toutes les expérimentations, la température de l'eau dans la cuve était comprise entre 20° et 25° pour limiter le dégazage des microbulles [91].

Fluides et écoulements.

Deux fluides sont considérés dans ces expériences : le liquide mimant le sang et le produit de contraste ultrasonore.

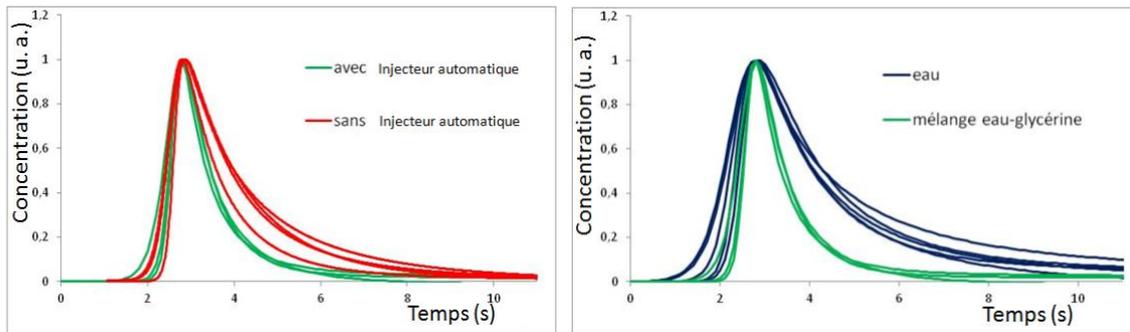
Comme indiqué précédemment, la viscosité d'un liquide conditionne son écoulement. Dans ce contexte, le fluide simulant les propriétés viscoélastiques du sang était constitué d'un mélange d'eau (62%) et de glycérine (38%) [92]. Une viscosité de $0,0036 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ était alors atteinte expérimentalement et reportée dans les paramètres de la simulation numérique. La Figure 20b) présente les courbes de rehaussement du fantôme « un vaisseau droit » de 2 mm de diamètre obtenues avec deux fluides de viscosité différentes : de l'eau avec une viscosité de $0,001 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et le mélange eau-glycérine.

L'influence de la viscosité du fluide se traduit sur les courbes par un étalement de la distribution de la concentration des microbulles au cours du temps avec une largeur à mi-hauteur qui passe de 1s à de 1,78s avec une viscosité trois fois moins grande.

Pour toutes les expérimentations, la température du mélange eau-glycérine était comprise entre 20° et 25° pour éviter la destruction des microbulles [91].

Le produit de contraste utilisé est dû SonoVue® (Bracco, Italie) reconstitué avec 5 mL de sérum physiologique, conformément aux recommandations. La solution est utilisée 20 minutes après reconstitution car le diamètre des microbulles tend à se stabiliser au-delà de ce laps de temps et ce, pendant 2 heures. Cette méthode est essentielle pour assurer un signal ultrasonore réhaussé le plus reproductible d'une expérience à l'autre. A chaque expérimentation, 0,1 mL de SonoVue® a été injecté à l'aide d'une seringue à insuline de 1 mL (Terumo®, Belgique). L'injection des microbulles était réalisée dans un tuyau en silicone en amont des fantômes *in vitro*, situé à une distance de 17 cm de la sonde ultrasonore dans le cas du fantôme « vaisseau droit » et de 39 cm pour le second fantôme avec un embranchement.

De manière à assurer la reproductibilité des injections, la seringue a été actionnée par un injecteur automatique développé au sein du laboratoire IR4M (Figure 21). Ce dernier fonctionnant avec des moteurs piézoélectriques rapides permet d'assurer une injection contrôlée avec une largeur à mi-hauteur fixée à 0,5 seconde, durée optimale choisie pour limiter le temps de calcul de la modélisation numérique.



a)

b)

Figure 20 : Courbes de rehaussement de la géométrie « deux tubes » avec et sans injecteur automatique a), Courbes de rehaussement de la géométrie « vaisseau droit » pour comparer l'utilisation d'eau avec l'utilisation du mélange eau-glycérine b).

On remarque que le mélange eau-glycérine permet de diminuer la largeur à mi-hauteur des courbes qui passe de 1s à de 1,78s. On remarque que l'injecteur automatique permet d'obtenir un écart-type de la largeur à mi-hauteur de 0,12s par rapport à 0,17s lorsque l'injection est manuelle.

Comme il peut être vu sur Figure 21b), l'injecteur automatique a permis d'améliorer la reproductibilité des mesures. En effet, l'injecteur automatique permet d'obtenir un écart-type de la largeur à mi-hauteur 0,12s par rapport à 0,17s lorsque l'injection est manuelle. Ces mesures du rehaussement du signal ultrasonore ont été réalisées avec la géométrie « deux tubes » dans les mêmes conditions que pour la validation de la modélisation numérique.

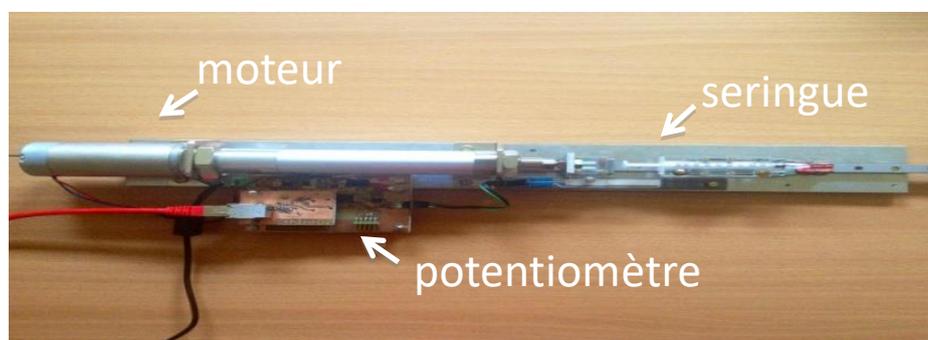


Figure 21 : Photographie de l'injecteur automatique utilisé avec l'emplacement de la seringue.

L'écoulement des deux fluides, équivalent sang et agent de contraste, est assurée par une pompe péristaltique disposant d'un mécanisme à galets (PumpDrive PD5101, Heidolph, Allemagne). Le liquide qui est contenu dans un tuyau flexible est entraîné par un rotor de galets qui presse le tuyau pendant la rotation et entraîne le déplacement du fluide se trouvant entre les galets. Placée en amont des fantômes, la pompe permet d'imposer un débit d'écoulement des fluides de 0 à 120 mL.min⁻¹ selon notre configuration.

Enfin, le montage fonctionne en circuit ouvert et il est rincé avec le fluide de manière à s'assurer que le tuyau est libre de microbulles entre chaque acquisition.

Un schéma du montage expérimental utilisé pour la validation de la modélisation numérique sur les géométries de 2 mm est présenté ci-dessous (Figure 22).

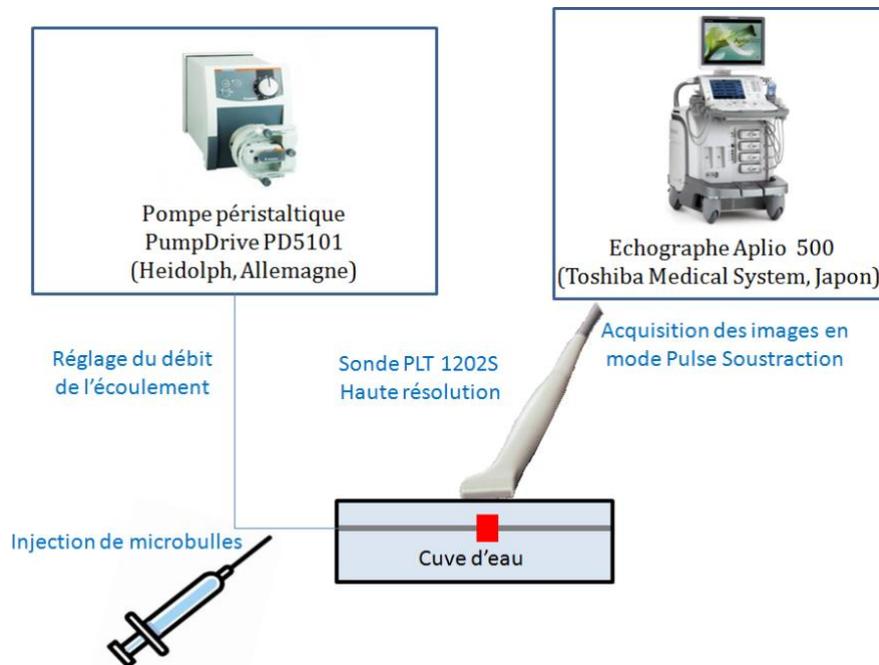
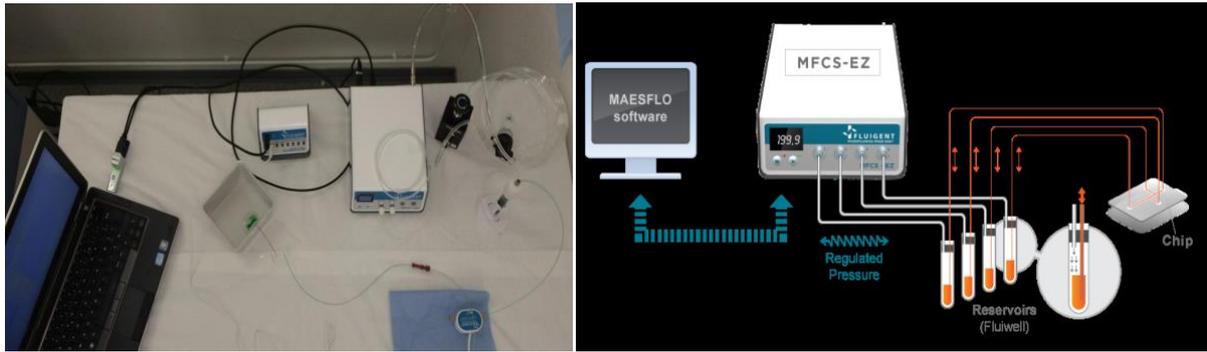


Figure 22 : Schéma du montage expérimental utilisé pour la validation de la modélisation numérique sur les géométries 2 mm.

- Montage expérimental pour le fantôme microfluidique.

Un banc expérimental microfluidique a été mis en place au sein de l'équipe pour à la fois valider notre approche numérique sur des faibles débits et pour, à terme, entreprendre des études *in vitro* de l'écoulement des agents de contraste dans les microvaisseaux. Dans le cadre de mes travaux, les expérimentations ont été réalisées avec un tube de 500 μm de diamètre en Fluorinated Ethylene Propylene (FEP) préalablement immergé dans une cuve d'eau (Figure 23).

Pour atteindre des débits de l'ordre du millilitre par minute, un circuit microfluidique peut être alimenté soit directement en débit (pousse seringue, pompe péristaltique), soit en imposant une différence de pression aux extrémités du circuit (compresseur et régulateur de pression). Pour optimiser la précision en débit avec une variation de 0,1%, nous avons opté pour un montage élaboré à partir d'un contrôleur de pression MFCS (Microfluidic Flow Control System, Fluigent technology, France) préalablement alimenté en pression par un compresseur. Il agit en pressurant un réservoir pour permettre l'écoulement des fluides (Figure 24). Le contrôleur de pression piloté par ordinateur est équipé de deux voies acceptant une pression de 0 à 700 mbar \pm 2,1 mbar avec des temps de réponse inférieurs 100ms. Pour assurer un rétrocontrôle précis en débit en ajustant les valeurs de pression appliquée, un débitmètre thermique couplé à un algorithme a été associé au montage. Une calibration automatique du débit F est réalisée en fonction de la pression ΔP appliquée pour déterminer la résistance du système fluidique R tel que $\Delta P = R \times F$.



a)

b)

Figure 23 : Photographie a) et Schéma du montage expérimental de microfluidique b).

Le débitmètre thermique est composé de deux capteurs thermiques situés de chaque côté d'une micro source de chaleur. La détermination de la puissance thermique P nécessaire pour augmenter la température du fluide de capacité calorifique C_p d'une certaine valeur ΔT permet d'obtenir par la formule suivante le débit massique Q_m :

$$P = Q_m C_p \Delta T$$

Équation II.20

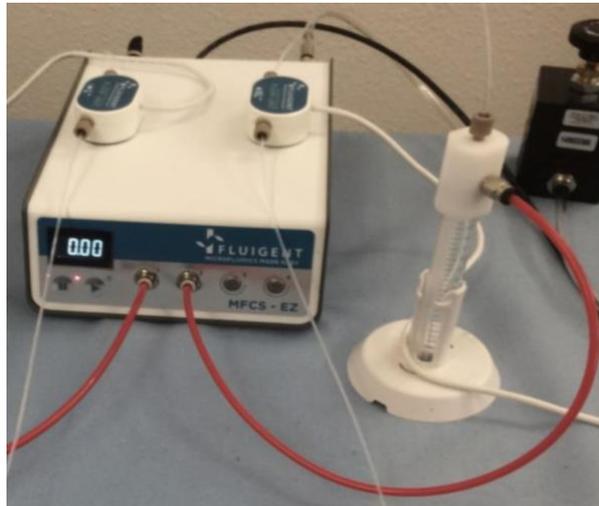


Figure 24 : Photographie du contrôleur de pression.

Pour limiter les risques d'obstruction des entrées du débitmètre avec un fluide visqueux, nous avons opté comme première condition d'utiliser de l'eau comme fluide mimant le sang. Bien évidemment, le coefficient de viscosité a été modifié en conséquence dans la modélisation numérique. La vitesse du fluide a été fixée à $0,09 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, grandeur proche de la norme physiologique du sang dans les capillaires.

Enfin, concernant l'injection de l'agent de contraste et sa détection par échographie, le matériel utilisé est le même que celui précédemment décrit.

- Méthode expérimentale pour l'étude de la validation de la modélisation numérique.

Pour étudier la validité de notre modèle numérique de l'écoulement des agents de contraste, nous nous sommes intéressés à la dynamique des microbulles au sein de trois géométries de fantômes différentes : les deux fantômes « vaisseau droit » aux deux échelles de tailles différentes (millimétrique et micrométrique) et le dernier incluant une bifurcation dans sa géométrie pour valider la dispersion des microbulles. Nous avons complété cette étude de la dynamique des microbulles selon une variation de la vitesse d'écoulement au sein de la géométrie avec une bifurcation. Ainsi quatre débits ont été étudiés : $26 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $34 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $41 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et $56 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (soit en vitesse : $0,13 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, $0,18 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, $0,21 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ et $0,3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$).

Considérant que les expériences en échographie de contraste ont des sources de variabilités connues (injection, nombre de microbulles, etc.), cinq mesures de répétabilité ont été réalisées pour chaque expérience. Pour rendre compte de cette variabilité, nous avons déterminé le coefficient de variabilité CV défini comme suit :

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \qquad \text{Équation II.21}$$

Avec σ l'écart-type et μ la moyenne.

Les données mesurées dépendantes des gains électroniques de l'échographe ont été normalisées pour faciliter la comparaison et l'interprétation avec les résultats obtenus par simulation numérique. De plus, les valeurs extraites des courbes numériques et expérimentales ont été obtenues par la méthode dite semi-quantitative avec en particulier le calcul des paramètres AUC, PI et TT.

2.3.2. Résultats et discussion sur l'étude comparative.

- Étude de validation de l'écoulement au cours du temps dans un « vaisseau droit » de 2 mm de diamètre.

Pour cette étude, nous avons réalisé trois injections successives de 0,1 mL de Sonovue. Les trois courbes de rehaussement du signal ultrasonore ainsi obtenues sont représentées en noir sur la Figure 25. Elles n'ont pas été moyennées entre elles pour illustrer la variabilité des mesures, souvent importantes en DCE-US. Dans le cadre de notre étude, les trois courbes apparaissent très similaires avec des coefficients de variabilités de 4%, 5% et 13% respectivement pour la valeur du PI, de l'AUC et du TT, paramètres graphiques décrivant la forme de la distribution. Ces valeurs sont globalement plus faibles que celles initialement obtenues au sein de l'équipe lors de travaux de thèse précédents de M. Gauthier [61] qui étaient compris entre 8 et 12% [64]. Ce premier résultat souligne l'intérêt de l'auto-injecteur pour améliorer la robustesse des mesures en minimisant la source de variabilité inhérente à l'étape d'injection. La courbe de rehaussement obtenue via la simulation numérique (représentée en rouge sur la Figure 25) se situe parfaitement dans l'ensemble des trois courbes expérimentales. Si nous considérons la moyenne des paramètres graphiques obtenus expérimentalement, alors la différence relative avec la courbe d'origine numérique est de 5%, 3%, respectivement pour le l'AUC et le TT. La différence relative pour le paramètre PI n'est pas pertinente car, après normalisation, il est égal à 1. Ces premiers résultats permettent de valider notre modèle numérique pour l'écoulement des agents de contraste au cours du temps dans le cas d'une configuration géométrique simple. En particulier, la validation porte sur l'hypothèse d'un modèle diphasique, la modélisation de l'injection en bolus des agents de contraste et le maillage du fantôme numérique.

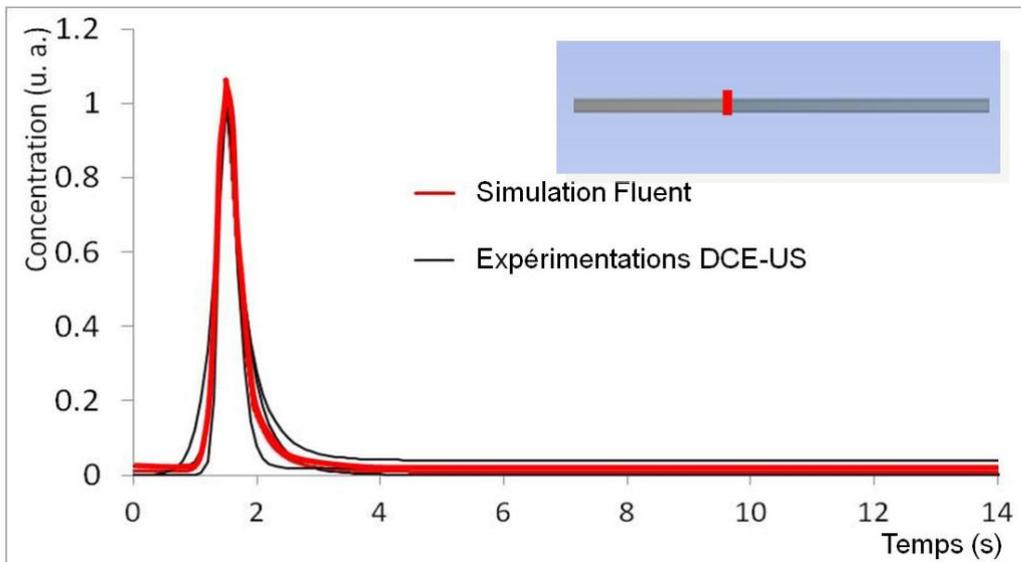


Figure 25 : Courbes de rehaussement issu des expérimentations DCE-US et de la simulation Fluent pour la géométrie « un vaisseau » pour un débit de 41 mL.min⁻¹.

- Étude de validation de l'écoulement au cours du temps dans un « vaisseau avec une bifurcation » de 2 mm de diamètre.

Dans le cadre de cette étude, nous nous intéressons également à la validation de l'écoulement des agents de contraste au cours du temps mais sur une géométrie de fantôme impliquant une modification de la distribution spatiale des microbulles avec l'introduction d'une bifurcation. Cinq injections de 0,1 mL de Sonovue ont été réalisées. Comme indiqué sur la Figure 26, les cinq courbes de rehaussement du signal ultrasonore apparaissent très similaires avec des coefficients de variabilités très faibles avec 8%, 9%, 20%, respectivement pour la valeur du PI, de l'AUC et du TT. L'auto-injecteur apparaît essentiel pour améliorer la robustesse des mesures. La courbe de rehaussement obtenue via Fluent est à l'image de celles obtenues expérimentalement, avec une différence relative avec les données mesurées de 6%, 5%, respectivement pour l'AUC et le TT. Ces premiers résultats permettent de valider notre modèle numérique pour l'écoulement des agents de contraste au cours du temps dans le cas d'une configuration géométrique comportant une unique bifurcation. Même si cela représente un niveau léger de complexité par rapport à un réseau vasculaire tumoral, il était essentiel d'éprouver la modélisation de la dispersion des agents de contraste à travers une jonction de deux vaisseaux. Ainsi cette étude a permis de valider au point de la bifurcation la bonne résolution des équations d'un modèle diphasique associé à un maillage de qualité.

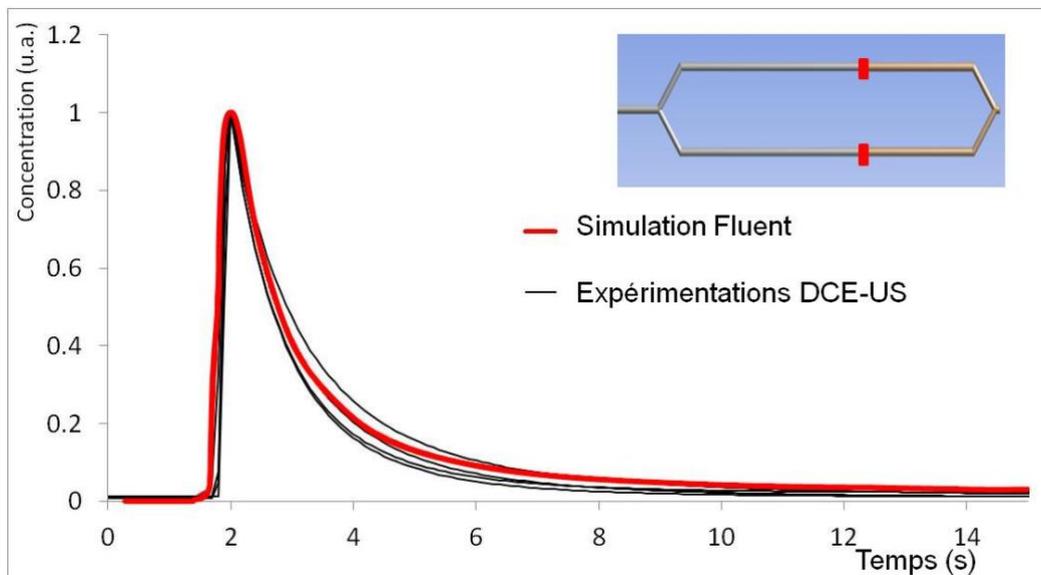


Figure 26 : Courbes de rehaussement issu des expérimentations DCE-US et de la simulation Fluent pour la géométrie « bifurcation » pour un débit de 41 mL.min⁻¹.

- Étude de validation de la vitesse d'écoulement dans un vaisseau avec une bifurcation de 2 mm de diamètre.

Cette étude visait la validation de la modélisation numérique selon différentes vitesses d'écoulement des agents de contraste. Plus précisément, il s'agissait d'évaluer la variation des courbes de rehaussement du signal en fonction de quatre vitesses : 0,13, 0,18, 0,21 et 0,29 $m.s^{-1}$. Les résultats de la Figure 27 correspondent respectivement à l'AUC et au TT selon l'approche numérique et expérimentale. Dans ce dernier cas, quatre injections successives ont été réalisées. Une moyenne et un écart type des paramètres ont alors été extraits. Sur la Figure 27a), il est observé une diminution des valeurs d'AUC selon les débits, conformément à ce qui était attendu. En effet, selon le théorème de l'indicateur dilué, l'AUC est inversement proportionnel en fonction du débit du fluide (cf. Chapitre 1, partie 1.1.3.). Plus précisément, une élévation de la vitesse d'écoulement entraîne une augmentation du volume du fluide traversant la région d'intérêt, responsable alors d'une diminution de la concentration des microbulles, directement proportionnelle à l'AUC. Le fit des deux courbes (données expérimentales et modélisées) est fait selon une équation en $1/x$. De plus, il y a une excellente concordance entre les données simulées et expérimentales avec une différence maximale entre les valeurs de 3%. Sur la Figure 27b), il est également observé une diminution du TT avec la vitesse d'écoulement du sang avec un Δ de 52%.

Nous pouvons également observer une excellente concordance entre les valeurs modélisées et celles mesurées avec une différence maximale de 6% pour le TT. Ainsi, ces résultats valident la bonne résolution des équations de Navier-Stokes sous Fluent selon différentes vitesses d'écoulement du fluide.

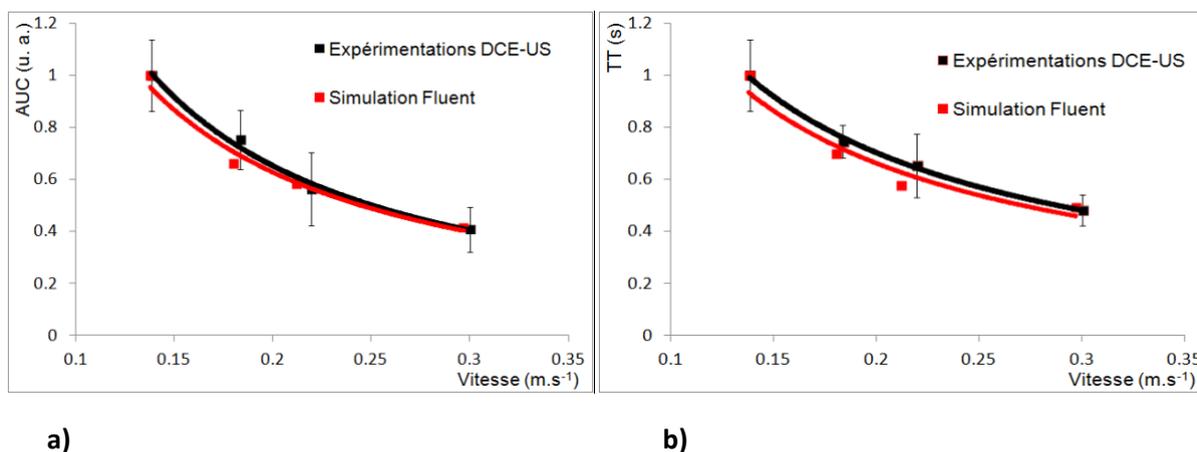


Figure 27 : Courbes représentant l'AUC a) et le TT b) en fonction de la vitesse pour quatre vitesses (0,13 $m.s^{-1}$, 0,18 $m.s^{-1}$, 0,21 $m.s^{-1}$ et 0,29 $m.s^{-1}$) pour la géométrie « bifurcation ».

- Étude de validation de l'écoulement au cours du temps dans un « vaisseau droit » de 500 μm de diamètre.

Cette étude menée sur un tube de 500 μm de diamètre avait pour objectif de valider le code Fluent pour simuler un écoulement d'agent de contraste avec un débit physiologique d'0,9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ sans être sujet à des effets de flottaison des microbulles en condition *in vitro*. Les quatre courbes de rehaussement du signal ultrasonore obtenues expérimentalement après injection du Sonovue, sont représentées en noir sur la Figure 28. A nouveau, elles sont toutes quatre similaires avec des coefficients de variabilités de 7%, 4% et 5% respectivement pour la valeur du PI, de l'AUC et du TT. La courbe de rehaussement obtenue via la simulation numérique (représentée en rouge sur la Figure 28) se situe parfaitement dans l'ensemble des quatre courbes expérimentales. D'un point de vue quantitatif, la différence relative avec la courbe d'origine numérique est de 5% et de 4% respectivement pour l'AUC et le TT. Ces résultats permettent de valider notre modèle numérique dans des conditions de vitesse d'écoulement proches de celles rencontrées *in vivo* au travers d'une configuration géométrique simple.

