



HAL
open science

Caractérisation par imagerie par Tomographie par Emission de position de la réponse tumorale après traitement de l'hépatocarcinome chez le petit animal : chimiothérapie, protonthérapie et potentialisation

Nastassja Muller

► **To cite this version:**

Nastassja Muller. Caractérisation par imagerie par Tomographie par Emission de position de la réponse tumorale après traitement de l'hépatocarcinome chez le petit animal : chimiothérapie, protonthérapie et potentialisation. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAE024 . tel-02497001

HAL Id: tel-02497001

<https://theses.hal.science/tel-02497001>

Submitted on 3 Mar 2020

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

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

ÉCOLE DOCTORALE Physique et Chimie-Physique (ED 182)
IPHC UMR7178

THÈSE présentée par :
Nastassja Muller

soutenue le : **9 septembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Physique et Ingénierie

**Caractérisation par imagerie par Tomographie
par Emission de Positons de la réponse
tumorale après traitement de l'hépatocarcinome
chez le petit animal : chimiothérapie,
protonthérapie et potentialisation**

THÈSE dirigée par :

Pr. LAQUERRIERE Patrice

Professeur des Universités, UNISTRA, Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. BORDENAVE Laurence

Praticien Hospitalier-Professeur Universitaire,
CHU, Bordeaux

Pr. KARCHER Gilles

Praticien Hospitalier-Professeur Universitaire,
CHU, Nancy

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. BRASSE David

Directeur de recherche, IPHC, Strasbourg

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Patrice Laquerriere, pour m'avoir initialement proposé de participer à cette grande aventure, et du temps qu'il m'a accordé pour mener à bien ce travail, m'aiguiller, me conseiller et me rappeler de penser différemment, un peu moins comme un clinicien mais plus comme un chercheur.

Je tiens à remercier David Brasse, pour son accueil au sein de l'équipe d'imagerie moléculaire du Département de Radiobiologie et d'Imagerie Moléculaire de l'IPHC et pour m'avoir permis de réaliser mon travail de thèse en parallèle du projet rpPET, pour les débats d'idées parfois soutenus mais m'ayant permis d'élargir mon champ de réflexion, et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'exprime également ma gratitude au Professeur Bordenave et au Professeur Karcher, pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je souhaite remercier particulièrement Patrice Marchand, Lionel Thomas et Bruno Jessel sans qui toute la partie expérimentale de ce travail n'aurait pas été possible, merci pour ce qu'ils m'ont appris et pour leur disponibilité.

Merci aux membres de la plateforme CYRCE et particulièrement à Monsieur Michel Pellicioli, pour avoir coordonné les irradiations protons.

Merci également aux autres membres du DRHIM pour leur aide, leur accueil et leur bonne humeur : Marc Rousseau, Frederic Boisson, Virgile Bekaert, Christian Finck, Marie Vanstalle, Jean-Michel Gallone, Ali Ouadi, Nicolas Chevillon.

J'adresse mes remerciements au Docteur Gerlinde Lang-Averous, Praticien Hospitalier du Département de Pathologie du CHU de Strasbourg, pour avoir accepté de réaliser les études anatomopathologiques de ce travail.

Je remercie également l'Institut National de lutte contre le Cancer, partenaire du projet rpPET.

Merci aussi au Docteur Didon-Poncelet Anne, chef du service de Médecine Nucléaire du Centre Hospitalier de Haguenau, pour m'avoir soutenue dans ce projet malgré le temps pris en parallèle de mon travail Hospitalier.

Merci au Docteur Clémentine Abt pour la relecture appliquée de ce manuscrit.

Merci à mes proches qui ont fait de moi ce que je suis, et qui m'ont soutenue dans mes choix.

Table des Matières

Liste des principales abréviations.....	11
Index des Figures et Tableaux	13
Introduction.....	17
I. Imagerie par Tomographie par Emission de Positons.....	19
1. Principes de la Tomographie par émission de positons.....	19
1.1. Principes physiques	19
1.1.1 Conditions chronologiques.....	19
1.1.2 Conditions géométriques	20
1.2. Résolution spatiale : limites physiques	21
1.2.1 Libre parcours moyen du positon.....	21
1.2.2 Colinéarité	22
1.3. Post-traitement	22
1.3.1 Reconstruction tomographique	22
1.3.2 Correction d'atténuation et de diffusion	22
1.3.3 Correction d'atténuation.....	22
1.3.4 Correction du diffusé.....	23
1.3.5 Correction du temps mort.....	23
1.4. Principes biologiques.....	23
1.5. Quantification.....	24
1.5.1 Standardized Uptake Value (SUV)	24
1.5.2 Correction de la décroissance	24
1.5.3 Effet de volume partiel.....	25
2. Métabolisme glucidique : ¹⁸ F-FDG.....	25
2.1. Physiopathologie	25
2.2. Excrétion physiologique et pièges diagnostiques	27
2.3. Indications oncologiques.....	28
3. Prolifération : ¹⁸ F-FLT.....	28
3.1. Physiopathologie	28
3.2. Excrétion physiologique et pièges diagnostiques	30
3.3. Indications oncologiques.....	31
4. Autres traceurs TEP	31
II. Carcinome hépatocellulaire	33
1. Epidémiologie.....	33

2.	Facteurs de risque	33
2.1.	La cirrhose	33
2.2.	Hépatites virales	34
2.3.	Carcinogènes environnementaux et chimiques	34
2.4.	Troubles métaboliques.....	34
3.	Dépistage.....	34
4.	Diagnostic	35
4.1.	Diagnostic anatomopathologique	35
4.2.	Diagnostic non invasif.....	35
5.	Bilan d'extension initial	36
6.	Traitements	37
6.1.	Traitements curatifs	38
6.1.1	La résection	38
6.1.2	La transplantation hépatique	38
6.1.3	Traitements percutanés	39
6.2.	Traitements palliatifs.....	39
6.2.1	Traitements locaux.....	39
6.2.2	Traitements systémiques	40
7.	Surveillance	41
8.	Modèle murin.....	42
III.	Protonthérapie	43
1.	Protonthérapie aspects physiques.....	43
1.1.	Les rayonnements ionisants.....	43
1.2.	Interaction des rayonnements avec la matière.....	43
1.2.1	Notion de pouvoir d'arrêt	43
1.2.2	Notion de transfert d'énergie linéique (TEL) d'une particule chargée.....	44
1.3.	Cas particulier des protons.....	44
2.	Protonthérapie aspects biologiques.....	45
2.1.	Interaction des rayonnements ionisants avec le vivant.....	45
2.1.1	Interaction indirecte.....	46
2.1.1.1	La radiolyse de l'eau	46
2.1.2	Interaction directe.....	48
2.2.	Effets biologiques des rayonnements ionisants.....	48
2.2.1	Mort cellulaire après irradiation	48
2.2.1.1	Mort par nécrose.....	49
2.2.1.2	Mort par apoptose	49

2.2.1.3.1. Voie intrinsèque	50
2.2.1.3.2. Voie extrinsèque.....	50
2.2.1.3 La mort par autophagie	50
2.2.2 La survie cellulaire	50
2.2.2.1 La sénescence	50
2.2.2.2 Mutation et cancérisation	51
2.3. Notion d'Efficacité Biologique Relative (EBR)	51
2.4. Cas de l'irradiation proton.....	52
2.4.1 EBR.....	52
2.4.2 Lésions de l'ADN	52
2.4.3 Apoptose	53
2.4.4 Angiogenèse	53
2.4.5 Inflammation	53
IV. Matériel et Méthodes	55
1. Modèles.....	55
1.1. Modèle tumoral.....	55
1.2. Modèle animal.....	56
2. Traitements	56
2.1. Chimiothérapie.....	56
2.2. Protonthérapie : production	56
3. Imagerie TEP	58
4. Confrontation à l'anatomopathologie.....	59
5. Protocoles d'expérimentation.....	60
5.1. Protocole chimiothérapie.....	60
5.2. Protocole protonthérapie.....	60
5.3. Protocole potentialisation chimio-protonthérapie	61
6. Traitement des données	62
6.1. Logiciel de traitement des données et paramètres étudiés	62
6.2. Statistiques.....	64
V. Résultats.....	65
1. Volumes tumoraux mesurés	65
2. ¹⁸ F-FDG	66
2.1. Groupe contrôle au ¹⁸ F-FDG	66
2.2. Régions témoins	66
2.3. Chimiothérapie	67
2.3.1 SUVmax	67

2.3.2	SUVmean 40%	68
2.3.3	Volume tumoral 40%.....	69
2.3.4	Index d'activité tumorale	70
2.4.	Protonthérapie	72
2.4.1	SUVmax	72
2.4.2	SUVmean 40%	73
2.4.3	Volume tumoral 40%.....	73
2.4.4	Index d'activité tumorale	74
3.	¹⁸ F-FLT.....	76
3.1.	Groupe contrôle au ¹⁸ F-FLT	76
3.2.	Régions témoins	77
3.3.	Chimiothérapie.....	78
3.3.1	SUVmax	78
3.3.2	SUVmean 40%	79
3.3.3	Volume tumoral 40%.....	80
3.3.4	Index d'activité tumorale	80
3.4.	Protonthérapie	82
3.4.1	SUVmax	82
3.4.2	SUVmean 40%	83
3.4.3	Volume tumoral 40%.....	84
3.4.4	Index d'activité tumorale	85
4.	Potentialisation	87
4.1.	¹⁸ F-FDG.....	87
4.2.	¹⁸ F-FLT	88
5.	Anatomopathologie.....	89
VI.	Discussion	93
1.	Intérêts et limites de l'imagerie au ¹⁸ F-FDG	93
1.1.	Chimiothérapie.....	93
1.2.	Protonthérapie	94
2.	Intérêts et limites de l'imagerie au ¹⁸ F-FLT.....	96
2.1.	Chimiothérapie.....	96
2.2.	Protonthérapie	97
3.	Réponse thérapeutique en cas de potentialisation	98
4.	Ki-67.....	98
VII.	Conclusions et perspectives	101
	ANNEXE I : Interaction rayonnement/matière.....	104

1.	Interaction des photons avec la matière.....	104
1.1.	La diffusion de Thomson-Rayleigh	104
1.2.	L'effet photo-électrique	104
1.3.	La diffusion Compton	104
1.4.	La création de paires	105
2.	Interaction des rayonnements particulaires avec la matière.	105
2.1.	Interaction des électrons avec la matière	105
2.2.	Interaction des particules chargées lourdes avec la matière.....	106
2.2.1	Collision inélastique avec les électrons : excitation, ionisation et capture électronique	106
2.2.2	Collision élastique avec les noyaux.	106
	ANNEXE II : Les dommages cellulaires.....	108
3.	Lésions cytoplasmiques et membranaires	108
4.	Lésions de l'ADN.....	108
4.1.	Ruptures de brin.....	109
4.2.	Altération des bases et des sucres	109
4.3.	Pontages	109
4.4.	Dommages multiples localisés	109
4.5.	Altération des chromosomes	110
4.5.1	Réarrangements intra-chromosomiques	110
4.5.2	Réarrangements inter-chromosomiques	110
4.6.	Effets épigénétiques.....	112
4.7.	Effet Bystander	112
	ANNEXE III : Mécanismes de réparation de l'ADN	114
5.	Réparation par excision de base (Base Excision Repair, BER)	114
6.	Réparation par excision de nucléotides (Nucleotide Excision Repair, NER)	114
7.	Réparation des mésappariements de bases (Mismatch Repair, MMR).....	115
8.	Réparation par suture non-homologue (Non Homologous End-Joining, NHEJ)	117
9.	Réparation par recombinaison homologue (RH)	118
	ANNEXE IV : Effectifs de souris par groupe	120
	Bibliographie :.....	121

Liste des principales abréviations

¹⁸ F-FAZA	¹⁸ F-fluoroazomycine arabinoside
¹⁸ F-FDG	¹⁸ Fluorothymidine
¹⁸ F-FLT	¹⁸ Fluoro-désoxyglucose
¹⁸ F-MISO	¹⁸ F-misonidazole
ADN	Acide-Désoxyribonucléique
AFP	Alpha-foetoprotéine
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
BLCC	Barcelona Clinic Liver Cancer
CHC	Carcinome hépatocellulaire
Cu(II)-ATSM	Copper(II)-diacetyl-bis(N(4)-methylthiosemicarbazone)
CYRCE	CYclorton pour la Recherche et l'Enseignement
EBR	Efficacité Biologique Relative
GLUT	Glucose Transporter
HAS	Haute Autorité de Santé
ICRU	International Commission on Radiation Units and Measurements
IL	Interleukine
INCa	Institut National du Cancer
IPHC	Institut Pluridisciplinaire Huber Curien
IRM	Imagerie par Résonance Nucléaire
PREcy	Plateforme de Radiobiologie Expérimentale auprès de CYRCE
REICIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumours
SOBP	Spread-Out Bragg Peak
SUV	Standardized Uptake Value
SUVmax	Standardized Uptake Value maximale
SUVmean	Standardized Uptake Value moyenne
SUVmean 40%	SUVmean du volume à 40% de la SUV max
TDM	Tomodensitométrie
TEL	Transfert d'Energie Linéique
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TK1	Thyrosine Kinase 1
TS	Thymidine Synthétase
VHB	Virus hépatite B
VHC	Virus hépatite C
Volume tumoral 40%	Volume tumoral à 40% de la SUVmax

Index des Figures et Tableaux

Figure 1: schéma illustrant les vraies coïncidences et les erreurs de localisation	21
Figure 2: exemple d'imagerie TEP au ^{18}F -FDG chez le petit animal, avec hyperfixation physiologique du parenchyme cérébral et du myocarde	26
Figure 3: passage intra-cellulaire et métabolisme du glucose et du ^{18}F -FDG [PETSCANonline.com]	27
Figure 4: voie de recyclage de la thymidine [Université de Genève, Dupertuis YM, http://www.unige.ch]	29
Figure 5: mécanismes menant à l'accumulation intracellulaire du ^{18}F -FLT [American Association for Cancer Research]	30
Figure 6 : exemple d'imagerie TEP au ^{18}F -FLT chez le petit animal, avec élimination physiologique par la vésicule biliaire et la vessie ;	31
Figure 7 : arbre décisionnel pour le diagnostic de CHC [Association Française de Formation Médicale Continue en Hépato-Gastro-Entérologie]	36
Figure 8: formule chimique et mécanisme d'action du Topotécan [http://acces.ens-lyon.fr]	41
Figure 9: courbe de Bragg à 25MeV dans l'eau et dans le plomb [ResearchGate, Benjamin Cheymol]	45
Figure 10: ionisation de la molécule d'eau	46
Figure 11: excitation de la molécule d'eau	46
Figure 12: recombinaisons possibles de la molécule d'eau	47
Figure 13: réactions de l'effet oxygène	47
Figure 14: interaction des radicaux avec l'ADN	48
Figure 15: mécanismes de mort cellulaire [Université Catholique de Louvain]	49
Figure 16: évolution du diamètre tumoral chez la souris nude en fonction du délai post-injection	55
Figure 17 : Principe d'addition des pics de Bragg à différentes énergies pour obtenir le SOBP adapté à la tumeur [Sumitomo Heavy Industries, Ltd]	57
Figure 18: schéma récapitulatif du protocole expérimental de chimiothérapie	60
Figure 19: schéma récapitulatif du protocole expérimental de protonthérapie	61
Figure 20: schéma récapitulatif du protocole expérimental de radio-chimiothérapie	61
Figure 21: visualisation de acquisitions à partir du logiciel Pmod®. A : Maximum Intensity Projection. B a) coupe sagittale, b) coupe frontale, c) coupe axiale. En bleu foncé, contour tumoral. En rose, contour du volume à 40% de la SUVmax. En bleu clair, région témoin de la cuisse controlatérale	62
Figure 22: Principe du seuillage 40%	63
Figure 23: évolution de la moyenne du volume tumoral, en fonction de la dose de chimiothérapie ..	65
Figure 24: évolution de la moyenne du volume tumoral, en fonction de la dose de protonthérapie .	66
Figure 25: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax des régions témoins (RT), au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par chimiothérapie	67
Figure 26: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax des régions témoins (RT), au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par protonthérapie	67
Figure 27: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax, au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle	68
Figure 28: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmean 40%, au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle	69
Figure 29: évolution de la moyenne normalisée du volume tumoral 40%, au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle	70
Figure 30: évolution de la moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale, au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle	71

Figure 31: imagerie du petit animal au ¹⁸ F-FDG au cours du traitement par chimiothérapie pleine dose. La flèche indique la xénogreffe sous-cutanée.	71
Figure 32: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax, au ¹⁸ F-FDG, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle	72
Figure 33: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmean 40%, au ¹⁸ F-FDG, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle	73
Figure 34: évolution de la moyenne normalisée du volume tumoral 40%, au ¹⁸ F-FDG, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle.....	74
Figure 35: évolution de la moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale, au ¹⁸ F-FDG, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle	75
Figure 36: imagerie du petit animal au ¹⁸ F-FDG au cours du traitement par protonthérapie 10 Gy. La flèche indique la xénogreffe sous-cutanée	76
Figure 37: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax des régions témoins (RT), au ¹⁸ F-FLT, des tumeurs traitées par chimiothérapie.....	77
Figure 38: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax des régions témoins, au ¹⁸ F-FLT, des tumeurs traitées par protonthérapie.....	78
Figure 39: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax, au ¹⁸ F-FLT, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle.....	79
Figure 40: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmean 40%, au ¹⁸ F-FLT, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle	79
Figure 41: évolution de la moyenne normalisée du volume tumoral 40%, au ¹⁸ F-FLT, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle	80
Figure 42: évolution de la moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale, au ¹⁸ F-FLT, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle.....	81
Figure 43: imagerie du petit animal au ¹⁸ F-FLT au cours du traitement par chimiothérapie pleine dose. La flèche indique la xénogreffe sous-cutanée.....	81
Figure 44: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax, au ¹⁸ F-FLT, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle	83
Figure 45: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmean 40%, au ¹⁸ F-FLT, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle	84
Figure 46: évolution de la moyenne normalisée du volume tumoral 40%, au ¹⁸ F-FLT, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle.....	85
Figure 47: évolution de la moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale, au ¹⁸ F-FLT, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle.....	86
Figure 48: imagerie du petit animal au ¹⁸ F-FLT au cours du traitement par protonthérapie 20 Gy. La flèche indique la xénogreffe sous-cutanée	86
Figure 49: valeurs absolues des pentes des index d'activité tumorale, au ¹⁸ F-FDG	87
Figure 50: valeurs absolues des pentes des index d'activité tumorale, au ¹⁸ F-FLT.....	88
Figure 51: Coupes anatomopathologiques des tumeurs selon les différents types de traitement. A : coloration Hématoxyline-Eosine x 20. B : coloration Hématoxyline-Eosine x 200. C : immunomarquage Ki-67 x 200.	91
Figure 52: structure de l'ADN [Université Pierre et Marie Curie – Paris].....	108
Figure 53: structure du chromosome [Wikipédia].....	110
Figure 54: exemples de remaniements inter-chromosomiques [Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology].....	111
Figure 55: mécanismes de la réparation par excision de nucléotides	115
Figure 56: mécanismes de la réparation des mésappariements de bases [Kanehisa Laboratories]... ..	116

Figure 57: mécanismes de la réparation par suture non-homologue et de la réparation par recombinaison homologue [Hannes Lans, Jurgen A Marteijn and Wim Vermeulen - BioMed Central] 118

Tableau 1: libre parcours moyen du positon en fonction de son énergie et de l'isotope parent [Master Physique Médicale Lyon - Tomographie d'émission de positons - Irène Buvat] 21

Tableau 2: classification BLCC [Rev Med Suisse 2015; volume 11. 1149-1151]..... 37

Tableau 3: score Child-Pugh [Rev Med Suisse 2010; volume 6. 1803-1808] 38

Tableau 4 : Comparatif des principaux effets d'une irradiation protons par rapport à une irradiation photons. 53

Tableau 5 : Caractéristiques de la caméra TEP petit animal Inviscan® 59

Tableau 6: tableau comparatif statistique des valeurs de mesure des pentes des index d'activité tumorale, au ¹⁸F-FDG 88

Tableau 7: tableau comparatif statistique des valeurs de mesure des index d'activité tumorale, au ¹⁸F-FLT 89

Tableau 8: mesures du Ki-67 des xénogreffes d'hépatocarcinome à J21 [Extrêmes]..... 89

Introduction

La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle employant des radiotraceurs, devenue quasiment incontournable dans le diagnostic, le bilan d'extension initial, le suivi thérapeutique et la recherche de récurrence de nombreuses pathologies oncologiques, dans les pays développés. Les indications de cet examen ne cessent de croître notamment en raison du développement de nouveaux radiotraceurs [1]. Effectivement, si historiquement le ^{18}F -desoxyglucose (^{18}F -FDG), traceur du métabolisme glucidique, a apporté la preuve de son avantage diagnostique dans bon nombre de pathologies oncologiques [2], l'heure est au développement de traceurs plus spécifiques pour une approche théranostique de la maladie. Dans notre étude nous nous intéresserons également à un traceur de la prolifération cellulaire, la ^{18}F -fluorothymidine (^{18}F -FLT). Il existe cependant bien d'autres traceurs et les possibilités diagnostiques et thérapeutiques sont en pleine expansion.

Dans la recherche pour la lutte contre le cancer, de nouvelles thérapeutiques voient le jour pour permettre une prise en charge plus personnalisée du patient et de sa pathologie. En chimiothérapie, les thérapeutiques ciblées ont révolutionné la prise en charge de nombreux cancers [3]. En radiothérapie, l'utilisation de l'irradiation photon a été perfectionnée par l'avènement de nouvelles techniques comme la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité, l'irradiation rotationnelle par tomothérapie et la stéréotaxie. Dernièrement, les équipes de recherche s'intéressent à l'utilisation des protons et des ions lourds en radiothérapie, exploitant leurs propriétés balistiques favorables comparativement aux photons. Dans un rapport de l'Institut National du Cancer (INCa) datant de juin 2016 [4], se basant notamment sur les objectifs du Plan Cancer 2014-2019, l'INCa étudie les opportunités de cette méthode thérapeutique et met en lumière de potentiels axes de recherche et de perfectionnement. C'est ainsi que l'hépatocarcinome, ou carcinome hépatocellulaire (CHC), apparaît comme une pathologie pouvant bénéficier de ces innovations technologiques. Effectivement, il s'agit d'une maladie au pronostic réservé [5], [6], relativement radio-résistante, au sein d'un organe radiosensible, en général fragilisé par des pathologies hépatiques sous-jacentes. Plusieurs équipes de recherche ont travaillé sur la faisabilité et l'efficacité de la protonthérapie ou de l'irradiation aux ions lourds, dans le traitement de l'hépatocarcinome [7]–[16]. L'étude de Sanford et al. Sur la comparaison entre l'irradiation photon X et l'irradiation proton pour le traitement de l'hépatocarcinome chez 133 patients, met en évidence une augmentation significative de la survie globale médiane des patients traités par protonthérapie (31 mois contre 14 mois) en rapport avec la diminution des effets secondaires mais sans incidence sur la récurrence locale. Il s'agit d'une orientation thérapeutique prometteuse.

Cependant, en routine clinique, il est nécessaire de pouvoir évaluer précocement l'efficacité de ces thérapeutiques innovantes. D'autant plus qu'il pourrait exister des traitements de rattrapage en cas d'échec initial. Ce travail est une étude préclinique menée à partir de xénogreffes d'hépatocarcinome chez le petit animal, ayant pour objectif d'évaluer l'utilité de l'imagerie TEP dans le suivi des traitements de l'hépatocarcinome par chimiothérapie conventionnelle, protonthérapie et recherche d'une potentialisation entre ces deux thérapeutiques. Il s'inscrit dans le cadre de l'étude rpPET, menée par L'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) de Strasbourg, de l'imagerie TEP du petit animal en protonthérapie. Mes travaux de recherche se sont articulés autour de trois grands axes.

Premièrement, l'utilisation de l'imagerie TEP au ^{18}F -FDG et au ^{18}F -FLT pour le suivi du traitement par chimiothérapie conventionnelle du CHC. Puis l'imagerie du traitement du CHC par irradiation proton, avec ces mêmes traceurs. Et enfin, la mise en place et l'exécution d'un protocole de recherche dédié au suivi d'un éventuel effet de potentialisation entre ces deux traitements.

I. Imagerie par Tomographie par Emission de Positons

1. Principes de la Tomographie par émission de positons

1.1. Principes physiques

La Médecine nucléaire est une discipline utilisant des atomes radioactifs pour marquer *in vivo* une fonction du corps humain. Pour cela, il existe différents atomes radioactifs : les émetteurs gamma (Thallium 201, Technétium 99 métastable, Gallium 67...), les émetteurs béta – (Yttrium 90) et les émetteurs béta + (Fluor 18, Carbone 11). Certains atomes sont à la fois émetteurs gamma et béta - (Iode 131).

La TEP est une technique d'imagerie nucléaire basée sur la détection des photons d'annihilation émis suite à une dégradation béta + avec création de paires. Les deux photons d'énergie 511keV émis seront détectés par une couronne de détecteurs. Ils seront considérés comme provenant de la même dégradation nucléaire si leur détection respecte les conditions géométriques (émis à environ 180° l'un de l'autre) et les conditions chronologiques (synchronisation d'émission) d'une dégradation nucléaire unique.