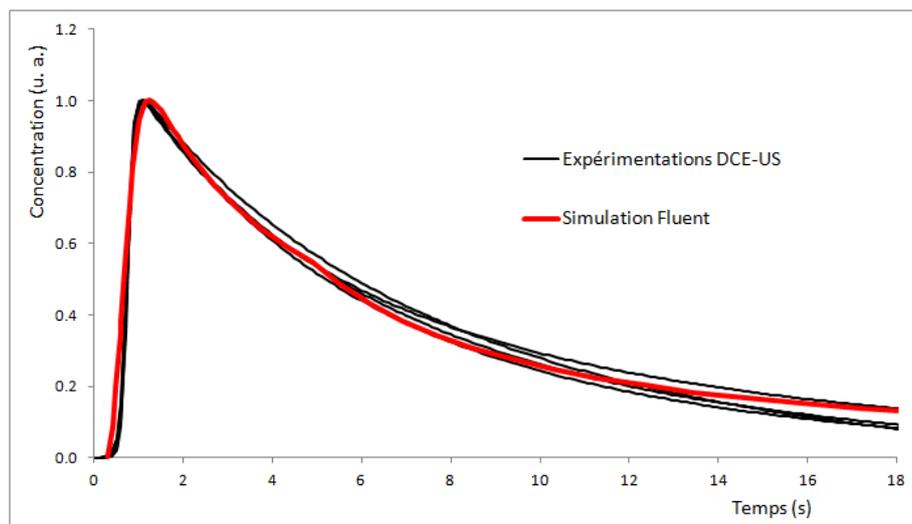


Figure 28 : Courbes de rehaussement issu des expérimentations DCE-US et de la simulation Fluent pour le tube de 500 μm de diamètre pour un débit de 0,9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.4. Conclusion.

Si la CFD apparaît comme un outil attractif pour mieux appréhender l'écoulement des agents de contraste en imagerie et leur quantification, de nombreuses hypothèses ont été nécessaires pour aborder la problématique du vivant. En particulier, nous avons présenté dans ce chapitre les choix faits en termes de modèle, de fluide, d'injection d'agent de contraste, de géométries parcourues et enfin de maillage. L'étude de la validité de ces hypothèses a été conduite en confrontant la modélisation à l'expérimentation avec une attention particulière portée à la minimisation de la variabilité des mesures. Les résultats ainsi obtenus ont porté sur différentes configurations d'écoulement et de géométries de fantôme et valident notre approche avec une grande concordance entre les données simulées et celles mesurées.

La validation de la modélisation numérique étant faite, nous nous sommes focalisés sur l'étude numérique de la sensibilité des deux méthodes mathématiques pour quantifier la concentration d'agents de contraste ultrasonores décrites dans le chapitre 1 qui sont la méthode semi-quantitative et celle dite quantitative. C'est l'objet du chapitre suivant.

2.5. Annexe.

```
#include "udf.h"
#include "dpm_tools.h"
#define PI 3.141592654

DEFINE_DPM_INJECTION_INIT(inj_surface,l)
{
  real Delta_t, vin, a2, a3, pentep, penteq, a, b, rayon, angle, y, z, a0;
  Particle *p ;
  real t = CURRENT_TIME ;
  real radius = 0.0002;

  /*temps à partir duquel il n'y a plus d'injection*/

  Delta_t = 27.91747;

  #define X_CENTER 0
  #define Y_CENTER 0
  #define Z_CENTER 0

  loop(p,l->p_init)
  {

  /*définition du diamètre et de la masse des microbulles*/

  P_DIAM(p) = 0.000003 ;
  P_RHO(p) = 6.16 ;
  P_MASS(p) = P_RHO(p)*PI*pow(P_DIAM(p),3.0)/6.0;

  /*définition de la vitesse des microbulles*/

  P_VEL(p)[0] = 0.01;
  P_VEL(p)[1] = 0;
  P_VEL(p)[2] = 0;

  /*définition des paramètres de la courbe de rehaussement*/

  vin=1.1;
  a2 = 118.763801;
  a3 = 2.86278775;
  pentep = 5.10803905;
  penteq = 4.20693482;
  a = -0.2823111;
  b = 30.2493575;

  if (t==0)
  {
  P_FLOW_RATE(p) = 0 ;
```

```

MARK_PARTICLE(p, P_FL_REMOVED);
}
else if (t<=Delta_t)
    {

/*prise en compte d'une distribution uniforme des microbulles sur la face d'entrée*/

real a0 = DPM_Uniform_Random();
rayon = radius * sqrt(a0); /*rayon aléatoire*/
angle = 2*PI*DPM_Uniform_Random(); /*angle aléatoire*/

/*coordonées d'injection des microbulles*/

y = rayon * sin(angle);
z = rayon * cos(angle);

P_INIT_POS(p)[0] = P_POS(p)[0] = X_CENTER;
P_INIT_POS(p)[1] = P_POS(p)[1] = Y_CENTER + y;
P_INIT_POS(p)[2] = P_POS(p)[2] = Z_CENTER + z;

        P_FLOW_RATE(p) = (vin + (a2-
        vin)*((a+pow((t/a3),penteq))/(b+pow((t/a3),pentep))))/0.013*P_MASS(p); /*définition de
        la distribution des microbulles en fonction du temps*/

    }

else if (t>Delta_t)

    {
        P_FLOW_RATE(p) = 0 ;
        MARK_PARTICLE(p, P_FL_REMOVED); /*cela ne lance pas la particule */
    }
}

Message("\n t=%10.5e s \n",t);
}

DEFINE_DELTAT(mydeltat,d)
{
real Delta_t;
real t = CURRENT_TIME,initial_dt=0;
real dt;

/*prise en compte des tailles des pas de temps successifs*/

real V[50000]={
7.648965e-001,
2.509280e-001,
1.452308e-001,
1.023985e-001,
7.947885e-002,

```

```
6.523486e-002,  
5.551982e-002,  
4.846163e-002,  
4.309445e-002,  
3.887025e-002,  
3.545512e-002,  
3.263404e-002,  
3.026222e-002,  
2.823862e-002,
```

```
8.019451e-004,  
8.019645e-004,  
8.019838e-004,  
8.020031e-004};
```

```
static int i=0;
```

```
Delta_t = 27.91747;
```

```
Message("\n t=%10.5e s \n",t);
```

```
dt=initial_dt;
```

```
#if 1
```

```
if (t<=Delta_t)
```

```
{
```

```
dt=V[i];
```

```
i=i+1;
```

```
}
```

```
else if (t>Delta_t)
```

```
{
```

```
dt=8.020031e-004;
```

```
}
```

```
#endif
```

```
return dt;
```

```
}
```

Chapitre 3 : Étude comparative des méthodes de quantification par la modélisation numérique de l'écoulement des agents de contraste dans les réseaux vasculaires.

En imagerie médicale, la modélisation numérique est une approche classique pour choisir les dimensions d'un détecteur et anticiper ses performances. En revanche, elle est plus rarement utilisée lorsqu'il s'agit d'évaluer les performances des modèles mathématiques afin de quantifier la concentration de produit de contraste, que ce soit en imagerie nucléaire, magnétique ou ultrasonore. Dans notre cas et comme déjà dit, nous avons fait ce choix méthodologique en raison de la dimension des vaisseaux concernés limitant une expérimentation *in vitro* aisée. Ainsi, après avoir validé les hypothèses faites pour modéliser l'écoulement des agents de contraste au travers d'une configuration géométrique et paramétrique figée, nous avons abordé plus largement notre étude sur la sensibilité des méthodes de quantification ultrasonore (la méthode quantitative et la méthode semi-quantitative présentées dans le chapitre 1) pour détecter des modifications précoces de la microvascularisation tumorale. Plus précisément nous avons initié cette étude en impliquant deux paramètres d'influence que sont le volume vasculaire et la vitesse d'écoulement du sang.

Après avoir présenté les paramètres d'entrée de la modélisation numérique propre à cette étude, nous détaillerons les deux paramètres vasculaires. Les résultats ainsi que leur discussion seront ensuite exposés.

3.1. Méthode de l'étude de sensibilité des méthodes de quantification par CFD.

A la différence du chapitre précédent qui était centré sur la comparaison avec l'expérimentation, nous avons cherché ici à tendre vers des conditions physiologiques réelles. Les différents éléments alors considérés vont être à présent détaillés.

3.1.1. Modélisation de l'injection des agents de contraste.

La modélisation de l'injection des agents de contraste sous Fluent est possible en implémentant une équation mathématique descriptive de la distribution de concentration des microbulles. Dans la pratique, pour simuler l'arrivée des microbulles au sein du réseau vasculaire avec une distribution de concentration réaliste, un signal ultrasonore a été recueilli *in vivo*, au niveau de l'entrée artérielle de la tumeur d'une souris (cf. Figure 29). Plus précisément, il s'agissait du signal ultrasonore obtenu dans une région d'intérêt en regard d'une des artères nourrissant la tumeur. La courbe de rehaussement retenue pour la modélisation numérique a été choisie parmi une série de cinq courbes expérimentalement obtenues sur cinq souris différentes lors de la thèse précédente de Marianne Gauthier [61]. Le principal critère de sélection a été le rapport signal sur bruit de la courbe. La méthode d'obtention de ses mesures *in vivo* est décrite dans le chapitre 4 partie 4.2.1.3.

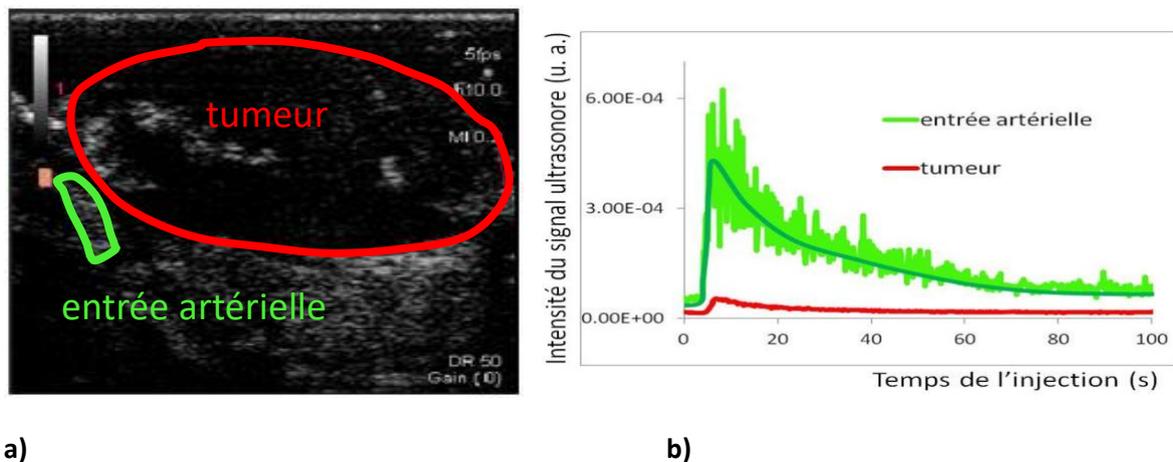


Figure 29 : Image ultrasonore d'une tumeur et de l'entrée artérielle correspondante sur une souris a), Courbes représentant le rehaussement du signal ultrasonore dans la tumeur et dans l'entrée artérielle en fonction du temps b).

Les courbes de rehaussement issues de l'échographe sont normalisées par la surface de la région d'intérêt imagée.

Dans les conditions *in vivo*, le parcours des microbulles au sein du système circulatoire de l'animal implique une courbe de rehaussement ultrasonore bien différente de celle obtenue *in vitro*. En particulier, l'absence de symétrie de la courbe avec un temps de montée très court a permis d'utiliser le programme de traitement de données dédié aux études cliniques (cf partie 1.3.1. du chapitre 1) et développé par le laboratoire en Visual Basic dans une macro Excel (Microsoft Office). Ainsi, l'équation mathématique de la courbe de l'intensité du signal ultrasonore en fonction du temps $I(t)$ ainsi obtenue est :

$$I(t) = 1,1 + (116,9) \frac{(-0,28 + (\frac{t}{2,86})^{4,2})}{(30,24 + (\frac{t}{2,86})^{5,1})} \quad \text{Équation III.1}$$

Une fois cette distribution de microbulles implémentée et discrétisée dans le programme CFD (cf. annexe du chapitre 2) au niveau de l'entrée des réseaux vasculaires, le parcours de l'écoulement des agents de contraste est simulé au sein de différentes géométries de réseau vasculaire. Ces dernières sont présentées dans la partie suivante.

3.1.2. Géométrie des fantômes numériques.

La géométrie des fantômes numériques a été déterminée dans le prolongement direct de l'étude de la validation avec un vaisseau droit de 500 μm de diamètre. Nous n'avons pas cherché à diminuer les dimensions de manière importante pour mimer les néo-vaisseaux de 10 à 20 μm en vue de rester dans le domaine de validité de nos hypothèses. Ainsi, trois fantômes numériques modélisant des réseaux vasculaires d'une complexité croissante ont été étudiés. Ils ont été développés pour étudier l'influence de deux paramètres vasculaires sur le signal ultrasonore rehaussé que sont le volume et la vitesse d'écoulement du sang. Ils consistaient en des réseaux une, deux, trois et quatre branches symétriques (cf. Figure 31 a), b), c), d) c'est à dire avec des rapports d'embranchement symétriques en terme de rayon r et d'angle θ selon la loi de Murray [90].

Les rapports d'embranchement ont donc été déterminés selon les deux équations indépendantes suivantes :

$$r_0^3 = r_1^3 + r_2^3 \quad \text{Équation III.2}$$

$$r_1 \cos \theta_1 + r_2 \cos \theta_2 = (1 + \epsilon)r_0 \quad \text{Équation III.3}$$

ϵ représente les variations par rapport à l'optimalité. Il est inférieur à 0,1. Dans l'étude, il a été fixé à zéro.

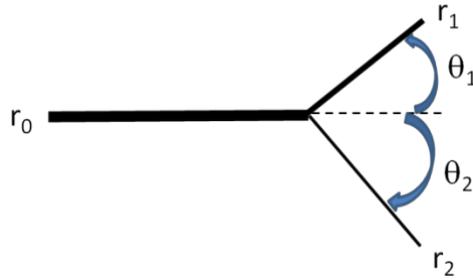


Figure 30 : Schéma illustrant la loi de Murray.

Une branche mère de rayon r_0 se sépare en deux branches filles de rayons respectifs r_1 et r_2 et angles respectifs θ_1 et θ_2 avec la branche mère.

Le diamètre $2r_0$ amont commun aux trois réseaux a été fixé à $500 \mu\text{m}$. En revanche, les diamètres des segments vasculaires après la première bifurcation sont de $390 \mu\text{m}$ et après la seconde bifurcation sont de $300 \mu\text{m}$. Les valeurs de θ_1 et θ_2 sont de $37,62^\circ$.

Enfin, la longueur en amont des réseaux a été déterminée selon un compromis entre une longueur suffisante pour que l'état stationnaire de l'écoulement soit établi et une longueur optimisant les temps de calcul numérique. Dans la littérature [93], il est indiqué que cette longueur caractéristique minimale L pour l'établissement d'un écoulement stationnaire au sein d'un tube de diamètre d est :

$$L = 0,04dR_e \quad \text{Équation III.4}$$

Avec R_e , le nombre de Reynolds.

Dans la pratique, il est convenu que cette longueur soit égale à trois fois le diamètre d du vaisseau avant la bifurcation et un diamètre après.

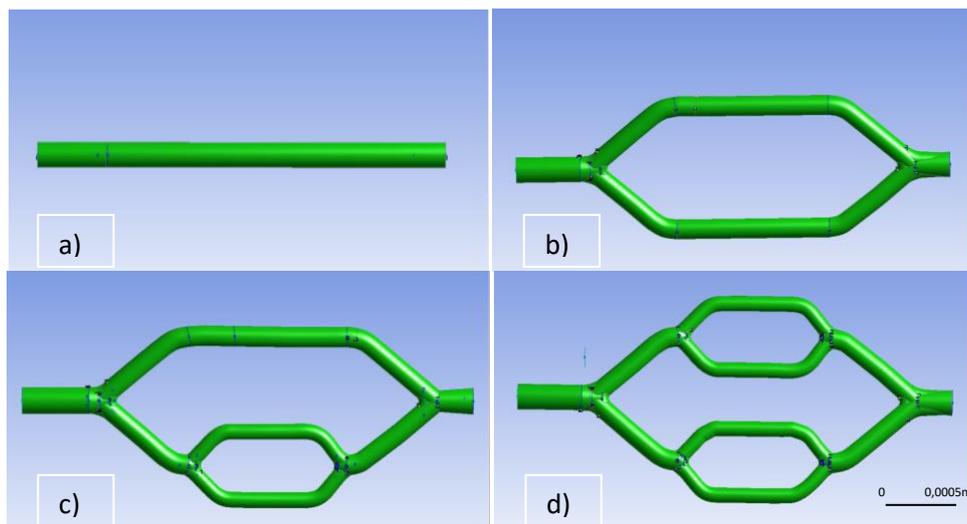


Figure 31 : Géométrie des fantômes numériques : « réseau une branche » symétrique a), « réseau deux branches » symétrique b), « réseau trois branches » symétrique c) et « réseau quatre branches » symétrique d).

Fantômes numériques	Types maillages	Tailles et nombres de mailles	Nb de mailles	Temps de calcul
Réseaux micrométriques	tétraédriques à l'intérieur et hexaédriques sur les proches parois	20 à 40 μm en couche limite 1 mm dans le sens de l'écoulement	De 2 à 4 millions de mailles	6 jours*

Tableau 7 : Tableau représentant les différentes caractéristiques des maillages des réseaux.

* Si le temps de calcul machine dépend fortement du nombre de mailles très différentes entre les géométries millimétriques et micrométriques, il est à noter que les modélisations menées prenaient en compte également les données d'injection d'agents de contraste différentes avec 3 secondes dans le premier cas et 100 secondes dans le second.

3.1.3. Paramètres d'influence étudiés.

- Modification du volume vasculaire du fantôme numérique.

Les volumes vasculaires peuvent être modifiés à plusieurs niveaux de la géométrie des réseaux : variation du diamètre, augmentation de la longueur du réseau ou multiplication du nombre de branche. Si ces trois approches sont pertinentes, nous avons privilégié la dernière. En effet, changer significativement le diamètre des vaisseaux entraînerait une modification du profil de vitesse d'écoulement et étirer la longueur du réseau impliquerait essentiellement un allongement du temps de parcours. Si ces approches sont bien évidemment à étudier par la suite, mon travail de thèse s'est donc porté sur la modélisation de quatre volumes différents correspondant à chacune des géométries précédemment décrites : une branche de $1,84 \cdot 10^{-3}$ mL, deux branches de $2,28 \cdot 10^{-3}$ mL, trois branches de $2,4 \cdot 10^{-3}$ mL et enfin quatre branches de $2,54 \cdot 10^{-3}$ mL.

La différence maximale examinée de volume vasculaire était de 38% de manière à avoir une différence significative sur les paramètres obtenus.

- Influence du flux vasculaire.

De même que pour l'étude des volumes vasculaires, cette étude avait pour objectif d'évaluer la sensibilité et la fiabilité des paramètres quantitatifs et semi-quantitatifs permettant de quantifier des variations de débit vasculaire au cours du développement tumoral et au cours d'un traitement anti-tumoral.

Concernant le choix des valeurs de vitesse d'écoulement, nous nous sommes appuyés sur les données décrites dans la littérature. En particulier, l'équipe de Brizel et celle de Kamoun ont mesuré par fluorescence des vitesses moyennes de déplacement des globules rouges de 0,0001 à 0,025 m.s⁻¹, dans des vaisseaux de 20 µm de diamètre [94, 95]. Étant donné que les diamètres des vaisseaux étudiés sont beaucoup plus grands (500 µm), nous avons choisi une plage de valeurs autour des vitesses les plus grandes : 0,01 m.s⁻¹, 0,02 m.s⁻¹, 0,03 m.s⁻¹ et 0,05 m.s⁻¹. Ainsi, la différence maximale étudiée sur les vitesses d'écoulement sanguin était de 80%.

3.1.4. Méthode d'analyse des données.

Sous Fluent, pour chaque configuration de vitesse ou de géométrie des fantômes, les données simulées sont représentées sous forme d'une courbe. Celle-ci correspond au nombre de microbulles par unité de temps présentes dans une région d'intérêt préalablement définie sur l'ensemble du réseau vasculaire. C'est donc directement à partir de cette courbe de rehaussement simulée, que les méthodes de quantification ont été appliquées. Dans le cas de la méthode semi-quantitative, les cinq paramètres les plus pertinents pour cette étude ont été déterminés : l'AUC, PI, P, T_m et TT. Dans le cas de l'étude de la méthode de quantification par déconvolution, une seconde région d'intérêt était implémentée à l'entrée du réseau vasculaire, pour extraire la fonction d'entrée artérielle numérique qui est identique à tous les réseaux et ne varie qu'avec la vitesse d'écoulement. La méthode quantitative permet d'obtenir le volume sanguin (VS) (en mL/100 g), le débit sanguin (FS) (en mL/min/100 g) et le temps de transit (MTT) (s). Cette méthode présentée dans la partie 1.3.3. du chapitre 1 donne la relation entre ces trois paramètres.

$$MTT = \frac{VS}{FS} \quad \text{Équation III.5}$$

Ainsi, le débit sanguin correspond au volume de sang traversant le réseau par unité de temps.

Enfin, pour évaluer la sensibilité des paramètres exprimant la microvascularisation aux différentes variables possibles (volume sanguin et vitesse d'écoulement), nous avons calculé la différence relative Δ . Exprimée en pourcentage, elle rend compte de l'amplitude maximale des valeurs des paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs en fonction des variables d'influence étudiées.

3.2. Résultats.

L'étude de l'influence du volume du réseau vasculaire sur les paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs sera suivie de celle de la vitesse d'écoulement du sang.

3.2.1. Étude de l'influence du volume des réseaux sur les paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs.

Les courbes de rehaussement modélisées sont représentées sur la Figure 32 pour une vitesse d'écoulement du sang de $0,03 \text{ m.s}^{-1}$. On remarque en premier lieu la grande différence d'amplitude entre la courbe de rehaussement de l'entrée artérielle (Figure 32A) qui est environ 180 fois plus réduite que celles des courbes de rehaussement issues des réseaux (Figure 32B). Il s'agit du même ordre de grandeur que le rapport entre les volumes des régions d'intérêt concernées : entrée tumorale versus réseau.

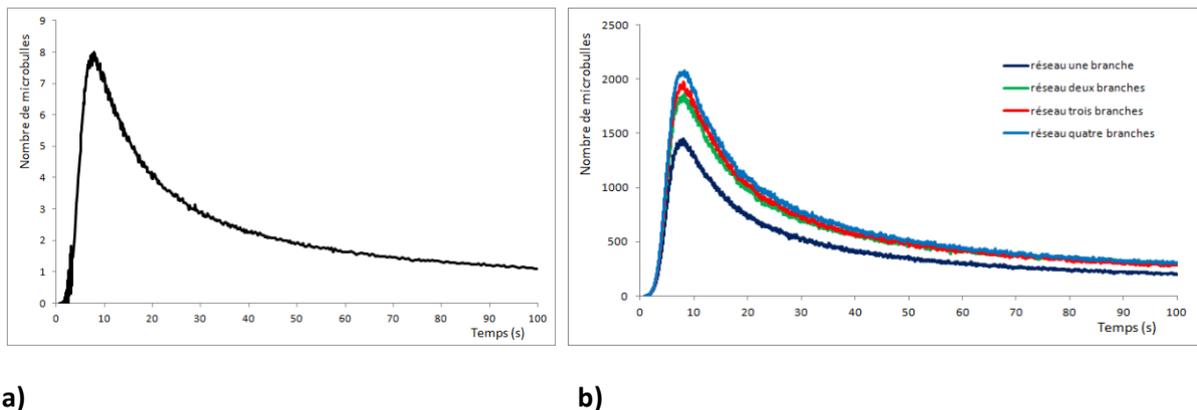


Figure 32 : Courbe de rehaussement brute de l'entrée artérielle pour le réseau une branche a) et des réseaux symétriques, une branche, deux branches, trois branches et quatre branches b) pour une vitesse du sang de $0,03 \text{ m.s}^{-1}$.

Concernant la variation des courbes de rehaussement en fonction du volume, la première observation porte sur les temps de montée des quatre courbes de rehaussement qui coïncident entre eux, conformément à ce qui était attendu puisqu'il s'agit de la même injection numérique implémentée à l'entrée des quatre réseaux. Nous pouvons également remarquer que les aires sous les courbes de rehaussement ainsi que les pics d'intensité maximums des courbes de rehaussement croissent en fonction du volume vasculaire du réseau. Cette variation est cohérente avec un nombre croissant de microbulles dans un réseau vasculaire grandissant. Nous allons à présent étudier plus en détail la variation des paramètres décrivant la microvascularisation et issus des méthodes de quantification.

- Étude par la méthode semi-quantitative :

Les cinq paramètres semi-quantitatifs, AUC, PI, P, T_m et TT ont été déterminés pour chacune des courbes associées à un volume vasculaire différent. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 8.

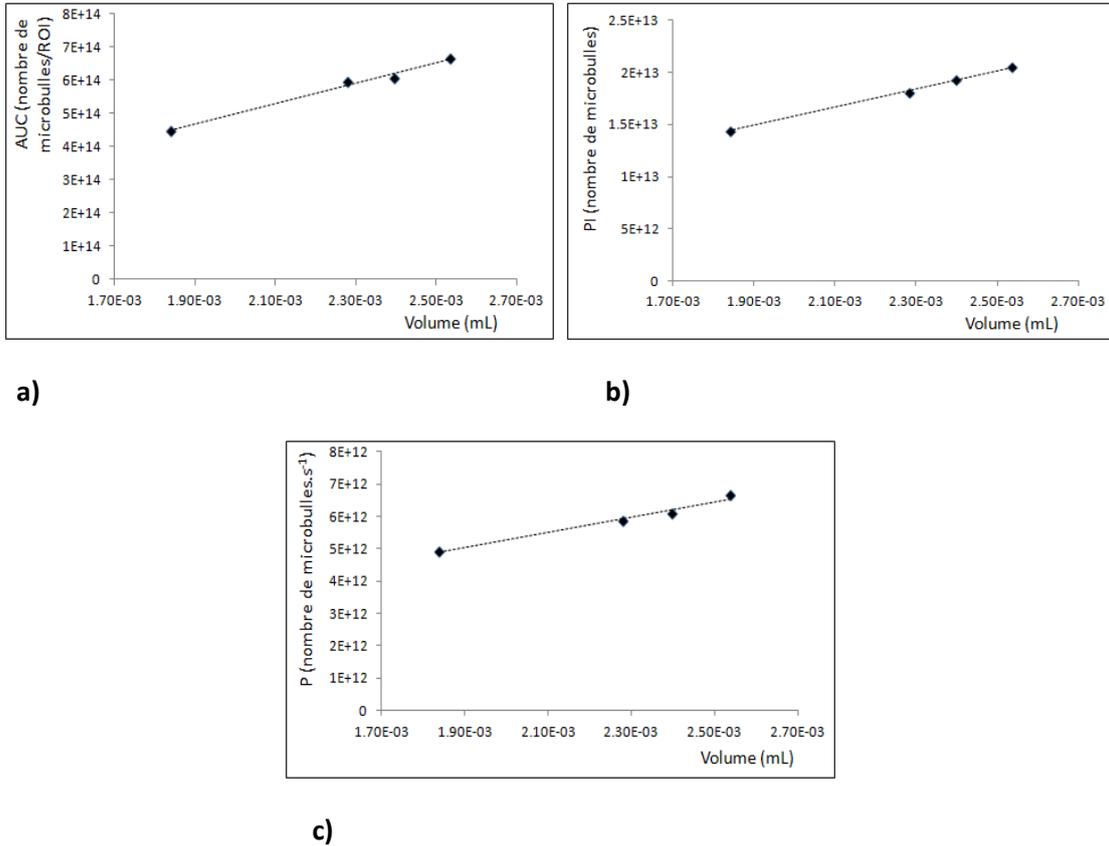


Figure 33 : AUC a), PI b) et P c) en fonction du volume du réseau ($1,84 \cdot 10^{-3}$ mL, $2,28 \cdot 10^{-3}$ mL, $2,4 \cdot 10^{-3}$ mL et $2,54 \cdot 10^{-3}$ mL) pour une vitesse de sang de $0,03 \text{ m.s}^{-1}$.

On observe sur la Figure 33a), b) et c) que l'AUC, le PI et la P augmentent linéairement avec le volume vasculaire du réseau ce qui était attendu puisque les trois paramètres sont directement proportionnels au nombre de microbulles compris dans le réseau vasculaire, qui croît évidemment avec le volume. Les variations relatives Δ sont de 19,5%, de 17,5% et de 14,9% respectivement pour l'AUC, le PI et la P pour une variation maximale de volume vasculaire de 38%.

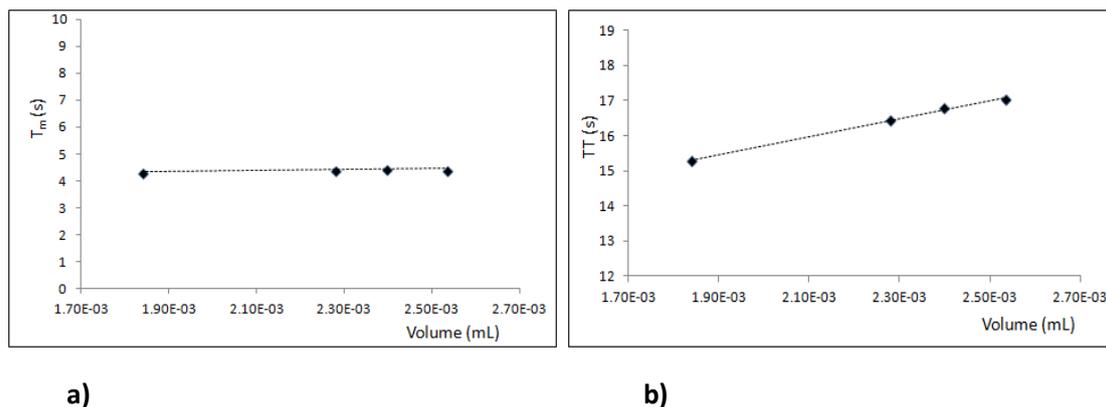


Figure 34 : T_m a) et TT b) en fonction du volume du réseau ($1,84 \cdot 10^{-3}$ mL, $2,28 \cdot 10^{-3}$ mL, $2,4 \cdot 10^{-3}$ mL et $2,54 \cdot 10^{-3}$ mL) pour une vitesse de sang de $0,03 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

Le T_m est considéré comme constant en fonction du volume vasculaire au regard de la Figure 34a) avec un Δ de 1,25%. Ce résultat est en accord avec une injection numérique identique pour les quatre réseaux, ce qui conditionne le temps d'arrivée pour le maximum d'agents de contraste.

Enfin, quant au paramètre TT, il croit avec le volume du réseau vasculaire avec un Δ de 10,2%. En effet, plus le réseau a un volume important, plus le temps moyen mis par les microbulles pour le traverser est élevé.

- Étude par la méthode quantitative :

Après déconvolution par la méthode SVD des courbes de rehaussement issues de l'entrée artérielle avec celle du réseau vasculaire, les trois paramètres VS, FS et MTT ont été déterminés. Leurs variations en fonction du volume sanguin sont présentées sur la Figure 35 et résumées dans le Tableau 1.

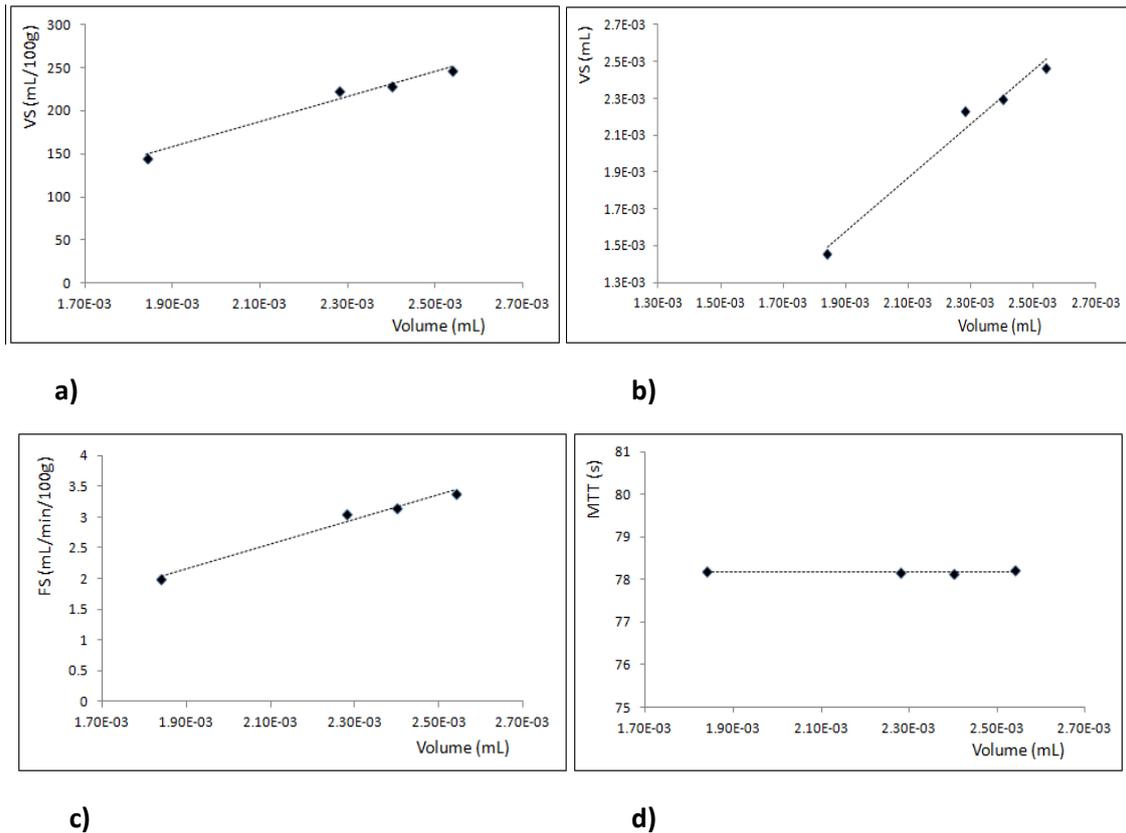


Figure 35 : VS en mL/100 g a), VS en mL b), FS c) et MTT d) en fonction du volume du réseau ($1,84 \cdot 10^{-3}$ mL, $2,28 \cdot 10^{-3}$ mL, $2,4 \cdot 10^{-3}$ mL et $2,54 \cdot 10^{-3}$ mL) pour une vitesse de sang de $0,03 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les paramètres VS et FS augmentent en fonction du volume vasculaire avec un Δ de 25,7%. Cette variation est largement supérieure à celle déterminée par la méthode semi-quantitative (AUC et PI).

Dans le premier cas, cette variation linéaire était attendue puisque VS permet de déterminer le volume vasculaire dans un volume de 100 g de tissu. Pour faciliter l'interprétation des données, nous avons exprimé VS en mL en prenant en compte la densité massique du tissu (cf Figure 35b). La correspondance entre VS et le volume sanguin du réseau est donnée par le coefficient directeur qui est de 1,46. Cette valeur est différente de la valeur unitaire attendue, probablement en raison d'un facteur multiplicatif ajouté lors de la déconvolution.

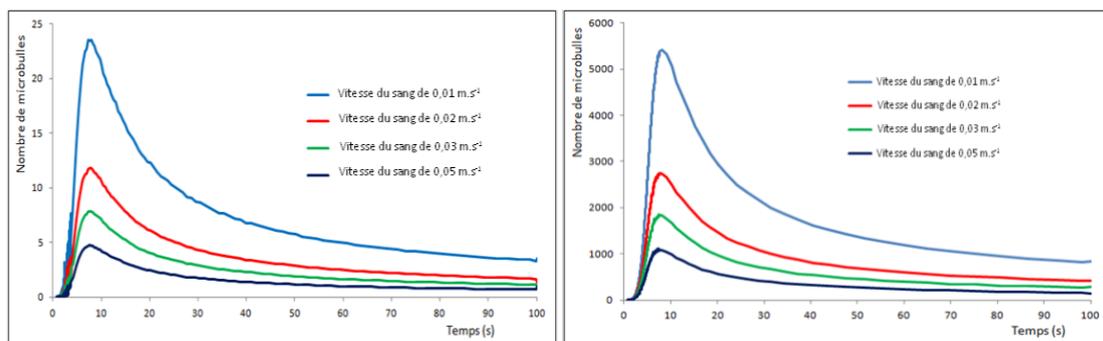
Le paramètre FS qui traduit le débit sanguin entrant dans un volume de 100 g de tissu s'amplifie avec le volume du réseau. En effet, le volume de sang VS ayant traversé le réseau par unité de temps est d'autant plus important que le volume de ce réseau croît. La variation Δ est identique à celle de VS.

Dans le cadre de la méthode quantitative, le MTT se rapporte au temps moyen d'une particule pour parcourir le réseau à l'image du paramètre TT obtenu pour la méthode semi-quantitative. Néanmoins, il apparaît que le MTT soit quasiment stable en fonction du volume du réseau avec une variation de 0,01% contrairement au paramètre TT qui lui présentait un Δ de 10%.

3.2.2. Étude de l'influence de la vitesse du sang dans le réseau trois branches symétrique sur les paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs.

Les courbes de rehaussement simulées à l'entrée artérielle et dans les réseaux sont présentées Figure 36 pour quatre valeurs de vitesses d'écoulement du sang différentes : $0,01 \text{ m.s}^{-1}$, $0,02 \text{ m.s}^{-1}$, $0,03 \text{ m.s}^{-1}$ et $0,05 \text{ m.s}^{-1}$. Qualitativement, nous observons que les amplitudes des courbes diminuent significativement en fonction de la vitesse d'écoulement du sang.

Cette variation est en accord avec la théorie de l'indicateur dilué présentée dans le chapitre 1 partie 1.3.1. qui régie la variation de l'AUC inversement proportionnelle au débit vasculaire. Par ailleurs, les temps de montée pour chacune des quatre courbes de rehaussement sont identiques en raison d'une injection numérique commune. Enfin, et comme précédemment, la valeur du maximum de l'entrée artérielle, à vitesse égale, est 117 fois moins élevé que celles déterminées pour les réseaux. Ce rapport est dû même ordre de grandeur que celui des volumes entrée tumorale versus réseau.



a)

b)

Figure 36 : Courbes de rehaussement brutes de l'entrée artérielle a) et du réseau trois branches symétrique b) pour différentes valeurs de vitesse d'écoulement du sang ($0,01 \text{ m.s}^{-1}$, $0,02 \text{ m.s}^{-1}$, $0,03 \text{ m.s}^{-1}$ et $0,05 \text{ m.s}^{-1}$).

- Étude par la méthode semi-quantitative :

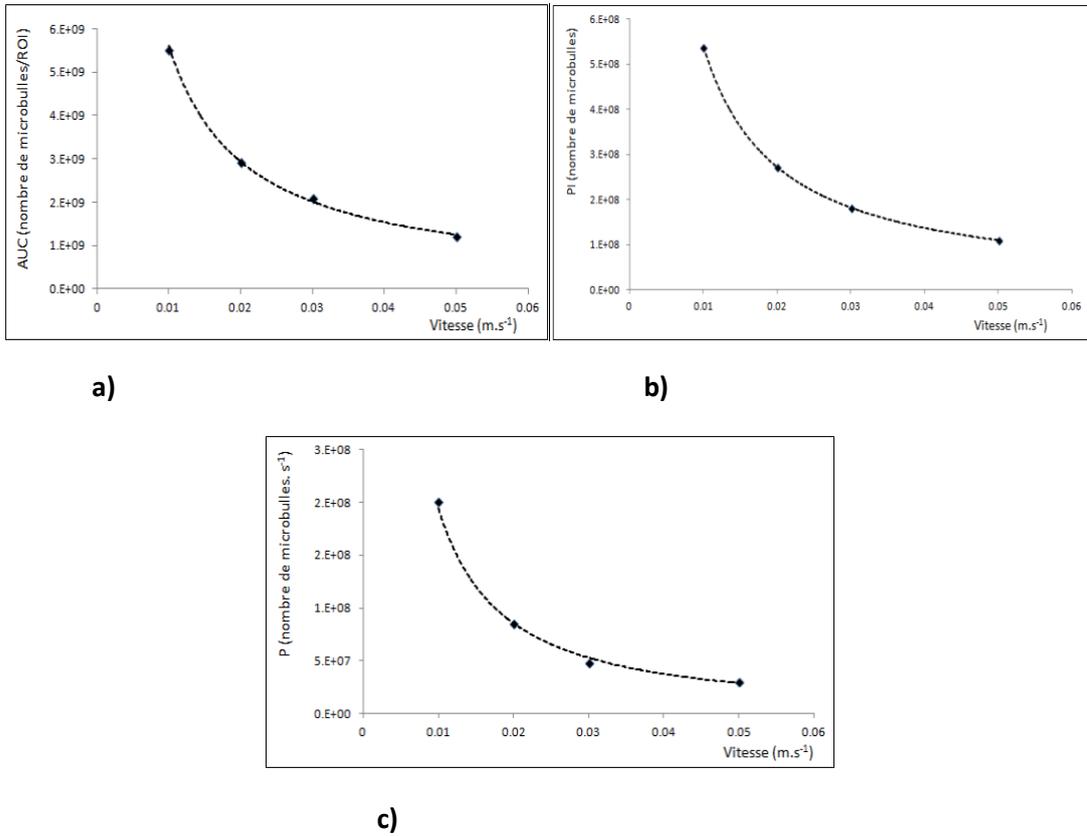


Figure 37 : AUC a), PI b) et la P c) en fonction de la vitesse d'écoulement du sang (0,01 m.s⁻¹, 0,02 m.s⁻¹, 0,03 m.s⁻¹ et 0,05 m.s⁻¹) pour le réseau trois branches symétrique.

Les variations de l'AUC et du PI sont présentées Figure 37 en fonction des vitesses d'écoulement du sang. Ces deux paramètres varient de manière similaire avec une variation Δ de 64% et de 60% respectivement pour l'AUC et le PI. Par ailleurs, les courbes de tendance indiquées en pointillé sont de forme mathématique en $1/x$ ce qui est cohérent avec la théorie de l'indicateur dilué. Plus précisément, comme le volume sanguin traversant la région d'intérêt augmente avec la vitesse d'écoulement, la concentration par ROI d'agents de contraste, alors comptabilisée dans cette zone, diminue.

Le paramètre P représentant le nombre d'agents de contraste entrant dans le réseau par unité de temps, varie de manière similaire à l'AUC et au PI. Ainsi, on observe une diminution également en $1/x$ en fonction des vitesses d'écoulement du sang avec un Δ de 73%.

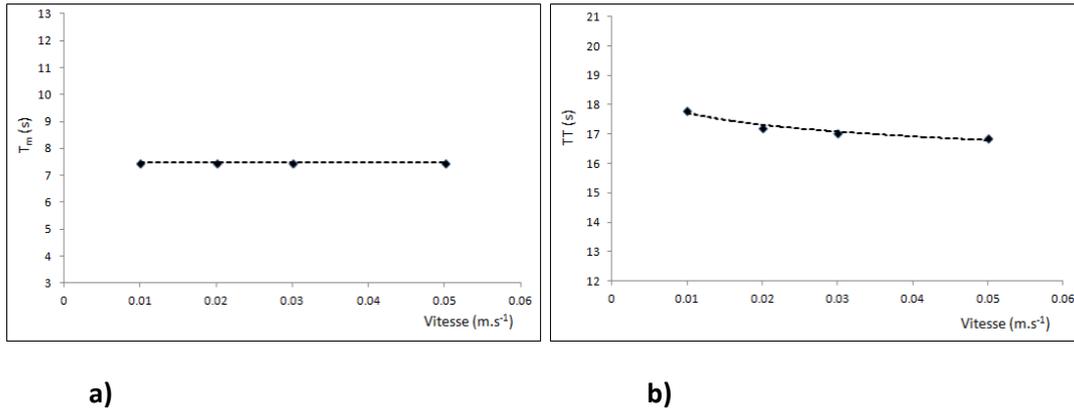


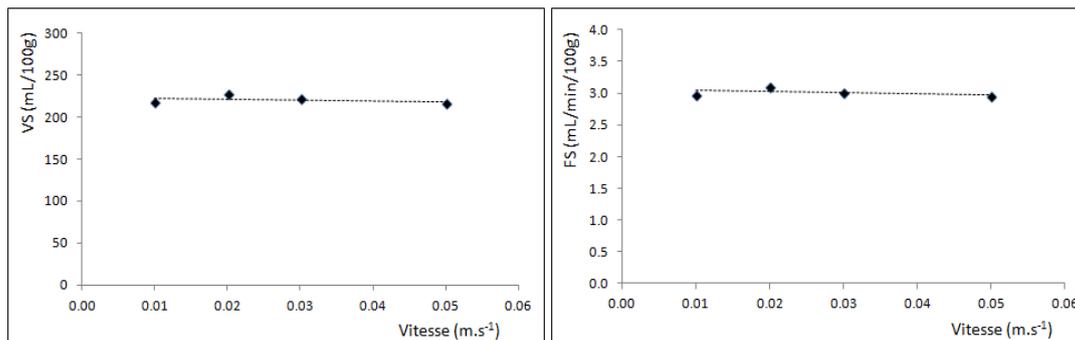
Figure 38 : T_m a) et TT b) en fonction de la vitesse d'écoulement du sang (0,01 m.s⁻¹, 0,02 m.s⁻¹, 0,03 m.s⁻¹ et 0,05 m.s⁻¹) pour le réseau trois branches symétrique.

La Figure 38 présente les variations des paramètres T_m et TT. Comme l'injection numérique est identique pour chacune des vitesses, les valeurs du T_m sont conformes à ce qui est attendu et sont stables quelle que soit la vitesse d'écoulement du sang avec un Δ de 0%.

En revanche, on observe que le temps de transit TT diminue en fonction de la vitesse d'écoulement du sang dans le réseau, en cohérence avec une réduction du temps de parcours microbulles pour quitter le réseau. La variation Δ est néanmoins assez faible avec seulement 3%.

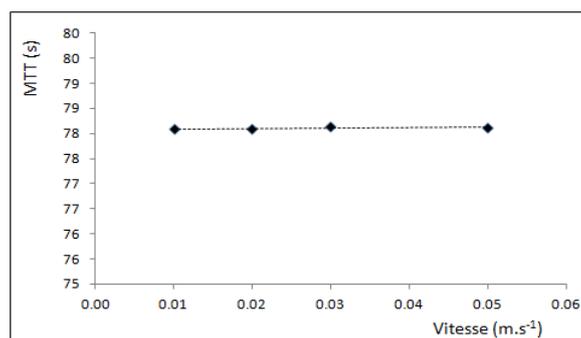
- Étude par la méthode quantitative :

Les variations des paramètres obtenus selon la méthode quantitative en fonction de la vitesse d'écoulement sont présentées dans la Figure 39 et résumées dans le tableau 8.



a)

b)



c)

Figure 39 : VS a), FS b) et MTT c) en fonction de la vitesse d'écoulement du sang (0,01 m.s⁻¹, 0,02 m.s⁻¹, 0,03 m.s⁻¹ et 0,05 m.s⁻¹) pour le réseau trois branches symétrique.

Le paramètre VS est stable en fonction de la vitesse d'écoulement du sang avec une faible variation Δ de 1,92%. En effet, après déconvolution, c'est-à-dire en s'affranchissant de toutes les variations d'entrée, le paramètre VS est a priori indépendant de la vitesse d'écoulement.

Le paramètre FS apparaît également constant en fonction de la vitesse d'écoulement du sang dans le réseau avec une variation Δ de 1,88%, contrairement à ce qui était attendu. L'hypothèse envisagée porte sur l'effet de la déconvolution envers la détermination de FS qui annihilerait l'influence de la vitesse d'écoulement à l'entrée du réseau. Ainsi, et comme vu précédemment, seul le volume du réseau contribuait à la variation de FS.

Comme pour la méthode semi-quantitative, le temps de transit devrait diminuer en fonction de la vitesse de l'écoulement du sang dans le réseau. En effet, l'augmentation de la vitesse d'écoulement du sang s'accompagne de la réduction du temps de parcours des microbulles pour traverser le réseau vasculaire. Or, le paramètre MTT est quasiment stable avec une différence de Δ de 0,028%.

Paramètres de la microvascularisation : semi-quantitatif et quantitatif.	Variation Δ en fonction du volume des réseaux (sans unité).	Variation Δ en fonction de la vitesse d'écoulement du sang dans le réseau trois branches symétrique (sans unité).
AUC	19,5%	64%
PI	17,5%	60%
P	14,9%	73%
T _m	1,25%	0%
TT	10,2%	3%
VS	25,7%	1,92%
FS	25,7%	1,88%
MTT	0,01%	0,028%

Tableau 8 : Récapitulatif des valeurs de Δ pour les paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs.

3.3. Discussion.

Cette étude numérique réalisée par CFD a permis de conduire une analyse précise et fiable des paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs en modélisant des géométries simples de réseaux et plusieurs vitesses d'écoulement du sang. A notre connaissance, l'étude présentée dans ce chapitre est une approche originale dans le domaine de l'échographie de contraste, en particulier pour caractériser des méthodes de quantification. Seules deux équipes ont initié des approches numériques dans le domaine : Krix et al. ont proposé en 2003 un modèle mathématique de multi-vaisseaux pour décrire la technique de destruction et de reperfusion [33] et l'équipe de Burns a développé la même année un modèle pour décrire le temps de transit selon l'architecture ordonnée ou non d'un réseau vasculaire tumoral obtenu à partir d'un modèle fractal [85].

Concernant la variation de 38% des volumes vasculaires, on constate une plus forte sensibilité des paramètres vasculaires quantitatifs VS et FS avec un Δ de 25,7% pour les deux paramètres, par rapport à celle obtenue de manière semi-quantitative avec l'AUC, le PI et la P dont les Δ respectifs sont de 19,5%, 17,5% et 14,9%. Il est à noter la linéarité attendue de VS en fonction du volume vasculaire. Du point de vue du temps de transit, il apparaît clairement peu sensible aux variations de volume avec un Δ maximal de 3% obtenu par la méthode semi-quantitative. L'approche quantitative, quant à elle, procure un Δ de 0,01%. Ces très faibles variations des paramètres temporels résultent probablement des volumes vasculaires insuffisants mis en jeu dans notre étude. En effet, une des approximations faites pour la théorie de l'indicateur dilué est justement celle d'un parfait mélange des agents de contrastes avec le sang. Dans le cas où cette situation ne serait pas respectée, les temps de transit estimés seraient plus faibles que les valeurs théoriques. L'équipe Li et al. montre ainsi une sous-estimation de la mesure du temps de transit en mettant en œuvre un fantôme *in vitro* sphérique de 260 mL associé à un débit élevé (supérieur à 500 mL.min⁻¹), limitant ainsi la dilution des agents de contraste [5]. En revanche, en utilisant un fantôme *in vitro* dit de « perfusion » (cartouche de dialyse composée de 8600 capillaires de 200 μ m de diamètre), la même équipe montre qu'avec un mélange parfait des agents de contraste, il y a une augmentation de 350% du temps de transit pour une variation de 208% du volume des fantômes *in vitro* (de 114 à 351 mL avec un débit de 500 mL.min⁻¹).

Dans le cas de la variation des vitesses d'écoulement du sang de 80%, les paramètres les plus sensibles sont cette fois-ci ceux obtenus avec la méthode semi-quantitative où l'AUC, PI et P ont des variations comprises entre 60% et 73% contrairement aux valeurs quantitatives VS et FS inférieures à 2%. D'ailleurs, FS est quasiment indépendant de la vitesse d'écoulement du sang en entrée de la tumeur pour la méthode quantitative. Concernant les paramètres semi-quantitatifs, les résultats numériques obtenus sont en désaccord avec l'étude expérimentale de Claassen et al. réalisée avec une cartouche de dialyse où l'AUC était faiblement corrélé au flux ($p=0,05$) [96]. A l'inverse, nos résultats sont en accord avec ceux mesurés *in vitro* par Ugolini et al. avec une forte corrélation ($r>0,9$) entre le débit sanguin et le PI, l'AUC et la pente P [59].

Cette équipe a également montré une absence de corrélation entre les temps de montée et le débit. Enfin, il apparaît que le temps de transit n'est pas non plus sensible aux variations de vitesse d'écoulement du sang avec des valeurs de Δ de 3% et de 0,028% pour les méthodes semi-quantitative et quantitative respectivement. A l'image des paramètres précédents, ces résultats sont en partie divergents avec les données de la littérature. Dans le cas de la méthode semi-quantitative, il existe deux études *in vitro* contradictoires : celle de Claassen et al. qui montre une absence de corrélation entre le TT mesuré et les débits ($p=0,18$) [96] et celle de Li et al., étude précédemment citée [97]. Cette équipe montre en effet dans les conditions de parfait mélange entre les agents de contraste et le fluide, une augmentation du temps de transit de 125% en fonction d'une variation de débit de 120% (de 500 mL.min⁻¹ à 1100 mL.min⁻¹). Ces données ont été obtenues de manière *in vitro* sur un fantôme ayant un volume de 351 mL, ce qui est 150 000 fois plus grand que le volume modélisé dans notre étude. Cette différence des volumes de cinq ordres de grandeur explique la discordance avec les résultats obtenus et qui implique bien évidemment des temps de parcours très faibles dans notre étude et peut-être un mélange imparfait des microbulles avec le sang. D'ailleurs, dans le cadre de notre étude comparative de validation décrite dans le chapitre 2 (partie 2.3.4), le volume vasculaire du fantôme numérique était 1000 fois plus grand que ceux modélisés dans ce chapitre (1,22 mL) et a permis de mettre en évidence une variation de 51% du TT selon les vitesses d'écoulement du fluide. Dans le cas de la méthode quantitative, une étude *in vitro* a été réalisée sur une cartouche de dialyse (114 mL) et révèle également une l'excellente adéquation entre le MTT, et ce quelle que soit la méthode de déconvolution choisie, et le débit du fluide (83 à 352 mL.min⁻¹) [98]. Au regard des résultats décrits dans la littérature, il est donc probable que le choix du volume du réseau vasculaire numérique étudié est trop réduit pour mettre en évidence une variation franche du temps de transit.