1.1.1 Conditions chronologiques

Les photons étant issus d'une même annihilation quelque part à l'intérieur de la couronne de détecteurs, leur détection doit être quasiment synchrone. Effectivement, le temps d'atteindre la couronne de détecteurs pris par chaque photon dépend du positionnement de l'annihilation, mais ne peut pas excéder le temps pris pour parcourir le diamètre de la couronne de détecteurs. Soit, le photon voyageant à la vitesse de la lumière : $t = D/c$. Avec ; t= temps de vol d'un photon, D = diamètre de la couronne de détecteurs, c = vitesse de la lumière. L'acceptation temporelle des photons pour être considérée comme appartenant à la même annihilation, appelée la fenêtre de coïncidence, doit être égale à au moins 2t.

A partir de ce postulat il est possible de préciser la localisation de l'annihilation par rapport aux détecteurs activés par une même annihilation, en considérant que le Δt d'activation entre les deux détecteurs est relié à la différence de trajet parcouru par les deux photons d'annihilation (Δd) avec :

$$\Delta d = \frac{c\Delta t}{2}$$

Préciser la localisation de l'annihilation permet d'augmenter le rapport signal/bruit. Ceci implique que la résolution temporelle du détecteur doit être suffisante pour permettre de discriminer des intervalles de temps de l'ordre de la nanoseconde.

Le TEP petit animal Inviscan® utilisé dans nos expérimentations est équipé d'une couronne de détection de diamètre 80mm. On considère donc un temps de vol t de $2,67 \cdot 10^{-10}$ s.

1.1.2 Conditions géométriques

Les photons issus de l'annihilation étant émis à environ 180° l'un de l'autre, ils doivent être détectés par une paire de détecteurs alignés sur la couronne de détecteurs. C'est ce que l'on appelle une coïncidence vraie. Dans ce cas, l'on en déduit que l'annihilation électron/positon a eu lieu sur le volume linéaire reliant les deux détecteurs.

Or, les photons de 511keV peuvent interagir avec le milieu avant d'arriver aux détecteurs. Lorsqu'il interagit par effet photo-électrique ou diffusion Compton, le photon peut être absorbé par le milieu et ne sera pas détecté par la couronne de détecteurs. Dans ce cas, la coïncidence ne sera plus détectée et l'information d'annihilation perdue. C'est le phénomène d'atténuation du milieu qui dépend de la densité des matériaux traversés.

Il se peut également qu'un photon dévié de sa trajectoire initiale après une diffusion Compton, ne respecte plus l'alignement des photons issus de l'annihilation initiale. Dans ce cas, le photon diffusé émis peut activer un autre détecteur. Le repositionnement théorique de l'annihilation à partir de ces données erronées mène à ce que l'on appelle une coïncidence diffusée (Figure 1), pouvant être à l'origine d'une fausse information sur l'image reconstruite.

Les coïncidences fortuites (Figure 1) correspondent à la détection de deux photons de 511keV par deux détecteurs alignés sur la couronne de détecteurs, dans un délai de temps respectant les conditions chronologiques, mais n'appartenant pas à la même annihilation. Les coïncidences fortuites peuvent également être responsables d'une fausse information dans l'image reconstruite. Le nombre de coïncidences fortuites est proportionnel au carré de l'activité injectée, et dépend de la largeur de la fenêtre en énergie choisie comme condition chronologique.

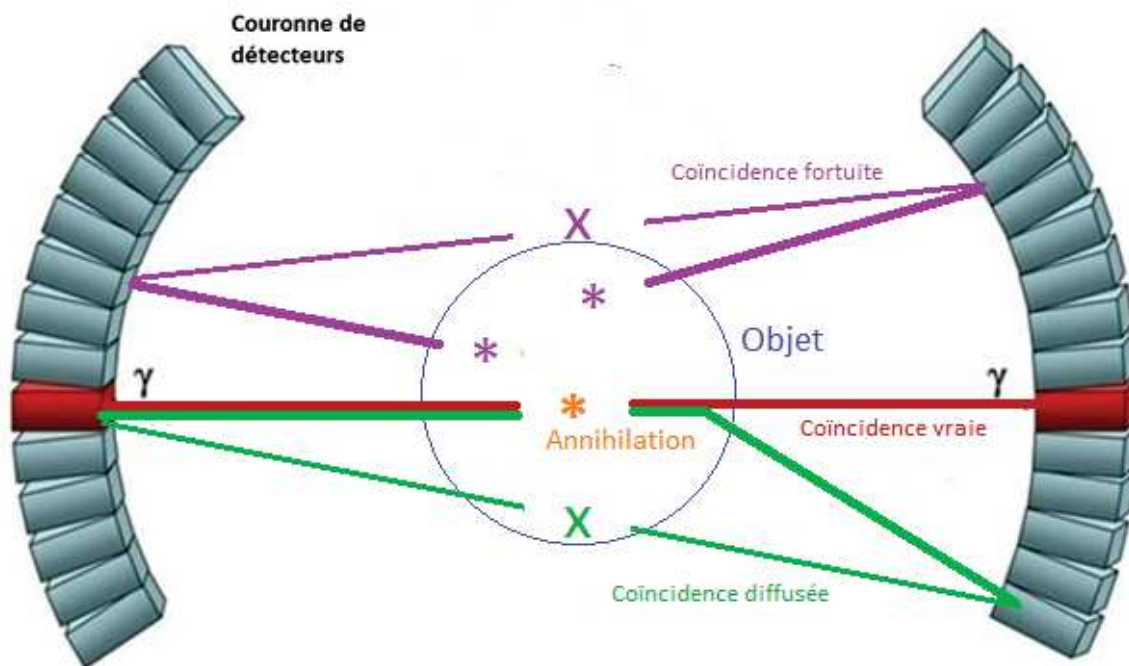


Figure 1: schéma illustrant les vraies coïncidences et les erreurs de localisation

1.2. Résolution spatiale : limites physiques

1.2.1 Libre parcours moyen du positon

L'information recueillie par la détection TEP après reconstruction correspond à la localisation de l'annihilation. Or, l'information nécessaire est en fait la localisation de la désintégration nucléaire avant le libre parcours moyen du positon dans la matière. Ce libre parcours moyen dépend du matériau traversé et du type d'atome radioactif. On privilégiera donc en imagerie TEP les radionucléides pour lesquels l'énergie cinétique moyenne du positon émis est la plus faible, limitant le libre parcours moyen. Pour le Fluor 18, le libre parcours moyen théorique dans l'eau est de 0,6mm (Tableau 1). Expérimentalement, sa mesure se rapproche de 0,1mm.

Isotope	¹¹ C	¹⁵ O	¹⁸ F
Energie cinétique théorique (en MeV)	0,39	0,73	0,25
Libre parcours moyen dans l'eau (en mm)	1,1	2,7	0,6

Tableau 1: libre parcours moyen du positon en fonction de son énergie et de l'isotope parent [Master Physique Médicale Lyon - Tomographie d'émission de positons - Irène Buvat]

1.2.2 Colinéarité

Les deux photons de 511KeV émis lors de la désintégration nucléaire ne sont en fait pas parfaitement colinéaires. On estime la non-colinéarité à $180^\circ \pm 6^\circ$. Il en résulte que l'incertitude sur la localisation de l'annihilation dépend de la distance désintégration/détecteur et donc du diamètre de la couronne de détecteurs.

1.3. Post-traitement

1.3.1 Reconstruction tomographique

La reconstruction des images TEP peut être réalisée suivant une méthode de reconstruction analytique ou itérative. Le principal exemple de méthode de reconstruction analytique est la rétroprojection filtrée. Les méthodes itératives sont actuellement préférées car elles permettent d'intégrer un opérateur de projection corrigeant les principales limites de l'images TEP (diffusion, atténuation...). Parmi les méthodes itératives sont différenciées les méthodes algébriques des méthodes statistiques. Le principal inconvénient de ces méthodes est la longueur des temps de calcul. C'est pourquoi, les algorithmes statistiques de type OSEM divisant en sous-ensembles le calcul, sont utilisés pour permettre d'augmenter la vitesse de reconstruction.

1.3.2 Correction d'atténuation et de diffusion

Comme expliqué ci-dessus, les phénomènes physiques d'atténuation et de diffusion peuvent altérer la détection du site d'annihilation. Ces phénomènes peuvent être pris en compte *a priori* afin de limiter leur impact.

1.3.3 Correction d'atténuation

L'atténuation des photons par effet photo-électrique et diffusion Compton est dépendante de la densité du milieu atténuant, qualifiée par le coefficient d'atténuation μ (en cm^{-1}) en fonction de l'énergie du rayonnement atténué. A 511keV, $\mu = 0,096 \text{ cm}^{-1}$ dans les tissus mous, quel que soit le radionucléide considéré. L'atténuation subie par le photon de 511keV dépend également de l'épaisseur de tissus atténuants traversée, et donc de la position de l'annihilation initiale. En considérant deux photons émis à une distance d_1 et d_2 des détecteurs, pour un diamètre D de la couronne de détecteurs, la probabilité de détecter la coïncidence p est égale à :

$$p = p_1 \times p_2 = p_0 \exp \int_{-\infty}^{d_1} -\mu(l) dl \cdot p_0 \exp \int_{d_2}^{+\infty} -\mu(l) dl = p_0 \exp \int_{-\infty}^{+\infty} -\mu(l) dl$$

Ainsi, connaître la cartographie des coefficients d'atténuation μ du milieu permet de compenser l'atténuation subie sur un volume linéaire de réponse entre deux détecteurs. Cette cartographie est obtenue par reconstruction tomographique de l'atténuation de rayonnements X à l'aide d'une Tomodensitométrie (TDM) couplée à la TEP.

En imagerie TEP, le facteur correctif de l'atténuation peut être intégré dans l'opérateur de projection utilisé dans l'algorithme statistique de reconstruction.

1.3.4 Correction du diffusé

Les photons de 511keV peuvent être diffusés dans le patient mais également dans les détecteurs. La première approche pour réduire l'impact de la diffusion Compton est d'appliquer une fenêtre spectrométrique en énergie. Effectivement, le photon diffusé est d'énergie inférieure au photon initial. Ce traitement est souvent insuffisant pour éliminer le bruit créé par la diffusion Compton. Une solution complémentaire est l'ajustement des queues de distribution. Il s'agit de filtrer les sinogrammes pour soustraire le diffusé situé en dehors de l'objet. Initialement le diffusé est estimé par ajustement de l'activité enregistrée en dehors de l'objet sur une fonction gaussienne. Cette contribution estimée du diffusé au sinogramme est ensuite soustraite. Le diffusé peut également être modélisé puis intégré dans l'opérateur de projection utilisé dans l'algorithme statistique de reconstruction.

En imagerie TEP les phénomènes d'atténuation et de diffusion sont intriqués car en rapport direct avec les interactions rayonnement/matière que sont l'effet photoélectrique et la diffusion Compton (Annexe I). L'interaction prédominante dépend de l'énergie du rayonnement et de la densité Z du matériau traversé. Si l'on considère un photon issu d'une annihilation d'énergie 511keV, et la densité de l'eau (Z à 8) dont est principalement constitué le corps humain, l'interaction prédominant est la diffusion Compton, prenant part à la fois dans le phénomène d'atténuation et de diffusion.

Concernant l'imagerie TEP petit animal en recherche, la correction du diffusé n'est en général pas nécessaire, la qualité des images et de la quantification étant considérée comme suffisante (diffusion de l'ordre de 5%).

1.3.5 Correction du temps mort

Ce que l'on appelle le temps mort de la caméra TEP est lié d'une part au cristal scintillant du détecteur et d'autre part au système électronique. Lorsqu'un photon interagit dans le cristal scintillant il émet une scintillation suivie d'une période réfractaire. Cette période réfractaire existe que le signal soit détecté ou non. Le système est dit paralysable. Un second temps mort est lié à la bande passante du système électronique. Ce système électronique est saturable. Une fois la saturation atteinte les signaux ne seront pas détectés pendant une période réfractaire. Ce système est dit non-paralysable.

La perte de données liée au temps mort dépend du nombre d'évènements à détecter, favorisé par les hauts taux de comptage. Le temps mort rend non linéaire la relation entre nombre d'évènements détectés et concentration d'activité. La correction du temps mort peut-être intégrée dans l'opérateur de projection des algorithmes statistiques de reconstruction.

1.4. Principes biologiques

Le radiotraceur utilisé en imagerie TEP est une association d'un atome émetteur bêta + comme vu ci-dessus et d'un vecteur. Le vecteur est une molécule liée à l'atome émetteur qui déterminera la

fonction étudiée. Ainsi pour un même atome émetteur bêta +, comme par exemple le fluor 18, il est possible de synthétiser plusieurs radiotraceurs différents et donc de visualiser des fonctions différentes au sein de l'organisme étudié. Une interprétation clinico-biologique avisée nécessite donc une parfaite connaissance des mécanismes cellulaires en jeu lors de l'interaction vecteur/milieu étudié.

1.5. Quantification

1.5.1 Standardized Uptake Value (SUV)

L'intensité du phénomène biologique étudié est proportionnelle à la quantité de fixation du radiotraceur dans les tissus, notamment dans les tissus tumoraux. Une quantification reproductible de la fixation est nécessaire pour permettre une interprétation plus objective de l'examen et un comparatif entre plusieurs examens. En imagerie clinique TEP, la valeur de la fixation normalisée (SUV pour Standardized Uptake Value) est la plus communément utilisée pour caractériser la fixation du 18F-FDG. Il s'agit d'une mesure de la fixation dans une région d'intérêt normalisée par la dose totale de radiotraceur injectée au sujet étudié, calculée selon la formule :

$$SUV = \frac{\text{Fixation de la région d'intérêt (kBq/ml)} \times \text{Poids total de l'organisme étudié (g)}}{\text{Activité injectée (kBq)} \times \text{Masse volumique eau (g/ml)}}$$

On définira plusieurs types de SUV : la SUV maximale de la région d'intérêt (SUVmax), la SUV moyenne (SUVmean), la SUV minimale (SUVmin), la SUV moyenne dans une sphère de volume défini centrée sur la SUVmax (SUVpeak)... Cependant, plusieurs études relatent le caractère très imprécis de cette mesure et l'absence de réalité biologique vraie due aux nombreuses approximations dans son calcul [17]–[20]. Malgré cela, la SUVmax est le paramètre le plus fréquemment utilisé en routine clinique. Son principal atout est d'être une mesure normalisée sans unité et considérée comme reproductible d'un patient à l'autre et d'une mesure à l'autre chez le même patient, si l'on respecte scrupuleusement des conditions d'acquisitions identiques. Par ailleurs, notons qu'il s'agit d'un paramètre quasi systématiquement rapporté dans les études cliniques, à l'origine d'une large bibliothèque d'informations globalement comparables. Notons tout de même que l'évolution récente des techniques d'acquisition et de reconstruction ont mis un peu à mal la reproductibilité des études, ayant induit une augmentation franche des mesures de SUVmax. On ne définit actuellement pas de seuil de SUV pour la limite lésion bénigne/lésion maligne. Le caractère malin d'une lésion dépendant de paramètres interprétatifs allant au-delà de la simple mesure de l'intensité de fixation (évolution, localisation, anatomie sous-jacente, hétérogénéité...).

1.5.2 Correction de la décroissance

Pour quantifier l'activité fixée à un temps t , $A(t)$, de manière reproductible entre différents examens, il faut tenir compte de l'activité injectée au temps 0, $A(0)$ et de la décroissance radioactive entre t_0 et t . On a :

$$A(t) = A(0) \times e^{-\lambda t}$$

Avec, λ le temps de demi-vie du radioélément considéré, c'est-à-dire le temps au bout duquel l'activité du radiotraceur diminue de moitié. Ce temps est connu et fixe pour un radiotraceur considéré. Le temps de demi-vie du radiotraceur dans l'organisme dépend à la fois de la demi-vie physique de l'atome radioactif (λ_{phy}) utilisé et de la demi-vie biologique du traceur dans l'organisme considéré (λ_{bio}), avec : $\lambda = \lambda_{phy} + \lambda_{bio}$. Effectivement, une partie de la radioactivité est éliminée avec le radiotraceur par les voies d'excrétion biologique (excrétion urinaire, excrétion biliaire...).

1.5.3 Effet de volume partiel

La résolution spatiale correspondant à la plus petite distance qui doit séparer deux objets ponctuels pour pouvoir les distinguer. La résolution spatiale de la TEP dépend de la réponse impulsionnelle de la caméra. La réponse impulsionnelle est telle que l'image d'un point sera une tache, dont la largeur à mi-hauteur détermine la résolution spatiale. L'image ainsi formée conserve la quantité totale de signal mais ce dernier est réparti sur un plus grand volume. Ainsi, l'intensité maximale du signal est diminuée. C'est ce que l'on appelle l'effet de volume partiel. L'effet de volume partiel a pour conséquence de sous-estimer le maximum d'intensité de fixation d'un objet de diamètre inférieur à deux fois la résolution spatiale de la caméra TEP. Il n'existe actuellement pas de correction systématique de l'effet de volume partiel, dont les effets sur les mesures des petites lésions doivent être gardés à l'esprit lors de l'interprétation. La résolution spatiale de la caméra TEP employée dans nos expérimentations est estimée à 1,1mm.

2. Métabolisme glucidique : ^{18}F -FDG

2.1. Physiopathologie

Une cellule vivante utilise le glucose comme source d'énergie. L'expression de récepteurs transmembranaires de la famille GLUT (Glucose Transporter) à la surface des cellules est corrélée à leur consommation de glucose. Ainsi, certaines cellules, comme les cellules cérébrales ou myocardiques, sont physiologiquement pourvues de nombreux récepteurs GLUT (Figure 2).

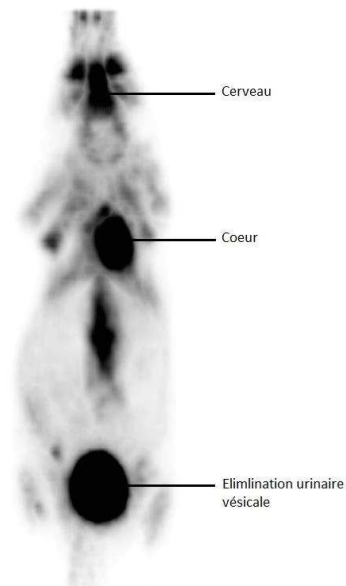


Figure 2: exemple d'imagerie TEP au ^{18}F -FDG chez le petit animal, avec hyperfixation physiologique du parenchyme cérébral et du myocarde

La cancérisation cellulaire est généralement responsable d'un accroissement de la consommation de glucose par la cellule, entraînant une surexpression des récepteurs GLUT. Les cellules tumorales surexpriment principalement l'isoforme 1, et à un moindre degré l'isoforme 3 du récepteur GLUT [21].

De la même manière l'activation des cellules immunitaires (processus inflammatoire ou infectieux), médiée par les cytokines, entraîne une surexpression des récepteurs GLUT 1. Ainsi, la surexpression des récepteurs GLUT n'est pas spécifique d'un seul phénomène physiologique ou pathologique.

Le FDG est un analogue du glucose qui, comme ce dernier, est capté par les cellules consommatrices de glucose via les GLUT [22]. Au niveau intracellulaire, le FDG est phosphorylé par une enzyme, l'hexokinase, en FDG-6-phosphate qui ne peut pas, contrairement au glucose, entrer dans le cycle de Krebs pour y être dégradé. Il va donc s'accumuler au cours du temps (Figure 3). Il est également décrit dans la littérature une surexpression des hexokinases dans les cellules fortement consommatrices de glucose, favorisant aussi l'accumulation du FDG.

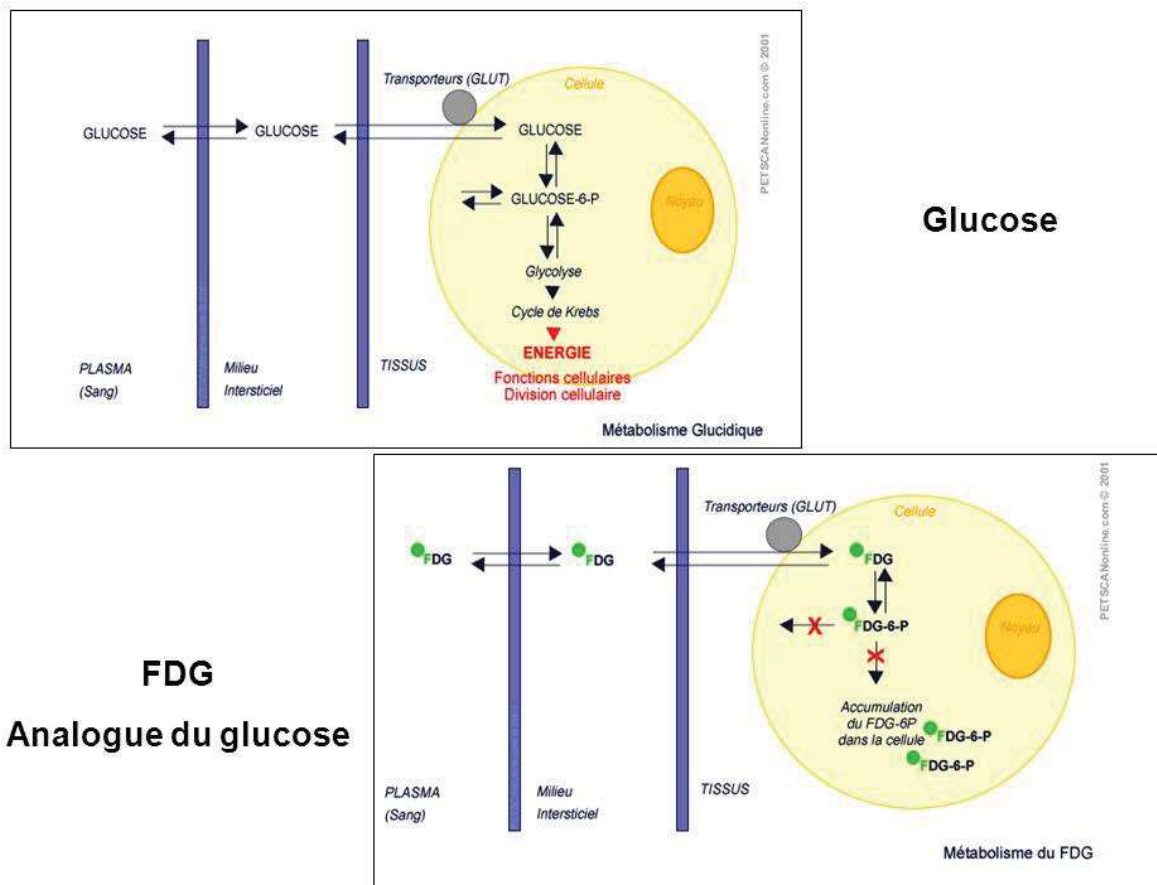


Figure 3: passage intra-cellulaire et métabolisme du glucose et du ^{18}F -FDG [PETSCANonline.com]

In fine, les cellules les plus consommatrices de glucose présenteront une accumulation différentielle du FDG.

2.2. Excrétion physiologique et pièges diagnostiques

L'excrétion physiologique du radiotracteur se fait dans les urines. Il est donc tout à fait normal d'observer des accumulations du traceur au niveau des uretères et de la vessie.

Comme indiqué ci-dessus les processus inflammatoires ou infectieux entraînent une surexpression du récepteur GLUT 1. Les pathologies inflammatoires ou les foyers infectieux sont à l'origine de foyers hyperfixants comparables aux atteintes néoplasiques, qu'il s'agit donc d'interpréter sur les acquisitions.

Les cellules musculaires lorsqu'il existe une contraction augmentent également leur consommation de glucose, à l'origine d'une hyperfixation relative. De même, la graisse brune activée pour la thermogénèse sera à l'origine d'une hyperfixation relative de ce tissu. Ainsi il est important que les sujets soient maintenus au repos et au chaud avant les acquisitions TEP au ^{18}F -FDG.

Enfin, lors d'une hyperglycémie relative, le glucose endogène fait concurrence au FDG injecté. Les sujets doivent donc être à jeun avant l'examen. De même, un hyperinsulinisme secondaire à un repas récent va entraîner l'accumulation du FDG dans le système musculaire par stockage.

2.3. Indications oncologiques

En France, la première Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour l'utilisation clinique de ^{18}F -FDG chez le patient en oncologie date de 1998. Les recommandations se sont élargies avec l'AMM européenne en 2002. Puis de nombreux travaux scientifiques ont confirmé son utilisation en oncologie [2], [23]. Les dernières recommandations de la Société Française de Médecine Nucléaire [1] publiées le 09.05.2018, valorisent la place de la TEP au ^{18}F -FDG dans le dépistage, le suivi du traitement et la recherche de récurrence de nombreux cancers.

Notons cependant que l'hépatocarcinome ne fait pas partie des pathologies oncologiques pour lesquelles la TEP au ^{18}F -FDG est recommandée en première intention. Effectivement, la TEP au ^{18}F -FDG est modérément sensible et spécifique dans la détection des carcinomes hépatocellulaires bien différenciés [24]–[26]. Cependant, lorsqu'il s'agit d'un hépatocarcinome peu différencié, l'évaluation TEP au ^{18}F -FDG retrouve un intérêt diagnostique non négligeable. C'est ce que rapporte l'étude de Talbot et al. [25], qui montre une sensibilité de 68% du ^{18}F -FDG pour les carcinomes hépatocellulaires, augmentant à 74% pour les carcinomes hépatocellulaires peu différenciés, alors qu'elle était mesurée à 59% pour les carcinomes hépatocellulaires bien différenciés.

3. Prolifération : ^{18}F -FLT

3.1. Physiopathologie

Lorsqu'une cellule se divise, la première étape est de dupliquer son ADN. La duplication de l'ADN nécessite d'intégrer des acides nucléiques, au nombre de quatre, dont la thymidine. Il y a deux voies qui permettent à la cellule d'obtenir la thymidine. La première consiste en la production de thymidine *de novo* par la thymidine synthétase (TS) à partir de desoxyuridine monophosphate (dUMP). La seconde consiste à recycler la thymidine existante (Figure 4).