3.4. Conclusion.

Il s'agit de la première étude numérique de ce type menée dans le domaine de l'échographie de contraste, d'après nos connaissances. Cette approche permet d'aborder la fiabilité des méthodes de quantifications d'agent de contraste dans des conditions idéales c'est à dire sans les sources de bruits et de variabilités impliquées dans les études *in vitro*. En particulier, nous avons étudié dans ce chapitre la sensibilité des paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs en fonction des variables vasculaires possibles que sont le volume du réseau et le débit sanguin.

Les principaux résultats obtenus sont :

i) Les paramètres semi-quantitatifs que sont l'AUC, PI, P, sont les plus sensibles aux variations de vitesse d'écoulement vasculaire et donc de débit,

ii) Les paramètres quantitatifs VS et FS sont les plus sensibles aux variations du volume vasculaire. Par ailleurs, notre étude a été conduite sur des réseaux vasculaires de petits volumes, compris entre $1,84 \cdot 10^{-3}$ mL et $2,54 \cdot 10^{-3}$ mL ce qui implique de très faibles variations des temps de transit, et ce quelles que soient les méthodes de quantification concernées. Ainsi, si cette première étude de faisabilité numérique est concluante et encourageante, elle doit être étendue à des réseaux vasculaires de volume plus important et également plus complexes. Par ailleurs, de nouvelles approches numériques sont envisagées pour palier au temps de calcul extrêmement long puisqu'il est de 6 jours pour chaque point.

Ces variations évaluées par simulation numérique doivent maintenant être étudiées *in vivo* dans le but de confronter les résultats pour mettre en évidence d'éventuelles similitudes mais également de soulever des contraintes expérimentales. En particulier, en plus d'étudier la faisabilité de détecter le signal de l'entrée artérielle dans les conditions *in vivo*, il faudra pouvoir extraire une solution stable par déconvolution, processus qui s'est avéré particulièrement difficile même dans des conditions numériques parfaites. C'est l'objet du chapitre suivant où il s'agira d'évaluer, sur des tumeurs de souris, l'efficacité d'un traitement anti-angiogénique selon les paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs.

Chapitre 4 : Étude comparative *in vivo* des méthodes de quantification : Analyse de leurs sensibilités pour évaluer l'efficacité thérapeutique.

En cancérologie, les approches expérimentales *in vivo* sur des modèles animaux sont essentielles tant pour étudier l'efficacité de nouvelles thérapies et évaluer des techniques d'imagerie que pour mieux comprendre la biologie des cancers. Dans le cadre des études visant à évaluer l'efficacité d'un traitement anticancéreux, l'échographie occupe une place importante puisqu'elle permet de réaliser un suivi de la taille des tumeurs mais également d'effectuer une analyse fonctionnelle par le biais de l'échographie de contraste ultrasonore tout en étant une technique peu coûteuse, facile d'accès, particulièrement sensible et en temps réel.

Il s'agira dans ce chapitre de conduire une analyse comparative des deux méthodes de quantification d'agent de contraste (semi-quantitative et quantitative) pour évaluer les modifications de la perfusion tumorale engendrées par l'administration de cabozantinib, un inhibiteur de tyrosine kinase. Pour compléter cette étude *in vivo* ultrasonore, des évaluations ont également été menées en IRM et le gold standard en immuno-histologie a été recherché.

Dans la première partie, la méthode expérimentale sera décrite, tant le modèle animal, le protocole d'étude pharmacologique, les acquisitions en imagerie US et IRM, l'immuno-histologie et enfin l'analyse statistique choisie. Après avoir présenté les résultats, nous les discuterons au regard des difficultés expérimentales rencontrées.

4.1. Présentation et objectif de l'étude.

L'objectif de cette étude dont le projet a été accepté par le comité d'éthique en expérimentation animale CEEA 26 est d'évaluer la sensibilité des méthodes de quantification par échographie de contraste ultrasonore décrites au chapitre 1 partie 1.3.3 (la méthode semi-quantitative et la méthode quantitative) afin de mettre en évidence des modifications de la perfusion tumorale et ainsi d'évaluer l'efficacité du traitement étudié. La microvascularisation tumorale a été étudiée sur un modèle de prostate humaine PC3 au cours d'une thérapie par cabozantinib. Les résultats obtenus en échographie de contraste ultrasonore (DCE-US³) ont été comparés à ceux obtenus en imagerie par résonance magnétique de contraste (DCE-IRM⁴) pour évaluer la sensibilité et l'efficacité de ces deux techniques d'imagerie à quantifier la perfusion tumorale et donc à prédire l'efficacité du traitement étudié.

³ Dynamic Contrast-Enhanced UltraSonography

⁴ Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging

4.2. Matériels et méthodes.

4.2.1. Modèle tumoral et animaux.

Le modèle tumoral étudié est un adénocarcinome prostatique humain PC3 (CRL-1435, ATCC American Type Culture Collection, États-Unis), choisi en raison du temps de pousse des cellules permettant de faire deux semaines de suivi tumoral et de commencer les examens 10 à 15 jours après l'injection des cellules, durée au bout de laquelle la vascularisation commence à se développer car la tumeur a atteint une taille de 150 mm³. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu de culture complet F12K (Gibco Life Technologies, États-Unis) et ont été placées dans un incubateur à 37 °C au cours de leur croissance. Un volume de 100 µL de cellules tumorales PC3 (5.10⁶ cellules.mL⁻¹) contenues dans du PBS a été injecté au niveau du flanc droit sur 44 souris nudes âgées de 6 à 8 semaines correspondant à des souris d'environ 25 g. Les souris nudes présentent l'avantage d'être immunodéprimées, ainsi, ne possédant pas de lymphocytes T, elles ont un système immunitaire déficient, ce qui permet une croissance tumorale rapide mais principalement l'implantation de cellules humaines. De plus, des souris sont utilisées par notre équipe depuis plusieurs années pour l'évaluation de traitements dans différents modèles de cancer. Ce choix comporte plusieurs avantages, notamment de comparaison et de suivi sur tous les projets menés depuis plusieurs années. C'est une espèce facile à manipuler et permettant d'obtenir de bons modèles de la vascularisation tumorale dans des temps relativement courts (entre 1 à 4 semaines).

4.2.2. Le cabozantinib.

Le cabozantinib (XL184) (Medchemtronica, Suède) est un inhibiteur de tyrosine kinase qui agit principalement en inhibant MET (Hepatocyte growth factor receptor – HGFR) et VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2), deux récepteurs fortement impliqués dans l'angiogenèse tumorale et l'envahissement métastatique [99]. Ce traitement a été récemment approuvé par la FDA (29 novembre 2012) pour le traitement du cancer métastatique médullaire de la thyroïde. De plus, son efficacité dans le cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC) a également été montrée avec l'obtention de réponses complètes et de suppressions des métastases osseuses observées par scanner [100].

Dans la littérature, les doses de cabozantinib administrées *in vivo* sur souris par gavage sont comprises entre 1 et 60 mg.kg⁻¹ (dose maximale tolérée) sur une durée maximale de 15 jours. Ces doses ont été testées sur des souris C57BL/6 (dose de 3, 10, 30, 40 et de 60 mg.kg⁻¹) et sur des modèles tumoraux de PC3 et de LuCaP35 (modèle de cancer de prostate) (dose de 60 mg.kg⁻¹) mais également de VCaP (modèle de cancer de prostate) (dose de 30 mg.kg⁻¹), TT (modèle de cancer de la thyroïde) (de 3, 10, 30, 60 mg.kg⁻¹), MDA-MB-231 (modèle de cancer du sein), H441 (modèle de cancer du poumon) et enfin de C6 (modèle de gliome) (dose de 1, 3, 10, 30, 60 mg.kg⁻¹) [99, 101-104]. Compte tenu de ces données, il a été choisi d'administrer le cabozantinib à deux doses : 10 mg.kg⁻¹ et 30 mg.kg⁻¹ pendant 5 jours consécutifs sur une durée de deux semaines.

La première dose est dans la limite de l'efficacité thérapeutique contrairement à la seconde qui a montré d'excellents résultats [99, 102]. Ainsi, les deux dosages doivent permettre l'étude comparative des deux méthodes de quantification pour évaluer les modifications de la microvascularisation.

Sur les 44 souris injectées :

- 12 souris ont reçu la dose de 10 mg.kg^{-1} de cabozantinib et l'évaluation de la microvascularisation a été uniquement réalisée par échographie de contraste ultrasonore,
- 12 souris ont reçu la dose de 30 mg.kg^{-1} de cabozantinib et l'évaluation de la microvascularisation a été faite en échographie de contraste ultrasonore et en imagerie par résonance magnétique de contraste (9 souris) et uniquement par échographie de contraste ultrasonore (3 souris).

Les 20 souris restantes ont été considérées comme des souris contrôles, c'est à dire sans prise de traitement (Figure 40).

4.2.3. Déroulement du protocole d'étude.

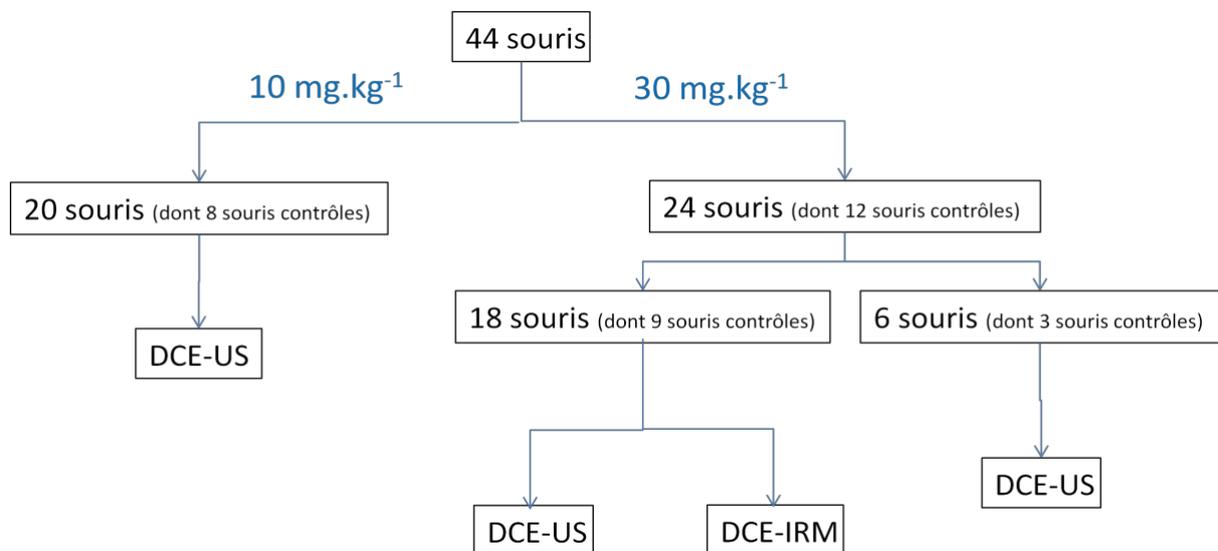


Figure 40 : Répartition des souris de l'étude.

Parmi les 44 souris de l'étude, 20 souris ont été utilisées pour l'étude de la dose à 10 mg.kg^{-1} et 24 pour celle de la dose à 30 mg.kg^{-1} . Pour l'étude de la dose à 10 mg.kg^{-1} , les souris ont uniquement eu des examens DCE-US alors que pour la dose à 30 mg.kg^{-1} elles ont eu des examens DCE-US et DCE-IRM.

Les acquisitions d'imagerie ont été effectuées 10 à 15 jours après l'injection des cellules tumorales afin d'avoir des volumes homogènes par groupe, compris entre 150 et 200 mm³. Au regard de l'expérience acquise par le laboratoire, il s'agit de la taille minimale à partir de laquelle la vascularisation tumorale commence à se développer et la tumeur atteint une taille nécessaire pour initier les sessions d'imagerie et initier le début d'un traitement [64, 105].

Dans un premier temps, un examen de référence avant le début des traitements (à D0) dans les deux modalités d'imagerie, US et IRM, a été réalisé. A la suite de ces examens, les traitements ont été administrés et les examens d'imagerie se sont poursuivis pour comparer le groupe traité avec le groupe contrôle. Un deuxième (à D7) et un troisième examen US (à D14) ont été effectués à une semaine et à deux semaines après le début du traitement. Dans le cas de l'IRM, pour limiter le déplacement des animaux, un deuxième et dernier examen IRM a été réalisé le dernier jour c'est à dire le quatorzième jour (à D14).

Lors des séances d'imagerie (US ou IRM), les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane (4% en induction et de 2 à 2,5% en maintien). Afin de maintenir leurs températures corporelles pendant les sessions d'imagerie, les souris ont été placées sur une table thermostatée (pour les US) et sous une ventilation thermo-régulée (pour l'IRM). Les souris ont été positionnées en échographie sur le côté de manière à avoir accès à la tumeur et en IRM de manière à placer la tumeur au centre de l'antenne. Les souris ont été sacrifiées le lendemain du dernier examen d'imagerie afin de réaliser les examens d'immuno-histologie.

4.2.4. Description des examens d'imagerie préclinique.

4.2.4.1. Échographie de contraste ultrasonore.

L'échographe utilisé pour les sessions d'imagerie est l'échographe Aplio XV (Toshiba, Japon). Les acquisitions ont été faites en mode B (Brillance en échelle de gris⁵), mode Doppler et mode contraste (DCE-US). La sonde utilisée est la sonde PLT 1202S (Toshiba, Japon) avec une fréquence d'émission de 12 MHz et des résolutions axiale et latérale de 0,1 mm. Elle permet de réaliser des acquisitions en mode B, en Doppler et en imagerie harmonique en mode Pulse Soustraction (cf partie 1.2.2. chapitre 1).

Dans un premier temps, on a réalisé en mode B une image de la plus grande coupe de la tumeur à la fois en longitudinale pour en déduire la longueur et l'épaisseur de la tumeur et en transversale pour en déduire la largeur et l'épaisseur de la tumeur (Figure 41). Une moyenne des deux épaisseurs est réalisée. Le volume de la tumeur est calculé par une approximation selon la formule suivante considérant le volume d'une ellipsoïde [106].

$$V = \frac{1}{2} * (\text{épaisseur} \times \text{largeur} \times \text{longueur}) \quad \text{Équation IV.1}$$

⁵ Mode conventionnel anatomique en échographie

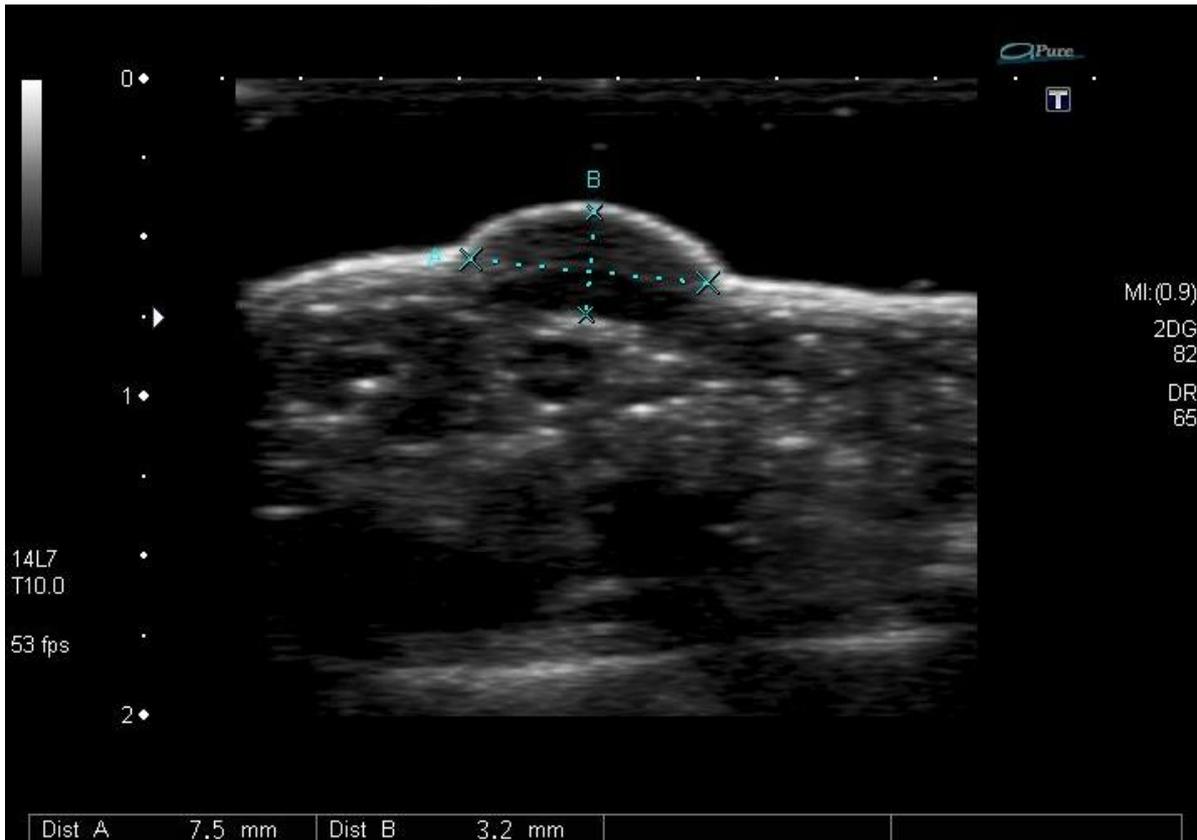


Figure 41 : Exemple d'une image obtenue en mode B pour déterminer le volume de la tumeur en position longitudinale à D0.

Les mesures de la longueur et de l'épaisseur de la tumeur de la souris sont représentées sur l'image.

Dans un second temps, un examen Doppler a été effectué pour évaluer la vascularisation via le nombre de vaisseaux dans la tumeur mais également pour localiser l'entrée artérielle sur la plus grande coupe de la tumeur (Figure 42) [106]. Le mode Doppler a été réglé pour détecter des vitesses maximales de $4,1 \text{ cm.s}^{-1}$. Cette évaluation a consisté à scanner longitudinalement et transversalement la tumeur pour en déduire pour chaque balayage le nombre de vaisseaux au sein de la tumeur. Le nombre de vaisseaux pris en compte a été obtenu en moyennant le nombre de vaisseaux comptés dans les deux sens de balayage (longitudinal et transversal).

Dans les cas où plusieurs entrées artérielles étaient visibles en mode Doppler, l'entrée artérielle considérée était la plus proche de la tumeur. En effet, il a été montré que des entrées artérielles prises trop loin de la tumeur entraînaient une sous-estimation du débit sanguin et une surestimation du temps de transit [107]. Par ailleurs, les entrées artérielles étaient identiques pour chaque souris d'un examen à l'autre via le Doppler à D0 servant de référence pour ceux à D7 et D14.

Enfin, une échographie de contraste ultrasonore en mode inversion d'impulsion nécessitant l'injection de $100 \mu\text{L}$ d'agents de contraste ultrasonore (Sonovue) (Bracco, Italie) via le sinus rétro-orbital a été réalisée pour mesurer la microvascularisation tumorale. La durée de cet examen était de 3min.

Comme déjà réalisé dans le laboratoire, la cadence image et la fréquence ont été respectivement fixés à 4 images par seconde et à 10 MHz, l'index mécanique a été fixé à 0,21 de manière à éviter la destruction des microbulles [64].



Figure 42 : Exemple d'une image obtenue en mode Doppler pour déterminer la position des entrées artérielles en position transversale à D0.

4.2.4.2. Imagerie par Résonance Magnétique.

Le dispositif utilisé est une IRM clinique 1,5 T (Philips Achieva, Nederland) au sein de la plateforme intitulée « Plateau IRM 1,5 T » située au SHFJ (Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay) avec l'antenne de surface micro-23 (Philips Achieva, Nederland) de 23 mm de diamètre et de fréquence du proton de 63,86 MHz.

Le repérage de la souris a été assuré dans un premier temps à l'aide de lasers, puis un repérage sagittal ($TR/TE=33ms/15ms$) a été effectué pour centrer la tumeur dans le champ de vue. Une image anatomique à haute résolution a été acquise par la suite pour déterminer la coupe tumorale de plus grand axe qui sera l'image de référence pour étudier la perfusion, cette coupe est a priori similaire à celle choisie pour les examens en DCE-US. Ces images anatomiques ont été réalisées avec une séquence gradient écho pondéré en T_1 : $TR/TE = 14ms/5ms$, $FOV = 150\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, matrice de reconstruction = 80×80 , nombre d'excitation = 1, nombre de coupes = 9, épaisseur de coupe = 0,4 mm, temps d'acquisition (TA) = 3,8min.

Après l'image anatomique de la tumeur, l'imagerie fonctionnelle a nécessité l'injection intraveineuse par la veine caudale de la souris de 150 μL d'agents de contraste, Dotarem (Guerbet, France) avec une concentration de 0,3 mmol.kg^{-1} . La durée de cet examen est d'environ 100min. Cette acquisition a été obtenue avec une séquence gradient écho pondéré en T_1 définie par les paramètres : TR/TE = 14ms/ 5ms, angle = 50°, FOV = 150 mm x 150 mm, matrice d'acquisition = 80 x80, 1 coupe de 0,4 mm.

Chaque souris a été imagée deux fois par IRM, une fois le jour précédent le début du traitement (imagerie de référence à D0) et une deuxième fois deux semaines après le début du traitement (à D14) ceci dans le but de pouvoir évaluer les modifications de la vascularisation et pour comparer les données obtenues à celles issues de la DCE-US.

4.2.5. Traitement et analyse des données.

4.2.5.1. Traitement des données issues de l'échographie de contraste ultrasonore.

La tumeur et l'entrée artérielle sont segmentées manuellement sur les images acquises par DCE-US via le logiciel du constructeur de l'échographe, UltraExtend (Toshiba, Japon). Un recalage des contourages au cours des 180 secondes d'acquisition pour corriger les mouvements respiratoires de la souris a été réalisé (Figure 43).

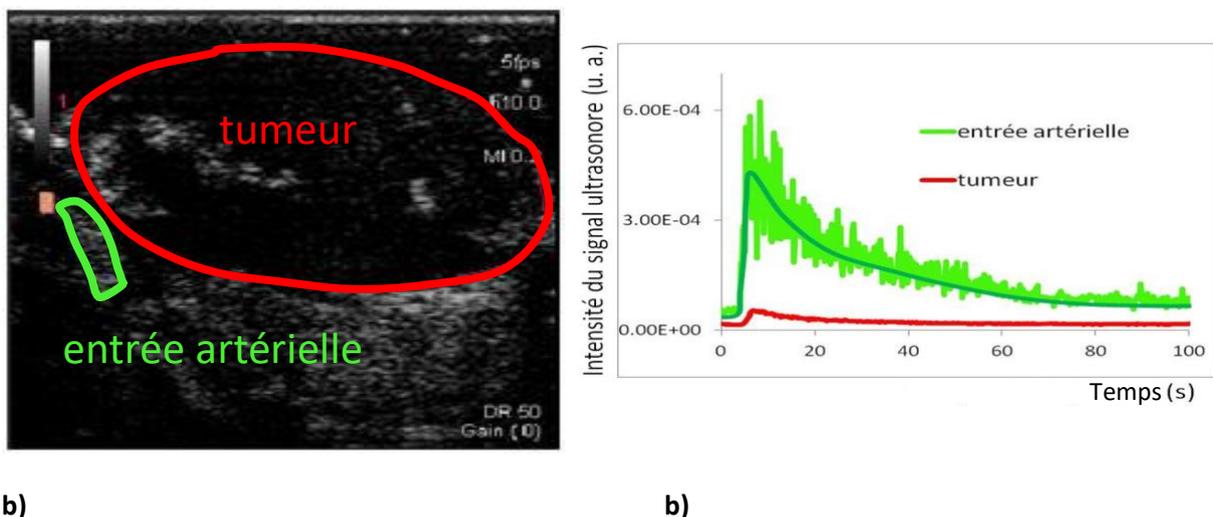


Figure 43 : Image ultrasonore en mode B à 12 MHz d'une tumeur de souris à D0 d'un plus grand axe de 0,5 cm segmentée en rouge et son entrée artérielle contourée en vert a). Courbes représentant le rehaussement du signal ultrasonore en fonction du temps dans la tumeur et au niveau de l'entrée artérielle b).

4.2.5.2. Méthode semi-quantitative.

Les examens ont été analysés avec la méthode semi-quantitative présentée dans la partie 1.3.1. du chapitre 1. La courbe de rehaussement du signal ultrasonore obtenue au cours du temps dans la région tumorale et au niveau de l'entrée artérielle a été traitée selon le modèle mathématique développé par l'équipe pour en déduire les paramètres graphiques que sont l'AUC, le PI, P, T_m et TT (Figure 44).

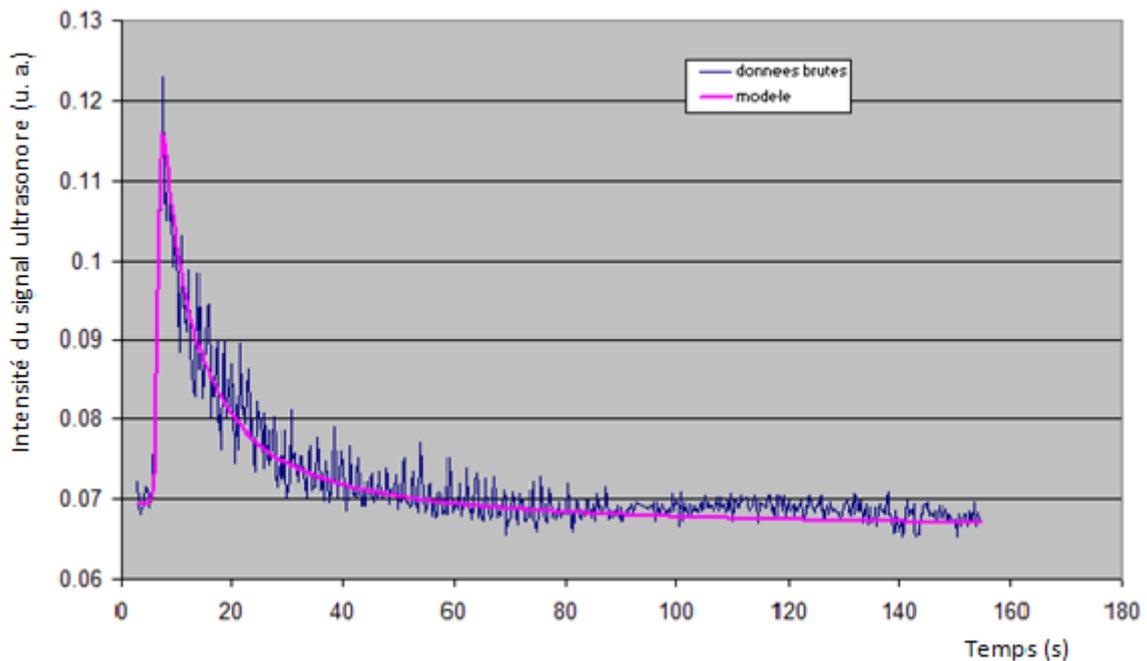


Figure 44 : Exemple de courbe de rehaussement du signal ultrasonore en fonction du temps et sa modélisation mathématique pour la méthode semi-quantitative.

4.2.5.3. Méthode quantitative.

L'analyse quantitative des examens a été réalisée selon la méthode présentée dans la partie 1.3.3. du chapitre 1. La déconvolution a été effectuée avec la méthode TSVD car elle donnait des réponses plus stables. Après la déconvolution, la courbe obtenue (Figure 45) permet d'extraire l'aire sous la courbe qui correspond au volume vasculaire, le maximum de l'intensité traduisant le débit vasculaire et enfin la largeur à mi-hauteur de la courbe égale au temps de transit.

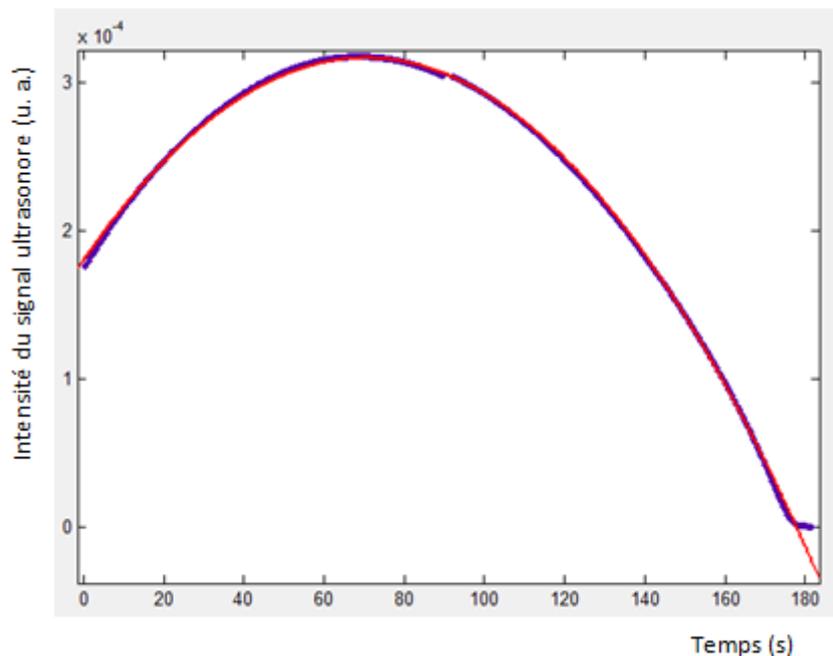


Figure 45 : Courbe de rehaussement ultrasonore déconvoluée d'une souris à D0 obtenue avec la méthode TSVD.

4.2.5.4. Traitement des données IRM.

Sur l'examen IRM, une segmentation de la tumeur a été réalisée sur la coupe de plus grand axe (Figure 46). Les données obtenues ont ensuite été analysées sous Matlab pour en déduire la courbe de décroissance du signal (durée d'environ 100min) au cours du temps. Sur les courbes, en ordonnée est représenté le signal de la tumeur normalisé deux fois : une fois par le signal du bruit de l'image et une autre par le signal de la tumeur avant l'injection de l'agent de contraste.

Les résultats IRM n'ont pas été quantifiés pour le moment. Cependant il est prévu que les données soient analysées.

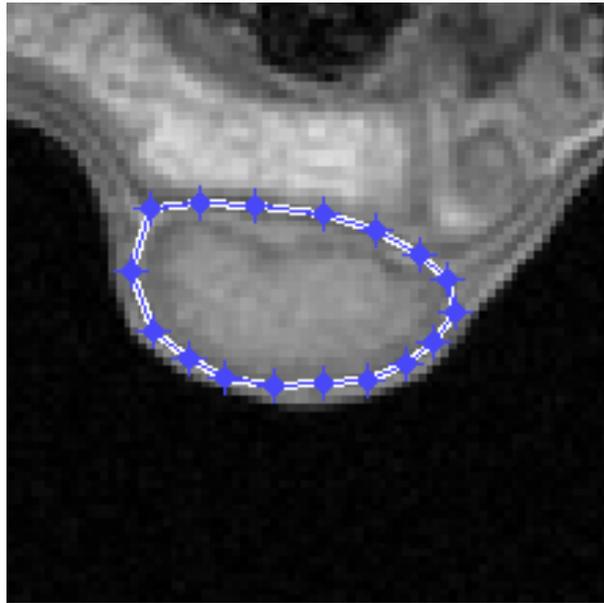


Figure 46 : Contourage de la tumeur de plus grand axe d'environ 1 cm d'une souris sur une image IRM anatomique de haute résolution T₁ avant l'injection de l'agent de contraste.

4.2.5.5. Analyse immuno-histologique.

A l'issue des sessions d'imagerie, les souris ont été euthanasiées par asphyxie au CO₂ et les tumeurs ont été prélevées puis coupées en deux dans le sens transversal. Les tissus tumoraux ont été immédiatement conservés dans du paraformaldéhyde 4% (Euromedex, France) pour le marquage Phospho-Met et dans du fineFIX (MM France, France) pour le CD34 et le CAIX. Les tumeurs ont ensuite été incluses en paraffine pour procéder à des coupes fines et régulières. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement a dans un premier temps subi une déshydratation par immersion dans des bains d'alcool puis dans des bains de xylène. La paraffine liquide a ensuite été coulée sur le prélèvement pour qu'après refroidissement la tumeur incluse dans le bloc de paraffine soit coupée en tranches de 4 µm d'épaisseur. Les tranches ont été réalisées dans le sens transversal et au centre de la tumeur pour que les analyses puissent être mises en correspondance avec les coupes acquises par imagerie US et IRM, c'est à dire les coupes centrales des tumeurs.

Une coloration en Hématoxyline Erythrosine Safran (HES) permet de distinguer les différents compartiments tissulaires des tumeurs par des colorations différentes. Elle a été faite afin d'observer la structure globale du tissu et distinguer les tissus viables des tissus nécrosés. L'hématoxyline de couleur bleu-noir, l'érythrosine de couleur rose et le safran de couleur jaune ont respectivement une affinité sélective pour les noyaux, le cytoplasme et le collagène.

Dans cette étude, en immunohistochimie, trois marqueurs ont été choisis : le CD34, le CAIX et le Phospho-Met respectivement exprimés sur les cellules endothéliales, sur les cellules en hypoxie (l'hypoxie étant un inducteur majeur de l'angiogenèse tumorale) et sur les cellules exprimant c-Met. Le CD34 permet de visualiser les vaisseaux sanguins par l'intermédiaire des cellules endothéliales. Grâce à ce marquage, le pourcentage de nécrose a été calculé.

Les lames marquées au CD34 ont été numérisées puis analysées via un script développé par la société TRIBVN (France) pour établir le nombre moyen et la surface moyenne des vaisseaux présents sur les lames. La densité de vaisseaux a été déterminée en considérant l'ensemble du tissu tumoral, nécrose incluse. Ce choix a été fait pour faciliter la comparaison avec les données ultrasonores n'excluant pas les zones nécrotiques.

Pour cette étude, une lame par échantillon et une tranche par lame ont été prises en compte.

Dans le cas du C-Met, celui-ci est surexprimé dans de nombreux cancers et contribue à la croissance tumorale, à l'angiogenèse et à l'envahissement métastatique. De plus, le cabozantinib inhibe l'expression de Met.

4.2.5.6. Analyse statistique.

L'ensemble des résultats du chapitre sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur type. Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel R version 3.2.1. Les tests statistiques ont été réalisés avec le test de Wilcoxon apparié pour comparer un même groupe à des jours différents et avec le test de Wilcoxon-Mann-Whitney pour comparer les données des deux groupes traités et contrôles à un temps donné. Des valeurs de p inférieures à 5% ont été considérées comme significatives.

4.3. Résultats.

Dans cette partie sont présentés les résultats de l'étude préclinique, selon les doses de cabozantinib administrées aux souris. Pour chacune des deux doses, nous détaillerons les résultats selon l'évolution des volumes tumoraux et de la vascularisation par Doppler et échographie de contraste. Dans ce dernier cas, les deux méthodes de quantification des agents de contrastes ultrasonore seront analysées.

4.3.1. Étude de l'efficacité du Cabozantinib à faible dose (10 mg.kg⁻¹).

Le nombre de souris pris en compte dans cette étude est résumé dans le Tableau 9. En raison du faible nombre de souris à D14 dans le groupe contrôle (N=2), les analyses statistiques sur cet échantillon n'ont pas été possibles.

	D0	D7	D14
Souris contrôles	5/5	5/5	2/5 (3 souris mortes)
Souris traitées dose 10 mg.kg⁻¹	7/7	6/7 (une souris morte)	5/7 (2 souris mortes)

Tableau 9 : Nombre de souris pris en compte pour les calculs des volumes tumoraux pour la dose à 10 mg.kg⁻¹.

4.3.1.1 Évolution des volumes tumoraux.

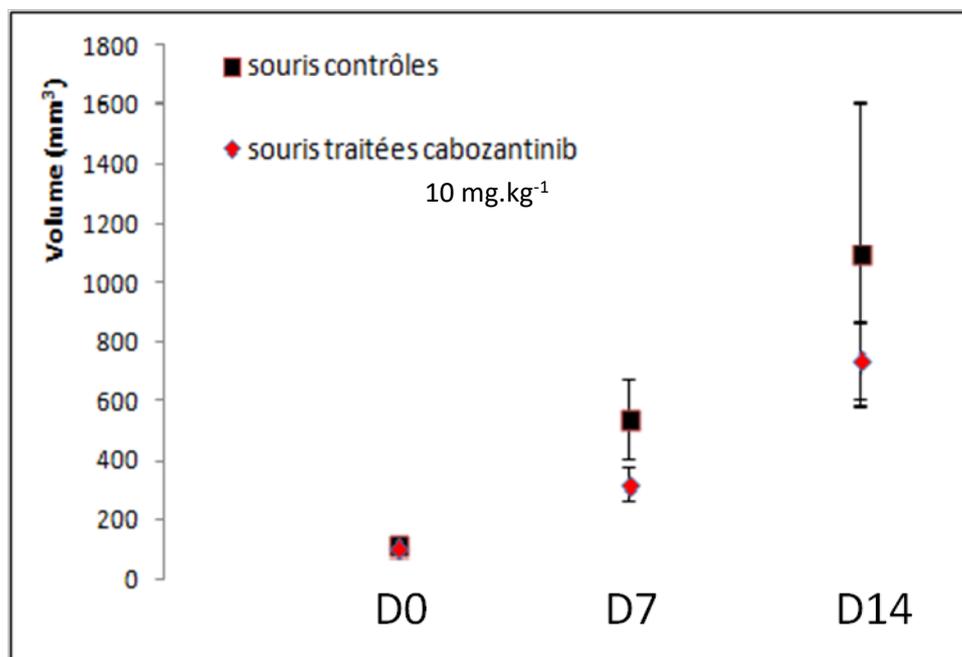


Figure 47 : Volumes tumoraux pour les souris ayant reçu la dose de 10 mg.kg⁻¹ par rapport aux souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm erreur type.

L'évolution des volumes tumoraux au cours du temps est indiquée sur la Figure 47. Avant traitement, c'est à dire à D0, les moyennes de volumes ne sont pas significativement différentes entre les souris traitées et les souris contrôles ($p=0,7$), ce qui est le gage d'un échantillon de taille de tumeur relativement homogène avec un écart type de 8,6. Après le démarrage du traitement à 10 mg.kg⁻¹, on peut observer une légère différence qui se dégage avec des volumes plus importants chez les souris contrôles de 539 mm³ versus 320 mm³ pour les souris traitées. Néanmoins, l'analyse statistique ne révèle pas non plus de différence significative ($p=0,1$). A D14, une différence importante est visible avec des volumes de 736 mm³ et 1095 mm³ pour respectivement le groupe traité et le groupe contrôle. En revanche, le faible nombre de souris entraîne une erreur type importante et empêche une analyse statistique pour le groupe contrôle (N=2).

Le tableau suivant résume les valeurs des volumes tumoraux pour chaque dose et à chaque temps d'évaluation (Tableau 10).

	D0 souris traitées	D0 souris contrôles	D7 souris traitées	D7 souris contrôles	D14 souris traitées	D14 souris contrôles
Volumes tumoraux (mm ³) pour la dose à 10 mg.kg ⁻¹	106,6	113,7	320,0	539,1	736,3	1095,0
Volumes tumoraux (mm ³) pour la dose à 30 mg.kg ⁻¹	98,4	91,2	266,2	611,6	605,3	1371,4

Tableau 10 : Récapitulatif des valeurs de volumes tumoraux pour chaque dose et à chaque temps d'évaluation.

4.3.1.2 Évolution de la vascularisation tumorale via le Doppler.

Le nombre de vaisseaux observé par Doppler de puissance et rapporté sur la Figure 48, augmente en fonction de la progression tumorale au cours du temps. A D0, les moyennes du nombre de vaisseaux entre les deux groupes sont différentes significativement ($p=0,009$) avec un Δ à 52,38%. Ainsi, contrairement à l'étude des volumes tumoraux, ici il n'y a pas une homogénéité vasculaire par Doppler des deux groupes de souris. Entre D0 et D7, l'augmentation pour le groupe traité est également significative ($p=0,03$) avec un Δ important de 92,2%.

Pour le groupe contrôle, un développement de la vascularisation est également observé avec un Δ de 62% mais cela n'est pas statistiquement significatif en raison d'une plus grande variabilité des observations.

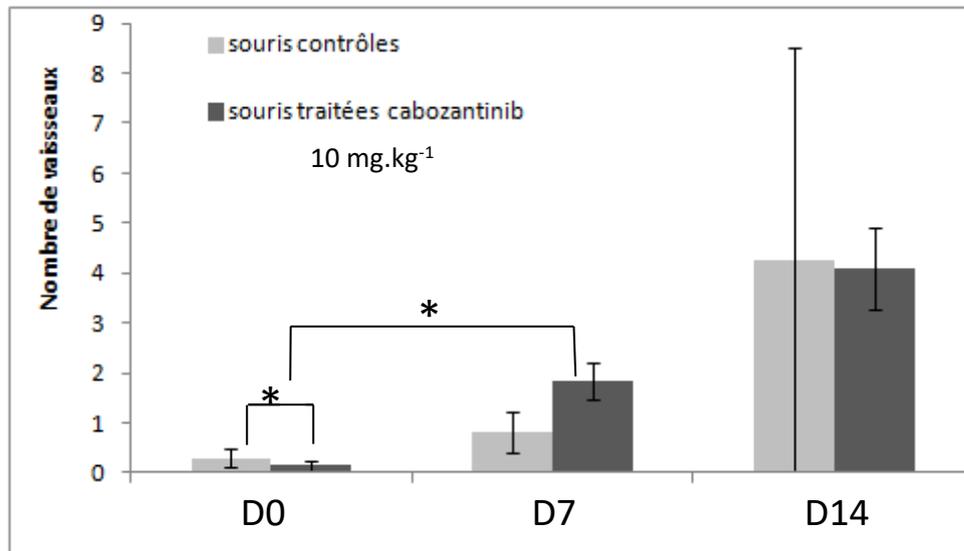


Figure 48 : Le nombre de vaisseaux en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 10 mg.kg⁻¹ et les souris contrôles.

Le tableau suivant résume les valeurs des nombres de vaisseaux pour chaque dose et à chaque temps d'évaluation (Tableau 11).

	D0 souris traitées	D0 souris contrôles	D7 souris traitées	D7 souris contrôles	D14 souris traitées	D14 souris contrôles
Nombre de vaisseaux pour la dose à 10 mg.kg ⁻¹	0,14	0,3	1,83	0,8	4,1	4,25
Nombre de vaisseaux pour la dose à 30 mg.kg ⁻¹	0,83	0,68	1,06	1,4	2,05	2,2

Tableau 11 : Récapitulatif du nombre de vaisseaux.

4.3.1.3. Quantification de la vascularisation par échographie de contraste ultrasonore.

- Méthode semi-quantitative.

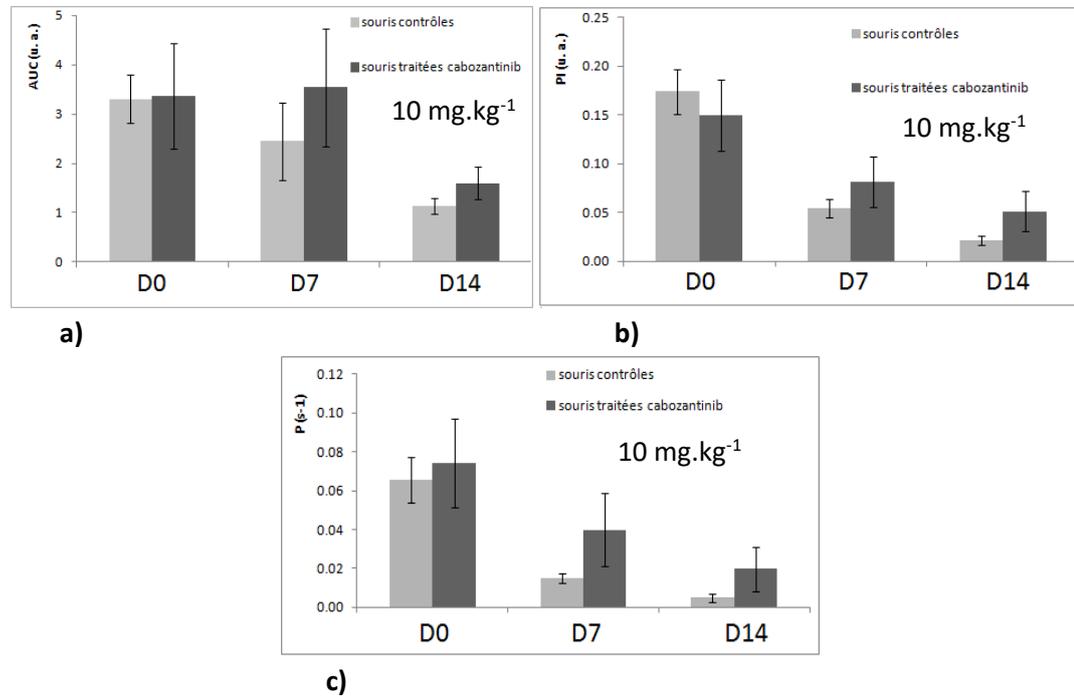


Figure 49 : L'AUC a), le PI b) et la P c) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 10 mg.kg⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm erreur type. Les valeurs de $p < 0,05$ sont également indiquées par une *.

Les paramètres semi-quantitatifs de la microvascularisation sont présentés sur la Figure 49. Dans le cas des paramètres AUC, PI et P, on remarque en premier lieu qu'à D0, leurs moyennes entre les deux groupes de souris ne présentent pas de différences significatives ($p=0,7$, $0,8$ et $0,8$ respectivement). Si cette observation est conforme à ce qui était attendu avant administration du traitement, elle diffère de celle établie par Doppler de puissance. De plus, ces trois paramètres vasculaires ont tendance à diminuer au cours du temps à la fois chez les souris traitées et chez les souris contrôles. Cette diminution n'est toutefois pas significative pour les deux groupes ($p > 0,06$).

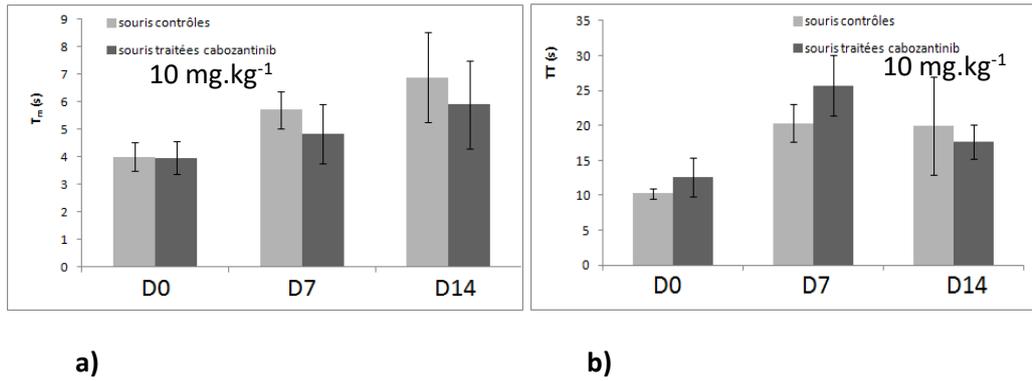


Figure 50 : Le T_m a) et le TT b) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 10 mg.kg⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± erreur type. Les valeurs de p<0,05 sont également indiquées par une *.

Contrairement aux simulations numériques, le TT ne suit pas la même tendance que les autres paramètres, avec comme nous pouvons l'observer sur la Figure 50, une augmentation de TT de D0 à D7 suivie d'une diminution à D14. Le T_m augmente au cours de la progression tumorale. Aucune différence significative n'est toutefois obtenue pour les deux paramètres temporels (p>0,25).

- Méthode quantitative.

Dans le cas de cette analyse, il a été impossible de traiter un jeu de données sur une souris à D0 en raison de la respiration de la souris qui rendait difficile le recalage du mouvement.

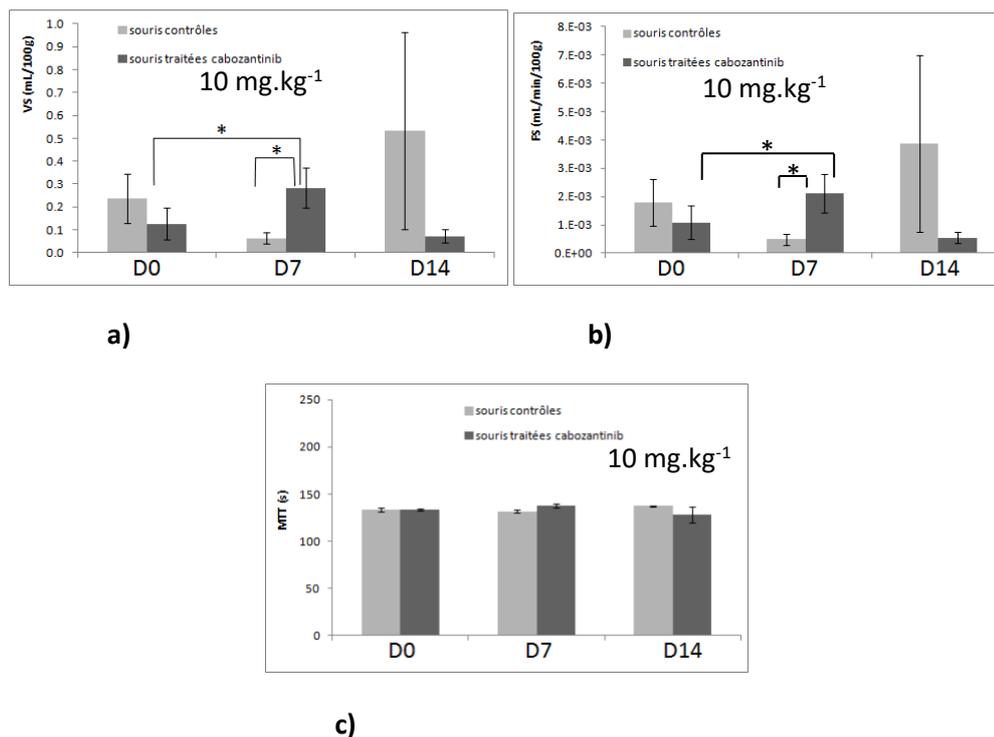


Figure 51 : Le VS a), le FS b) et le MTT c) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 10 mg.kg⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± erreur type. Les valeurs de p<0,05 sont également indiquées par une *.

Sur la Figure 51, on remarque qu'à D0, pour les trois paramètres, les valeurs des groupes traités et des groupes contrôles ne présentent pas de différences significatives (p compris entre 0,3 et 0,8). Concernant les moyennes du VS pour le groupe traité et pour le groupe contrôle, l'importante dispersion des données ne permet pas de conclure quant à une variation au cours du temps. Pour le groupe traité, il est observé une différence significative de VS entre D0 et D7 avec un Δ de 55,48% (p=0,03). A D7, il y a également une différence significative entre le groupe traité et le groupe contrôle pour ce paramètre avec un Δ de 77,6% (p=0,01).

Concernant le FS, l'analyse des résultats indique une tendance similaire à celle de VS. Entre D0 et D7, il y a une différence significative entre les deux groupes avec un Δ de 48,13% (p = 0,03) et à D7, il y a un Δ de 76,88% également significatif (p=0,03).

Enfin, le MTT ne varie pas au cours du temps puisqu'il est issu du rapport mathématique entre VS et FS.

Le tableau suivant résume les valeurs des paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs à chaque temps d'évaluation pour la dose à 10 mg.kg⁻¹ (Tableau 12).

	D0 souris traitées	D0 souris contrôles	D7 souris traitées	D7 souris contrôles	D14 souris traitées	D14 souris contrôles
AUC	3,3	3,3	3,5	2,4	1,5	1,1
PI	0,1	0,1	0,08	0,05	0,05	0,02
P	0,07	0,06	0,04	0,01	0,02	0,004
T _m	3,9	4,0	4,8	5,7	5,9	6,8
TT	12,6	10,2	25,7	20,3	17,7	20,0
VS	0,1	0,2	0,06	0,06	0,07	0,5
FS	0,001	0,001	0,0004	0,0004	0,0005	0,003
MTT	133,3	133,2	131,8	131,8	128,3	137,2

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des paramètres quantitatifs et semi-quantitatifs pour la dose à 10 mg.kg⁻¹.

4.3.2. Étude de l'efficacité du Cabozantinib à dose conventionnelle (30 mg.kg⁻¹).

Le nombre de souris pris en compte est présenté dans le Tableau 13.

	D0	D7	D14
Souris contrôles	12/12	12/12	12/12
Souris traitées dose 30 mg.kg⁻¹	12/12	12/12	12/12

Tableau 13 : Nombre de souris pris en compte pour les calculs des volumes tumoraux pour la dose à 30 mg.kg⁻¹.

4.3.2.1. Évolution des volumes tumoraux.

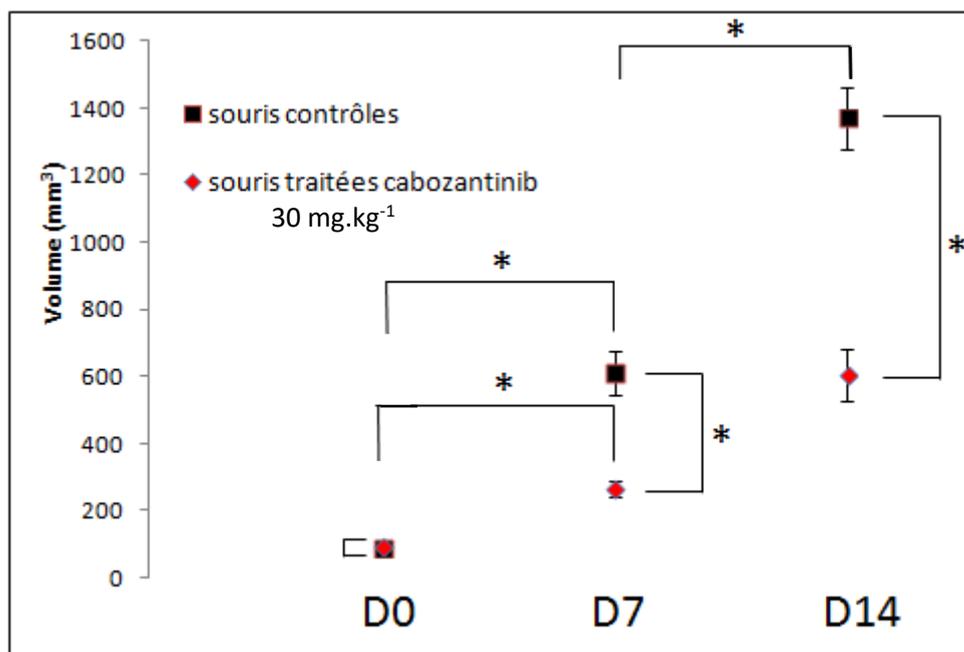


Figure 52 : Volumes tumoraux pour les souris ayant reçu la dose de 30 mg.kg⁻¹ par rapport aux souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± erreur type. Les valeurs de p<0,05 sont également indiquées par une *.