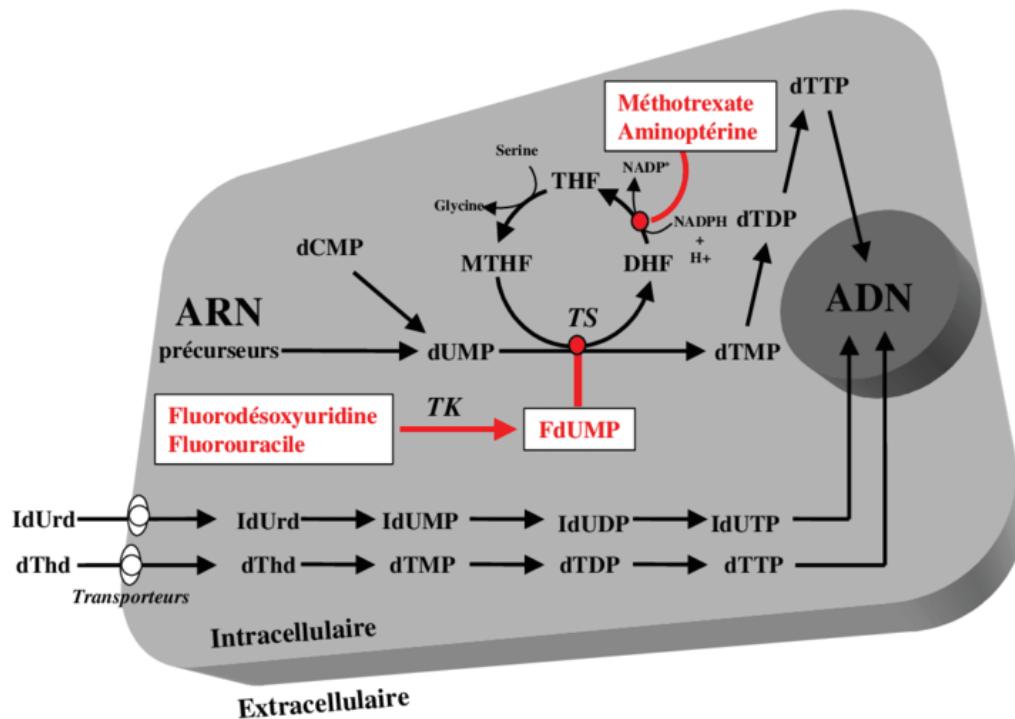


Figure 4: voie de recyclage de la thymidine [Université de Genève, Dupertuis YM, <http://www.unige.ch>]

Dans cette seconde voie, la thymidine circulante est intégrée dans la cellule par diffusion facilitée. Puis, la thymidine est phosphorylée au sein de la cellule par une enzyme, la thymidine kinase 1 (TK1). C'est la thymidine triphosphate qui sera intégrée dans l'ADN au cours de la duplication.

L'activité de la TK1 est régulée en fonction des besoins cellulaires. Une cellule en phase de prolifération (phase S) va surexprimer la TK1.

Le ^{18}F -FLT est un analogue de la thymidine, marqué au fluor 18. Il suit le même parcours que la thymidine naturelle du compartiment extra-cellulaire vers le compartiment intra-cellulaire. Cependant, les phosphorylations par la TK1 ne lui permettront pas d'intégrer le noyau et l'ADN. Le ^{18}F -FLT va, à l'instar du ^{18}F -FDG, s'accumuler dans la cellule, aboutissant à une accumulation différentielle dans le temps entre les cellules peu proliférantes et les cellules à fort taux de prolifération (Figure 5).

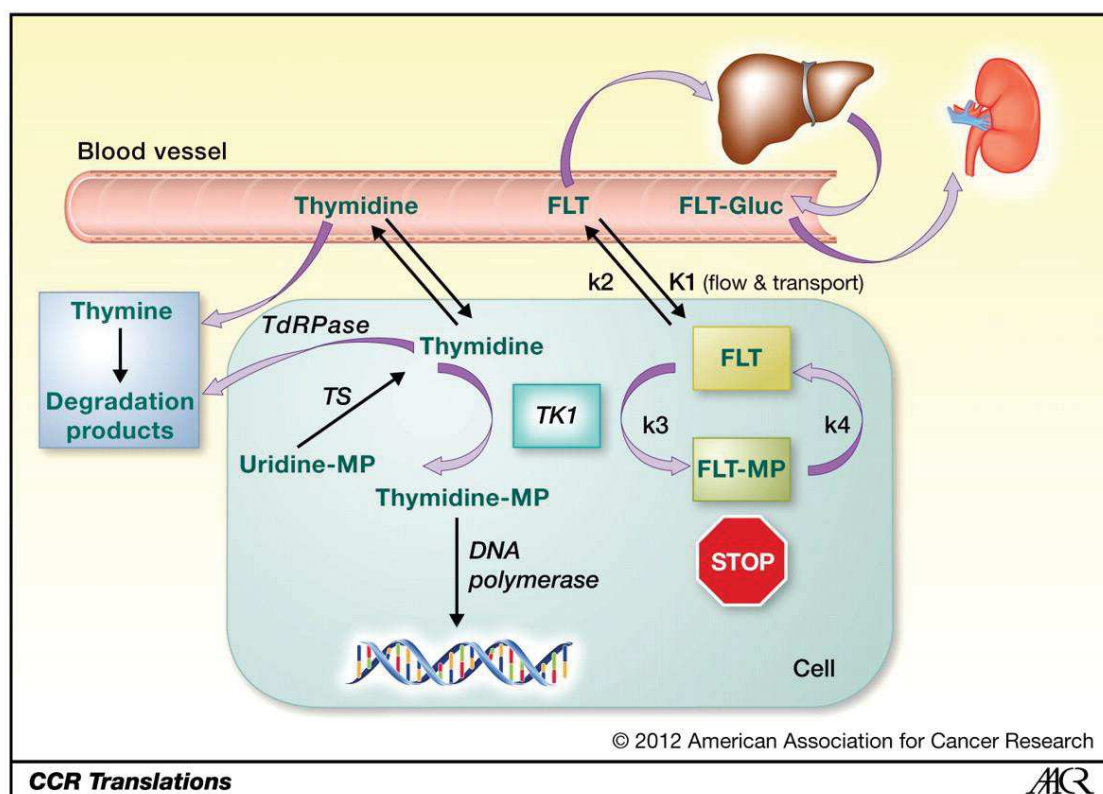


Figure 5: mécanismes menant à l'accumulation intracellulaire du ^{18}F -FLT [American Association for Cancer Research]

3.2. Excrétion physiologique et pièges diagnostiques

La principale limite de l'imagerie TEP de la prolifération au ^{18}F -FLT est la production *de novo* de thymidine. Effectivement lorsque cette voie de production est favorisée, elle ne fait pas intervenir la TK1, et donc ces cellules n'accumulent pas le ^{18}F -FLT [27], [28]. Ainsi la sensibilité de l'imagerie au ^{18}F -FLT est dépendante de l'utilisation de la voie de recyclage de la thymidine qui peut être différente selon chaque tumeur.

Tout comme pour le ^{18}F -FDG il existe des fixations physiologiques du radiotracer. Pour la ^{18}F -FLT il s'agit de la moelle osseuse et du foie [29]–[31].

Il existe également une élimination urinaire physiologique du radiotracer. Chez le petit animal, on individualise également une élimination biliaire du traceur (Figure 6).

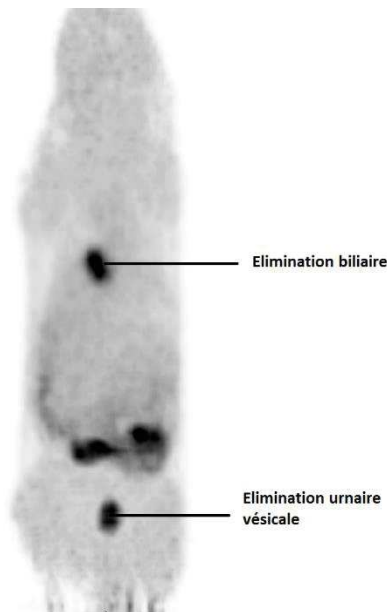


Figure 6 : exemple d'imagerie TEP au ^{18}F -FLT chez le petit animal, avec élimination physiologique par la vésicule biliaire et la vessie ;

3.3. Indications oncologiques

Le ^{18}F -FLT n'a actuellement pas trouvé sa place en routine clinique pour l'évaluation oncologique. Plusieurs études rapportent cependant son intérêt diagnostique dans l'évaluation de pathologies oncologiques notamment les cancers du sein, pulmonaire ou cérébraux [29], [32]–[36]. Dans cette dernière indication, le ^{18}F -FLT permet de quantifier la prolifération de tumeurs cérébrales suspectes, alors que la fixation physiologique du ^{18}F -FDG du parenchyme cérébral gêne l'interprétation de cet organe. En tant que marqueur de la prolifération cellulaire, le ^{18}F -FLT est très avantageux puisqu'il a été établi une corrélation entre la mesure de la fixation du ^{18}F -FLT in vivo et la mesure du Ki-67 tumoral in vitro [31].

4. Autres traceurs TEP

Il existe d'autres traceurs TEP développés pour la visualisation de fonctions cellulaires et moléculaires différentes. Dans le cadre de notre étude deux types de traceurs sont intéressants à connaître, un traceur du métabolisme lipidique, la ^{18}F -Choline et les traceurs de l'hypoxie.

La ^{18}F -Choline est un traceur du métabolisme lipidique. C'est un substrat extrinsèque à la phosphatidylcholine, précurseur des phospholipides composants la membrane cellulaire. Les tumeurs augmentent leur transport intracellulaire de choline et son intégration dans la membrane cellulaire. La ^{18}F -Choline a obtenu son Autorisation de Mise sur le Marché pour la détection des métastases osseuses du cancer de la prostate, la localisation des carcinomes hépatocellulaires bien différenciés et

la caractérisation de nodules hépatiques lorsque la TEP/TDM au ^{18}F -FDG n'est pas concluante. Plusieurs études [24], [26] rapportent la supériorité diagnostique du TEP à la ^{18}F -Choline dans le bilan d'extension des carcinomes hépatocellulaires bien différenciés.

Les traceurs de l'hypoxie ont été développés suite à plusieurs constats : les tumeurs hypoxiques sont plus résistantes aux traitements par chimiothérapie et radiothérapie, leur pronostic est plus péjoratif, leur proportion à la migration métastatique est majorée [30], [37]–[39]. Ainsi, la détermination du caractère hypoxique d'une tumeur permettrait d'adapter les traitements, par exemple d'augmenter localement la dose délivrée en radiothérapie. Il existe deux grandes classes de traceurs de l'hypoxie : les traceurs imidazolés et les traceurs non-imidazolés. Parmi les traceurs imidazolés l'on trouvera le ^{18}F -misonidazole (^{18}F -MISO) et le ^{18}F -fluoroazomycine arabinoside (^{18}F -FAZA). Concernant les traceurs non imidazolés on retiendra principalement le Copper(II)-diacetyl-bis(N(4)-methylthiosemicarbazone) (Cu(II)-ATSM) marqué au ^{60}Cu ou au ^{64}Cu [40], [41].

Ainsi, l'imagerie par émission de positons est reconnue comme un outil nécessaire pour le suivi évolutif de nombreuses pathologies oncologiques, et de leur traitement qu'il soit systémique ou local [42]–[44]. L'avènement de nouveaux traceurs en élargit encore les possibilités, permettant d'étudier de manière ciblées les mécanismes biologiques en jeu. Mes travaux de recherche ont eu pour but de déterminer si cet outil diagnostique permet le suivi des traitements du carcinome hépatocellulaire, un cancer au pronostic réservé et aux alternatives thérapeutiques variées.

II. Carcinome hépatocellulaire

1. Epidémiologie

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente en France 53% des cancers du foie et des voies biliaires, qui sont la 6^{ème} cause de décès par cancer en France [45]. Dans le monde, l'incidence de l'hépatocarcinome est de 500000 à 1000000 nouveaux cas par an pour 600000 décès [46]. Cette incidence est très variable en fonction des zones géographiques. C'est en Asie du Sud Est et en Afrique Sub-saharienne que l'incidence est la plus élevée (supérieure à 20 cas pour 100000 habitants), cela s'explique par la prévalence plus importante des principaux facteurs de risque que sont les hépatites virales et les cancérigènes environnementaux, notamment la contamination par aflatoxine. En France, l'incidence est considérée comme intermédiaire selon le rapport de l'Institut National de Veille Sanitaire de juillet 2013, atteignant en 2012 12,1 hommes pour 100000 habitants et 2,4 femmes pour 100000 habitants [5]. Cette incidence est en constante progression depuis 1980. Effectivement, l'incidence du CHC a augmenté en moyenne chez l'homme de 3,8% par an entre 1980 et 2005, et de 4% par an chez la femme [6]. Cette incidence est également en constante progression dans d'autres pays développés comme le Royaume-Uni, les Etats-Unis, le Japon, l'Australie ou encore le Canada.

Le pronostic du CHC est réservé. Effectivement, en France, en 2009, les décès dus à un cancer du foie étaient estimés à 3290 décès chez l'homme, soit une incidence de 12,1 pour 100000 hommes, et à 674 décès chez la femme, soit une incidence de 1,8 femmes pour 100000 habitants. Il s'agit d'une mortalité du sujet jeune puisqu'un tiers des décès masculins et un cinquième des décès féminins surviennent avant l'âge de 65 ans [6].

2. Facteurs de risque

2.1. La cirrhose

Les trois principaux facteurs de risque de développer une cirrhose dans les pays développés sont : la surconsommation d'alcool, les hépatites virales et la stéatose hépatique non alcoolique (ou NASH pour « Non Alcoholic Steato Hepatitis ») [47]. Quelle que soit son étiologie, la cirrhose hépatique est un facteur de risque de développer un CHC. L'inflammation chronique secondaire à l'état cirrhotique entraîne des phénomènes de nécrose/régénération du tissu hépatique qui font le lit de la cancérisation. Le risque de développer un CHC est cependant variable en fonction de la pathologie responsable de la cirrhose. Il est le plus élevé lorsqu'il s'agit d'une hépatite virale C (VHC) (risque à 5 ans de 17% à 30%) ou d'une hémochromatose (risque à 5 ans de 21%), que dans les cas d'hépatite virale B (VHB) (risque à 5 ans de 10% à 15%), de cirrhose alcoolique (risque à 5 ans de 8%), de stéatose hépatique non alcoolique (risque à 5 ans de 7,5%), ou encore de cirrhose biliaire primitive (risque à 5 ans de 5%) [48].

2.2. Hépatites virales

Hormis la cirrhose induite par l'infection virale chronique active, les hépatites virales augmentent le risque de développer un CHC par des mécanismes qui leur sont propres. Ainsi, en s'intégrant dans le génome de l'hôte, le VHB peut induire des mutations dites insertionnelles et la cancérisation cellulaire [49]. Le mécanisme de transactivation est également décrit avec le VHB. Cela correspond à une activation anormale par les protéines virales de gènes cellulaires. Concernant le VHC, les mécanismes sont moins bien élucidés, mais à la fois les mutations insertionnelles et la transactivation sont évoquées.

2.3. Carcinogènes environnementaux et chimiques

La surconsommation d'alcool [50] et le tabagisme [51] sont des facteurs de risque de développer un CHC, même en l'absence de cirrhose.

L'aflatoxine est un type de toxine produite par des moisissures pouvant contaminer certains aliments comme le maïs, le riz, le blé, l'arachide, le soja ou le tournesol. Les populations d'Asie et d'Afrique sont les plus exposées aux aflatoxines. Dans ces pays, l'aflatoxine représente un important facteur de risque de CHC sur foie sain. La physiopathologie de cancerogenèse secondaire à l'intoxication par aflatoxine est connue. Effectivement la toxine induirait une mutation de l'anti-oncogène p53.

2.4. Troubles métaboliques

Certaines déficiences métaboliques constitutives peuvent accroître le risque de CHC, il s'agit du déficit en alpha-1 antitrypsine, de la porphyrie, de la tyrosinémie héréditaire ou des glycoséoses de types I et III. La stéatose hépatique non alcoolique ne constitue un facteur de risque de CHC que lorsqu'elle est compliquée de cirrhose.

3. Dépistage

La population à risque de développer un CHC étant bien identifiée, le dépistage est indiqué chez les patients cirrhotiques. Effectivement, les possibilités thérapeutiques dépendant notamment de l'extension initiale de la pathologie, un dépistage précoce permet une augmentation de la survie globale [52]–[54].

En France, la Haute Autorité de Santé (HAS) recommande un bilan de suivi semestriel chez les patients cirrhotiques [55] comprenant une échographie hépatique avec examen Doppler et un dosage de l'Alpha-foetoprotéine (AFP) [56]. La sensibilité de l'échographie hépatique en dépistage du CHC est de

58 à 89% [57]–[59], mais dépend beaucoup de la taille de la lésion. Elle est d'environ 70% pour les lésions de l'ordre du centimètre, et jusqu'à 95% pour des lésions de 3 cm [60], [61]. Le dosage de l'AFP est un outil diagnostique secondaire puisque sa valeur prédictive positive est faible [62].

4. Diagnostic

4.1. Diagnostic anatomopathologique

Jusqu'en 2000, l'analyse anatomopathologique d'une lésion biopsiée était la référence pour le diagnostic de CHC. Les critères anatomopathologiques diagnostiques du CHC sont posés par consensus international [63]. La sensibilité de détection dépend de la taille de la tumeur, de la localisation et de l'expérience de l'anatomopathologiste. La sensibilité est estimée entre 70 et 90% [64], [65]. La sensibilité de l'étude anatomopathologique sur prélèvement biopsique chute à 60% pour les tumeurs de taille inférieure à 2cm. Au vu des complications liées au prélèvement par biopsie, des solutions pour un diagnostic non invasif du CHC ont été proposées à partir de 2001 [66].

4.2. Diagnostic non invasif

Le diagnostic non invasif est basé à la fois sur l'imagerie par TDM (Tomodensitométrie X) avec injection de produit de contraste iodé, l'IRM hépatique ou l'échographie-doppler, et sur le dosage de l'AFP. Effectivement, l'hépatocarcinome est une tumeur richement vascularisée, lui conférant des caractéristiques spécifiques à l'imagerie. Cela se traduit sur une TDM ou une IRM (Imagerie par Résonance Nucléaire) avec triple acquisition artérielle, parenchymateuse et portale, par une captation rapide du produit de contraste au temps artériel suivie d'un lavage rapide. Bien que moins sensible que l'IRM, le scanner avec injection de produit de contraste iodé est en général réalisé en première intention [67]. Concernant le dosage de l'AFP, bien qu'il ait une valeur prédictive positive faible pour les petites lésions, un dosage supérieur à 400ng/ml bénéficie d'une spécificité proche de 100%.

Selon les critères initialement proposés par Bruix et al. [66], deux imageries spécifiques ou une imagerie spécifique associée à un dosage de l'AFP supérieur à 200ng/ml suffisent au diagnostic de CHC pour les lésions de plus de 2cm. Ces critères ont été révisés par la suite, permettant d'établir un arbre décisionnel dépendant principalement de la taille de la lésion suspecte de CHC (Figure 7). On constate cependant que la biopsie reste nécessaire dans les cas litigieux.

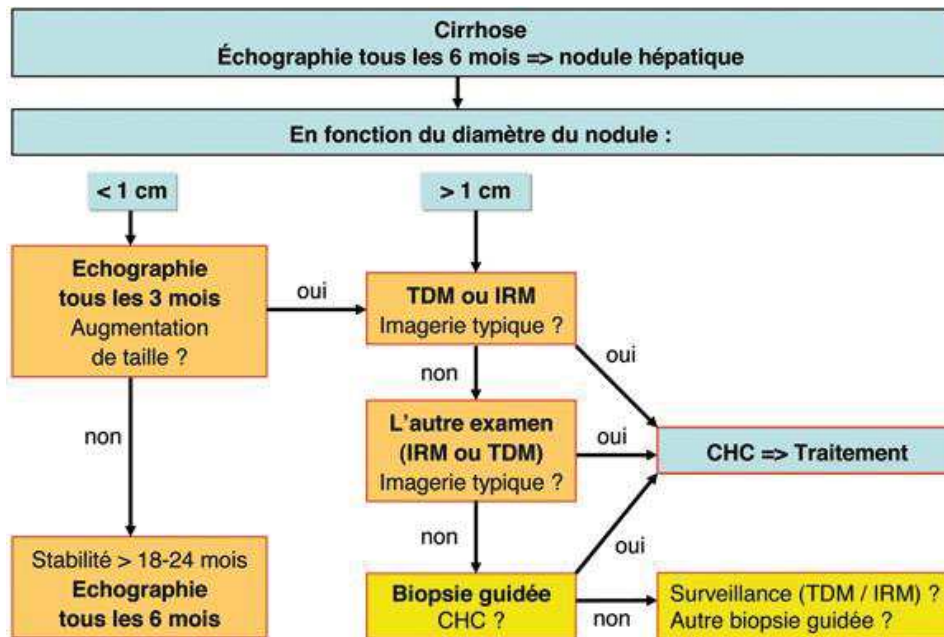


Figure 7 : arbre décisionnel pour le diagnostic de CHC [Association Française de Formation Médicale Continue en Hépatogastro-Entérologie]

La TEP au ^{18}F -FDG n'est actuellement pas recommandée dans le diagnostic du CHC. Effectivement, le CHC présente une fixation inconstante du ^{18}F -FDG et la plupart des CHC bien différenciés sont négatifs [66]. Le taux global de détection de la TEP/TDM a été décrit comme inférieur à celui de la TDM avec injection de produit de contraste iodé et de l'IRM [67].

5. Bilan d'extension initial

Un bilan d'extension initial fiable est capital dans la prise en charge ultérieure du patient. Effectivement, les possibilités thérapeutiques sont dépendantes de deux principaux facteurs : l'extension de la pathologie, et l'état général du patient.

L'extension est évaluée au sein du parenchyme hépatique pour déterminer le nombre, la taille et la localisation précise des lésions de CHC notamment la proximité avec les principaux éléments constitutifs de la structure du foie (vaisseaux, voies biliaires intra-hépatiques, capsule). Dans l'environnement direct du foie sont recherchés l'extension aux vaisseaux, notamment les embolies vasculaires et l'atteinte des voies biliaires extra-hépatiques. Plus à distance seront étudiées les lésions secondaires ganglionnaires et l'atteinte d'autres organes (métastases pulmonaires, osseuses, cérébrales...). Pour cela, le bilan d'extension comprend une évaluation abdominale par IRM abdominale ou TDM, et une évaluation thoracique par TDM. L'échographie Doppler hépatique permet l'étude des lésions intra-hépatiques mais surtout l'évaluation des flux vasculaires. La TDM hépatique à l'avantage de permettre une mesure de la volumétrie hépatique.

Le scanner cérébral et la scintigraphie osseuse, à la recherche de métastases à distance, sont réalisés sur point d'appel.

La TEP au ¹⁸F-FDG n'est actuellement pas recommandée dans le bilan d'extension initial du CHC en raison de sa faible sensibilité dans le cas des CHC bien différenciés [68]. Dans une étude de Talbot et al. de 2010 [25], la sensibilité du ¹⁸F-FDG était de 68%, diminuant jusqu'à 59% dans le cas des CHC bien différenciés. Cependant, plusieurs études décrivent un apport diagnostique de la TEP à la ¹⁸F-Choline, dans la détection de CHC bien différenciés [24], [26]. L'étude de Chalaye et al. [69] sur l'utilisation d'une évaluation TEP en double isotope, associant une imagerie au ¹⁸F-FDG et une imagerie à la ¹⁸F-Choline, rapporte une modification du grade de la maladie dans 11% des cas et un changement thérapeutique dans 14% des cas. Il s'agirait donc d'une évolution prometteuse malgré l'absence actuelle de recommandation.

6. Traitements

La classification BLCC (Barcelona Clinic Liver Cancer – Tableau 2) est une classification pronostique qui prend en compte le bilan d'extension initial mais également le bilan fonctionnel hépatique (score Child-Pugh – tableau 3) et l'état de santé global du patient, pour aider au choix thérapeutique. Seuls certains des traitements proposés sont considérés comme curatifs. Il s'agit de la transplantation hépatique, de la résection ou de la destruction percutanée.