A D0, les volumes tumoraux moyens des souris contrôles et des souris traitées ne présentent pas non plus de différences significatives ($p= 0,4$). Par contre, à l'inverse du précédent dosage, la comparaison des volumes tumoraux entre les deux groupes de souris montre que le cabozantinib semble avoir une action à D7 ($p= 2.10^{-5}$) et également à D14 ($p= 1.10^{-5}$) avec de faibles erreurs type inférieures à 92,5.

A D7, la moyenne des volumes tumoraux est de $320 \text{ mm}^3 \pm 78$ pour les souris traitées et presque le double pour les souris contrôles avec $601 \text{ mm}^3 \pm 23$. De même à D14, la moyenne des volumes tumoraux est de $638 \text{ mm}^3 \pm 320$ pour les souris traitées et de $1371 \text{ mm}^3 \pm 262$ pour les souris contrôles.

4.3.2.2. Évolution de la vascularisation tumorale via le Doppler.

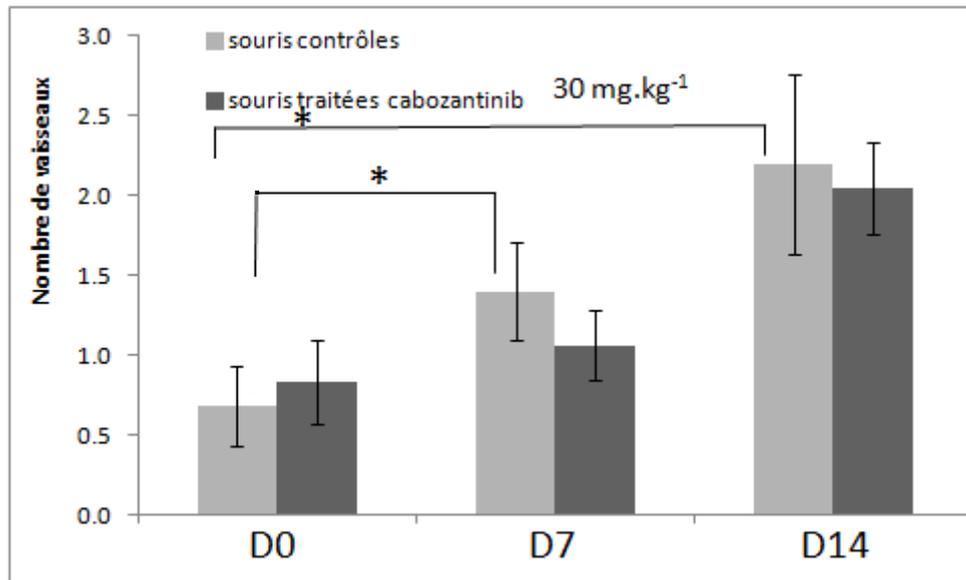


Figure 53 : Le nombre de vaisseaux en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 30 mg.kg⁻¹ et les souris contrôles.

On remarque sur la Figure 53 un nombre croissant de vaisseaux observés par Doppler de puissance au cours de la progression tumorale dans le temps. Cette fois-ci, à D0, il n'y a pas de différence significative entre les groupes. En revanche, on observe une augmentation significative du nombre de vaisseaux au cours du temps au sein du groupe contrôle avec un Δ de 51,3% entre D0 et D7 ($p=0,03$) et un Δ de 69% entre D0 et D14 ($p=0,02$). Dans le cas du groupe traité, une augmentation du nombre de vaisseaux est également observée mais pas statistiquement significative.

4.3.2.3. Évaluation de la vascularisation tumorale par échographie de contraste.

- Méthode semi-quantitative.

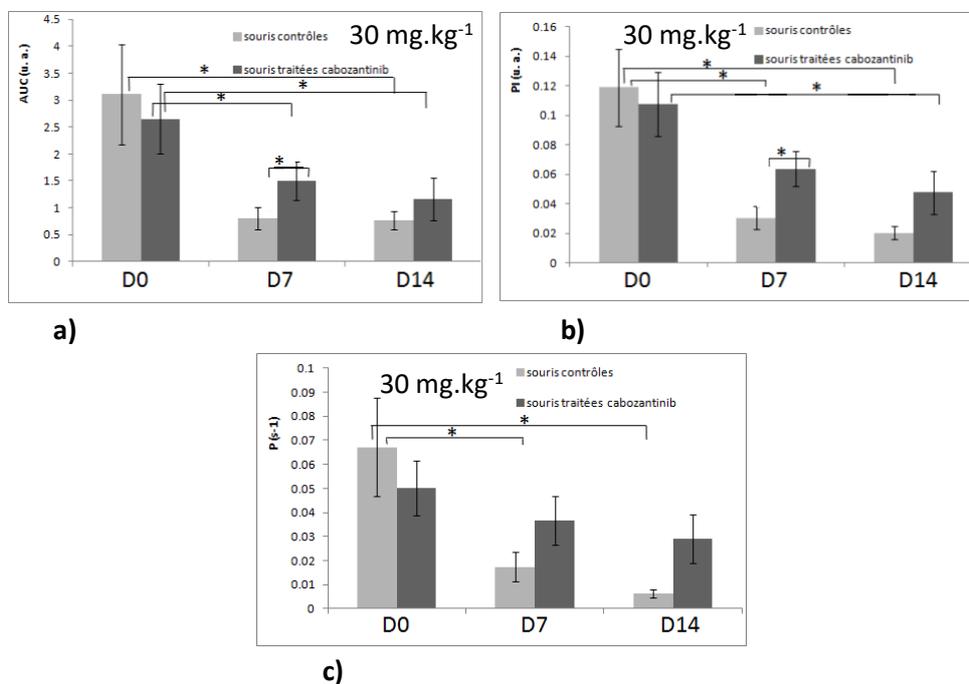


Figure 54 : L'AUC a), le PI b) et la P c) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 30 mg.kg⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm erreur type. Les valeurs de $p < 0,05$ sont également indiquées par une *.

Les résultats obtenus par cette méthode de quantification sont présentés sur les histogrammes en figures 54 et 55. A D0, tous les paramètres semi-quantitatifs de la microvascularisation (AUC, PI, P, T_m et TT) ne présentent pas de différences significatives entre le groupe à traiter et le groupe contrôle ($p > 0,8$).

Concernant l'AUC, le PI et la P, nous pouvons observer sur la Figure 54, leur diminution au cours du temps et ce quel que soit le groupe concerné. D'après les simulations numériques, cette variation peut provenir de deux effets physiologiques différents et étroitement liés : soit une diminution globale du volume vasculaire au sein de la tumeur, soit une augmentation du débit sanguin, en raison de la diminution des diamètres des vaisseaux. Pour l'AUC, cette diminution est significative. Dans le cas du groupe traité de D0 à D7, un Δ de 43,39% est observée ($p = 0,03$) et pour un délai entre D0 à D14, c'est un Δ de 56,6% ($p = 0,01$). Dans le cas du groupe contrôle de D0 à D14, il y a une différence de 75,48% ($p = 0,01$). Dans le cas d'une comparaison entre les deux groupes, une différence significative est observée uniquement à D7 avec un Δ de 46,3% ($p = 0,03$).

Concernant le PI, ces variations sont à l'image de celles de l'AUC. Ainsi, statistiquement, la diminution observée est vérifiée pour le groupe traité de D0 à D14 avec un Δ de 55,62% ($p = 0,01$). Dans le cas du groupe contrôle, la diminution déterminée entre D0 et D7 correspond à un Δ de 74,53% ($p = 0,003$) et entre D0 et D14 avec un Δ de 82,94% ($p = 0,003$).

Pour le paramètre PI également, nous observons une différence significative uniquement à D7 pour un Δ de 52,35% ($p=0,02$).

Enfin, la diminution observée pour le paramètre P est confirmée pour le groupe contrôle de D0 à D7 avec un Δ de 74,1% et de D0 à D14 un Δ de 90,92% avec des valeurs de p de 0,02 et de 0,003 respectivement.

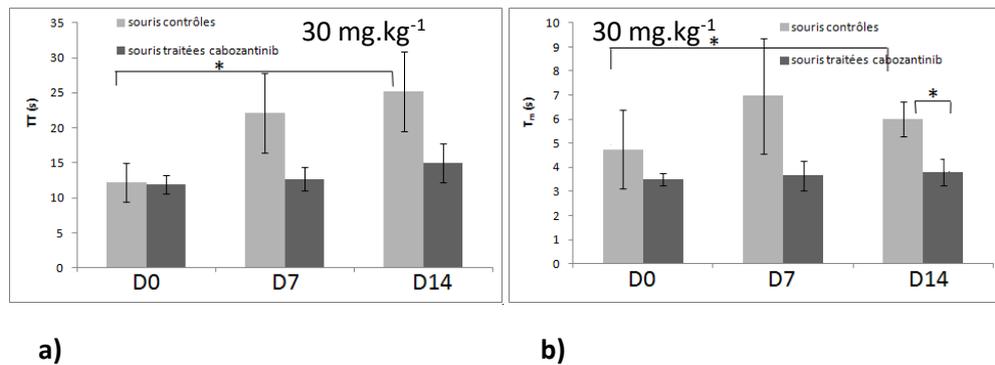


Figure 55 : Le TT a) et le T_m b) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 30 mg.kg⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm erreur type. Les valeurs de $p < 0,05$ sont également indiquées par une *.

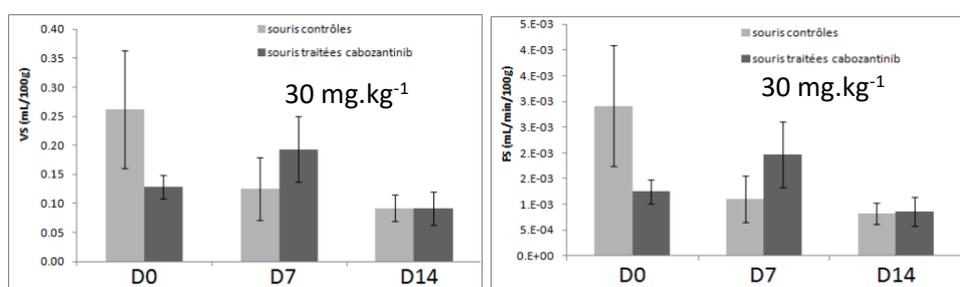
Dans le cas des paramètres temporels présentés sur la Figure 55, on observe une augmentation globale du temps de transit TT. Cette observation est contraire à ce qui a été relevé via la modélisation numérique où il a été montré que ce paramètre suit les mêmes tendances de variation que les paramètres vasculaires AUC, PI, et P selon le volume vasculaire et le débit sanguin. Ainsi, ce résultat suggère probablement la contribution de l'architecture du réseau vasculaire qui se complexifie au cours du temps, favorisant un TT croissant, indépendamment des autres paramètres. Cette observation est significative uniquement pour le groupe contrôle de D0 à D14 avec un Δ de 51,78% ($p=0,003$). Dans le cas du paramètre T_m, il est difficile d'en déduire une variation dans un sens précis. En revanche, la valeur du T_m pour le groupe contrôle à D0 est différente significativement de celle à D14 avec un faible Δ de 21,03% ($p=0,04$). A D14, ce paramètre présente une moyenne différente significativement entre le groupe contrôle et le groupe traité ($p=0,04$).

- Méthode quantitative.

Dans le cas de cette analyse, il a été impossible de traiter les données de sept examens en raison de la respiration de la souris qui rendait difficile le recalage du mouvement. Le nombre de souris étudiées par cette méthode de quantification est résumé dans le Tableau 14.

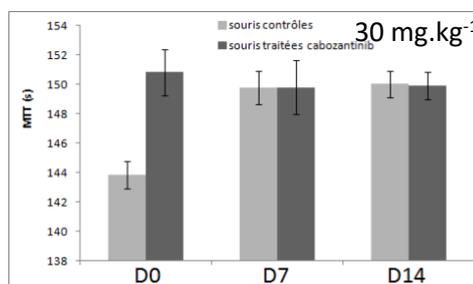
	D0	D7	D14
Souris contrôles	11/12 (une souris inexploitable)	11/12 (une souris inexploitable)	10/12 (2 souris inexploitable)
Souris traitées dose 30 mg.kg⁻¹	12/12	10/12 (2 souris inexploitable)	11/12 (une souris inexploitable)

Tableau 14 : Tableau présentant les nombres de souris pris en compte pour les calculs des paramètres semi-quantitatifs pour la dose à 30 mg.kg⁻¹.



a)

b)



c)

Figure 56 : Le VS a), le FS b) et le MTT c) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 30 mg.kg⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm erreur type. Les valeurs de $p < 0,05$ sont également indiquées par une *.

Dans le cas des paramètres quantitatifs (Figure 56), il n'existe pas de différences significatives à D0 entre le groupe à traiter et le groupe contrôle (p entre 0,2 et 0,4). Comme avec la dose à 10 mg.kg⁻¹ la dose à 30 mg.kg⁻¹ ne permet pas d'observer une tendance particulière des moyennes du VS au cours du temps, avec pour le groupe traité et pour le groupe contrôle, aucune conclusion statistique quant à une variation particulière avec des valeurs de p entre 0,1 et 0,9. Ceci est probablement dû à l'importante dispersion des données. Concernant le FS, l'analyse des résultats donne les mêmes variations que pour le VS avec des valeurs de p comprises entre 0,1 et 1. Concernant le MTT, nous pouvons en déduire qu'il n'y a pas de variations en fonction du temps que ce soit pour le groupe traité ou pour le groupe contrôle.

Le tableau suivant résume les paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs pour la dose à 30 mg.kg⁻¹ (Tableau 15).

	D0 souris traitées	D0 souris contrôles	D7 souris traitées	D7 souris contrôles	D14 souris traitées	D14 souris contrôles
AUC	2,6	3,1	1,5	0,8	1,1	0,7
PI	0,1	0,1	0,06	0,03	0,04	0,02
P	0,05	0,06	0,03	0,01	0,02	0,006
T _m	3,5	4,7	3,6	6,9	3,8	6,01
TT	11,9	12,1	12,7	22,1	15	25,2
VS	0,1	0,2	0,1	0,1	0,09	0,09
FS	0,001	0,002	0,001	0,001	0,0008	0,0008
MTT	112,2	102,9	108,6	113,0	98,6	113,2

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs pour la dose à 30 mg.kg⁻¹.

4.3.3. Quantification de la vascularisation en IRM.

Dans le cas de l'évaluation de la vascularisation par DCE-IRM, il a été impossible de traiter huit examens : 2 à D0 et 6 à D14 soit suite à des mouvements de la souris en cours d'acquisition, rendant impossible la correspondance des coupes tumorales avec les ultrasons, soit en raison de résultats incohérents avec un signal avant injection du gadolinium supérieur à celui acquis après injection. Le nombre de souris étudiées par cette méthode de quantification est résumé dans Tableau 16.

Les Figure 57 et Figure 58 présentent les rehaussements relatifs du signal de l'agent de contraste en IRM respectivement à D0 et à D14.

	D0	D14
Souris contrôles	8/9 (1 souris inexploitables)	5/9 (4 souris inexploitables)
Souris traitées dose 30 mg.kg⁻¹	8/9 (1 souris inexploitables)	7/9 (2 souris inexploitables)

Tableau 16 : Tableau présentant les nombres de souris pris en compte pour l'étude de la vascularisation en IRM pour la dose à 30 mg.kg⁻¹.

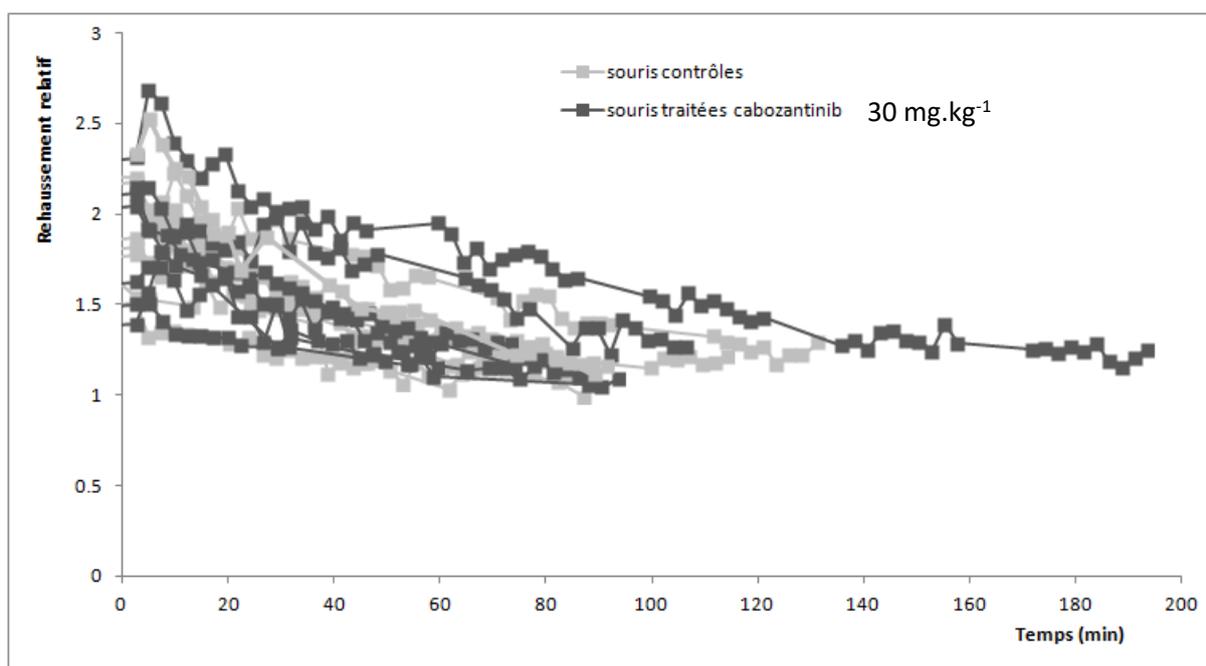


Figure 57 : Rehaussement relatif en IRM en fonction du temps pour les souris traitées avec 30 mg.kg⁻¹ et les souris contrôles à D0.

Sur la Figure 57, à D0, on remarque qualitativement que les courbes de rehaussement ont tendance à diminuer en fonction du temps pour les souris contrôles et les souris traitées.

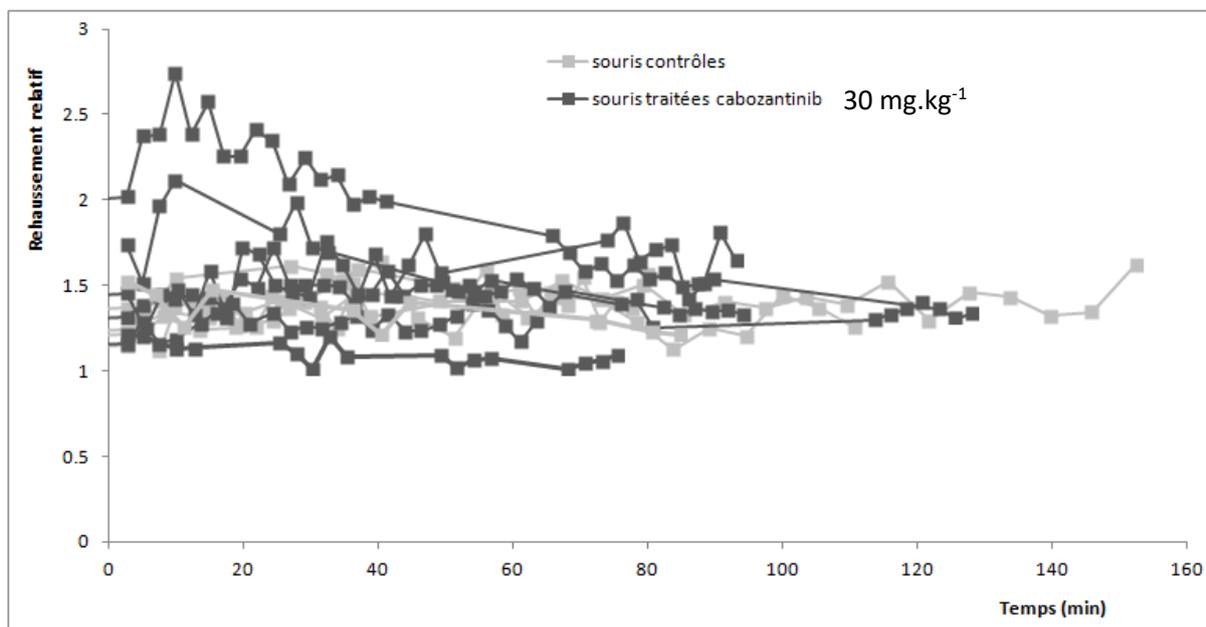


Figure 58 : Rehaussement relatif en IRM en fonction du temps pour les souris traitées avec 30 mg.kg⁻¹ et les souris contrôles à D14.

Sur la Figure 58, les courbes de rehaussement obtenues à D14 présentent un faible rehaussement du signal au cours du temps, ce qui signifie que le signal dans la tumeur après l'injection de l'agent de contraste est proche de celui avant l'injection de l'agent de contraste. Seules deux images de tumeur ont un rehaussement du signal IRM observable. L'hypothèse est que les tumeurs de ces deux souris sont moins nécrosées, permettant ainsi la circulation de l'agent de contraste au sein du réseau vasculaire tumoral.

4.3.4. Analyse immuno-histologique.

Les analyses immuno-histologiques ont été réalisées sur l'ensemble des souris imagées à D14 après le dernier examen IRM.

De manière générale, la microvascularisation est souvent décrite dans la littérature par le nombre de vaisseaux par unité de surface. Dans le cadre de notre étude, le pourcentage moyen de la densité de vaisseaux est, pour la dose à 10 mg.kg⁻¹, de 0,011%±0.002 pour les souris traitées et presque le double avec 0,020%±0.001 pour les souris contrôles. Etant donné le peu de souris contrôles à D14 (2 souris à D14) pour la dose à 10 mg.kg⁻¹, aucune analyse statistique n'a été faite pour cette dose. Pour la dose à 30 mg.kg⁻¹, et contrairement à ce qui est attendu, cet écart se réduit avec un pourcentage moyen de la densité des vaisseaux de 0,008%±0.002 pour les souris traitées et de 0,011%±0.001 pour les souris contrôles (p=0,02). A cela, nous pouvons remarquer que les densités vasculaires des groupes contrôles étudiés aux deux doses de cabozantinib sont très différentes, probablement en raison de la différence de lots des cellules tumorales PC3 utilisées pour l'étude à 10 mg.kg⁻¹ par rapport à celle à 30 mg.kg⁻¹ qui a été réalisée six mois après.

Néanmoins, rien n'explique pourquoi l'écart entre les densités vasculaires diminue en augmentant le dosage du traitement, excepté une modification de la taille des vaisseaux.

Dans ce cas, pour la faible dose de cabozantinib (10 mg.kg^{-1}), le pourcentage moyen de surface de vaisseaux est de $1,2\% \pm 0,1$ pour les souris contrôles versus $0,7\% \pm 0,1$ pour les souris traitées. Pour une dose plus élevée (30 mg.kg^{-1}), le pourcentage moyen de surface de vaisseaux est de $0,9\% \pm 0,1$ pour les souris contrôles versus $0,6\% \pm 0,1$ pour les souris traitées ($p=0,3$). De même que précédemment, il existe un écart important sur les groupes contrôles entre les deux dosages, ce qui rend délicate toute interprétation. En revanche, la faible vascularisation des tumeurs avec des pourcentages très faibles signale la présence d'une importante nécrose dans tous les groupes et à toutes les doses. Son pourcentage a été calculé sur les lames HES sur 6 souris traitées à la dose à 30 mg.kg^{-1} et sur 6 souris contrôles. Les résultats ont permis de confirmer l'importante présence de nécrose dans les tumeurs. En effet, les souris traitées présentent un pourcentage de nécrose de 92% et les souris contrôles présentent un pourcentage de nécrose de 91% (Figure 59).

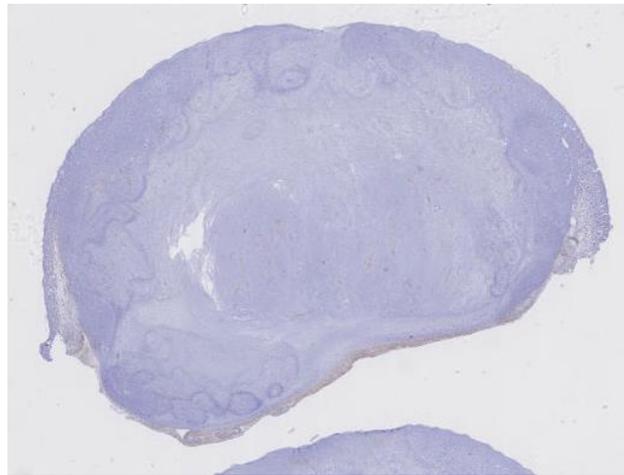


Figure 59 : Image d'une coupe histologique du marquage CD34 pour une souris contrôle à la dose à 30 mg.kg^{-1} . On remarque l'importante présence de nécrose au centre de l'image.

Par ailleurs, concernant les marqueurs, le marquage CAIX utilisé pour mettre en évidence l'hypoxie ne donne pas de différences entre les souris traitées et les souris contrôles. En effet, à cause de l'importante nécrose dans les tumeurs, le marquage apparaît positif sur tous les échantillons.

Quant au marquage Phospho-MET, celui-ci est négatif sur l'ensemble des échantillons. Les tumeurs n'expriment, peut-être, pas Phospho-MET en raison du nombre de passages des cellules. Pour s'en assurer il aurait fallu vérifier l'expression de Phospho-MET sur les cellules avant l'injection aux souris.

4.4. Discussion.

Ce chapitre a porté sur l'étude de la vascularisation par IRM et par échographie de contraste ultrasonore avec une quantification suivant deux méthodes, la méthode quantitative et la méthode semi-quantitative. L'objectif était de comparer la fiabilité et la capacité de ces trois évaluations de la vascularisation tumorale à prédire l'efficacité thérapeutique. Outre des évaluations par imagerie, des analyses immuno-histologiques ont également été réalisées. Pour cette étude, le traitement utilisé était le cabozantinib qui a une action d'inhibition de MET et du VEGF dont les expressions sont prédictives du mauvais pronostic d'un cancer et résultent en une augmentation de l'angiogenèse et de l'invasion [99].

Concernant les volumes tumoraux, pour la dose à 30 mg.kg^{-1} , on remarque une augmentation du volume tumoral en fonction du temps qui est plus importante pour le groupe contrôle par rapport au groupe traité. Cette observation est vérifiée statistiquement. Pour la dose à 10 mg.kg^{-1} , une augmentation est également visible mais sans confirmation statistique. Plusieurs études publiées dans la littérature ont montré une efficacité thérapeutique sur 10 semaines de traitement avec une dose de 60 mg.kg^{-1} sur des tumeurs de prostate LuCaP-35 avec une différence de 575% entre les volumes tumoraux des souris contrôles avec ceux des souris traitées et castrées [103]. Une autre étude a souligné l'importance du modèle animal choisi sur l'efficacité thérapeutique avec des variations du simple au double sur des variations de volumes tumoraux (de 325 à 600%) selon les modèles animaux STS26T, MDA-MB-231 et H441 [99, 108]. Dans le cadre de notre étude, nous obtenons une différence de 733% entre les souris contrôles et les souris traitées avec la dose à 30 mg.kg^{-1} . Les différences peuvent donc s'expliquer par l'influence du modèle tumoral.