Stade BCLC	Indice de performance	Morphologie tumorale	Fonction hépatique	Traitement habituellement proposé
0	0	Unique < 2 cm, pas d'invasion vasculaire, pas de nodule satellite	Child-Pugh A	Résection chirurgicale, ablation
A	0	Unique > 2 cm ou jusqu'à 3 nodules de moins de 3 cm	Child-Pugh A-B	Résection chirurgicale, ablation
B	0	Multinodulaire sans invasion vasculaire	Child-Pugh A-B	Chimioembolisation, radioembolisation
C	1-2	Invasion macrovasculaire, envahissement ganglionnaire ou métastases	Child-Pugh A-(B)	Sorafénib
D	3-4	Indifférent	Child-Pugh C	Soins de support

Tableau 2: classification BLCC [Rev Med Suisse 2015; volume 11. 1149-1151]

	1 point	2 points	3 points
Ascite	Absente	Modérée	Tendue ou réfractaire aux diurétiques
Bilirubine ($\mu\text{mol/l}$)	< 35	35-50	> 50
Albumine (g/l)	> 35	28-35	< 28
INR	< 1,7	1,7-2,2	> 2,2
TP	> 50%	40-50%	< 40%
Encéphalopathie	Absente	Légère à modérée (stade 1-2)	Sévère (stade 3-4)

Le pronostic de la cirrhose est établi en fonction du score total des points:
Child-Pugh A (5-6 points): survie à 1 an de 100%
Child-Pugh B (7-9 points): survie à 1 an de 80%
Child-Pugh C (10-15 points): survie à 1 an de 45%

Tableau 3: score Child-Pugh [Rev Med Suisse 2010; volume 6. 1803-1808]

6.1. Traitements curatifs

6.1.1 La résection

Il s'agit du traitement de première intention lorsqu'elle est réalisable. La principale contre-indication à la résection est une fonctionnalité hépatique altérée. Effectivement, le parenchyme résiduel après résection doit permettre d'assurer une fonction hépatique suffisante. Chez les patients cirrhotiques, la survie à 5 ans après résection est de 60% [66], [70] et la mortalité péri-opératoire de 2 à 3%. La récurrence grève le pronostic après résection puisqu'elle est de l'ordre de 50% à 5 ans [71], comprenant l'évolution métastatique intra-hépatique mais également l'apparition de lésions *de novo*.

6.1.2 La transplantation hépatique

La transplantation est un traitement de choix lorsque la résection n'est pas réalisable, puisque la survie à 5 ans atteint 70% [72]–[74]. Les critères de sélection des patients éligibles incluent l'état médical global afin de s'assurer que le patient est capable de tolérer la chirurgie et la prise en charge ultérieure, et des critères propres à la pathologie dits de Milan. Selon les critères de Milan, qui complètent la classification BLCC, la lésion de CHC ne doit pas excéder 5cm de diamètre pour une lésion unique ou 3 lésions de maximum 3cm chacune. Bien sûr la pathologie doit être restée strictement intra-hépatique. La mortalité péri-opératoire est estimée à 3% et la mortalité à 1 an inférieure à 10%. Dans une population sélectionnée selon les critères de Milan, la récurrence est estimée à moins de 15% [75], [76].

6.1.3 Traitements percutanés

Ils sont indiqués lorsque la prise en charge chirurgicale n'est pas envisageable en raison de l'état général du patient, mais que les lésions hépatiques sont limitées en taille et en nombre. Historiquement, il s'agit de l'alcoolisation tumorale par éthanol. Dans un second temps ont été développées des destructions thermiques comprenant l'ablation par radiofréquence, micro-ondes, laser ou cryothérapie. L'ablation par radiofréquence est recommandée pour le traitement des lésions de plus de 2cm de diamètre, puisqu'il apporte un meilleur contrôle local que l'alcoolisation. La survie à 5 ans est estimée 40-70% [77], [78]. Les complications graves du traitement par radiofréquence, que sont l'hémopéritoine, la thrombose portale, le bilome ou l'abcès hépatique, sont plus fréquentes que dans le traitement par alcoolisation (4% vs 2,7%) [79]. L'alcoolisation est préférée au traitement par radiofréquence lorsque le traitement de la lésion est considéré comme à risque de complication car trop proche de la vascularisation.

6.2. Traitements palliatifs

Les autres traitements possibles, qu'ils soient locaux ou systémiques, ne sont pas considérés comme curatifs.

6.2.1 Traitements locaux

La chimioembolisation est recommandée en première ligne dans le traitement des patients ne pouvant pas bénéficier d'un traitement curatif. Il s'agit de délivrer une chimiothérapie directement au contact de la tumeur, par cathétérisation, puis d'emboliser les vaisseaux afin de garder une imprégnation locale de chimiothérapie. Les molécules de chimiothérapie employées sont en général le Cisplatine ou la Doxorubicine. Cette opération peut être renouvelée plusieurs fois, mais induit *in fine* une détérioration de la fonction hépatique. La chimioembolisation n'est pas recommandée pour les patients présentant une invasion tumorale vasculaire ou une extension extra-hépatique.

Le traitement conventionnel par radiothérapie X des lésions est limité par la radiosensibilité du foie, d'autant plus délétère sur le foie fragilisé des patients cirrhotiques. Les nouvelles techniques de radiothérapie que sont l'irradiation rotationnelle par tomothérapie, la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité, et la stéréotaxie, apportent une plus grande précision dans la programmation et la délivrance de la dose, limitant ainsi l'irradiation du foie sain fragile et les effets secondaires [80]–[85].

L'irradiation des lésions hépatiques par radiothérapie protons ou radiothérapie aux ions lourds est en développement [12], [14], [57], [86]–[89]. L'avantage de ces techniques est leur balistique répartissant l'ensemble de la dose dans un faible volume limitant ainsi la dose délivrée au tissu sain.

Enfin, il est possible de traiter localement les lésions hépatiques par radioembolisation de microsphères liées à un radioélément émetteur bêta – (Yttrium 90 Iode 131). Ce traitement est possible en cas de thrombose porte. L'efficacité thérapeutique rapportée se situe entre 35 et 50% [90]–[92]. La

toxicité hépatique concerne 20% des patients, et le décès secondaire au traitement, 3% de la population traitée [90].

6.2.2 Traitements systémiques

La chimiothérapie des CHC est difficilement applicable au vu du terrain médical des patients. Effectivement, la cirrhose et l'insuffisance hépatique perturbent le métabolisme des agents anti-cancéreux et peuvent en augmenter la toxicité, notamment hépatique. D'autres complications propres à la chimiothérapie comme l'immunodépression et les infections secondaires qui en résultent, sont plus difficilement supportées dans cette population fragile. De plus, les chimiothérapies cytotoxiques de première génération, présentent un effet modéré sur le contrôle de la maladie [93]–[97].

Avec le développement des thérapeutiques ciblées, de nouveaux traitements antiprolifératifs ont pu être testés sur l'hépatocarcinome. Plus particulièrement, le Sorafénib, un inhibiteur des tyrosines kinases, a prouvé une amélioration de la survie des patients atteints de CHC. Dans une étude de phase III multicentrique contre placebo, Llovet et al [66], la survie globale médiane du groupe traité était de 10,7 mois, contre 7,9 mois dans le groupe contrôle. Dès lors, le Sorafénib est devenu la référence pour le traitement systémique des hépatocarcinomes chez les patients présentant une pathologie localement avancée avec une fonction hépatique conservée (Child Pugh A) [61], [98]. D'autres molécules ciblant la prolifération (anti-EGFR, IGF-1R...) ou l'angiogenèse (anti-VEGF) sont en cours d'étude pour le traitement du CHC.

Dans notre étude, nous avons choisi le traitement par Topotécan comme chimiothérapie de référence. Ce choix a été fait à partir des données de la littérature [93], [99], [100] décrivant une relative efficacité de cette molécule sur le CHC. Le Topotécan est un inhibiteur de la Topoisomérase I, une enzyme nécessaire à la réplication de l'Acide-Désoxyribonucléique (ADN). Effectivement, la Topoisomérase réduit la torsion de l'ADN, permettant au cortège enzymatique répliatif d'accéder à l'ADN (Figure 8). Inhiber la Topoisomérase I empêche la réplication des cellules en phase S et ainsi la division cellulaire, notamment des cellules tumorales.

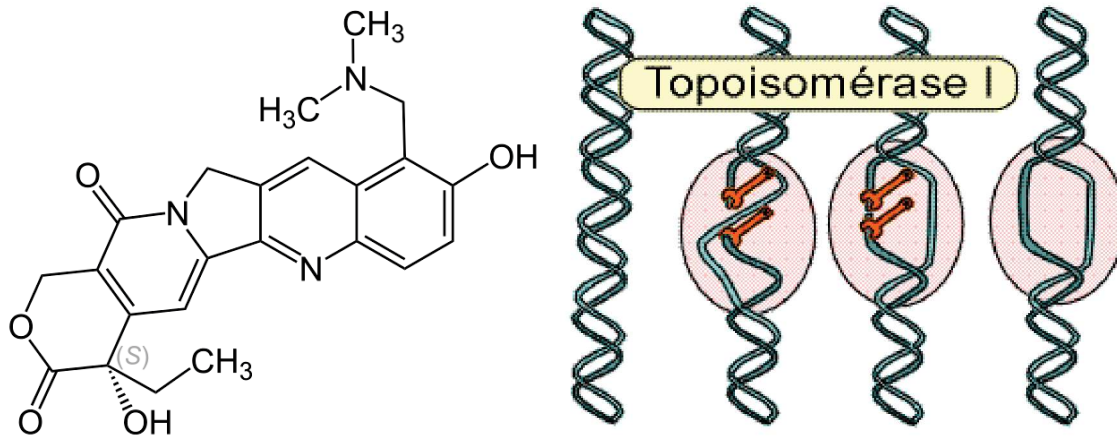


Figure 8: formule chimique et mécanisme d'action du Topotécan [<http://accs.ens-lyon.fr>]

7. Surveillance

Le dosage de l'AFP est utile lorsque cette dernière était augmentée avant traitement. Sa normalisation est un signe d'efficacité thérapeutique. Puis, l'augmentation après traitement permet de dépister la récurrence.

Concernant la surveillance par imagerie, l'IRM est utilisée en première intention ou la TDM hépatique le cas échéant. Les critères REICIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) sont appliqués à la tumeur initiale prenant le contraste. Ainsi la réponse est considérée comme complète si la lésion a totalement régressé, partielle si la somme des diamètres de la lésion a diminué d'au moins 30%. On parle de progression lorsque la somme des diamètres de la lésion a augmenté d'au moins 20% ou qu'une nouvelle lésion est détectée [66].

Concernant la périodicité de la surveillance, elle dépend du type de traitement réalisé. Après résection, le risque de récurrence hépatique est important. Il sera recherché par une surveillance clinico-biologique tous les trois mois pendant un an, puis tous les 6 mois. L'imagerie comprendra une IRM ou une TDM hépatique en alternance avec une échographie hépatique, tous les 3 mois pendant 3 ans, puis tous les 6 mois.

Après transplantation hépatique, le taux de récurrence étant plus élevé les deux premières années, les patients doivent être surveillés régulièrement pendant cette période. L'imagerie hépatique sera associée à un scanner thoracique à la recherche de localisations extra-hépatiques, principalement pulmonaires.

Après traitement per-cutané, le suivi clinico-biologique est réalisé tous les trois mois pendant un an, puis tous les 6 mois. L'imagerie comprendra une IRM ou une TDM hépatique en alternance avec une échographie hépatique, tous les 3 mois pendant 3 ans, puis tous les 6 mois.

Après radiothérapie ciblée, la surveillance par imagerie IRM ou TDM ne doit pas être réalisée trop tôt, au risque de confondre l'inflammation péri-lésionnelle initiale avec une reprise évolutive.

Après chimioembolisation, un contrôle clinico-biologique et d'imagerie sera réalisé 6 semaines après le traitement. Puis, le suivi sera adapté à la nécessité de réaliser de nouveaux cycles de traitement.

Enfin, après thérapie ciblée par inhibiteur des tyrosines kinases, l'efficacité thérapeutique est évaluée par une surveillance clinico-biologique régulière, au moins une fois par mois, une imagerie hépatique de préférence par IRM tous les 2 à 3 mois, associée à une surveillance de l'extension extra-hépatique par TDM thoraco-abdomino-pelvienne.

8. Modèle murin

Le développement tumoral est un phénomène complexe in vivo impliquant à la fois la cellule tumorale mais également son environnement tissulaire et le système immunitaire de l'hôte. Les modèles animaux sont utilisés pour étudier l'ensemble complexe d'événements loco-régionaux permettant le développement tumoral. Le modèle murin est de loin le plus utilisé en cancérologie. L'expérimentation animale est encadrée par des règles éthiques communément acceptées depuis 1959 [101]. Dans nos expérimentations, nous avons réalisé une xénogreffe à partir de cellules tumorales issues d'un hépatocarcinome humain. Plusieurs souches tumorales d'hépatocarcinome sont disponibles sur le marché : HepG2, Huh7, SK-Hep-1, and Hep3B. Notre choix s'est porté sur la souche SK-Hep 1 en raison de son important potentiel prolifératif.

Le carcinome hépatocellulaire est donc une pathologie dont la prise en charge est complexe et qui engage le pronostic vital du patient. La morbi-mortalité liée aux différents traitements existants ne permet pas toujours de les mettre en œuvre et incite les médecins et les chercheurs à développer des thérapies personnalisées. Ainsi, le traitement par radiothérapie qui était jusque-là difficilement réalisable en raison de la radiosensibilité du parenchyme hépatique, s'oriente vers l'utilisation des protons ou des ions lourds qui présentent une balistique avantageuse. Cet axe de recherche pour le développement de la protonthérapie a été évoqué dans le rapport de l'INCa rédigé en juin 2016, portant sur les indications et capacité de traitement en protonthérapie [4]. La suite de cet exposé s'attachera à poser les bases théoriques du traitement par protonthérapie.

III. Protonthérapie

1. Protonthérapie aspects physiques

1.1. Les rayonnements ionisants

Un rayonnement est dit ionisant lorsqu'il est capable de déposer assez d'énergie dans la matière pour créer une ionisation. Pour cela, le rayonnement doit avoir une énergie supérieure à l'énergie de liaison de l'électron à l'atome cible, soit un minimum de 10eV. Il existe deux grands types de rayonnements ionisants : les rayonnements électromagnétiques et les rayonnements particulaires.

1.2. Interaction des rayonnements avec la matière

Un rayonnement, qu'il soit considéré comme ionisant ou non, interagit avec la matière environnante de différentes manières en fonction de sa nature, de son énergie et de la composition de l'environnement. Les différents types d'interaction d'un rayonnement avec la matière sont résumés en annexe (Annexe I). Dans le cas particulier des protons, il faut se référer à l'interaction des particules chargées lourdes avec la matière. De ces principes d'interaction découlent les notions de pouvoir d'arrêt et de transfert d'énergie linéique.

1.2.1 Notion de pouvoir d'arrêt

Le pouvoir d'arrêt (S en meV/cm) décrit les processus de perte d'énergie de la particule. Il dépend des différentes composantes d'interaction de la particule :

$$S_{\text{total}} = S_{\text{coll}} + S_{\text{rad}} + S_{\text{nucl}}$$

Avec, S_{coll} le pouvoir d'arrêt électronique par collision inélastique, S_{rad} le pouvoir d'arrêt de radiation et S_{nucl} le pouvoir d'arrêt nucléaire par collision élastique. Le pouvoir d'arrêt linéique correspond à la perte moyenne d'énergie (dE) d'une particule incidente par distance parcourue (dx) dans le milieu, et peut être calculé selon la formule de Bethe-Block :

$$S = -\frac{dE}{dx} = 4\pi k^2 \frac{z^2 e^4}{m_0 v^2} N_e Z \left[\ln\left(\frac{2m_0 v^2}{I}\right) - \ln(1 - \beta^2) - \beta^2 \right]$$

Avec, k une constante, z la charge de la particule incidente, e la charge élémentaire, N_e le nombre d'électrons par unité de volume, m_0 la masse de la particule incidente, v la vitesse de la particule incidente, Z le numéro atomique du milieu traversé, I l'énergie moyenne d'ionisation en eV et $\beta=v/c$.

Cette formule exprime l'interdépendance entre le pouvoir d'arrêt, la vitesse du projectile, et donc son énergie cinétique, et le numéro atomique Z du matériau traversé. Ainsi le pouvoir d'arrêt sera d'autant plus élevé que le Z du matériau ralentisseur est élevé, et que la vitesse de la particule incidente est faible.

1.2.2 Notion de transfert d'énergie linéique (TEL) d'une particule chargée

Les interactions d'une particule chargée dans la matière vont être responsables d'un transfert d'énergie progressif le long de sa trajectoire, et donc d'une « trace » laissée dans la matière par son passage. A la différence du pouvoir d'arrêt, le TEL décrit l'énergie reçue par le milieu, comprenant également l'énergie cédée par les particules secondaires. Le TEL a été défini dans le rapport ICRU 49 (ICRU49D 1993) comme le rapport dE/dl (en keV/ μm) avec dE l'énergie moyenne cédée par une particule d'énergie E et dl l'unité de longueur de trajet parcouru. Plus le TEL d'une particule est important, plus grande sera la quantité d'énergie cédée sur une petite distance. Cette notion est importante en radiobiologie, comme nous le verrons plus loin, puisqu'elle détermine les dégâts induits par un rayonnement dans un milieu biologique.

1.3. Cas particulier des protons

Le proton est une particule chargée lourde. Le pouvoir d'arrêt du proton dans la matière est dépendant de sa vitesse : plus la vitesse est faible, plus son énergie cinétique est faible, plus le pouvoir d'arrêt est élevé, et donc le dépôt d'énergie dans la matière. Si l'on représente le pouvoir d'arrêt du proton en fonction de sa pénétration dans la matière, on obtient la courbe de Bragg (Figure 9).

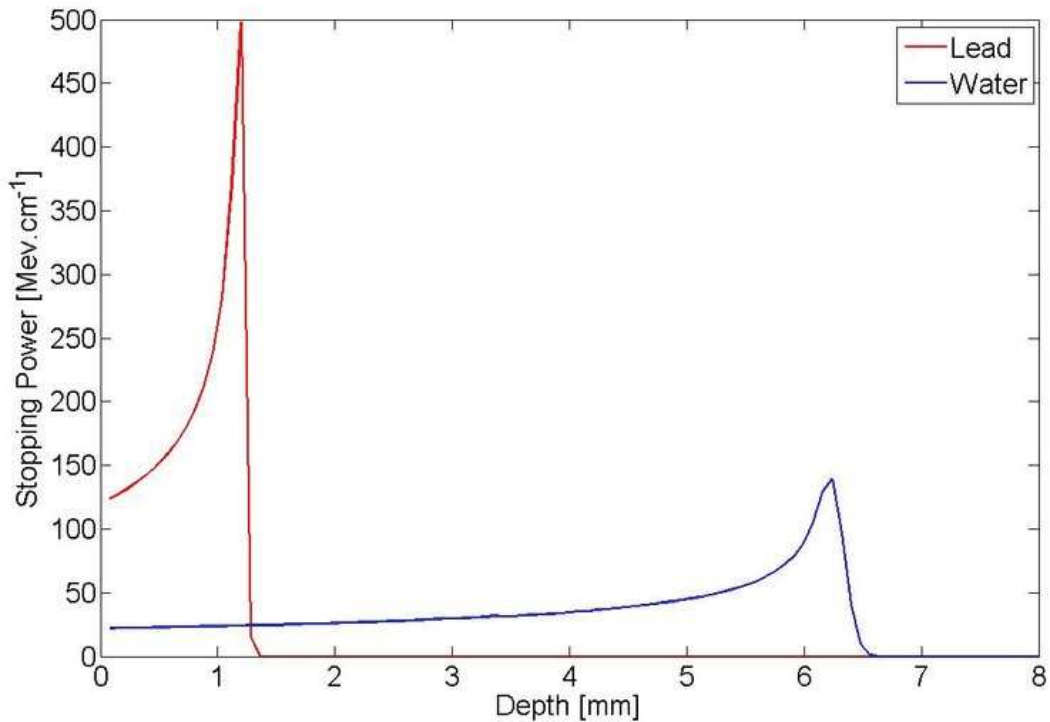


Figure 9: courbe de Bragg à 25MeV dans l'eau et dans le plomb [ResearchGate, Benjamin Cheymol]

La courbe de Bragg atteint son maximum lorsque la vitesse du proton est minimale, c'est le pic de Bragg. La localisation du pic de Bragg dépend du matériau traversé et de l'énergie du proton incident.

C'est cette notion qui est utilisée en protonthérapie pour déposer le maximum d'énergie par unité de volume au sein de la tumeur à traiter et épargner les tissus sains environnants.

Si l'on considère l'énergie cédée au milieu par le proton, le TEL varie le long de la trajectoire du proton. Les protons sont donc considérés comme des rayonnements ionisants à faible TEL, jusqu'au pic de Bragg où le rayonnement interagit comme un rayonnement à haut TEL. Pour un faisceau de protons de 65-260 MeV le TEL initial est de 0.4-1.0 keV/ μ m augmentant à 100 keV/ μ m au pic de Bragg.

2. Protonthérapie aspects biologiques

2.1. Interaction des rayonnements ionisants avec le vivant

Les dégâts induits dans les tissus biologiques peuvent résulter d'une interaction directe des rayonnements avec l'ADN ou les organelles cellulaires, ou le plus souvent d'une interaction indirecte via la formation de radicaux libres au cours de la radiolyse de l'eau.

2.1.1 Interaction indirecte

Le corps humain étant composé pour 70% d'eau la probabilité d'interaction d'un rayonnement ionisant avec l'eau contenue dans un tissu biologique est élevée. Cette interaction va induire une réaction en chaîne menant à la production de radicaux libres oxygénés. Un radical libre est composé d'un atome possédant un électron non apparié sur sa couche électronique externe. Les électrons étant stables lorsqu'ils sont appariés par deux, la tendance d'un électron isolé est de s'apparier, ce qui le rend très réactif et induit des réactions chimiques avec son entourage.

2.1.1.1 La radiolyse de l'eau

Dans les suites directes de l'interaction du rayonnement avec une molécule d'eau (10^{-15} secondes), la molécule d'eau peut être soit ionisée, soit excitée en fonction de l'énergie cédée par la particule incidente (ΔE) et de l'énergie de liaison au noyau de l'électron de l'atome cible (E_i).

Si $\Delta E > E_i$, l'électron est expulsé du cortège électronique, il y a ionisation (Figure 10):

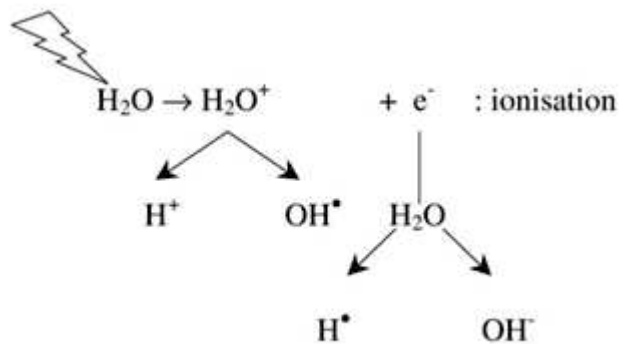


Figure 10: ionisation de la molécule d'eau

L'électron libéré par ionisation est appelé électron solvaté ou aqueux.

Si $\Delta E < E_i$, l'électron passe dans un niveau d'énergie supérieur, l'atome est excité (Figure 11):

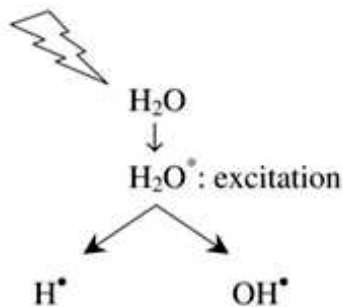


Figure 11: excitation de la molécule d'eau

Le point représente un électron non-apparié et donc un ion radical hautement réactif.

Ainsi vont être créés à la fois des composants oxydants (OH•) et des composants réducteurs (H• et e⁻).

Ces composants vont diffuser dans le milieu (10⁻⁷ secondes après l'interaction rayonnement/matière) en fonction de leur taille et de leur masse. H•, plus léger, migre plus vite que OH• et s'éloigne davantage de la trajectoire du rayonnement ionisant. Puis, les radicaux peuvent se recombinaison entre eux (Figure 12):

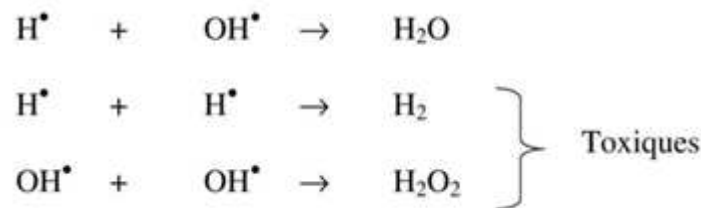
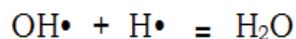


Figure 12: recombinaisons possibles de la molécule d'eau

Si la première recombinaison n'est pas délétère, les deux autres sont à l'origine notamment de radicaux (H₂O₂, H₂) très réactifs, toxiques pour le milieu cellulaire car ils se comportent comme des oxydants puissants attaquant les composés biologiques du milieu [102].

Pour les rayonnements à TEL élevé, le nombre d'ionisations dans le milieu suivant une trajectoire est élevé. La différence de vitesse de migration de OH• et H• va créer des zones de concentration disjointes de ces radicaux, favorisant les recombinaisons homologues et donc la création de radicaux H₂ et H₂O₂ hautement réactifs. Ainsi, la production d'eau oxygénée, peut se faire même en l'absence d'oxygène dans le milieu.

A contrario, pour les rayonnements à faible TEL, le nombre d'ionisation suivant une trace sera moins important. Il faudra donc plus de traces pour obtenir un même nombre d'ionisations dans le milieu. Les différentes trajectoires des traces vont s'interpénétrer, favorisant les recombinaisons hétérologues :



De 10⁻⁶ à 10⁻³ secondes après l'interaction du rayonnement ionisant dans la matière, se produisent des réactions chimiques avec l'oxygène du milieu. C'est ce que l'on nomme l'effet oxygène (Figure 13):

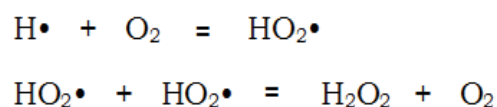


Figure 13: réactions de l'effet oxygène

L'effet oxygène prend une part importante dans les dégâts engendrés aux tissus pour les rayonnements à faible TEL [103].