Dans le cas de l'étude *in vivo* par la méthode semi-quantitative, on observe une diminution significative de l'AUC et du PI chez les souris traitées uniquement pour un dosage à 30 mg.kg^{-1} . Pour le groupe contrôle, on remarque également une diminution significative de l'AUC, du PI, mais aussi de la pente. Il y a donc une diminution de la perfusion tumorale au cours de l'étude que ce soit pour le groupe traité ou pour le groupe contrôle. Pour le groupe traité, cette diminution était attendue en raison de l'effet du traitement. Lors de notre étude par simulation numérique, il a été montré que l'AUC, le PI et la pente diminuaient en fonction de la vitesse d'écoulement du sang et augmentaient en fonction du volume vasculaire. Il est difficile de conclure que les diminutions observées *in vivo* soient dues à une augmentation du débit sanguin et à la diminution du volume vasculaire. D'autant plus que l'examen d'immuno-histologie ne montre pas de variation du volume sanguin au cours du traitement pour le groupe traité, mais également pour le groupe contrôle. Dans le cas du groupe contrôle, la diminution de la perfusion peut s'expliquer par l'apparition de nécrose au sein de la tumeur.

Cette nécrose observée sur les animaux et quantifiée en histologie à plus de 90% de la surface totale de la tumeur peut également être à l'origine de la diminution des paramètres pour le groupe traité et masquer ainsi l'efficacité thérapeutique. Ainsi, la seule différence significative observée entre le groupe contrôle et le groupe traité est observée uniquement à D7 pour l'AUC et le PI, mais avec des paramètres de microvascularisation que sont l'AUC et le PI plus importants chez les souris traitées.

Plusieurs équipes ont montré des diminutions des paramètres ultrasonores semi-quantitatifs suite à l'administration de thérapies avec la méthode d'injection du Sonovue en bolus. Dans le cadre d'une étude d'un nouveau traitement anti-vasculaire, Lavisse et al. ont montré une diminution de 7% de la valeur initiale du PI 6 heures après l'injection de AVE8062 [106]. De même Zhou et al. ont étudié l'efficacité d'un traitement anti-angiogénique sur 20 souris avec une efficacité significative observée par DCE-US dès le septième jour via l'AUC, le PI et un paramètre en lien avec la perfusion (AUC/MTT) [109]. Ces paramètres semi-quantitatifs se sont également avérés sensibles pour suivre l'efficacité de chimiothérapies sur des rats [110]. A l'inverse, Krix et al. a montré sur 13 souris sans traitement que l'AUC était non corrélé à la vascularisation de la tumeur (volume, débit et perfusion) contrairement au PI et à la pente [57]. L'hypothèse alors avancée par les auteurs était la variabilité de l'injection, qui peut être annihilée en mettant en œuvre la méthode quantitative par déconvolution.

Concernant le temps de transit TT et le temps de montée T_m , pour la dose à 30 mg.kg⁻¹, il y a pour le groupe contrôle, une augmentation significative de ces paramètres au cours du temps et pour le T_m , une différence significative à D14 entre le groupe contrôle et le groupe traité, avec une valeur plus importante pour le groupe contrôle. Ces variations peuvent s'expliquer par une détérioration de la fonctionnalité des vaisseaux et, ou, par une complexification des réseaux vasculaires au cours du développement tumoral, limitées par la thérapie chez les souris traitées par rapport au groupe contrôle. En modélisation numérique, aucune variation des paramètres temporels n'apparaît en fonction du volume du réseau et du débit vasculaire pour la méthode quantitative comme pour la méthode semi-quantitative, probablement parce que ni la variation de la fonctionnalité des vaisseaux, ni la complexité des ramifications n'ont été modélisées.

Dans le cas de l'étude *in vivo* par la méthode quantitative, les valeurs calculées présentent d'importantes variations, ceci étant dû à la difficulté et à l'imprécision faite pour identifier l'entrée artérielle et la conserver au cours des différents examens à D0, D7 et D14. En effet, il est difficile de sélectionner la même entrée artérielle d'un examen à un autre, ceci en raison de la modification du réseau sanguin en cours du développement tumoral. Ainsi, selon l'entrée artérielle prise en compte, la forme de la courbe de rehaussement de cette dernière entraîne un biais sur le résultat de la déconvolution. Il est observé *in vivo*, entre D0 et D7, une augmentation significative du volume vasculaire VS et du débit sanguin FS uniquement pour la dose à 10 mg.kg⁻¹. Les simulations numériques avaient montré une augmentation de VS et FS en fonction du débit vasculaire et une indépendance au volume vasculaire du réseau tumoral. Dans notre étude *in vivo*, il n'est pas possible d'en déduire un lien entre cette augmentation et le volume vasculaire de la tumeur puisque l'examen d'immuno-histologie ne montre pas de variations du volume sanguin au cours du traitement pour les deux groupes, traité et contrôle. Par contre, l'efficacité thérapeutique est établie à D7 avec une différence significative du groupe traité versus contrôle à la fois pour VS et FS.

Si l'on considère les deux méthodes de quantification, il apparaît que la méthode semi-quantitative n'est pas sensible aux faibles modifications vasculaires mises en jeu à la dose à 10 mg.kg⁻¹ contrairement à la méthode quantitative. En revanche, pour la dose à 30 mg.kg⁻¹, la méthode semi-quantitative met en évidence des différences significatives, contrairement à la méthode quantitative, probablement pour des raisons de difficultés de mise en œuvre expérimentales rencontrées. En particulier, il a été impossible de trouver une entrée artérielle avec une région d'intérêt supérieure à 0,6 mm².

Or Gauthier et al. mettent en évidence *in vivo* sur 5 souris l'importance d'une surface supérieure à 1 mm² pour s'affranchir des effets de volumes partiels qui biaisent l'évaluation quantitative par déconvolution [105].

De plus, l'importante nécrose du modèle tumoral PC3 limite l'interprétation histologique des données. Il apparaît alors impossible au regard de ces résultats de statuer sur la plus grande sensibilité d'une des deux méthodes.

Enfin, concernant l'étude de la vascularisation par IRM, on remarque à D14 des courbes avec un rehaussement du signal très faible à la fois pour les souris contrôles et traitées. Ainsi, la DCE-IRM n'a pas permis d'identifier un effet significatif du traitement sur la microvascularisation à forte dose, puisque très peu d'agents de contraste sont entrés dans le réseau vasculaire tumoral. Cela est probablement en raison de la présence de lacs nécrotiques importants.

4.5. Conclusion.

L'objectif de cette étude était d'étudier la capacité des méthodes de quantification en échographie de contraste (la méthode semi-quantitative et la méthode quantitative) et de l'IRM à prédire l'efficacité thérapeutique.

Du point de vue des volumes vasculaires, le cabozantinib a une action pour la dose à 30 mg.kg⁻¹ qui est validée statistiquement. Le modèle tumoral choisi pour l'étude est caractérisé par une nécrose très importante qui entraîne une différenciation difficile en échographie de contraste entre les groupes traités et contrôles de même qu'entre les deux doses étudiées que ce soit pour la méthode semi-quantitative ou quantitative.

Concernant l'étude des modifications de la vascularisation par DCE-US, les méthodes de quantification du signal ultrasonore sont difficilement comparables sur un tissu nécrotique à 90%. Cette nécrose limite également les interprétations physiologiques des variations des paramètres ultrasonores suggérées par la simulation numérique. Néanmoins, cette première étude menée sur un ensemble de 44 souris confirme la mise en œuvre délicate de la mesure du signal ultrasonore dans l'artère nourricière. Son repérage au cours du temps est rendu difficile par la modification du réseau vasculaire en cours du développement tumoral, et sa petite taille est source d'une sous évaluation du signal, rendant la quantification incertaine.

Conclusion

L'échographie de contraste ultrasonore tient une place importante dans l'estimation de l'efficacité des traitements anti-angiogéniques via l'évaluation de la vascularisation tumorale ; permettant ainsi de choisir plus rapidement le traitement le plus efficace en limitant ainsi les effets secondaires et en réduisant la durée de la thérapie et le coût du traitement. A partir de la quantification du signal ultrasonore détecté dans la tumeur, cette technique permet d'en déduire des paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs caractérisant la vascularisation tumorale tels que le volume et le débit vasculaire. Cependant, cette technique pose de nombreux questionnements relatifs à la sensibilité des méthodes de quantification du signal ultrasonore.

C'est dans ce contexte que se situe l'objectif de ma thèse qui était d'évaluer la sensibilité des méthodes de quantification du signal ultrasonore à partir de la modélisation numérique et de l'expérimentation *in vitro* et *in vivo*. Mon travail de thèse se décline en trois volets correspondant chacun à un chapitre de ma thèse. Le premier volet est consacré à la validation de la modélisation numérique de l'écoulement des agents de contraste ultrasonores dans un réseau vasculaire. L'étude numérique de l'influence du volume vasculaire et de la vitesse d'écoulement sanguin sur les méthodes de quantifications du signal ultrasonore est abordée dans le deuxième volet. Enfin, le dernier volet concernait l'étude *in vivo* de la sensibilité des méthodes de quantification ultrasonore sur un modèle de tumeur dans le but de confronter les résultats de cette étude aux résultats de la modélisation numérique. Les résultats les plus importants obtenus dans ces trois volets seront présentés ci-après.

La modélisation numérique de la vascularisation est une approche qui a déjà permis de nombreuses avancées en cardiovasculaire, notamment, dans le développement de dispositifs médicaux implantables mais également pour mieux appréhender les suites d'une intervention chirurgicale. L'importation de cette approche numérique vers l'imagerie de contraste pour mieux appréhender les performances de quantifications des méthodes mathématiques existantes est très novatrice. Plus précisément, il a fallu développer un modèle numérique dédié au suivi du micro-écoulement des agents de contraste ultrasonore dans des vaisseaux sanguins. L'injection des microbulles, l'écoulement du sang et le réseau vasculaire ont été modélisés au plus proche des situations réalistes avec, toutefois des hypothèses fortes à valider. Ainsi, une étude comparative, expériences versus modélisation numérique, a été conduite pour valider notre modèle dans des réseaux vasculaires plus ou moins complexes. Deux échelles ont été retenues : une échelle millimétrique et une échelle micrométrique. L'échelle millimétrique a été étudiée pour avoir une correspondance avec la géométrie des fantômes *in vitro*. L'échelle micrométrique a été prise en compte pour s'approcher des conditions physiologiques *in vivo*. Cette étude a permis de valider un certain nombre d'hypothèses faites pour la modélisation numérique comme l'injection réaliste des microbulles à l'entrée des fantômes, le maillage des géométries numériques et surtout la prise en compte du sang comme un fluide homogène Newtonien.

Une fois notre modèle numérique validé, il a été mis en œuvre pour étudier la sensibilité des méthodes de quantification ultrasonore selon différentes variables physiologiques d'influence que sont le débit sanguin et le volume vasculaire tumoral. Une attention particulière a été portée pour se situer dans les conditions les plus proches que possible de la réalité. Ainsi, les réseaux modélisés ont été tracés en respectant les rapports d'embranchement selon la loi de Murray, les vitesses du sang simulées sont issues de données *in vivo* de la littérature tandis que la forme du bolus de microbulles injectées résulte d'examens d'échographie de contraste ultrasonore sur des tumeurs de souris. Cette étude a permis d'en déduire d'importants résultats. Tout d'abord, les paramètres les plus sensibles aux variations du volume vasculaire sont l'aire sous la courbe, le maximum et la pente de la courbe de rehaussement pour la méthode semi-quantitative. En revanche, la méthode quantitative apparaît légèrement plus sensible lorsqu'il s'agit d'évaluer les modifications du débit sanguin. Les paramètres quantifiés temporels (TT et MTT) ne se sont pas révélés pertinents pour décrire les variations de la vascularisation en raison de trop faibles volumes vasculaires mis en jeu. L'hypothèse alors non respectée pour la détermination mathématique des paramètres est l'existence *a priori* d'un mélange parfait des agents de contraste avec le sang. En dernier lieu, cette étude a permis de confirmer la fiabilité de la méthode quantitative.

Les études *in vivo* sur souris ont une grande importance pour comprendre les mécanismes du cancer mais également pour évaluer de nouvelles thérapies et pour améliorer les techniques d'imagerie. Ce dernier chapitre, traite via cette dernière approche de la sensibilité des méthodes de quantification du signal ultrasonore pour évaluer l'efficacité d'un traitement anti-angiogénique sur des tumeurs de souris. La première constatation de cette étude est l'inadéquation du modèle tumoral PC3 utilisé à l'imagerie dite de contraste de par sa nette propension à nécroser. En effet, il est difficile de différencier les souris traitées des contrôles, de même que les deux doses étudiées que ce soit pour la méthode semi-quantitative ou quantitative. La correspondance avec la modélisation a également été limitée même si certaines tendances ont pu être dégagées. En particulier, dans le cadre de l'étude *in vivo*, les variations du paramètre temporel TT se sont révélées significatives, contrairement à la modélisation numérique, et sont plus importantes pour le groupe contrôle. Cela suggère soit une détérioration de la fonctionnalité des vaisseaux ou bien une importante modification de l'architecture vasculaire, configurations non modélisées.

Les perspectives scientifiques de ce programme de recherche s'inscrivent principalement dans le prolongement immédiat de la thèse. Il s'agit tout d'abord de compléter les études numériques sur des réseaux vasculaires de complexité et de volumes croissants, mais également d'étendre l'étude à d'autres méthodes de quantification reposant sur la reperfusion et le maximum d'intensité. Par ailleurs, aujourd'hui la compréhension de l'hétérogénéité tumorale est un enjeu majeur en cancérologie. Ainsi, il apparaît essentiel d'étudier les effets de l'hétérogénéité du réseau vasculaire tumoral sur l'écoulement des microbulles pour identifier des modifications spécifiques du signal ultrasonore. Ainsi, il sera possible d'évaluer un niveau d'hétérogénéité vasculaire tumoral selon la forme du signal collecté. D'un point de vue instrumental, la prochaine étape vise à développer une méthodologie robuste et pertinente pour quantifier les microbulles par imagerie de contraste ultrasonore 4D. L'imagerie 4D permettrait en effet de s'affranchir des variations inter-opérateur fréquemment mentionnées dans la littérature. Les prochaines études *in vivo* pour valider la 4D seront menées sur un autre modèle tumoral induisant peu de nécrose ; ceci dans le but de pouvoir confronter les résultats obtenus en modélisation numérique avec les résultats *in vivo*.

Références

- [1] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/> consulté le 02/02/16.
- [2] J. Folkman, "Tumor angiogenesis: therapeutic implications," *N Engl J Med*, vol. 285, pp. 1182-6, Nov 18 1971.
- [3] N. Lassau, *et al.*, "Standardization of dynamic contrast-enhanced ultrasound for the evaluation of antiangiogenic therapies: the French multicenter Support for Innovative and Expensive Techniques Study," *Invest Radiol*, vol. 47, pp. 711-6, Dec 2012.
- [4] N. Lassau, *et al.*, "Validation of dynamic contrast-enhanced ultrasound in predicting outcomes of antiangiogenic therapy for solid tumors: the French multicenter support for innovative and expensive techniques study," *Invest Radiol*, vol. 49, pp. 794-800, Dec 2014.
- [5] J. Folkman, "Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors," *Ann Surg*, vol. 175, pp. 409-16, Mar 1972.
- [6] D. M. McDonald and P. Baluk, "Significance of blood vessel leakiness in cancer," *Cancer Res*, vol. 62, pp. 5381-5, Sep 15 2002.
- [7] G. Bergers, *et al.*, "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis," *Nat Cell Biol*, vol. 2, pp. 737-44, Oct 2000.
- [8] D. M. McDonald and P. L. Choyke, "Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic," *Nat Med*, vol. 9, pp. 713-25, Jun 2003.
- [9] P. Baluk, *et al.*, "Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer," *Curr Opin Genet Dev*, vol. 15, pp. 102-11, Feb 2005.
- [10] J. A. Nagy, *et al.*, "Heterogeneity of the tumor vasculature," *Semin Thromb Hemost*, vol. 36, pp. 321-31, Apr 2010.
- [11] D. Fukumura, *et al.*, "Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models," *Microcirculation*, vol. 17, pp. 206-25, Apr 2010.
- [12] S. K. Stamatelos, *et al.*, "A bioimage informatics based reconstruction of breast tumor microvasculature with computational blood flow predictions," *Microvasc Res*, vol. 91, pp. 8-21, Jan 2014.
- [13] N. Weidner, *et al.*, "Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma," *N Engl J Med*, vol. 324, pp. 1-8, Jan 3 1991.
- [14] F. Mollica, *et al.*, "A model for temporal heterogeneities of tumor blood flow," *Microvasc Res*, vol. 65, pp. 56-60, Jan 2003.
- [15] P. Therasse, *et al.*, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada," *J Natl Cancer Inst*, vol. 92, pp. 205-16, Feb 2 2000.
- [16] A. R. Padhani and K. A. Miles, "Multiparametric imaging of tumor response to therapy," *Radiology*, vol. 256, pp. 348-64, Aug 2010.
- [17] A. R. Padhani and M. Neeman, "Challenges for imaging angiogenesis," *Br J Radiol*, vol. 74, pp. 886-90, Oct 2001.
- [18] P. S. T. J P B O'Connord, "Dynamic contrast-enhanced imaging techniques: CT and MRI," *The British Journal of Radiology*, vol. 84, pp. S112-S120, 2011.
- [19] K. L. Peterson, *et al.*, "Quantitative assessment of blood volume, blood flow, and permeability of the brain of clinically normal dogs by use of dynamic contrast-enhanced computed tomography," *Am J Vet Res*, vol. 69, pp. 45-50, Jan 2008.
- [20] W. van Elmpt, *et al.*, "Multiparametric imaging of patient and tumour heterogeneity in non-small-cell lung cancer: quantification of tumour hypoxia, metabolism and perfusion," *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, Sep 4 2015.
- [21] P. G. Qiao, *et al.*, "Early evaluation of targeted therapy effectiveness in non-small cell lung cancer by dynamic contrast-enhanced CT," *Clin Transl Oncol*, Aug 5 2015.

- [22] Y. S. Sung, *et al.*, "Dynamic contrast-enhanced MRI for oncology drug development," *J Magn Reson Imaging*, Feb 8 2016.
- [23] L. A. Brandao, *et al.*, "Brain tumors: a multimodality approach with diffusion-weighted imaging, diffusion tensor imaging, magnetic resonance spectroscopy, dynamic susceptibility contrast and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging," *Magn Reson Imaging Clin N Am*, vol. 21, pp. 199-239, May 2013.
- [24] K. Chen, *et al.*, "Quantitative PET imaging of VEGF receptor expression," *Mol Imaging Biol*, vol. 11, pp. 15-22, Jan-Feb 2009.
- [25] H. Kurihara, *et al.*, "Radiolabelled agents for PET imaging of tumor hypoxia," *Curr Med Chem*, vol. 19, pp. 3282-9, 2012.
- [26] G. Komar, *et al.*, "Decreased blood flow with increased metabolic activity: a novel sign of pancreatic tumor aggressiveness," *Clin Cancer Res*, vol. 15, pp. 5511-7, Sep 1 2009.
- [27] H. Anderson and P. Price, "Clinical measurement of blood flow in tumours using positron emission tomography: a review," *Nucl Med Commun*, vol. 23, pp. 131-8, Feb 2002.
- [28] N. Lassau, *et al.*, "New hemodynamic approach to angiogenesis: color and pulsed Doppler ultrasonography," *Invest Radiol*, vol. 34, pp. 194-8, Mar 1999.
- [29] N. Lassau, *et al.*, "Evaluation of contrast-enhanced color Doppler ultrasound for the quantification of angiogenesis in vivo," *Invest Radiol*, vol. 36, pp. 50-5, Jan 2001.
- [30] R. Gramiak and P. M. Shah, "Echocardiography of the aortic root," *Invest Radiol*, vol. 3, pp. 356-66, Sep-Oct 1968.
- [31] D. R. Morel, *et al.*, "Human pharmacokinetics and safety evaluation of SonoVue, a new contrast agent for ultrasound imaging," *Invest Radiol*, vol. 35, pp. 80-5, Jan 2000.
- [32] Correas J.-M., Tranquart F, Bouakaz A., "Echographie de contraste : Méthodologie et applications cliniques.," *Springer*, 2007.
- [33] M. Krix, *et al.*, "A multivessel model describing replenishment kinetics of ultrasound contrast agent for quantification of tissue perfusion," *Ultrasound Med Biol*, vol. 29, pp. 1421-30, Oct 2003.
- [34] K. Wei, *et al.*, "Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of microbubbles administered as a constant venous infusion," *Circulation*, vol. 97, pp. 473-83, Feb 10 1998.
- [35] H. Chen, *et al.*, "Preliminary observations on the spatial correlation between short-burst microbubble oscillations and vascular bioeffects," *Ultrasound Med Biol*, vol. 38, pp. 2151-62, Dec 2012.
- [36] J. Eydling, *et al.*, "Parameters of cerebral perfusion in phase-inversion harmonic imaging (PIHI) ultrasound examinations," *Ultrasound Med Biol*, vol. 29, pp. 1379-85, Oct 2003.
- [37] F. Forsberg, *et al.*, "Assessment of angiogenesis: implications for ultrasound imaging," *Ultrasonics*, vol. 42, pp. 325-30, Apr 2004.
- [38] T. Schlosser, *et al.*, "[Determination of the renal blood flow in macro- and microcirculation by means of pulse inversion imaging]," *Rofo*, vol. 176, pp. 724-30, May 2004.
- [39] J. R. Eisenbrey, *et al.*, "Recent Experiences and Advances in Contrast-Enhanced Subharmonic Ultrasound," *Biomed Res Int*, vol. 2015, p. 640397, 2015.
- [40] M. Claudon, *et al.*, "Guidelines and good clinical practice recommendations for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) in the liver - update 2012: A WFUMB-EFSUMB initiative in cooperation with representatives of AFSUMB, AIUM, ASUM, FLAUS and ICUS," *Ultrasound Med Biol*, vol. 39, pp. 187-210, Feb 2013.
- [41] N. Lassau, *et al.*, "Gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib: monitoring response with contrast-enhanced sonography," *AJR Am J Roentgenol*, vol. 187, pp. 1267-73, Nov 2006.
- [42] M. Lamuraglia, *et al.*, "To predict progression-free survival and overall survival in metastatic renal cancer treated with sorafenib: pilot study using dynamic contrast-enhanced Doppler ultrasound," *Eur J Cancer*, vol. 42, pp. 2472-9, Oct 2006.

- [43] N. Lassau, *et al.*, "Advanced hepatocellular carcinoma: early evaluation of response to bevacizumab therapy at dynamic contrast-enhanced US with quantification--preliminary results," *Radiology*, vol. 258, pp. 291-300, Jan 2011.
- [44] N. Lassau, *et al.*, "Metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib: early evaluation of treatment response using dynamic contrast-enhanced ultrasonography," *Clin Cancer Res*, vol. 16, pp. 1216-25, Feb 15 2010.
- [45] N. Lassau, *et al.*, "Quantitative functional imaging by dynamic contrast enhanced ultrasonography (DCE-US) in GIST patients treated with masatinib," *Invest New Drugs*, vol. 30, pp. 765-71, Apr 2012.
- [46] V. Lazar, *et al.*, "Sorafenib plus dacarbazine in solid tumors: a phase I study with dynamic contrast-enhanced ultrasonography and genomic analysis of sequential tumor biopsy samples," *Invest New Drugs*, vol. 32, pp. 312-22, Apr 2014.
- [47] E. Frampas, *et al.*, "Advanced Hepatocellular Carcinoma: early evaluation of response to targeted therapy and prognostic value of Perfusion CT and Dynamic Contrast Enhanced-Ultrasound. Preliminary results," *Eur J Radiol*, vol. 82, pp. e205-11, May 2013.
- [48] C. F. Dietrich, *et al.*, "An EFSUMB introduction into Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound (DCE-US) for quantification of tumour perfusion," *Ultraschall Med*, vol. 33, pp. 344-51, Aug 2012.
- [49] F. Piscaglia, *et al.*, "The EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Practice of Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS): update 2011 on non-hepatic applications," *Ultraschall Med*, vol. 33, pp. 33-59, Feb 2012.
- [50] O. Lucidarme, *et al.*, "Validation of ultrasound contrast destruction imaging for flow quantification," *Ultrasound Med Biol*, vol. 29, pp. 1697-704, Dec 2003.
- [51] J. Eyding, *et al.*, "Contrast burst depletion imaging (CODIM): a new imaging procedure and analysis method for semiquantitative ultrasonic perfusion imaging," *Stroke*, vol. 34, pp. 77-83, Jan 2003.
- [52] J. Eyding, *et al.*, "Validation of the depletion kinetic in semiquantitative ultrasonographic cerebral perfusion imaging using 2 different techniques of data acquisition," *J Ultrasound Med*, vol. 23, pp. 1035-40, Aug 2004.
- [53] J. M. Hudson, *et al.*, "Dynamic contrast enhanced ultrasound for therapy monitoring," *Eur J Radiol*, vol. 84, pp. 1650-7, Sep 2015.
- [54] C. Strouthos, *et al.*, "Indicator dilution models for the quantification of microvascular blood flow with bolus administration of ultrasound contrast agents," *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 57, pp. 1296-310, Jun 2010.
- [55] Institut Gustave Roussy, 2008, "Procédé et Système de Quantification de Vascularisation Tumorale," *Elie N., Lassau N., Peronneau P., Rouffiac V.*, W0/2008/053268,.
- [56] P. Peronneau, *et al.*, "Contrast ultrasonography: necessity of linear data processing for the quantification of tumor vascularization," *Ultraschall Med*, vol. 31, pp. 370-8, Aug 2010.
- [57] M. Krix, *et al.*, "Comparison of intermittent-bolus contrast imaging with conventional power Doppler sonography: quantification of tumour perfusion in small animals," *Ultrasound Med Biol*, vol. 29, pp. 1093-103, Aug 2003.
- [58] D. Cosgrove, *et al.*, "Quantification of blood flow," *Eur Radiol*, vol. 11, pp. 1338-44, 2001.
- [59] P. Ugolini, *et al.*, "In vitro flow quantification with contrast power Doppler imaging," *Ultrasound Med Biol*, vol. 26, pp. 113-20, Jan 2000.
- [60] M. Gauthier, *et al.*, "Estimation of intra-operator variability in perfusion parameter measurements using DCE-US," *World J Radiol*, vol. 3, pp. 70-81, Mar 28 2011.
- [61] G. M., "Etude de l'influence de l'entrée artérielle tumorale par modélisation numérique et in vitro en imagerie de contraste ultrasonore : application clinique pour l'évaluation des thérapies ciblées en cancérologie.," 2011.
- [62] T. S. Koh, *et al.*, "Assessment of perfusion by dynamic contrast-enhanced imaging using a deconvolution approach based on regression and singular value decomposition," *IEEE Trans Med Imaging*, vol. 23, pp. 1532-42, Dec 2004.