Dans le cas d'une molécule d'ADN, de structure chimique R-H, l'interaction avec les radicaux OH• peut mener à des composés d'addition R-R' (Figure 14):

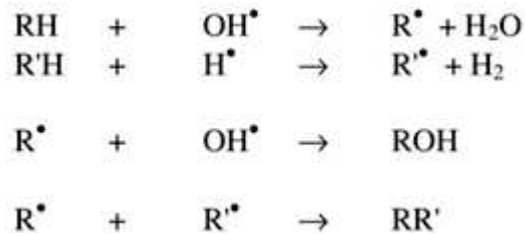


Figure 14: interaction des radicaux avec l'ADN

2.1.2 Interaction directe

Les effets directs des rayonnements ionisants sont observés lorsque le rayonnement interagit directement avec sa cible. Cependant cette interaction est beaucoup moins probable que l'interaction indirecte avec les molécules d'eau.

2.2. Effets biologiques des rayonnements ionisants

Ces interactions sont à l'origine de lésions à l'échelle cellulaire. Ces atteintes peuvent toucher les différents éléments constitutifs de la cellule : les organelles, le cytosquelette, le noyau et l'ADN. Ces effets sont décrits en annexe (Annexe II). Plus particulièrement, lorsque l'ADN est touché, les modifications induites sur le code génétique peuvent être à l'origine de mutations transmissibles d'une cellule mère à une cellule fille. Puisque les interactions entre le vivant et les rayonnements ionisants du milieu sont fréquentes, les organismes ont développé des mécanismes de réparation de l'ADN, afin de conserver au maximum leur patrimoine génétique initial (Annexe III). Lorsque ces mécanismes sont insuffisants, ou que les dommages cellulaires sont irréparables, le devenir de la cellule est engagé.

2.2.1 Mort cellulaire après irradiation

Les modifications génétiques ou les altérations des composants cellulaires après irradiation peuvent être soit létales, aboutissant à la mort cellulaire (Figure 15), soit viables pouvant conduire à la cancérisation.

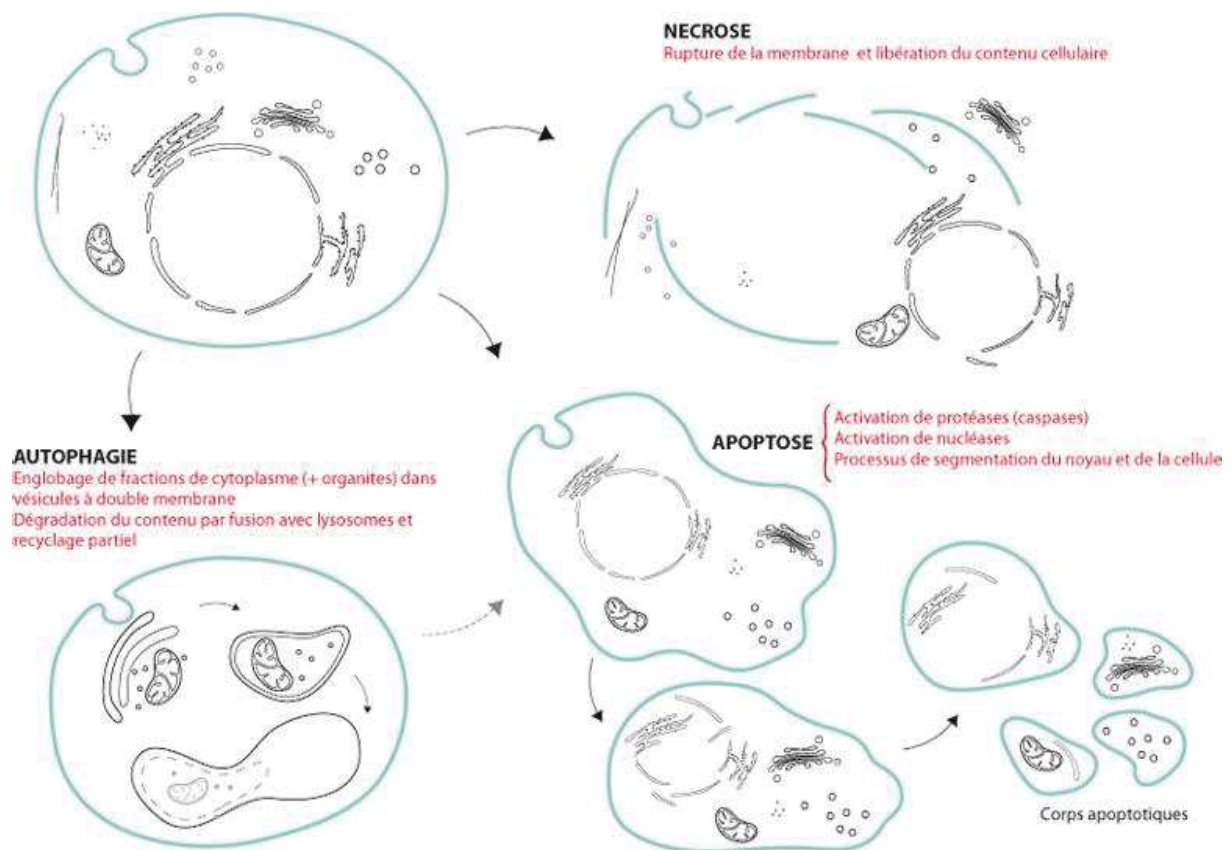


Figure 15: mécanismes de mort cellulaire [Université Catholique de Louvain]

2.2.1.1 Mort par nécrose

La nécrose est une mort cellulaire désorganisée avec libération du contenu cellulaire dans le milieu à l'origine d'une réaction inflammatoire. La cellule nécrotique présente initialement une dilatation dite oncose avec gonflement puis explosion des organites. Les lysosomes et les peroxysomes libèrent des enzymes lytiques dans le cytoplasme. Les phospholipases, lipoxygénases et sphingomyélinases entraînent la perméabilisation de la membrane cellulaire puis la libération des composants dans l'espace intercellulaire.

2.2.1.2 Mort par apoptose

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire programmée et contrôlée. Une cellule en apoptose est caractérisée par son isolement avec perte des jonctions inter-cellulaire (desmosomes), la condensation de la chromatine, la fragmentation du noyau, la formation de vésicules contenant les débris cellulaires et la dégradation de l'ADN en plusieurs fragments de 180 à 200 paires de bases (corps apoptotiques) qui seront ensuite phagocytés. L'apoptose fait intervenir des voies de signalisation dont les principaux acteurs sont les caspases (Cystein-ASpartate proteASE). On distingue les caspases

initiant le processus d'apoptose, dites initiatrices, des caspases poursuivant le processus, dites effectrices. L'initiation de l'apoptose peut se faire par voie intrinsèque ou par voie extrinsèque.

2.2.1.3.1. Voie intrinsèque

Dans le cas de la voie intrinsèque, l'apoptose est une réponse à des stress intra-cellulaires. L'apoptose est initiée par des protéines régulatrices de la famille Bcl telles que Bax et Bak. Suite à un stress Bax vient s'accrocher à la membrane externe des mitochondries [104] qui deviennent perméables. Le cytochrome c mitochondrial est libéré dans le cytosol, se lie avec la protéine Apaf-1 (Apoptosis Protease-Activating Factor-1) et forme l'apoptosome. D'autres facteurs mitochondriaux tels que Smac/Diablo, Endonucléase G, Omi/HtrA2 et AIF sont libérés. L'apoptosome se lie à la procaspase 9, l'active en caspase 9 initiatrice, menant à une cascade d'activation des caspases.

Le cytochrome c active également la production intracellulaire de réactifs oxygénés tels que, le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), qui favorisent la destruction des composants cellulaires. Il en est de même pour l'endonucléase G libérée par le cytochrome c.

2.2.1.3.2. Voie extrinsèque

Le signal initial est extracellulaire, il active un récepteur membranaire de la famille TNF (Tumor Necrosis Factor), tel FAS, TRAIL ou TNF-R1. Il y aura trimérisation de ce récepteur qui active la procaspase 8 intracellulaire en caspase 8 initiatrice. Cette activation nécessite un médiateur FADD (Fas-associated death domain). Puis la caspase 8 déclenche la cascade apoptotique.

2.2.1.3 La mort par autophagie

En réponse à un stress, la cellule séquestre le contenu intracellulaire dans une vacuole, dite autophagosome. L'autophagosome subit une maturation en vacuole dégradative avant fusion avec le lysosome cellulaire. Les enzymes lysosomiales digèrent le contenu de l'autophagosome.

2.2.2 La survie cellulaire

2.2.2.1 La sénescence

La sénescence est à mi-chemin entre la survie et la mort cellulaire. On distingue la sénescence par raccourcissement des télomères, qui est la réponse physiologique à la division cellulaire et donc au vieillissement, de la sénescence indépendante des télomères, activée notamment par l'exposition aux rayonnements ionisants. Les mécanismes morphologiques et biochimiques sont cependant semblables dans ces deux cas. Les dommages de l'ADN vont induire des protéines de signalisation et de réparation de l'ADN. De là, il y aura activation de p53 puis accumulation de p21^{WAF1}, un inhibiteur

des kinases dépendantes des cyclines. La résultante de cette cascade biochimique est l'arrêt du cycle cellulaire. La cellule reste quiescente, mais il n'y a pas de mort cellulaire [105].

2.2.2.2 Mutation et cancérisation

Suite à une irradiation, le code génétique d'une cellule peut être modifié, tout en conservant la viabilité cellulaire. Il s'agit en général d'une défaillance des systèmes de réparation de l'ADN à l'origine d'une réparation infidèle au code génétique natif. Bien qu'il puisse tout à fait s'agir de mutations muettes, c'est-à-dire sans conséquence sur la traduction protéique, ces mutations peuvent également être à l'origine de protéines différentes ou déficientes. *In fine*, de telles mutations génétiques si elles sont transmises aux cellules filles lors de la division, peuvent être à l'origine d'un gain ou d'une perte fonctionnelle à l'échelle d'un groupe cellulaire.

Lorsqu'il y a cancérisation, ces mutations sont à l'origine d'un dysfonctionnement des mécanismes de régulation cellulaire. La cellule mère et les cellules filles engendrées ne répondent plus à la régulation de leur environnement.

Pour quantifier les effets biologiques d'un rayonnement ionisant, on a recours à une mesure expérimentale standardisée : l'Efficacité Biologique Relative (EBR).

2.3. Notion d'Efficacité Biologique Relative (EBR)

Déterminer l'EBR d'un rayonnement ionisant correspond à une quantification relative de ses effets biologiques dans des conditions standardisées. Les effets du rayonnement étudié sont comparés à un rayonnement de référence connu.

Habituellement le rayonnement de référence considéré est un rayonnement X de faible TEL (3KeV/ μm). L'ICRU (International Commission on Radiation Units) recommande les rayonnements Y du ^{60}Co [106].

On a alors :

$$\text{EBR} = D_{\text{ref}}/D_r$$

Avec D_{ref} la dose du rayonnement de référence et D_r la dose du rayonnement étudié produisant les mêmes effets biologiques.

Les effets biologiques considérés sont la mortalité cellulaire ou l'incapacité définitive à se diviser obtenues grâce à un test de survie clonogénique.

La connaissance de l'EBR d'un rayonnement ionisant permet de prédire les effets biologiques des irradiations volontaires réalisées dans un contexte expérimental ou médical, mais également de réaliser une dosimétrie biologique en déterminant à partir de prélèvements biologiques la dose absorbée par un organisme vivant lors d'irradiations non maîtrisées, dans un contexte accidentel par exemple.

L'EBR détermine le facteur de pondération du rayonnement (W_r) utilisé dans les calculs dosimétriques. Effectivement, il y a plusieurs façons d'appréhender la dose délivrée par un rayonnement ionisant. Tout d'abord la dose absorbée (D), correspondant à la dose physique, c'est-à-dire l'énergie reçue par unité de masse, exprimée en Grey (Gy). A partir de la dose absorbée sera calculée la dose équivalente (H) en tenant compte du facteur de pondération du rayonnement, selon la formule :

$$H = D \times W_r$$

La dose équivalente est exprimée en Sievert (Sv).

Enfin, si l'on tient compte de la sensibilité du tissu irradié, pourra être calculé la dose efficace (E) en Sievert, en utilisant un facteur de sensibilité des tissus (W_t) :

$$E = H \times W_t$$

2.4. Cas de l'irradiation proton

Les caractéristiques physiques particulières des protons induisent des réactions biologiques parfois différentes des autres sources de rayonnements ionisants (Tableau 4).

2.4.1 EBR

Pour un faisceau de protons de 65-260 MeV l'EBR calculée est de 1.1-1.2 [107]–[110]. Cependant, cette valeur de l'EBR des protons est considérée comme peu précise puisque pouvant varier en fonction de l'énergie du proton et la localisation de la cible le long du trajet du faisceau [111]–[113]. Effectivement, comme nous l'avons vu précédemment, le dépôt d'énergie du proton dans le milieu est plus important au niveau du pic de Bragg. Il en est de même pour l'EBR.

2.4.2 Lésions de l'ADN

Les lésions à type de cassures double-brin sont plus difficilement réparées que les cassures simple brin et induisent de fait un taux de létalité cellulaire plus élevé. Différentes études ont cherché à prouver que le taux de cassures double-brin est plus important lors d'une irradiation proton que d'une irradiation aux rayonnements X ou γ [114], [115]. Concernant les modifications épigénétiques et plus particulièrement la méthylation de l'ADN, les protons induisent plutôt une hyperméthylation contrairement aux rayonnements X qui induisent plutôt une hypométhylation. Le rôle de ces modifications épigénétiques dans le devenir de la cellule irradiée est encore débattu. Effectivement, l'hypométhylation globale de l'ADN aurait pour conséquence une instabilité de l'ADN et une augmentation du risque cancéreux par augmentation de l'expression de certains gènes [116]. De la même manière, l'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeur peut mener à la cancérisation cellulaire [117]–[119].

2.4.3 Apoptose

Plusieurs études décrivent une augmentation du taux de cellules apoptotiques suite à une irradiation proton, comparativement à une irradiation photons [120], [121]. L'irradiation proton favoriserait l'expression de certains signaux pro-apoptotiques : p38 [122], [123], JNK [122], [124], MAP (mitogen-activated protein) [122], Bax, p 21 [121]. A contrario, l'irradiation photon activerait certains signaux de survie : ERK (Signal regulated kinase) [122], [124], p21 [121].

2.4.4 Angiogenèse

L'angiogenèse est modifiée lors d'une irradiation photon. Plusieurs études montrent une néovascularisation plus importante de la tumeur après irradiation photon (réf). Cela s'explique par l'induction de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, IL-6 (interleukine 6), HIF-1 α , bFGF. A contrario, l'angiogenèse semble inhibée suite à une irradiation proton [125], [126]. Puisque la néovascularisation tumorale favorise la dissémination métastatique, l'irradiation proton permettrait de réduire ce risque en comparaison avec l'irradiation photon.

2.4.5 Inflammation

Les facteurs pro-inflammatoires ont été rapportés dans plusieurs études comme surexprimés après une irradiation photon. D'autres études concernant l'irradiation proton rapportent une sous-expression de facteurs proinflammatoires tels l'IL-6, l'IL-8 [127], TGF- β [128], IL-1 et Stat-5a. Cette observation n'est pas considérée comme favorable à l'élimination tumorale puisque l'induction d'une inflammation locale permettrait le recrutement de cellules immunitaires, aidant la destruction précoce des cellules tumorales ayant perdu les signaux de surface de reconnaissance du « Soi » [129]. Cependant des études complémentaires sont nécessaires puisque d'autres études contredisent ces résultats [130].

	Photons	Protons
EBR	1	1,1 - 1,2
Cassures double-brin	-	+
Epigénétique	Hyperméthylation	Hypométhylation
Apoptose	-	+
Angiogenèse	+	-
Inflammation	+	-

Tableau 4 : Comparatif des principaux effets d'une irradiation protons par rapport à une irradiation photons.

IV. Matériel et Méthodes

1. Modèles

1.1. Modèle tumoral

La lignée cellulaire SK-Hep1 a été choisie pour son fort potentiel prolifératif et son caractère radiorésistant [131]. C'est une lignée cellulaire tumorale humaine isolée à partir du liquide d'ascite d'un patient porteur d'un adénocarcinome hépatique [132]. Elle présente des caractéristiques mésenchymateuses de dédifférenciation tumorale [133], [134].

La lignée tumorale a été obtenue auprès de la société ATCC®, HTB™. Toutes les cellules étaient au 4^{ème} passage après décongélation lors de l'inoculation.

Une étude préalable, faisant partie du projet de recherche rpPET, mené à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) en collaboration avec le Centre de Lutte contre le Cancer Paul Strauss, a permis de vérifier que la croissance tumorale pour une inoculation au petit animal (souris NMRI-nu/nu) en sous-cutané (10^6 cellules en suspension) était rapide et homogène. Le suivi de la croissance a été réalisé par mesure du plus grand diamètre lésionnel et du diamètre perpendiculaire au pied à coulisse. Une taille cible a été définie pour le traitement, en rapport avec la profondeur atteignable par le faisceau de proton utilisé pour le traitement, à savoir 5mm. La figure 16 résume les résultats de l'étude préalable de croissance (n=15) avec une taille cible obtenue pour environ 80% des sujets à J5.

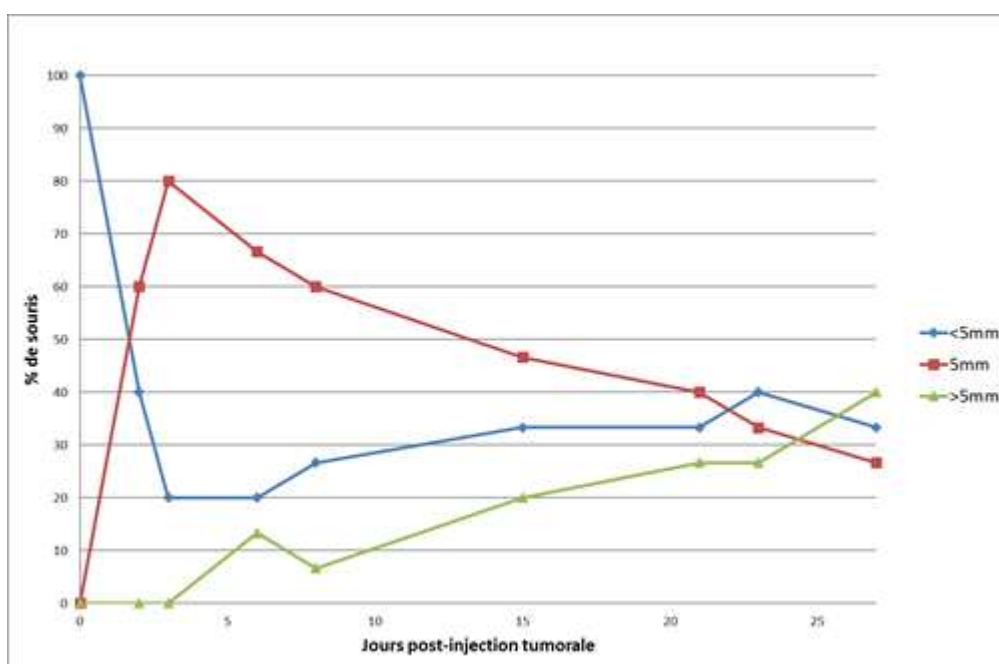


Figure 16: évolution du diamètre tumoral chez la souris nude en fonction du délai post-injection

1.2. Modèle animal

L'hôte est un animal immunodéficient (NMRI-nu/nu), porteur de la mutation homozygote du gène *Foxn1nu* appelée couramment le gène *nude* [135]. Ces souris sont athymiques, ne produisant pas de lymphocytes T. Les souris *nude* (NMRI-nu/nu) de 6 semaines ont été obtenues auprès de Janvier labs. Pendant toute la durée des expérimentations les souris étaient gardées en cage individuelle, et nourries avec des granulés spécifiques. Leurs conditions d'élevage respectaient les directives Européennes (Directive No. 86/609/ CEE). La tumeur était inoculée en sous-cutané de la région de la cuisse par injection de cellules en suspension (10^6 cellules) à J0 (n°Apofis 9101 et 3659).

2. Traitements

2.1. Chimiothérapie

La chimiothérapie employée dans les expérimentations est un inhibiteur de la Topoisomérase I, le Topotécan. Le choix de cette chimiothérapie et la dose administrée se sont basés sur des données de la littérature [93], [99], [100], [136], [137]. Effectivement la dose totale administrée, 12,5 mg/kg a été rapportée comme la dose maximale tolérée chez le petit animal. L'étude de Guichard et al. [137] menée sur le traitement par Topotécan du carcinome ovarien chez le petit animal avait pour but de déterminer quel était le protocole d'administration optimal de cette dose totale pour obtenir le maximum d'effet thérapeutique avec le minimum d'effets secondaires. A partir de ces données nous avons retenu deux doses de traitement :

- une pleine dose de 12,5 mg/kg répartie en 10 injections intra-péritonéales, à raison de 1 injection par jour de 1,25mg/kg, 5 jours par semaine, deux semaines d'affilée,
- une demi-dose de 6,25 mg/kg répartie en 10 injections intra-péritonéales à raison de 1 injection par jour de 0,625mg/kg, 5 jours par semaine, deux semaines d'affilée.

Le Topotécan en poudre était divisé en 10 échantillons correspondants à la dose quotidienne suffisante pour traiter l'ensemble du lot de souris. Le Topotécan était conservé à 5°C dans l'obscurité. Pour obtenir la solution injectable en intra-péritonéal, le Topotécan était dilué au moment du traitement avec 300 µL d'eau stérile et le pH ajusté à 4 à l'aide de 0,1 N HCl et 0,1 N NaOH. Enfin, la solution était diluée avec du NaCl 0,9% (B.Braun VetCare®) pour obtenir un volume injectable d'au maximum 200 µL par jour et par souris.

2.2. Protonthérapie : production

La production du faisceau d'irradiation proton a été réalisée à l'aide du cyclotron de la plateforme CYRCE (CYclotron pour la Recherche et l'Enseignement) de l'IPHC. Le cyclotron de la plateforme est un modèle TR 24 de la société Advanced Cyclotron Systems, Inc. (ACSI®). Il s'agit d'un cyclotron de

nouvelle génération à fort courant de faisceau (200 μ A extensible à 500 μ A) dont l'énergie maximal est de 25MeV.

Le cyclotron fonctionne avec un apport initial de H- qui vont être accélérés à raison de 50keV par quart de tour. Puis le faisceau traverse une fine feuille de carbone placée sur son trajet afin d'induire la perte de deux électrons pour former des protons.

De là le faisceau sera utilisé soit pour la production de radionucléides, après avoir interposé une cible sur son trajet, soit pour l'irradiation.

Le faisceau d'irradiation traverse un collimateur de 10mm. Il s'agissait d'un faisceau d'énergie 25MeV pour l'ensemble des expérimentations. Avant chaque utilisation, le faisceau protons était calibré avec mesure de l'énergie initiale au niveau d'une cup, et à l'air à hauteur du site d'irradiation.

En fonction de l'énergie du faisceau nécessaire à l'irradiation, s'échelonnant de 25MeV à 1MeV, ce dernier était dégradé par traversée d'une feuille d'aluminium d'épaisseur déterminée. Le programme d'irradiation des tumeurs était calculé par l'équipe de l'IPHC et comprenait 20 plans d'irradiation (Figure 17), répartis de la profondeur vers la surface, pour obtenir un pic de Bragg élargi ou SOBP (Spread-Out Bragg Peak). Le diamètre du faisceau était de 10mm. L'énergie du faisceau permettait d'atteindre une profondeur d'irradiation de 10mm, ayant servi de base au choix de la taille tumorale cible avant irradiation, permettant d'obtenir une irradiation homogène de l'ensemble du volume tumoral.

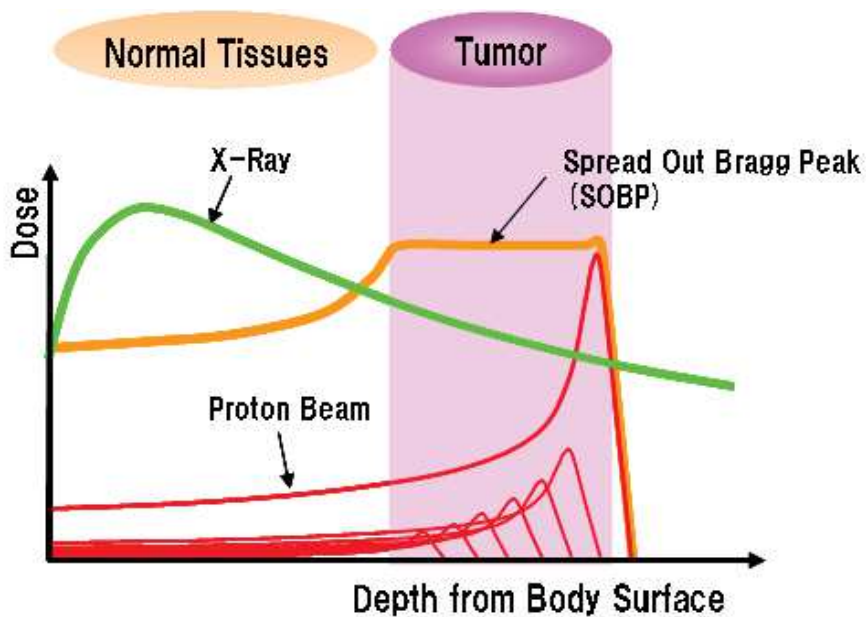
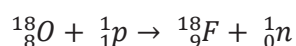


Figure 17 : Principe d'addition des pics de Bragg à différentes énergies pour obtenir le SOBP adapté à la tumeur [Sumitomo Heavy Industries, Ltd]

3. Imagerie TEP

3.1 Production de fluor 18

La production de fluor 18 a également été réalisée à l'aide du cyclotron de la plateforme CYRCE de l'IPHC. Pour cela, était utilisé le faisceau de protons produit comme décrit ci-dessus à partir de l'accélération des H-. Ce faisceau était ensuite dirigé sur une cible d'eau enrichie en oxygène 18 pour mener à la réaction :



La demi-vie du fluor 18 ainsi produit est de 110 minutes.

3.2 Traceurs

3.2.1 ${}^{18}\text{F}$ -FDG

Le ${}^{18}\text{F}$ -FDG utilisé pour les expérimentations a été produit par le laboratoire de la plateforme CYRCE de l'IPHC. La dose moyenne employée était de 11 (+/- 1) MBq par souris. Le radiotraceur était dilué dans du sérum physiologique 0,9% NaCl (B.Braun VetCare®) pour obtenir un volume injectable moyen de 180 µL, (volume minimum de 155 µL). L'activité réellement injectée était calculée par mesure de l'activité avant injection et mesure de l'activité résiduelle.

Pour les expérimentations au ${}^{18}\text{F}$ -FDG, les souris *nude* devaient être mises à jeun au moins 4 heures avant l'injection du radiotraceur. Les acquisitions étaient réalisées 45 minutes après injection intraveineuse (veine de la queue). Les souris étaient anesthésiées pendant la biodistribution, et lors de l'acquisition pour obtenir une immobilisation pendant toute la durée de l'acquisition statique de 10 minutes.

3.2.2 ${}^{18}\text{F}$ -FLT

Le ${}^{18}\text{F}$ -FLT utilisé pour les expérimentations a été produit par le laboratoire de la plateforme CYRCE de l'IPHC, selon une méthode décrite dans la littérature [138]. La dose moyenne employée était de 13 (+/- 1) MBq par souris. Le radiotraceur était dilué dans du sérum physiologique 0,9% NaCl (B.Braun VetCare®) pour obtenir un volume injectable moyen de 180 µL. L'activité réellement injectée était calculée par mesure de l'activité avant injection et mesure de l'activité résiduelle.

Les acquisitions étaient réalisées 90 minutes après injection intraveineuse. Pour l'acquisition, les souris étaient anesthésiées pour obtenir une immobilisation toute la durée de l'acquisition statique de 10 minutes.

3.3 Acquisitions et reconstruction

Les acquisitions étaient réalisées à l'aide d'une caméra TEP dédiée au petit animal Inviscan®. Les détecteurs de la caméra TEP sont composés de cristaux de type LYSO associés à des photodétecteurs. Les caractéristiques de la caméra TEP sont décrites dans le tableau 5.

Sensibilité entre 250 keV et 750 keV	9,8%
Résolution spatiale	1,1 mm
Champ de vue axial	94 mm
Champ de vue transaxial	80 mm
Résolution en énergie	14%
Résolution temporelle	1,8 ns

Tableau 5 : Caractéristiques de la caméra TEP petit animal Inviscan®

La reconstruction était de type OSEM (Ordered subset expectation) avec 8 itérations et 4 sous-ensembles.

4. Confrontation à l'anatomopathologie

25 souris ont été sacrifiées à J21 afin de prélever la tumeur pour analyse anatomopathologique. Les tumeurs étaient prélevées et fixées au formol 4% et incluses en blocs de paraffine. Les coupes étaient réalisées au microtome à une épaisseur de 4 µm puis étalées sur lames super frost plus® et séchées à l'étuve à 52°C pendant une heure.

Les lames étaient ensuite passées à l'automate BENCHMARK Ultra de VENTANA pour immunomarquage du Ki-67, un index de prolifération cellulaire, à partir d'un clone Mib-1 de DAKO M7240, suivant le protocole : prétraitement par CC1 pendant 64 min et incubation avec l'anticorps de 32 min.

La mesure du Ki-67 a été réalisée sur 4 souris témoins, 5 souris traitées par chimiothérapie pleine dose, 4 souris traitées par irradiation proton à la dose de 10 Gy, 4 souris traitées par irradiation proton à 20 Gy, 4 souris traitées par irradiation proton à 10 Gy et Topotécan pleine dose et 4 souris traitées par irradiation proton à 20 Gy et Topotécan pleine dose. Le Ki-67 était mesuré par comptage du pourcentage de noyaux marqués dans la zone à l'activité mitotique la plus élevée de la coupe.

5. Protocoles d'expérimentation

5.1. Protocole chimiothérapie

Le protocole de traitement par chimiothérapie (Figure 18) comprenait :

- L'inoculation des cellules tumorales à J0,
- Le traitement par chimiothérapie dose complète ou demi-dose de J5 à J9 et de J12 à J16. Le début du traitement a été choisi en fonction de l'étude préliminaire sur l'obtention de la taille tumorale cible, de 5mm de diamètre, pour 80% des tumeurs à J5.
- Les examens TEP au ^{18}F -FDG ou au ^{18}F -FLT à J5, J12, J19, J26.

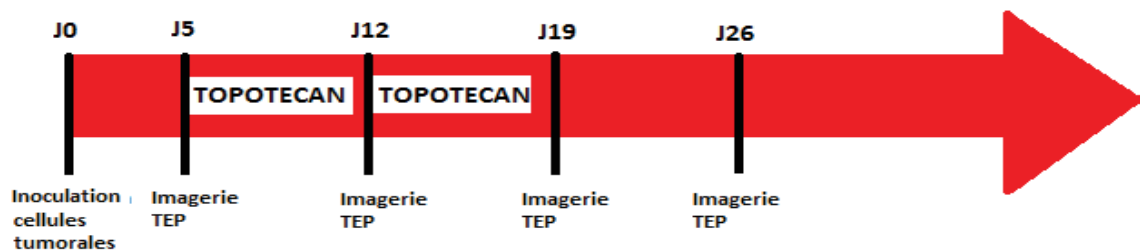


Figure 18: schéma récapitulatif du protocole expérimental de chimiothérapie

Sept souris ont été incluses dans le groupe contrôle suivi par imagerie au ^{18}F -FDG et neuf dans le groupe contrôle suivi par imagerie au ^{18}F -FLT. Les groupes contrôles correspondaient à des souris xénotransplantées mais non traitées.

Onze souris ont été incluses dans le groupe traité par chimiothérapie dose complète, 15 dans le groupe traité par demi-dose, pour les acquisitions au ^{18}F -FDG. Les critères d'exclusion étaient la mort de l'animal avant la fin du protocole ou l'absence de donnée d'une acquisition pour cause de problème technique lié à l'injection du radiotracer ou à l'acquisition.

Neuf souris ont été incluses dans le groupe traité par chimiothérapie dose complète, 6 dans le groupe traité par demi-dose, pour les acquisitions au ^{18}F -FLT.

5.2. Protocole protonthérapie

Le protocole de protonthérapie (Figure 19) comprenait :

- L'inoculation des cellules tumorales à J0,
- L'irradiation proton à une dose de 5, 10 ou 20 Gy en une fraction à J7,
- Les examens TEP au ^{18}F -FDG ou au ^{18}F -FLT à J6, J12, J18, J25.

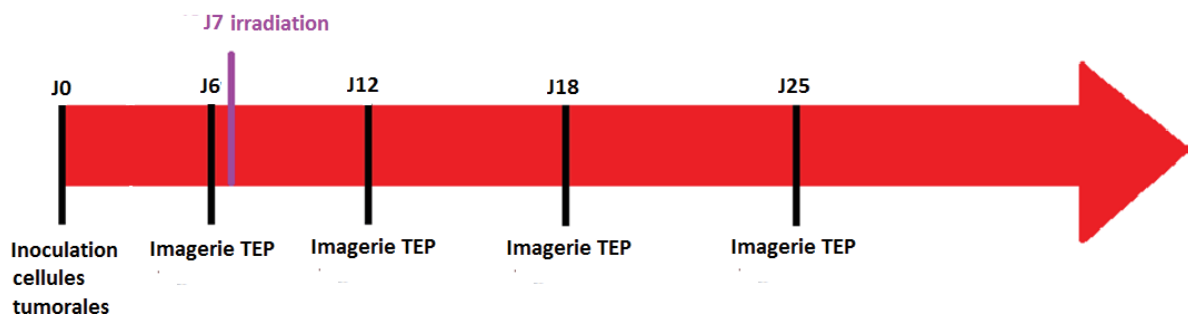


Figure 19: schéma récapitulatif du protocole expérimental de protonthérapie

Pour des raisons techniques, les jours l'imagerie TEP du protocole d'irradiation par protons n'ont pas pu être parfaitement calés sur les jours d'imagerie du protocole de chimiothérapie.

Cinq souris étaient incluses dans le groupe traité par 5 Gy, 6 dans le groupe traité par 10 Gy et 7 dans le groupe traité par 20 Gy, pour acquisitions au ^{18}F -FDG.

Six souris étaient incluses dans le groupe traité par 5 Gy, 13 dans le groupe traité par 10 Gy et 9 dans le groupe traité par 20 Gy, pour les acquisitions au ^{18}F -FLT.

5.3. Protocole potentialisation chimio-protonthérapie

Le protocole de potentialisation chimio-protonthérapie (Figure 20) comprenait :

- L'inoculation des cellules tumorales à J0,
- Le traitement par chimiothérapie dose complète de J5 à J9 et de J12 à J16,
- L'irradiation proton à une dose de 5, 10 ou 20 Gy en une fraction à J6,
- Les examens TEP au ^{18}F -FDG ou au ^{18}F -FLT à J19 et J26.

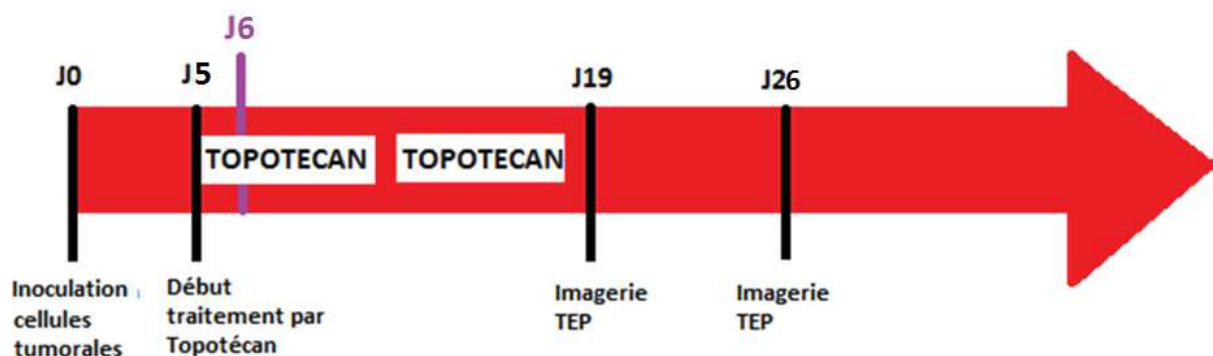


Figure 20: schéma récapitulatif du protocole expérimental de radio-chimiothérapie

Les jours d'imagerie du protocole de potentialisation ont été choisis après étude des résultats des deux autres protocoles afin de s'affranchir de potentiels biais de fixation comme l'inflammation post-radiothérapie, et de saisir les moments clés du traitement (reprise tumorale).

La recherche de potentialisation entre les deux types de traitements a été réalisée, pour les images au ^{18}F -FDG, sur 7 souris du groupe chimiothérapie et irradiation 5 Gy, 6 souris du groupe chimiothérapie et irradiation 10 Gy, et 6 souris du groupe chimiothérapie et irradiation 20 Gy.

Pour les images au ^{18}F -FLT, sur 6 souris du groupe chimiothérapie et irradiation 5 Gy, 5 souris du groupe chimiothérapie et irradiation 10 Gy, et 6 souris du groupe chimiothérapie et irradiation 20 Gy.

Les effectifs des différents groupes sont résumés dans le tableau en annexe (Annexe IV).

6. Traitement des données

6.1. Logiciel de traitement des données et paramètres étudiés

Le logiciel employé était le logiciel Pmod®. Il permet la visualisation des acquisitions avec reconstructions dans le plan axial, sagittal et coronal (Figure 21). Les résultats étaient considérés comme significatifs pour $p \leq 0.05$.

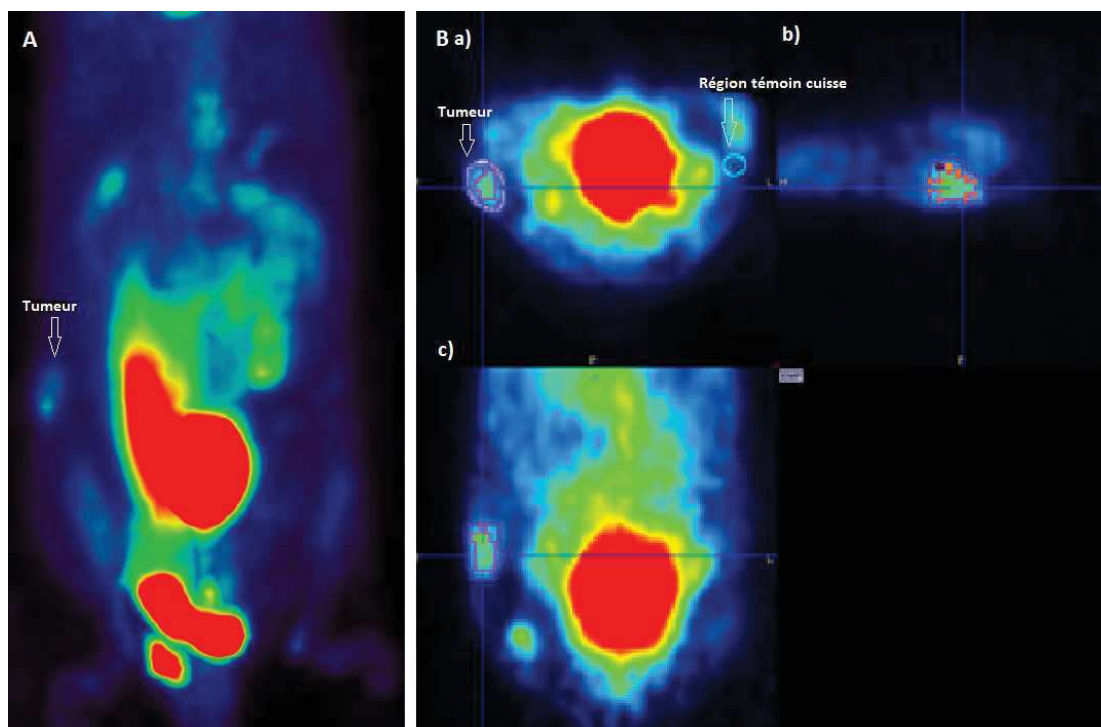


Figure 21: visualisation de acquisitions à partir du logiciel Pmod®. A : Maximum Intensity Projection. B a) coupe sagittale, b) coupe frontale, c) coupe axiale. En bleu foncé, contour tumoral. En rose, contour du volume à 40% de la SUVmax. En bleu clair, région témoin de la cuisse controlatérale.

La tumeur était alors délimitée coupe par coupe. Une région témoin de 1mm³ était délimitée au niveau du muscle de la cuisse controlatérale et un volume de 1mm³ était également délimité au niveau du foie. Ce volume de 1mm³ avait été choisi pour obtenir une région témoin relativement homogène correspondant à du tissu grasseux de la cuisse controlatérale en évitant les tissus musculaire ou osseux. Pour la région témoin du foie, deux volumes ont été délimités : 1mm³ et 2mm³. Les résultats n'étant pas statistiquement différents, il a été choisi de conserver les données de la mesure de 1mm³.

Les paramètres relevés dans ces volumes étaient :

- La SUV maximale (SUVmax) de la tumeur, de la région témoin controlatérale et de la région témoin du foie, définies par :

$$SUV_{max} = \frac{\text{Fixation maximale dans la région d'intérêt (kBq/ml)} \times \text{Poids total de l'animal (g)}}{\text{Activité injectée (kBq)} \times \text{Masse volumique eau (g/ml)}}$$

- La SUV moyenne (SUVmean) de la tumeur et de la région témoin du foie, définie par :

$$SUV_{mean} = \frac{\text{Moyenne de la fixation dans la région d'intérêt (kBq/ml)} \times \text{Poids total l'animal (g)}}{\text{Activité injectée (kBq)} \times \text{Masse volumique eau (g/ml)}}$$

A partir de la SUVmax de la tumeur, était contouré un volume correspondant à un seuillage à 40% de la SUVmax (l'on ne conservait que les 40% les plus fixants du volume initial) (Figure 22).

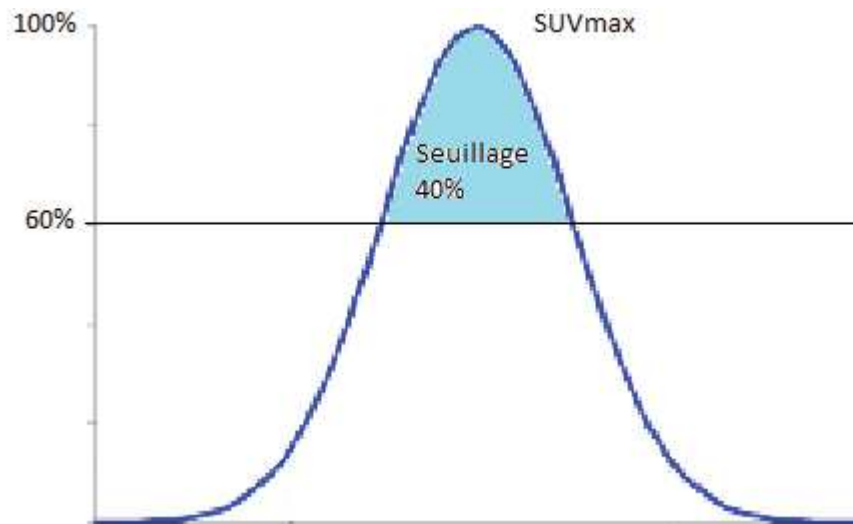


Figure 22: Principe du seuillage 40%.

Le but de ce seuillage était de s'affranchir du caractère opérateur dépendant de la délimitation initiale de la tumeur. Dans ce volume délimité à 40% de la SUV max, étaient relevés :

- La SUV maximale (SUVmax 40%)

- La SUV moyenne (SUVmean 40%)
- Le volume tumoral (Volume tumoral 40%)

A partir de ces données était également calculé un paramètre composite correspondant au produit :

$$SUV_{mean} 40\% \times Volume 40\%$$

Ce paramètre est appelé index d'activité tumorale.

L'ensemble des mesures était réalisé sur chacune des acquisitions du protocole.

Les données concernant un groupe de souris étaient moyennées. Pour la présentation des résultats, les moyennes des mesures comparées ont été normalisées sur la première imagerie (rapportée à une valeur de 1).

Pour la recherche de potentialisation, les pentes de croissance ou de décroissance entre les mesures réalisées à J19 et J26 ont été calculées et comparées aux pentes des mesures réalisées à J19 et J26 pour la chimiothérapie, et aux pentes des mesures réalisées à J18 et J25 pour la protonthérapie. Les paramètres étudiés étaient la SUVmax de la tumeur et l'index d'activité tumorale.

6.2. Statistiques

L'étude comparative à partir des données quantitatives était réalisée sur le logiciel StatXact® par test de Mann-Whitney exact. Pour les études longitudinales était utilisé le test de Mann-Whitney exact stratifié. Les résultats étaient considérés comme significatifs pour $p \leq 0.05$.

V. Résultats

1. Volumes tumoraux mesurés

La mesure du volume tumoral au pied à coulisse met en évidence une croissance au cours du temps du volume tumoral des souris du groupe contrôle (n=12) (Figure 23). Cette croissance est significative ($p \leq 0.05$) à partir de J12. Il en est de même pour les souris traitées par chimiothérapie demi-dose (n=11) dont la croissance est significative à partir de J14. Le volume tumoral des souris traitées par chimiothérapie pleine dose (n=13) ne présente pas de variation significative et est considérée comme stable. Le volume tumoral mesuré est significativement différent entre les groupes traités à pleine dose et demi-dose à partir de J16.

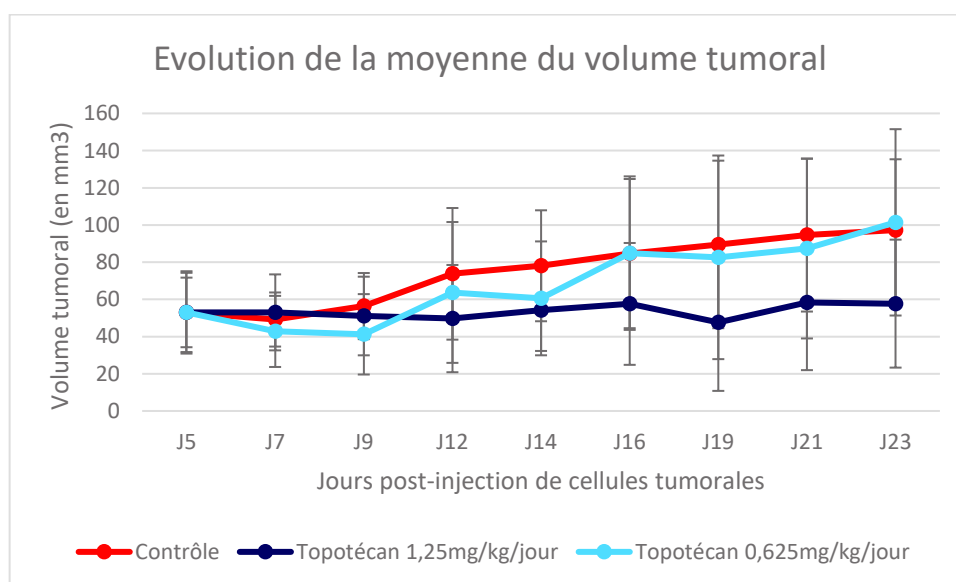


Figure 23: évolution de la moyenne du volume tumoral, en fonction de la dose de chimiothérapie

Concernant les souris traitées par irradiation (Figure 24), le volume tumoral est décroissant au cours du temps, quelle que soit la dose. Cette décroissance est significative dès J9 dans le groupe traité à 5Gy (n=11), et à partir de J12 pour les groupes traités à 10 Gy (n=19) et 20 Gy (n=16). Il n'est pas mis en évidence de croissance significative de ces courbes pour un éventuel échappement thérapeutique. La différence entre le groupe contrôle (n=12) et les souris traitées par protonthérapie est significative à partir de J9 pour les groupes traités à 5 et 10 Gy et à partir de J12 pour le groupe traité à 20 Gy.

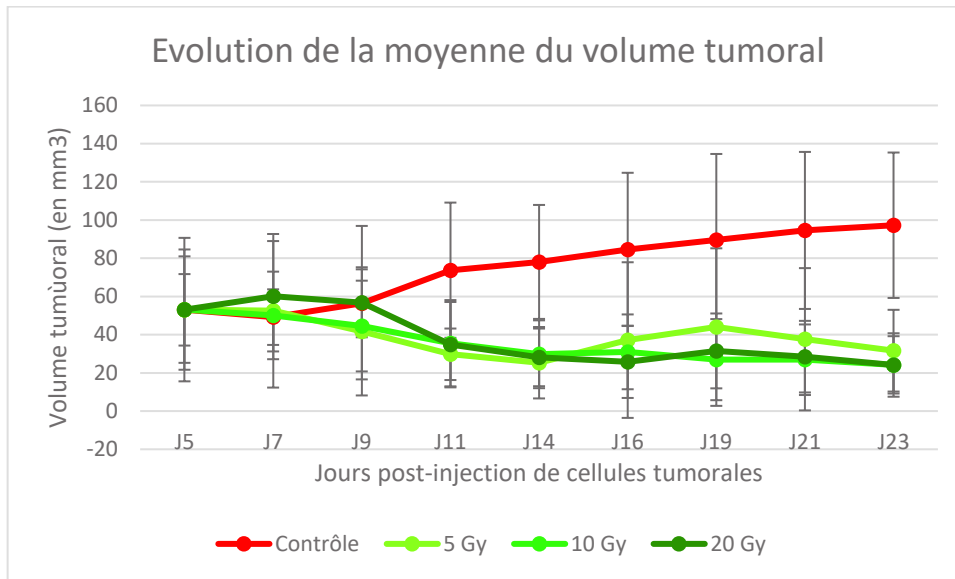


Figure 24: évolution de la moyenne du volume tumoral, en fonction de la dose de protonthérapie

2. ^{18}F -FDG

2.1. Groupe contrôle au ^{18}F -FDG

La moyenne normalisée de la SUVmax du groupe contrôle était de 1 à J5, 1,47 à J12, 1,41 à J19 et 2,03 à J26.

La moyenne normalisée de la SUVmean 40% du groupe contrôle était de 1 à J5, 1,43 à J12, 1,36 à J19 et 1,97 à J26.

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% de la SUVmax du groupe contrôle était de 1 à J5, 1,55 à J12, 2,93 à J19 et 2,67 à J26.

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale du groupe contrôle était de 1 à J5, 2,16 à J12, 4,00 à J19 et 5,37 à J26.

Les mesures de SUVmax, SUVmean 40% et de l'index d'activité tumorale, présentent une augmentation statistiquement significative entre chacun des points de mesure.

2.2. Régions témoins

Les mesures de SUVmax dans les régions témoins ne présentent pas de variation statistiquement significative et sont donc considérées comme stables (Figures 25 et 26).