- [63] S. Sourbron, *et al.*, "Pixel-by-pixel deconvolution of bolus-tracking data: optimization and implementation," *Phys Med Biol*, vol. 52, pp. 429-47, Jan 21 2007.
- [64] M. Gauthier, *et al.*, "Assessment of quantitative perfusion parameters by dynamic contrast-enhanced sonography using a deconvolution method: an in vitro and in vivo study," *J Ultrasound Med*, vol. 31, pp. 595-608, Apr 2012.
- [65] C. Pozrikidis, "Numerical simulation of blood flow through microvascular capillary networks," *Bull Math Biol*, vol. 71, pp. 1520-41, Aug 2009.
- [66] A. W. El-Kareh and T. W. Secomb, "A mathematical model for comparison of bolus injection, continuous infusion, and liposomal delivery of doxorubicin to tumor cells," *Neoplasia*, vol. 2, pp. 325-38, Jul-Aug 2000.
- [67] B. C. Fry, *et al.*, "Estimation of blood flow rates in large microvascular networks," *Microcirculation*, vol. 19, pp. 530-8, Aug 2012.
- [68] J. B. Geddes, *et al.*, "Blood flow in microvascular networks: a study in nonlinear biology," *Chaos*, vol. 20, p. 045123, Dec 2010.
- [69] K. Khanafer and R. Berguer, "Fluid-structure interaction analysis of turbulent pulsatile flow within a layered aortic wall as related to aortic dissection," *J Biomech*, vol. 42, pp. 2642-8, Dec 11 2009.
- [70] D. A. Berdajs, *et al.*, "Analysis of flow dynamics in right ventricular outflow tract," *J Surg Res*, vol. 197, pp. 50-7, Jul 2015.
- [71] J. Lantz, *et al.*, "Numerical and experimental assessment of turbulent kinetic energy in an aortic coarctation," *J Biomech*, vol. 46, pp. 1851-8, Jul 26 2013.
- [72] L. J. Olivieri, *et al.*, "Hemodynamic Modeling of Surgically Repaired Coarctation of the Aorta," *Cardiovasc Eng Technol*, vol. 2, pp. 288-295, Dec 2011.
- [73] M. Midulla, *et al.*, "Haemodynamic imaging of thoracic stent-grafts by computational fluid dynamics (CFD): presentation of a patient-specific method combining magnetic resonance imaging and numerical simulations," *Eur Radiol*, vol. 22, pp. 2094-102, Oct 2012.
- [74] T. C. Lucas, *et al.*, "Blood flow in hemodialysis catheters: a numerical simulation and microscopic analysis of in vivo-formed fibrin," *Artif Organs*, vol. 38, pp. 556-65, Jul 2014.
- [75] C. Karmonik, *et al.*, "Influence of LVAD cannula outflow tract location on hemodynamics in the ascending aorta: a patient-specific computational fluid dynamics approach," *ASAIO J*, vol. 58, pp. 562-7, Nov-Dec 2012.
- [76] E. Sirois and W. Sun, "Computational evaluation of platelet activation induced by a bioprosthetic heart valve," *Artif Organs*, vol. 35, pp. 157-65, Feb 2011.
- [77] I. Borazjani, *et al.*, "High-resolution fluid-structure interaction simulations of flow through a bi-leaflet mechanical heart valve in an anatomic aorta," *Ann Biomed Eng*, vol. 38, pp. 326-44, Feb 2010.
- [78] C. Karmonik, *et al.*, "Computational fluid dynamics in patients with continuous-flow left ventricular assist device support show hemodynamic alterations in the ascending aorta," *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 147, pp. 1326-1333 e1, Apr 2014.
- [79] P. G. Menon, *et al.*, "Characterization of neonatal aortic cannula jet flow regimes for improved cardiopulmonary bypass," *J Biomech*, vol. 46, pp. 362-72, Jan 18 2013.
- [80] A. C. Lesart, *et al.*, "On the importance of the submicrovascular network in a computational model of tumour growth," *Microvasc Res*, vol. 84, pp. 188-204, Sep 2012.
- [81] A. Stéphanou, *et al.*, "Mathematical modelling of flow in 2D and 3D vascular networks: Applications to anti-angiogenic and chemotherapeutic drug strategies," *Mathematical and Computer Modelling*, vol. 41, pp. 1137-1156, 2005.
- [82] J. Wu, *et al.*, "Coupled modeling of blood perfusion in intravascular, interstitial spaces in tumor microvasculature," *J Biomech*, vol. 41, pp. 996-1004, 2008.
- [83] J. Wu, *et al.*, "Study of tumor blood perfusion and its variation due to vascular normalization by anti-angiogenic therapy based on 3D angiogenic microvasculature," *J Biomech*, vol. 42, pp. 712-21, Apr 16 2009.

- [84] S. J. Chapman, *et al.*, "Multiscale modeling of fluid transport in tumors," *Bull Math Biol*, vol. 70, pp. 2334-57, Nov 2008.
- [85] R. Karshafian, *et al.*, "Transit time kinetics in ordered and disordered vascular trees," *Phys Med Biol*, vol. 48, pp. 3225-37, Oct 7 2003.
- [86] G. Brix, *et al.*, "On impulse response functions computed from dynamic contrast-enhanced image data by algebraic deconvolution and compartmental modeling," *Phys Med*, vol. 28, pp. 119-28, Apr 2012.
- [87] P. Meier and K. L. Zierler, "On the theory of the indicator-dilution method for measurement of blood flow and volume," *J Appl Physiol*, vol. 6, pp. 731-44, Jun 1954.
- [88] N. Tateishi, *et al.*, "Flow dynamics of erythrocytes in microvessels of isolated rabbit mesentery: cell-free layer and flow resistance," *J Biomech*, vol. 27, pp. 1119-25, Sep 1994.
- [89] S. Yamaguchi, *et al.*, "Cell-free plasma layer in cerebral microvessels," *Biorheology*, vol. 29, pp. 251-60, Mar-Jun 1992.
- [90] C. D. Murray, "A Relationship between Circumference and Weight in Trees and Its Bearing on Branching Angles," *J Gen Physiol*, vol. 10, pp. 725-9, May 20 1927.
- [91] H. Mulvana, *et al.*, "Temperature dependent behavior of ultrasound contrast agents," *Ultrasound Med Biol*, vol. 36, pp. 925-34, Jun 2010.
- [92] A. D. Anastasiou *et al.*, "Experimental study of pulsatile blood flow in micro channels.," *ECCE 7*, 2010.
- [93] P. R. Hoskins, "Simulation and validation of arterial ultrasound imaging and blood flow," *Ultrasound Med Biol*, vol. 34, pp. 693-717, May 2008.
- [94] D. M. Brizel, *et al.*, "A comparison of tumor and normal tissue microvascular hematocrits and red cell fluxes in a rat window chamber model," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 25, pp. 269-76, Jan 15 1993.
- [95] W. S. Kamoun, *et al.*, "Simultaneous measurement of RBC velocity, flux, hematocrit and shear rate in vascular networks," *Nat Methods*, vol. 7, pp. 655-60, Aug 2010.
- [96] L. Claassen, *et al.*, "Quantification of flow rates using harmonic grey-scale imaging and an ultrasound contrast agent: an in vitro and in vivo study," *Ultrasound Med Biol*, vol. 27, pp. 83-8, Jan 2001.
- [97] P. C. Li, *et al.*, "Time-intensity-based volumetric flow measurements: an in vitro study," *Ultrasound Med Biol*, vol. 28, pp. 349-58, Mar 2002.
- [98] M. Mezl, *et al.*, "Absolute ultrasound perfusion parameter quantification of a tissue-mimicking phantom using bolus tracking [Correspondence]," *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 62, pp. 983-7, May 2015.
- [99] F. M. Yakes, *et al.*, "Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth," *Mol Cancer Ther*, vol. 10, pp. 2298-308, Dec 2011.
- [100] D. C. Smith, *et al.*, "Cabozantinib in patients with advanced prostate cancer: results of a phase II randomized discontinuation trial," *J Clin Oncol*, vol. 31, pp. 412-9, Feb 1 2013.
- [101] W. K. You, *et al.*, "VEGF and c-Met blockade amplify angiogenesis inhibition in pancreatic islet cancer," *Cancer Res*, vol. 71, pp. 4758-68, Jul 15 2011.
- [102] F. Bentzien, *et al.*, "In vitro and in vivo activity of cabozantinib (XL184), an inhibitor of RET, MET, and VEGFR2, in a model of medullary thyroid cancer," *Thyroid*, vol. 23, pp. 1569-77, Dec 2013.
- [103] J. Dai, *et al.*, "Cabozantinib inhibits prostate cancer growth and prevents tumor-induced bone lesions," *Clin Cancer Res*, vol. 20, pp. 617-30, Feb 1 2014.
- [104] T. J. Graham, *et al.*, "Preclinical evaluation of imaging biomarkers for prostate cancer bone metastasis and response to cabozantinib," *J Natl Cancer Inst*, vol. 106, p. dju033, Apr 2014.
- [105] M. Gauthier, *et al.*, "Impact of the arterial input function on microvascularization parameter measurements using dynamic contrast-enhanced ultrasonography," *World J Radiol*, vol. 4, pp. 291-301, Jul 28 2012.

- [106] S. Lavis, *et al.*, "Early quantitative evaluation of a tumor vasculature disruptive agent AVE8062 using dynamic contrast-enhanced ultrasonography," *Invest Radiol*, vol. 43, pp. 100-11, Feb 2008.
- [107] F. Calamante, *et al.*, "Quantification of bolus-tracking MRI: Improved characterization of the tissue residue function using Tikhonov regularization," *Magn Reson Med*, vol. 50, pp. 1237-47, Dec 2003.
- [108] K. E. Torres, *et al.*, "Activated MET is a molecular prognosticator and potential therapeutic target for malignant peripheral nerve sheath tumors," *Clin Cancer Res*, vol. 17, pp. 3943-55, Jun 15 2011.
- [109] J. H. Zhou, *et al.*, "Contrast-enhanced ultrasonic parametric perfusion imaging in the evaluation of antiangiogenic tumor treatment," *Eur J Radiol*, vol. 81, pp. 1360-5, Jun 2012.
- [110] K. Maheo, *et al.*, "Non-invasive quantification of tumor vascular architecture during docetaxel-chemotherapy," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 134, pp. 1013-25, Aug 2012.

Table des figures

Figure 1 : Oscillations volumétriques de la microbulle en fonction de la pression appliquée.....	20
Figure 2 : Section efficace de diffusion en fonction de la fréquence pour trois microbulles de tailles différentes.	21
Figure 3 : Principe de l'imagerie par inversion de phase.....	23
Figure 4 : Principe de l'imagerie par modulation d'amplitude.....	24
Figure 5 : Principe de l'imagerie par modulation d'amplitude et de phase.....	25
Figure 6 : Courbe de l'intensité de contraste en fonction du temps pour l'approche « replenishment ».....	29
Figure 7 : Courbe de l'intensité de contraste en fonction du temps pour l'Imagerie durant la phase de destruction. Δt est l'intervalle entre deux impulsions acoustiques.....	31
Figure 8 : Courbe représentant l'intensité ultrasonore des microbulles en fonction du temps pour une injection de microbulles en continu.....	33
Figure 9 : Fonction résidue ou courbes déconvoluées pour les méthodes de Tikhonov a) et Truncated SVD b).....	38
Figure 10 : Réflexion spéculaire à l'interface entre deux milieux d'impédances différentes.....	47
Figure 11 : Variations de la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement pour les fluides rhéoépaississants, les fluides Newtoniens et les fluides rhéofluidifiants.....	59
Figure 12 : Courbe de rehaussement du signal ultrasonore obtenue <i>in vitro</i> avec le montage expérimental décrit partie 1.3.1. de ce chapitre.....	64
Figure 13 : Répartition des microbulles sur la face d'entrée de la géométrie a).....	65
Figure 14 : Géométrie du fantôme numérique « bifurcation » de 2 mm de diamètre pour la validation de la modélisation numérique.....	66
Figure 15 : Variation du PI en fonction du nombre de mailles de la géométrie du fantôme « un tube ».....	68
Figure 16 : Maillage couche limite : géométrie « vaisseau droit » et « bifurcation » de 2 mm.....	69
Figure 17 : Maillage raffiné de la bifurcation : géométrie « bifurcation » de 2 mm.....	69
Figure 18 : Image d'une échographie de contraste ultrasonore du fantôme <i>in vitro</i> « un tube » et la courbe de rehaussement des agents de contraste correspondante.....	72
Figure 19 : Image d'une échographie de contraste ultrasonore du fantôme <i>in vitro</i> « deux tubes » et la courbe de rehaussement des agents de contraste correspondante.....	72
Figure 20 : Courbes de rehaussement de la géométrie « deux tubes » avec et sans injecteur automatique a), Courbes de rehaussement de la géométrie « vaisseau droit » pour comparer l'utilisation d'eau avec l'utilisation du mélange eau-glycérine b).....	75
Figure 21 : Photographie de l'injecteur automatique utilisé avec l'emplacement de la seringue.....	75
Figure 22 : Schéma du montage expérimental utilisé pour la validation de la modélisation numérique sur les géométries 2 mm.....	76
Figure 23 : Photographie a) et Schéma du montage expérimental de microfluidique b).....	77
Figure 24 : Photographie du contrôleur de pression.....	77
Figure 25 : Courbes de rehaussement issu des expérimentations DCE-US et de la simulation Fluent pour la géométrie « un vaisseau » pour un débit de 41 mL.min ⁻¹	79

Figure 26 : Courbes de rehaussement issu des expérimentations DCE-US et de la simulation Fluent pour la géométrie « bifurcation » pour un débit de 41 mL.min ⁻¹	80
Figure 27 : Courbes représentant l’AUC a) et le TT b) en fonction de la vitesse pour quatre vitesses (0,13 m.s ⁻¹ , 0,18 m.s ⁻¹ , 0,21 m.s ⁻¹ et 0,29 m.s ⁻¹) pour la géométrie « bifurcation ».	81
Figure 28 : Courbes de rehaussement issu des expérimentations DCE-US et de la simulation Fluent pour le tube de 500 µm de diamètre pour un débit de 1 mL.min ⁻¹	82
Figure 29 : Image ultrasonore d’une tumeur et de l’entrée artérielle correspondante sur une souris a), Courbes représentant le rehaussement du signal ultrasonore dans la tumeur et dans l’entrée artérielle en fonction du temps b).	88
Figure 30 : Schéma illustrant la loi de Murray.	90
Figure 31 : Géométrie des fantômes numériques : « réseau une branche » symétrique a), « réseau deux branches » symétrique b), « réseau trois branches » symétrique c) et « réseau quatre branches » symétrique d).	91
Figure 32 : Courbe de rehaussement brute de l’entrée artérielle pour le réseau une branche a) et des réseaux symétriques, une branche, deux branches, trois branches et quatre branches b) pour une vitesse du sang de 0,03 m.s ⁻¹	93
Figure 33 : AUC a), PI b) et P c) en fonction du volume du réseau (1,84.10 ⁻³ mL, 2,28.10 ⁻³ mL, 2,4.10 ⁻³ mL et 2,54.10 ⁻³ mL) pour une vitesse de sang de 0,03 m.s ⁻¹	94
Figure 34 : T _m a) et TT b) en fonction du volume du réseau (1,84.10 ⁻³ mL, 2,28.10 ⁻³ mL, 2,4.10 ⁻³ mL et 2,54.10 ⁻³ mL) pour une vitesse de sang de 0,03 m.s ⁻¹	95
Figure 35 : VS en mL/100 g a), VS en mL b), FS c) et MTT d) en fonction du volume du réseau (1,84.10 ⁻³ mL, 2,28. 10 ⁻³ mL, 2,4.10 ⁻³ mL et 2,54.10 ⁻³ mL) pour une vitesse de sang de 0,03 m.s ⁻¹	96
Figure 36 : Courbes de rehaussement brutes de l’entrée artérielle a) et du réseau trois branches symétrique b) pour différentes valeurs de vitesse d’écoulement du sang (0,01 m.s ⁻¹ , 0,02 m.s ⁻¹ , 0,03 m.s ⁻¹ et 0,05 m.s ⁻¹).	97
Figure 37 : AUC a), PI b) et la P c) en fonction de la vitesse d’écoulement du sang (0,01 m.s ⁻¹ , 0,02 m.s ⁻¹ , 0,03 m.s ⁻¹ et 0,05 m.s ⁻¹) pour le réseau trois branches symétrique.	98
Figure 38 : T _m a) et TT b) en fonction de la vitesse d’écoulement du sang (0,01 m.s ⁻¹ , 0,02 m.s ⁻¹ , 0,03 m.s ⁻¹ et 0,05 m.s ⁻¹) pour le réseau trois branches symétrique.	99
Figure 39 : VS a), FS b) et MTT c) en fonction de la vitesse d’écoulement du sang (0,01 m.s ⁻¹ , 0,02 m.s ⁻¹ , 0,03 m.s ⁻¹ et 0,05 m.s ⁻¹) pour le réseau trois branches symétrique.	100
Figure 40 : Répartition des souris de l’étude.	108
Figure 41 : Exemple d’une image obtenue en mode B pour déterminer le volume de la tumeur en position longitudinale à D0.	110
Figure 42 : Exemple d’une image obtenue en mode Doppler pour déterminer la position des entrées artérielles en position transversale à D0.	111
Figure 43 : Image ultrasonore en mode B à 12 MHz d’une tumeur de souris à D0 d’un plus grand axe de 0,5 cm segmentée en rouge et son entrée artérielle contourée en vert a). Courbes représentant le rehaussement du signal ultrasonore en fonction du temps dans la tumeur et au niveau de l’entrée artérielle b).	112
Figure 44 : Exemple de courbe de rehaussement du signal ultrasonore en fonction du temps et sa modélisation mathématique pour la méthode semi-quantitative.	113

Figure 45 : Courbe de rehaussement ultrasonore déconvoluée d'une souris à D0 obtenue avec la méthode TSVD.....	114
Figure 46 : Contourage de la tumeur de plus grand axe d'environ 1 cm d'une souris sur une image IRM anatomique de haute résolution T ₁ avant l'injection de l'agent de contraste.	115
Figure 47 : Volumes tumoraux pour les souris ayant reçu la dose de 10 mg.kg ⁻¹ par rapport aux souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± erreur type.	118
Figure 48 : Le nombre de vaisseaux en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 10 mg.kg ⁻¹ et les souris contrôles.	120
Figure 49 : L'AUC a), le PI b) et la P c) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 10 mg.kg ⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± erreur type. Les valeurs de p<0,05 sont également indiquées par une *.	121
Figure 50 : Le T _m a) et le TT b) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 10 mg.kg ⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± erreur type. Les valeurs de p<0,05 sont également indiquées par une *.	122
Figure 51 : Le VS a), le FS b) et le MTT c) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 10 mg.kg ⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± erreur type. Les valeurs de p<0,05 sont également indiquées par une *.	123
Figure 52 : Volumes tumoraux pour les souris ayant reçu la dose de 30 mg.kg ⁻¹ par rapport aux souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± erreur type. Les valeurs de p<0,05 sont également indiquées par une *.	125
Figure 53 : Le nombre de vaisseaux en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 30 mg.kg ⁻¹ et les souris contrôles.	126
Figure 54 : L'AUC a), le PI b) et la P c) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 30 mg.kg ⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± erreur type. Les valeurs de p<0,05 sont également indiquées par une *.	127
Figure 55 : Le TT a) et le T _m b) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 30 mg.kg ⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± erreur type. Les valeurs de p<0,05 sont également indiquées par une *.	128
Figure 56 : Le VS a), le FS b) et le MTT c) en fonction du jour d'examen pour les souris traitées avec la dose à 30 mg.kg ⁻¹ et les souris contrôles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± erreur type. Les valeurs de p<0,05 sont également indiquées par une *.	129
Figure 57 : Rehaussement relatif en IRM en fonction du temps pour les souris traitées avec 30 mg.kg ⁻¹ et les souris contrôles à D0.	131
Figure 58 : Rehaussement relatif en IRM en fonction du temps pour les souris traitées avec 30 mg.kg ⁻¹ et les souris contrôles à D14.	132
Figure 59 : Image d'une coupe histologique du marquage CD34 pour une souris contrôle à la dose à 30 mg.kg ⁻¹ . On remarque l'importante présence de nécrose au centre de l'image.....	133

Table des tableaux

Tableau 1 : Paramètres caractérisant la vascularisation tumorale obtenus par les différentes techniques d'imagerie fonctionnelles.....	14
Tableau 2 : Agents de contraste ultrasonore commercialisés dans le monde.....	20
Tableau 3 : Célérité pour différents tissus considérés.	44
Tableau 4 : Impédance acoustique pour différentes tissus considérés.	45
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des grandeurs prises en compte pour les deux échelles étudiées...	61
Tableau 6 : Tableau représentant les différentes caractéristiques des maillages des différentes géométries des fantômes.....	68
Tableau 7 : Tableau représentant les différentes caractéristiques des maillages des réseaux.	91
Tableau 8 : Récapitulatif des valeurs de Δ pour les paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs. ...	101
Tableau 9 : Nombre de souris pris en compte pour les calculs des volumes tumoraux pour la dose à 10 mg.kg ⁻¹	117
Tableau 10 : Récapitulatif des valeurs de volumes tumoraux pour chaque dose et à chaque temps d'évaluation.....	119
Tableau 11 : Récapitulatif du nombre de vaisseaux.	120
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des paramètres quantitatifs et semi-quantitatifs pour la dose à 10 mg.kg ⁻¹	124
Tableau 13 : Nombre de souris pris en compte pour les calculs des volumes tumoraux pour la dose à 30 mg.kg ⁻¹	124
Tableau 14 : Tableau présentant les nombres de souris pris en compte pour les calculs des paramètres semi-quantitatifs pour la dose à 30 mg.kg ⁻¹	129
Tableau 15 : Tableau récapitulatif des paramètres semi-quantitatifs et quantitatifs pour la dose à 30 mg.kg ⁻¹	130
Tableau 16 : Tableau présentant les nombres de souris pris en compte pour l'étude de la vascularisation en IRM pour la dose à 30 mg.kg ⁻¹	131

Liste des congrès/publication/prix

- Communications orales et posters dans des congrès nationaux :

Boyer L, Le Notre P, Thomas S, Leguerney I, Lassau N, Pitre-Champagnat S. Numerical modeling of the dynamic of ultrasound contrast agents in a vascular network: Validation study. Société de Biomécanique (SB), 4 au 6 septembre 2013, Marseille. (Poster).

Boyer L, Thomas S, Leguerney I, Lassau N, Pitre-Champagnat S. Numerical modeling of the dynamic of ultrasound contrast agents in a vascular network. GDR MecaBio, 24 au 25 juin 2014, Paris. (Poster).

Boyer L, Thomas S, Leguerney I, Lassau N, Pitre-Champagnat S. Numerical modeling of the flow of ultrasound contrast agents in tumor microvasculature. Société de Biomécanique (SB), 27 au 29 août 2014, Valenciennes. (Présentation orale).

- Communications orales et posters dans des congrès internationaux :

Boyer L, Le Notre P, Thomas S, Leguerney I, Lassau N, Pitre-Champagnat S. Numerical modeling of the dynamic of ultrasound contrast agents in a vascular network: Validation study. IEEE International Ultrasonics Symposium, 21 au 25 juillet 2013, Prague. (Poster).

Boyer L, Le Notre P, Thomas S, Leguerney I, Lassau N, Pitre-Champagnat S. Numerical modeling of the dynamic of ultrasound contrast agents in a vascular network: Validation study. Radiological Society of North America (RSNA), 1^{er} au 6 décembre 2013, Chicago. (Poster).

Boyer L, Thomas S, Leguerney I, Lassau N, Pitre-Champagnat S. Numerical modeling of the dynamic of ultrasound contrast agents in the vascular network. Radiological Society of North America (RSNA), 30 novembre au 5 décembre 2014, Chicago. (Présentation orale).

Boyer L, Thomas S, Leguerney I, Lassau N, Pitre-Champagnat S. Numerical modeling of the flow of ultrasound contrast agents in tumor microvasculature. American Institute of Ultrasound in Medicine (AIUM), 21 au 25 mars 2015, Orlando. (Présentation orale).

- Publication :

Boyer L, Thomas S, Leguerney I, Lassau N, Pitre-Champagnat S. "Numerical modelling of the flow of the ultrasound contrast agents in tumour microvasculature," *Comput Methods Biomech Biomed Engin*, vol. 17 Suppl 1, pp. 18-9, 2014.

- Prix :
« New Investigator Honorable Mention – Basic Science »
Prix décerné par l'AIUM (American Institut of Ultrasound in Medicine). Mars 2015, Orlando.

Titre : Imagerie multiparamétrique en échographie de contraste (DCE-US) pour caractériser la vascularisation tumorale : de la modélisation numérique à l'expérimentation préclinique.

Mots clés : Modélisation numérique, DCE-US, angiogénèse.

L'évaluation de la vascularisation tumorale par l'échographie de contraste ultrasonore a montré son intérêt pour déterminer l'efficacité des traitements anti-angiogéniques. Malgré tout, cette technique suscite de nombreux questionnements concernant la sensibilité des méthodes de quantification du signal ultrasonore. Pour répondre à cette problématique, il a été question dans cette thèse de développer la première modélisation numérique de l'écoulement du sang et des agents de contraste dans des réseaux vasculaires pour étudier les méthodes de quantification du signal ultrasonore et leurs sensibilités par rapport à des variations de volume du réseau tumoral et des vitesses du sang. Une première étape de la thèse a consisté à valider, par une comparaison expérimentale, les hypothèses faites pour la modélisation numérique et principalement la prise en compte du sang comme un fluide Newtonien homogène.

La modélisation numérique a permis de mettre en évidence les paramètres les plus sensibles aux modifications du débit vasculaire tumorale que sont l'aire sous la courbe, le rehaussement maximal et la pente de la courbe de rehaussement du signal dans le cadre de la méthode semi-quantitative. Lorsqu'il s'agit de suivre les variations du volume vasculaire tumoral, il apparaît que la méthode quantitative par déconvolution de la fonction artérielle est plus sensible. Les méthodes de quantification ont également été étudiées par le biais d'une étude *in vivo* sur 44 souris. Cette approche numérique de l'écoulement des agents de contraste est prometteuse et peut permettre à terme une évaluation plus large des autres méthodes de quantification développées à ce jour pour l'échographie de contraste.

Title : Multiparametric imaging in Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasonography (DCE-US) to characterize tumor vasculature : from numerical modeling to preclinical testing.

Keywords : Numerical modeling, DCE-US, angiogenesis.

Evaluation of tumor vascularization by dynamic contrast-enhanced ultrasonography showed interest for the assessment of the effectiveness of anti-angiogenic treatments. Nevertheless, this technique raises many questions about the sensitivity of quantification methods of the ultrasound signal. To address this issue, this thesis focused on the development of the first digital modeling of blood flow and contrast agents in vascular networks to study the methods of quantification of the ultrasound signal and their sensitivity according to variations of tumor network volume and blood velocity. A first step of the thesis was to validate by an experimental comparison, the assumptions of the digital modeling and mainly the taking into account of the blood as a homogeneous Newtonian fluid.

Digital modeling allowed to highlight parameters sensitive to the modification of the blood flow which are in the case of the semi-quantitative method the area under the enhancement curve, the maximum of the enhancement curve and the slope of the enhancement curve. When it comes to follow variations of the tumor vascular volume, it appears that the quantitative method by deconvolution of the arterial function is more sensitive. The quantification methods have also been investigated through an *in vivo* study of 44 mice. This digital approach of the flow of the contrast agents is promising and may eventually enable a more extensive evaluation of other quantification methods developed in dynamic contrast-enhanced ultrasonography to date.