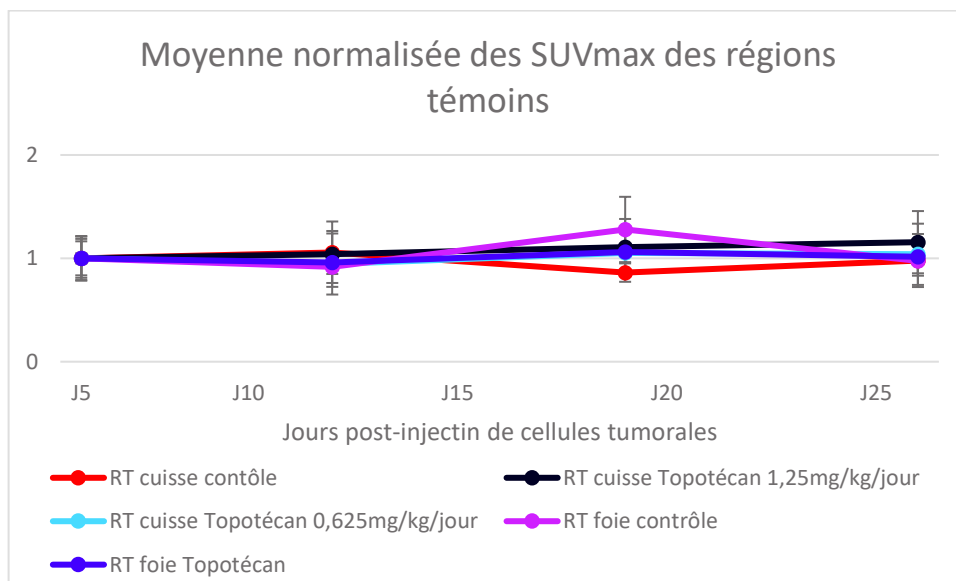


Figure 25: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax des régions témoins (RT), au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par chimiothérapie

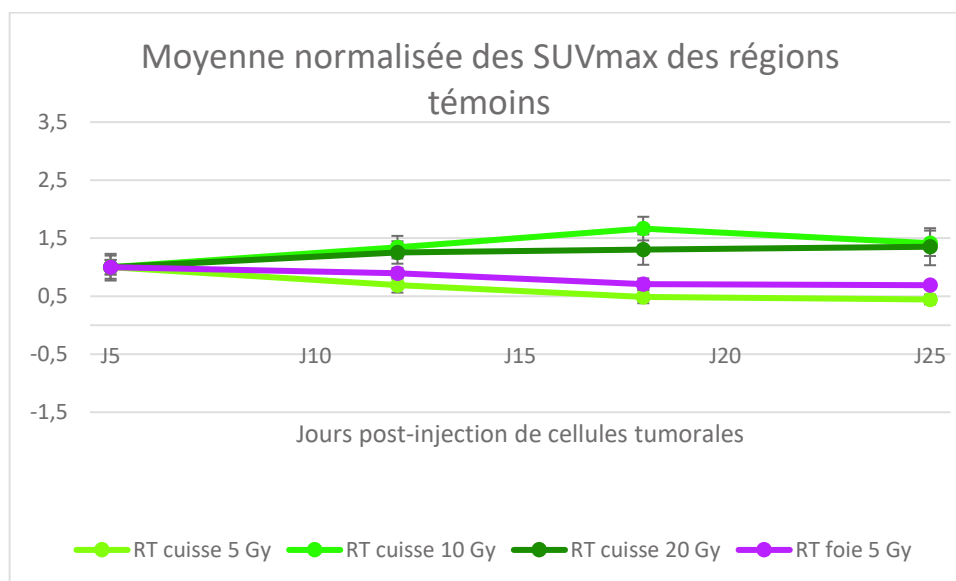


Figure 26: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax des régions témoins (RT), au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par protonthérapie

2.3. Chimiothérapie

2.3.1 SUVmax

La moyenne normalisée de la SUVmax (Figure 27) du groupe traité à dose complète était de 1 à J5, 1,14 à J12, 1,23 à J19 et 1,57 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J19 et J26. La différence avec le groupe contrôle est significative à J19 et J26.

La moyenne normalisée de la SUVmax du groupe traité à demi-dose était de 1 à J5, 1,20 à J12, 1,31 à J19 et 1,50 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J12 et J26. La croissance observée de la fixation est donc plus précoce que dans le groupe traité à dose complète. La différence avec le groupe traité à dose complète est significative à J19.

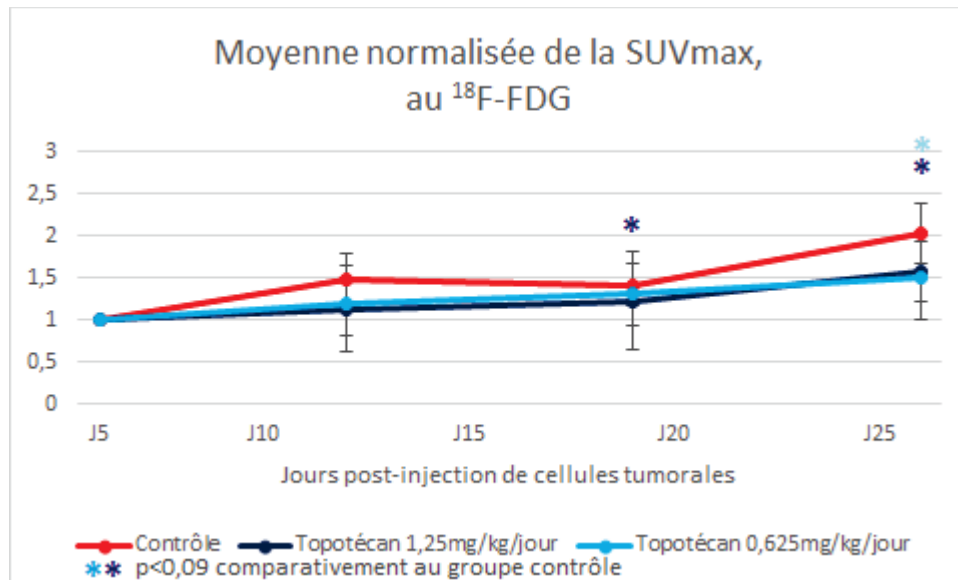


Figure 27: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax, au ¹⁸F-FDG, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle

2.3.2 SUVmean 40%

La moyenne normalisée de la SUVmean 40% (Figure 28) du groupe traité à dose complète était de 1 à J5, 1,17 à J12, 1,09 à J19 et 1,59 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J19 et J26. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J19 et J26.

La moyenne normalisée de la SUVmean 40% du groupe traité à demi-dose était de 1 à J5, 1,15 à J12, 1,27 à J19 et 1,45 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J12 et J26. Il n'y a pas de différence significative avec le groupe traité à dose complète.

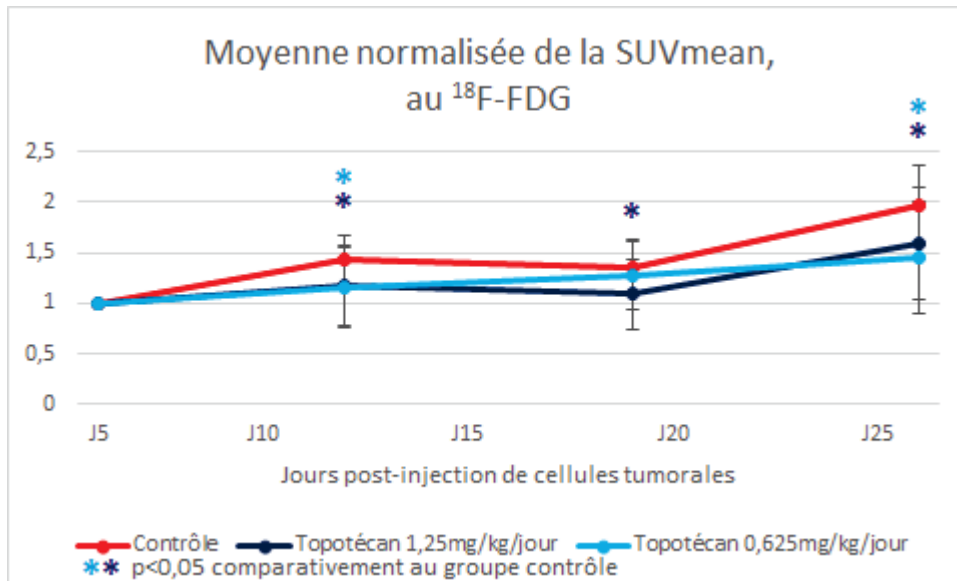


Figure 28: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmean 40%, au ¹⁸F-FDG, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle

2.3.3 Volume tumoral 40%

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% (Figure 29) du groupe traité à dose complète était de 1 à J5, 0,68 à J12, 0,84 à J19 et 1,23 à J26. Ces mesures présentent une décroissance statistiquement significative entre J5 et J12, puis une croissance entre J19 et J26. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J19 et J26.

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% du groupe traité à demi-dose était de 1 à J5, 1,09 à J12, 1,80 à J19 et 2,58 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J12 et J26. La différence avec le groupe traité à dose complète est significative à J19.

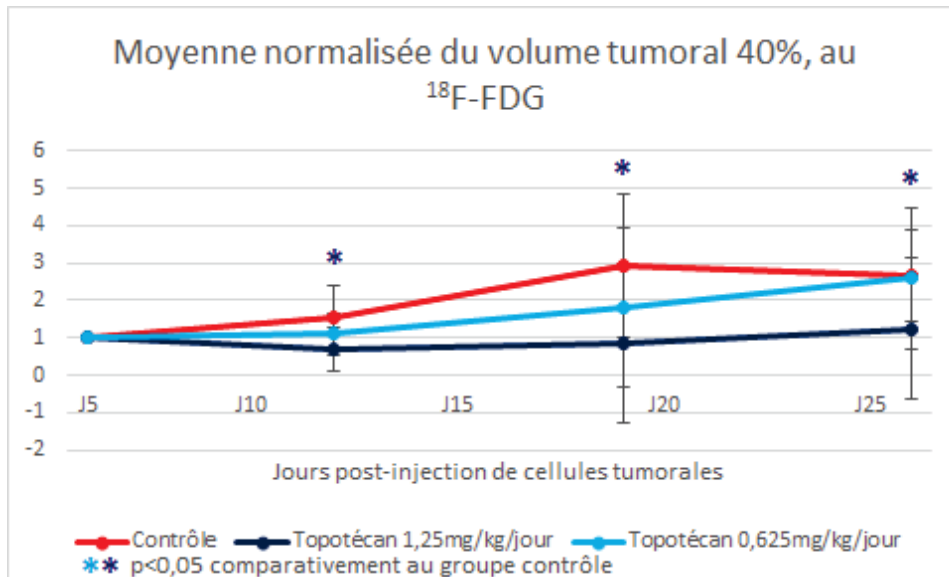


Figure 29: évolution de la moyenne normalisée du volume tumoral 40%, au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle

2.3.4 Index d'activité tumorale

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale (Figure 30) du groupe traité à dose complète était de 1 à J5, 0,69 à J12, 0,88 à J19 et 1,69 à J26. Ces mesures présentent une décroissance statistiquement significative entre J5 et J12, puis une croissance entre J19 et J26. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J19 et J26.

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale du groupe traité à demi-dose était de 1 à J5, 1,21 à J12, 2,09 à J19 et 3,22 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J12 et J26. La différence avec le groupe traité à dose complète est significative à J19 et J26.

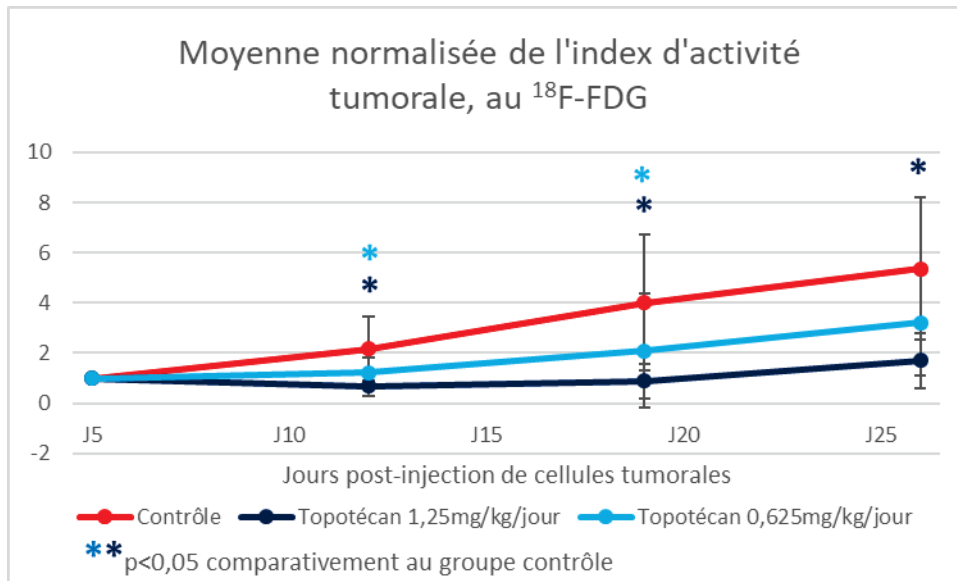


Figure 30: évolution de la moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale, au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle

Les images TEP au ^{18}F -FDG réalisées lors du protocole de traitement par chimiothérapie nous permettent de visualiser une fixation du ^{18}F -FDG par la tumeur (Figure 31) qui se détache du bruit de fond environnant. La tumeur peut être délinéée. La fixation tumorale est différente de celle des régions contrôles dessinées dans la patte controlatérale et du parenchyme hépatique.

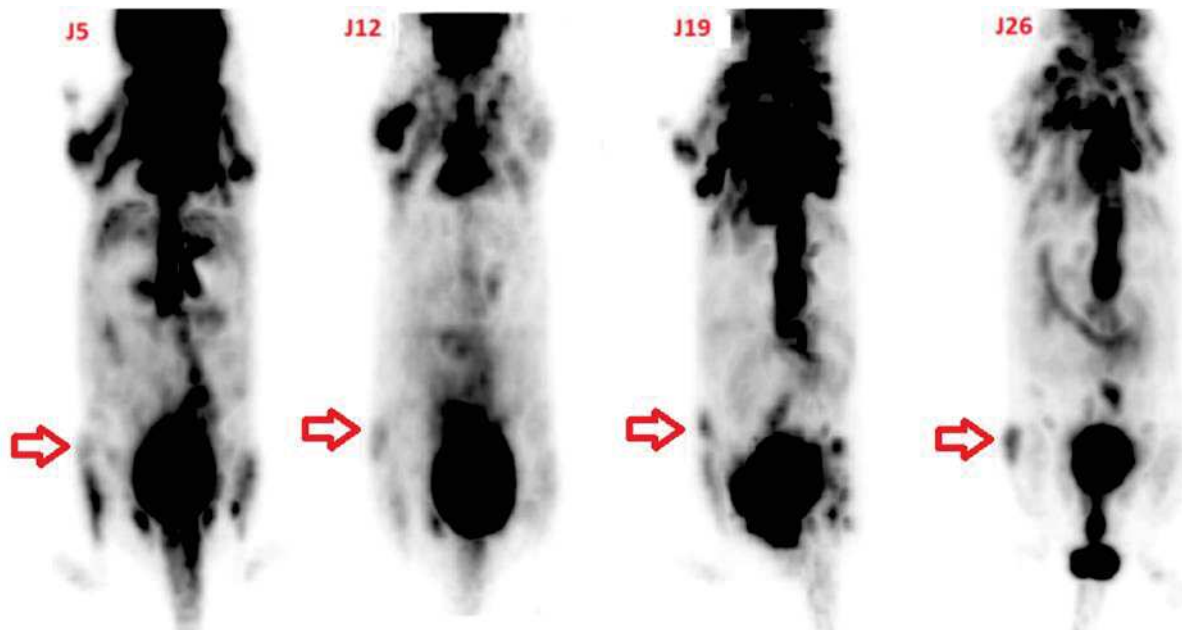


Figure 31: imagerie du petit animal au ^{18}F -FDG au cours du traitement par chimiothérapie pleine dose. La flèche indique la xénogreffe sous-cutanée.

La fixation tumorale est significativement différente entre les groupes traités et le groupe contrôle, quel que soit le paramètre mesuré. Cela témoigne de l'efficacité du traitement. Cependant, il persiste une croissance statistiquement significative de l'ensemble des paramètres mesurés, pour les souris traitées par Topotécan. Nous en déduisons que l'efficacité du traitement est insuffisante à empêcher totalement le développement tumoral. De plus, les mesures du volume tumoral 40% et de l'index d'activité tumorale mettent en évidence des différences significatives entre le groupe traité à demi-dose et le groupe traité à pleine dose, faisant évoquer une différence d'efficacité thérapeutique entre les deux doses de chimiothérapie.

2.4. Protonthérapie

2.4.1 SUVmax

La moyenne normalisée de la SUVmax (Figure 32) du groupe traité à 5Gy était de 1 à J6, 0,88 à J12, 0,54 à J18, et 0,69 à J25. Ces mesures présentent une croissance significative entre J18 et J25. La différence avec le groupe contrôle est significative à J18 et J25.

La moyenne normalisée de la SUVmax du groupe traité à 10Gy était de 1 à J6, 1,29 à J12, 0,94 à J18, et 0,71 à J25. Ces mesures présentent une décroissance statistiquement significative entre J12 et J18. La différence avec le groupe contrôle est significative à J18 et J25.

La moyenne normalisée de la SUVmax du groupe traité à 20Gy était de 1 à J6, 1,19 à J12, 1,14 à J15, 0,90 à J18, 0,82 à J22, et 0,69 à J25. Ces mesures présentent une décroissance statistiquement significative entre J12 et J18. La différence avec le groupe contrôle est significative à J18 et J25.

La moyenne normalisée de la SUVmax du groupe traité à 5 Gy est significativement inférieure de celles des souris traitées à 10 et 20 Gy à J12.

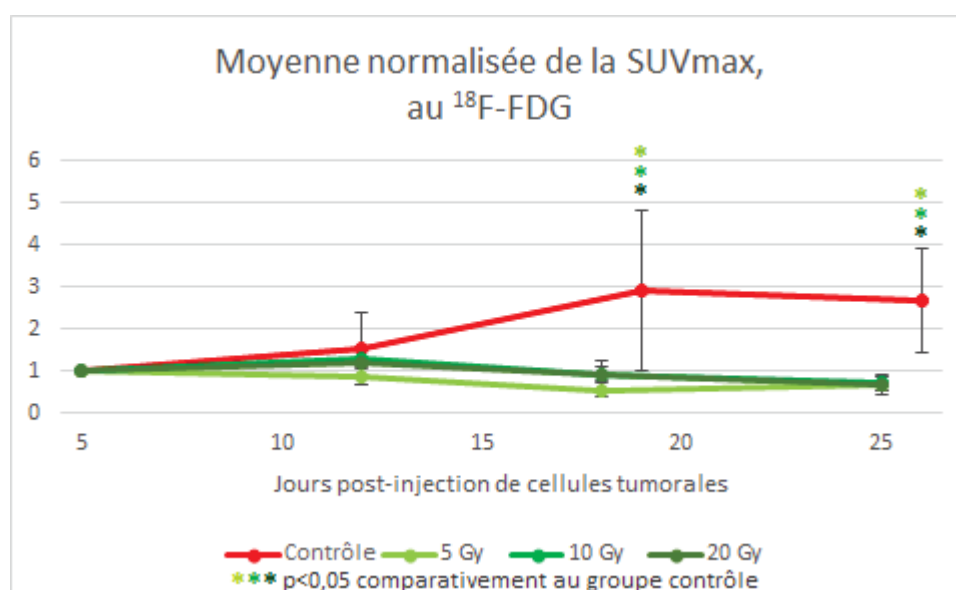


Figure 32: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax, au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle

2.4.2 SUVmean 40%

La moyenne normalisée de la SUVmean 40% (Figure 33) du groupe traité à 5Gy était de 1 à J6, 0,91 à J12, 0,55 à J18, et 0,71 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation statistiquement significative. La différence avec le groupe contrôle est significative à J 12, J18 et J25.

La moyenne normalisée de la SUVmean 40% du groupe traité à 10 Gy était de 1 à J6, 1,23 à J12, 0,84 à J18, et 0,69 à J25. Ces mesures présentent une décroissance statistiquement significative entre J12 et J18. La différence avec le groupe contrôle est significative à J 12, J18 et J25.

La moyenne normalisée de la SUVmean 40% du groupe traité à 20Gy était de 1 à J6, 1,20 à J12, 0,90 à J18, et 0,70 à J25. Ces mesures présentent une décroissance statistiquement significative entre J12 et J18. La différence avec le groupe contrôle est significative à J 12, J18 et J25.

La moyenne normalisée de la SUVmean 40% du groupe traité à 5 Gy est significativement inférieure de celles des souris traitées à 10 et 20 Gy à J12.

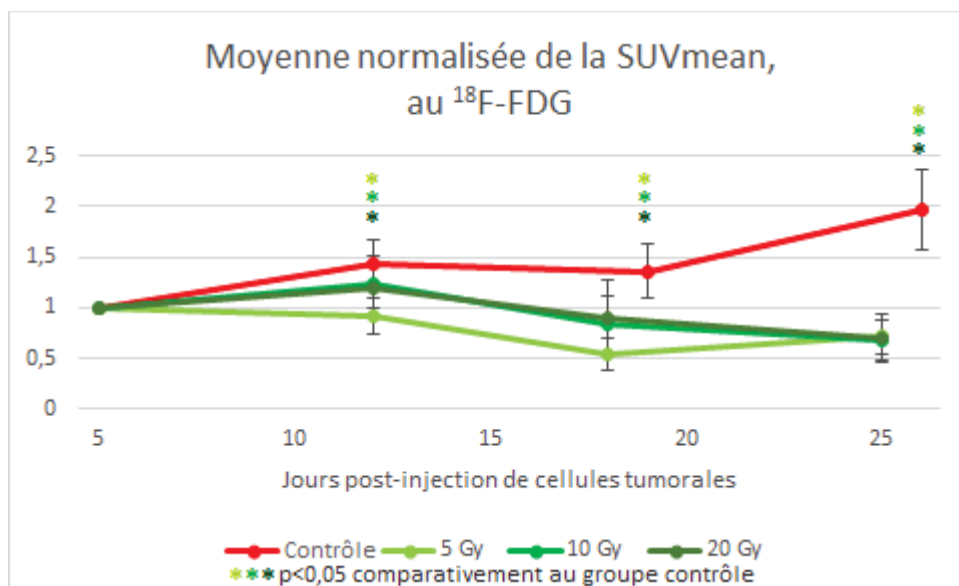


Figure 33: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmean 40%, au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle

2.4.3 Volume tumoral 40%

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% (Figure 34) du groupe traité 5Gy était de 1 à J6, 0,77 à J12, 0,68 à J18, et 0,61 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation statistiquement significative. La différence avec le groupe contrôle est significative à J18 et J25.

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% du groupe traité 10 Gy était de 1 à J6, 0,66 à J12, 0,59 à J18, et 0,43 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation statistiquement significative. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J18 et J25.

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% du groupe traité 20 Gy était de 1 à J6, 0,67 à J12, 0,36 à J18, et 0,40 à J25. Ces mesures présentent une décroissance statistiquement significative entre J12 et J18. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J18 et J25.

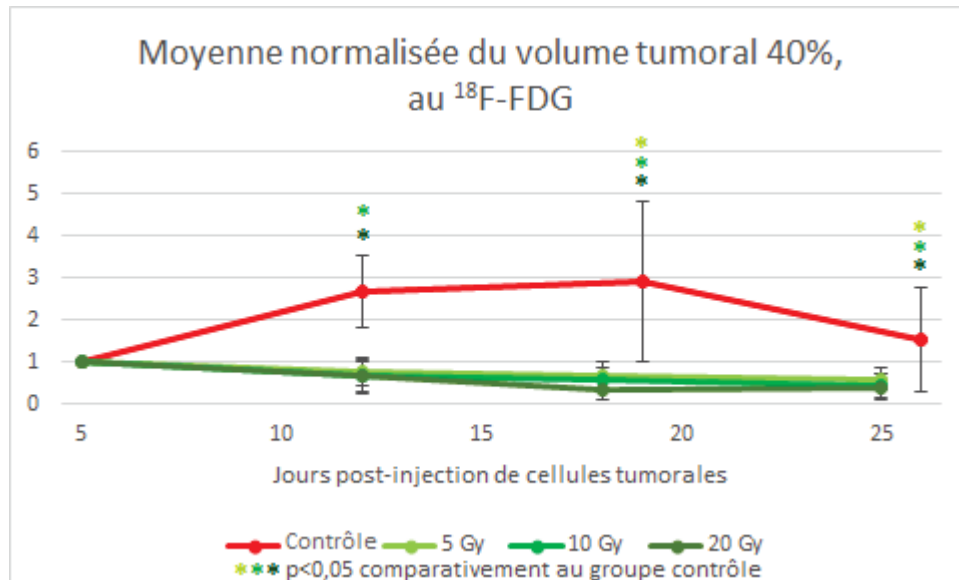


Figure 34: évolution de la moyenne normalisée du volume tumoral 40%, au ¹⁸F-FDG, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle

2.4.4 Index d'activité tumorale

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale (Figure 35) du groupe traité à 5Gy était de 1 à J6, 0,67 à J12, 0,38 à J15, 0,39 à J18, et 0,45 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation statistiquement significative. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J18 et J25.

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale du groupe traité à 10Gy était de 1 à J6, 0,78 à J12, 0,46 à J18, et 0,26 à J25. Ces mesures présentent une décroissance statistiquement significative entre J12 et J18. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J18 et J25.

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale du groupe traité à 20Gy était de 1 à J6, 0,71 à J12, 0,24 à J18, et 0,25 à J25. Ces mesures présentent une décroissance statistiquement significative entre J12 et J18. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J18 et J25.

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale est statistiquement significative entre le groupe traité à 5Gy et les groupes traités à 10 et 20 Gy à J25.

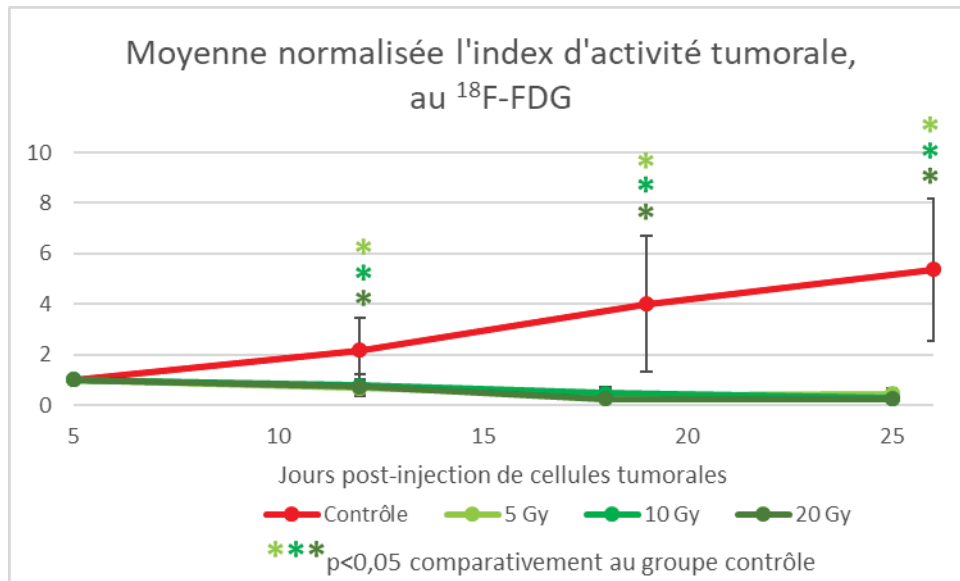


Figure 35: évolution de la moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale, au ^{18}F -FDG, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle

Les examens TEP au ^{18}F -FDG sur les souris traitées par protonthérapie mettent en évidence (Figure 36) une différence statistiquement significative de la fixation avec les souris témoins, quelle que soit la dose, ce qui témoigne de l'efficacité de ce traitement. Cette différence est supérieure à celle visualisée en cours de chimiothérapie. De plus, les différents paramètres mesurés sont stables ou en décroissance au cours des expérimentations, contrairement aux mesures réalisées dans le protocole chimiothérapie qui sont croissantes. L'efficacité de la protonthérapie serait supérieur à celle de la chimiothérapie.

La mesure de l'index d'activité tumorale met en évidence une différence statistiquement significative entre le groupe traité à 5Gy et les groupes traités à 10 et 20 Gy à J25, la mesure réalisée après traitement à 5Gy étant supérieure. Cette différence sera discutée plus loin.

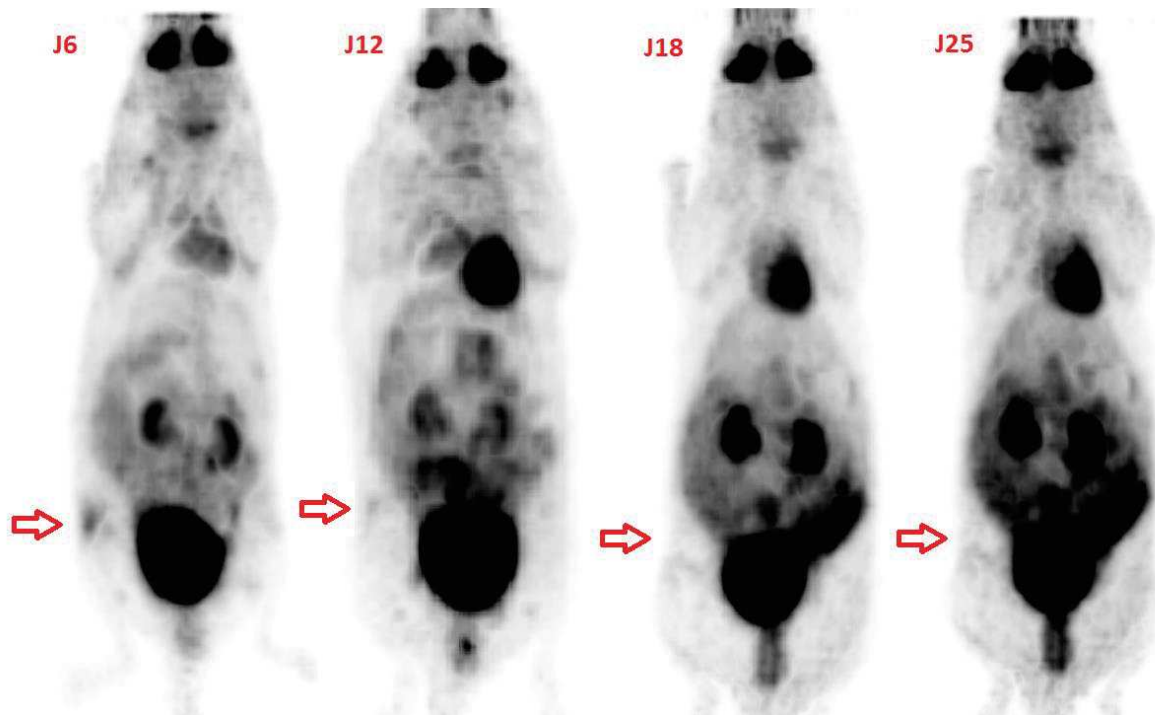


Figure 36: imagerie du petit animal au ^{18}F -FDG au cours du traitement par protonthérapie 10 Gy. La flèche indique la xénogreffe sous-cutanée

3. ^{18}F -FLT

3.1. Groupe contrôle au ^{18}F -FLT

La moyenne normalisée de la SUVmax du groupe contrôle était de 1 à J5, 1,70 à J12, 1,97 à J19 et 2,52 à J26.

La moyenne normalisée de la SUVmean 40% du groupe contrôle était de 1 à J5, 1,62 à J12, 1,65 à J19 et 2,24 à J26.

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% de la SUVmax du groupe contrôle était de 1 à J5, 2,90 à J12, 3,18 à J19 et 2,71 à J26.

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale du groupe contrôle était de 1 à J5, 3,33 à J12, 4,65 à J19 et 5,81 à J26.

Les mesures de SUVmax, SUVmean 40%, du volume 40% et de l'index d'activité tumorale, présentent une augmentation statistiquement significative entre chacun des points de mesure.

3.2. Régions témoins

La moyenne normalisée de la SUVmax du groupe traité par chimiothérapie à dose complète dans la région témoin de la cuisse (Figure 37), présente une croissance statistiquement significative entre J19 et J26.

Cette croissance n'existe pas sur la mesure de la SUVmax de la région témoin du foie.

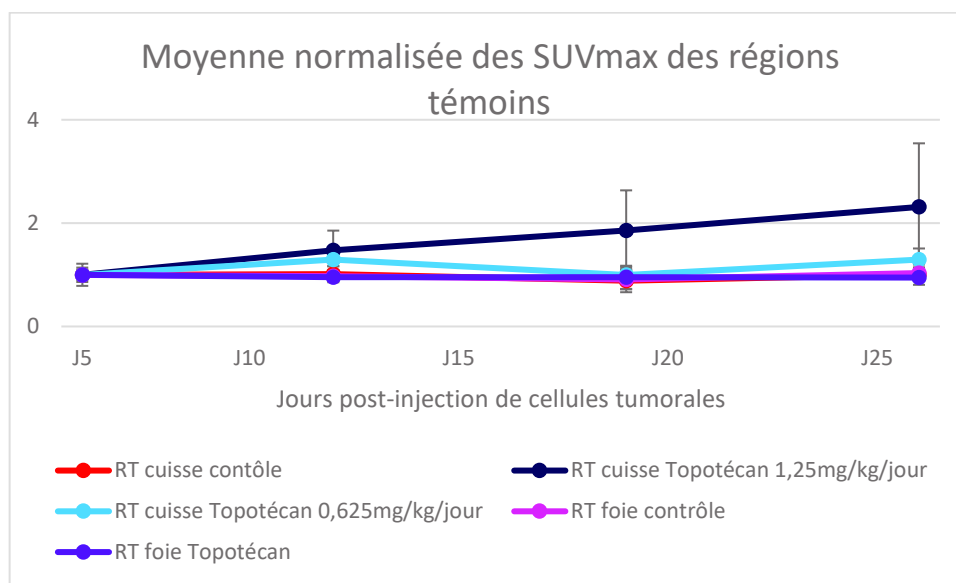


Figure 37: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax des régions témoins (RT), au ^{18}F -FLT, des tumeurs traitées par chimiothérapie

Dans le groupe traité par irradiation proton, les mesures de SUVmax dans les régions témoins (Figure 38) ne présentent pas de variation statistiquement significative et sont donc considérées comme stables.

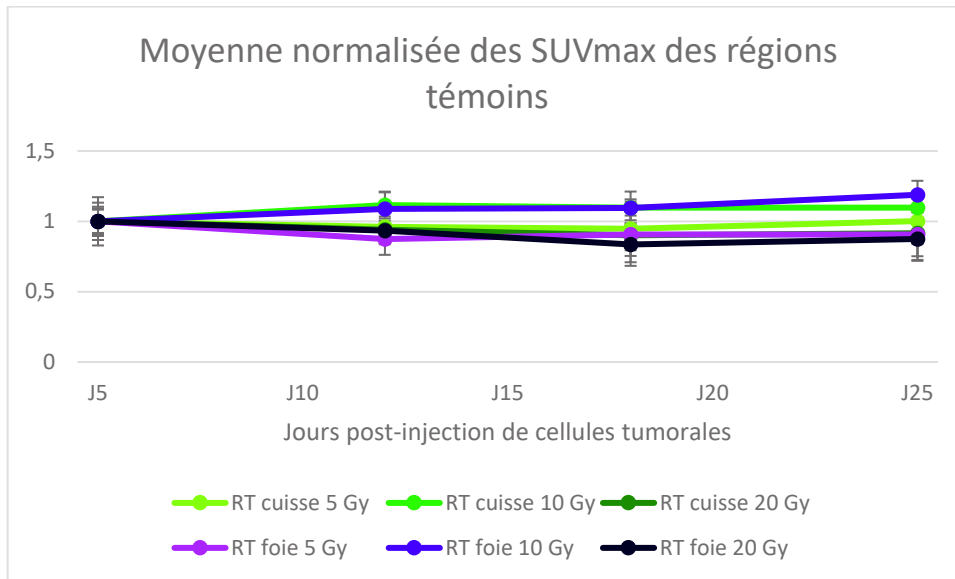


Figure 38: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax des régions témoins, au ^{18}F -FLT, des tumeurs traitées par protonthérapie

3.3. Chimiothérapie

3.3.1 SUVmax

La moyenne normalisée de la SUVmax (Figure 39) du groupe traité à dose complète était de 1 à J5, 1,39 à J12, 1,72 à J19 et 1,66 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J5 et J12. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J19 et J26.

La moyenne normalisée de la SUVmax du groupe traité à demi-dose était de 1 à J5, 1,65 à J12, 1,54 à J19 et 1,39 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative de J5 à J19. Il n'y a pas de différence significative avec le groupe traité à dose complète. La différence avec le groupe contrôle est significative à J26.

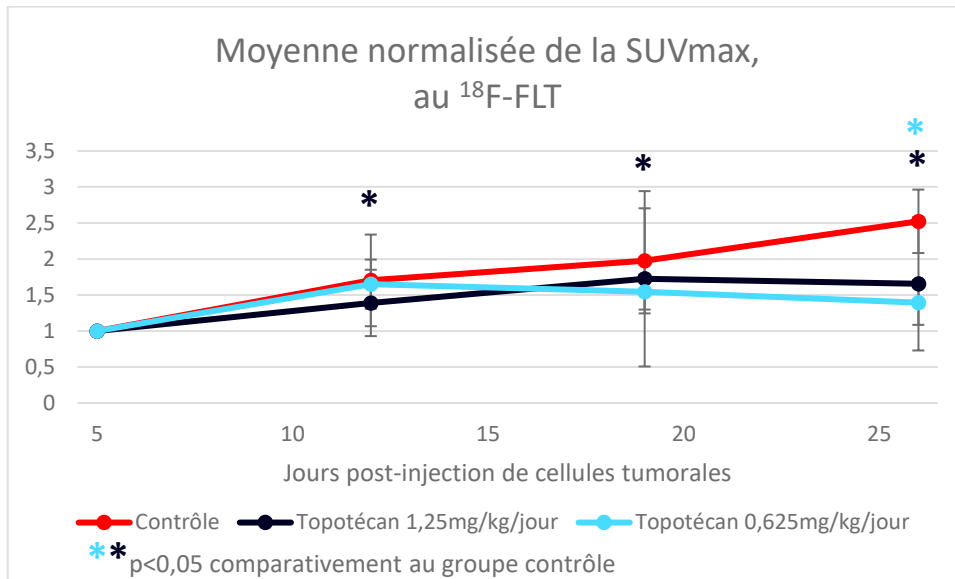


Figure 39: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax, au ¹⁸F-FLT, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle

3.3.2 SUVmean 40%

La moyenne normalisée de la SUVmean (Figure 40) du groupe traité à dose complète était de 1 à J5, 1,51 à J12, 2,26 à J19 et 2,66 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J5 et J26. Il n'y a pas de différence significative avec le groupe contrôle.

La moyenne normalisée de la SUVmean du groupe traité à demi-dose était de 1 à J5, 1,83 à J12, 1,71 à J19 et 1,54 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J5 et J26. La différence avec le groupe traité à dose complète est significative à J26.

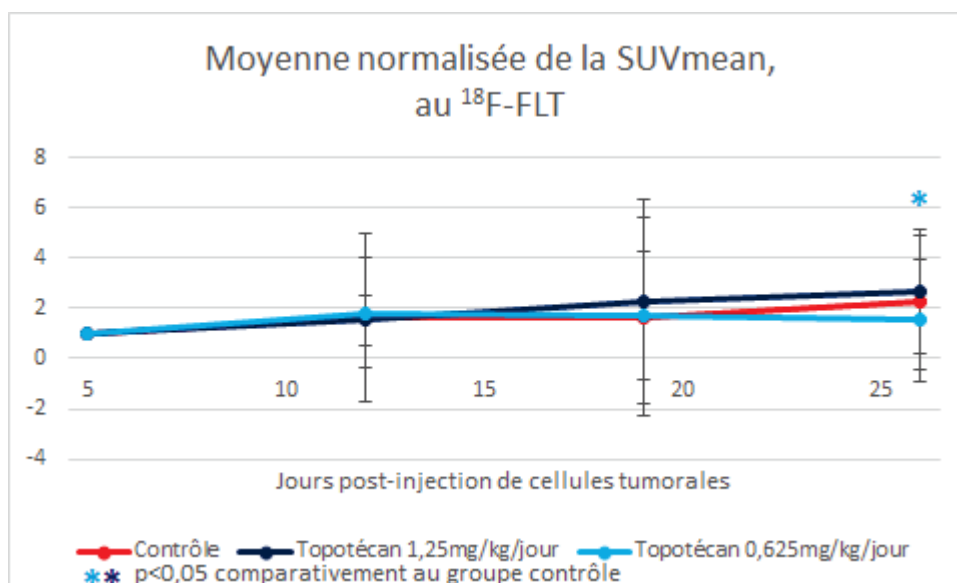


Figure 40: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmean 40%, au ¹⁸F-FLT, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle

3.3.3 Volume tumoral 40%

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% (Figure 41) du groupe traité à dose complète était de 1 à J5, 1,29 à J12, 1,76 à J19 et 1,56 à J26. Ces mesures ne présentent pas de variation significative dans le temps (croissance ou décroissance). La différence avec le groupe contrôle est significative à J19 et J26.

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% du groupe traité à demi-dose était de 1 à J5, 1,55 à J12, 2,01 à J19 et 2,35 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J12 et J26. La différence avec le groupe traité à dose complète est significative à J26.

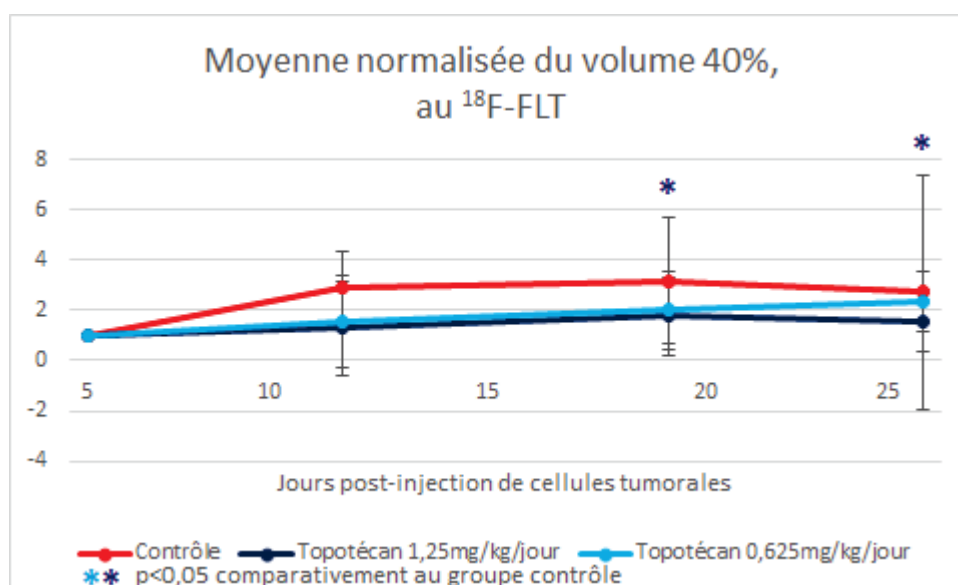


Figure 41: évolution de la moyenne normalisée du volume tumoral 40%, au ^{18}F -FLT, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle

3.3.4 Index d'activité tumorale

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale (Figure 42) du groupe traité à dose complète était de 1 à J5, 1,95 à J12, 4,35 à J19 et 4,13 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J5 et J19, puis se stabilisent. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12.

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale du groupe traité à demi-dose était de 1 à J5, 2,72 à J12, 3,08 à J19 et 3,10 à J26. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J5 et J26. Il n'y a pas de différence significative avec le groupe traité à dose complète.

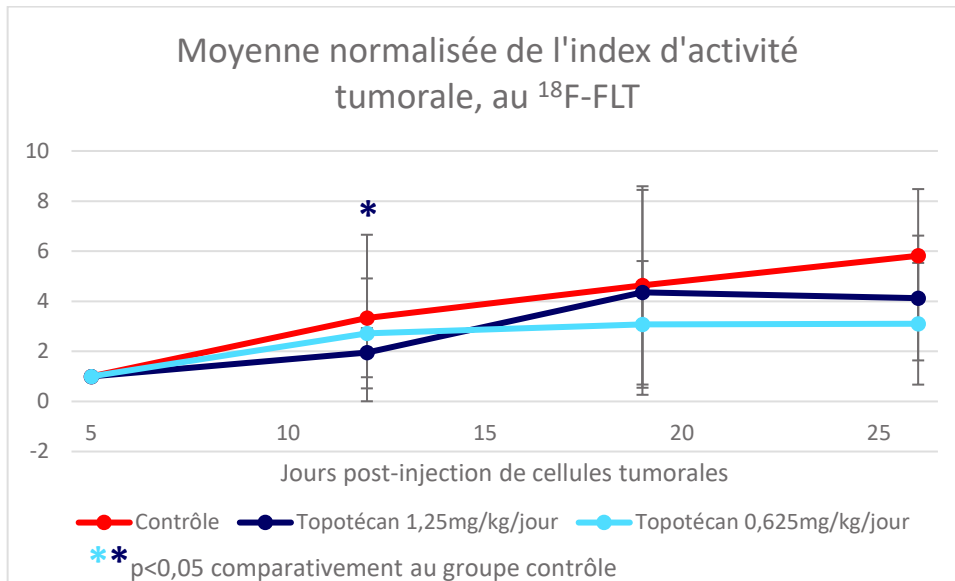


Figure 42: évolution de la moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale, au ^{18}F -FLT, des tumeurs traitées par chimiothérapie, comparativement au groupe contrôle

Tout comme pour les images réalisées au ^{18}F -FDG, le ^{18}F -FLT nous permet de différencier la tumeur de son environnement. La délimitation et la mesure des différents paramètres est possible. L'intensité de fixation de la tumeur est supérieure à celle mesurée sur les images réalisées au ^{18}F -FDG. Cependant, il est observé une fixation aspécifique du squelette hématopoïétique et de la rate à partir de J18, en rapport avec la stimulation de l'hématopoïèse en cours de chimiothérapie par inhibiteurs de la Topoisomérase I (Figure 43).

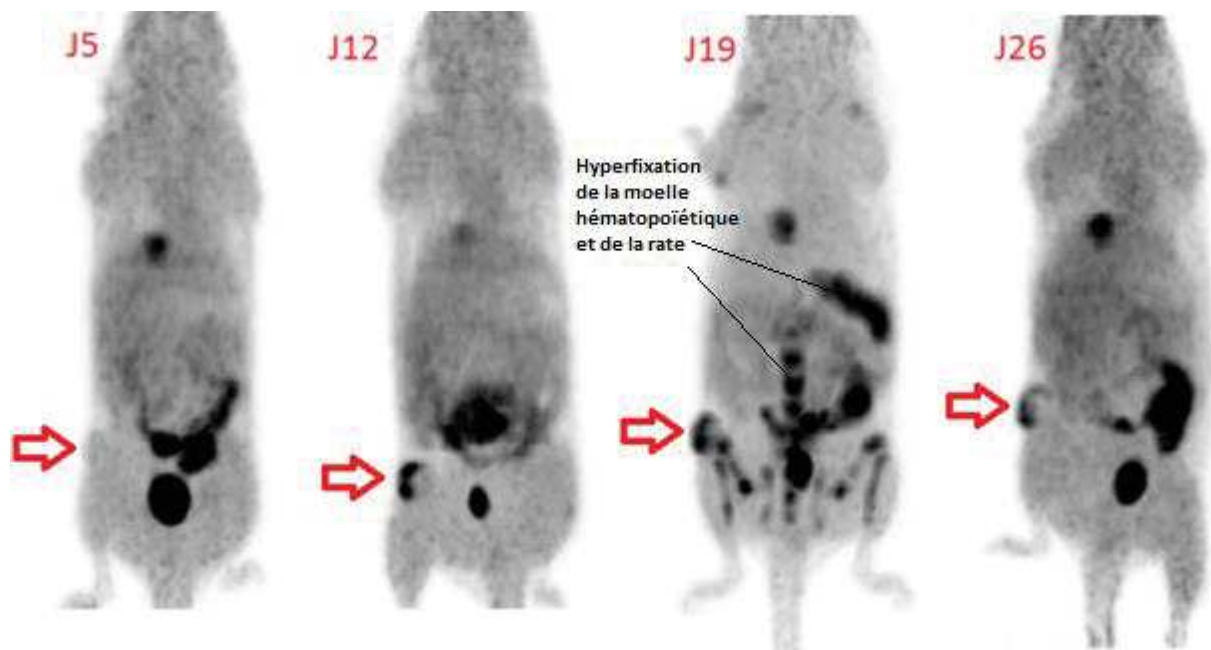


Figure 43: imagerie du petit animal au ^{18}F -FLT au cours du traitement par chimiothérapie pleine dose. La flèche indique la xénogreffe sous-cutanée

Cette hyperfixation peut gêner l'interprétation mais surtout la mesure quantitative fiable des paramètres étudiés. Dans nos expérimentations, on observe une croissance significative de la fixation dans la région témoin de la cuisse controlatérale pendant le traitement par chimiothérapie, quelle que soit la dose. Cette croissance est interprétée comme l'inclusion d'une partie du signal parasite de la moelle hématopoïétique du fémur dans la ROI de la cuisse. A contrario, la fixation de la région témoin du foie est stable dans le temps.

Concernant la prolifération tumorale au cours du traitement, on retrouve une relative efficacité de la chimiothérapie, quelle que soit la dose. Effectivement, le niveau de fixation tumoral est statistiquement inférieur de celui des souris témoins. Il persiste cependant une augmentation de la prolifération tumorale au cours du temps, témoignant d'une croissance tumorale ralentie mais non stoppée.

3.4. Protonthérapie

3.4.1 SUVmax

La moyenne normalisée de la SUVmax (Figure 44) du groupe traité à 5Gy était de 1 à J6, 1,31 à J12, 1,94 à J18, et 1,16 à J25. Ces mesures présentent une croissance statistiquement significative entre J12 et J18 puis une décroissance significative entre J18 et J25. La différence avec le groupe contrôle est significative à J25.

La moyenne normalisée de la SUVmax du groupe traité à 10Gy était de 1 à J6, 1,26 à J12, 1,18 à J18, et 1,37 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation statistiquement significative. La différence avec le groupe contrôle est significative à J18 et J25.

La moyenne normalisée de la SUVmax du groupe traité à 20Gy était de 1 à J6, 0,96 à J12, 1,04 à J18, et 0,87 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation significative dans le temps. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J18 et J25.

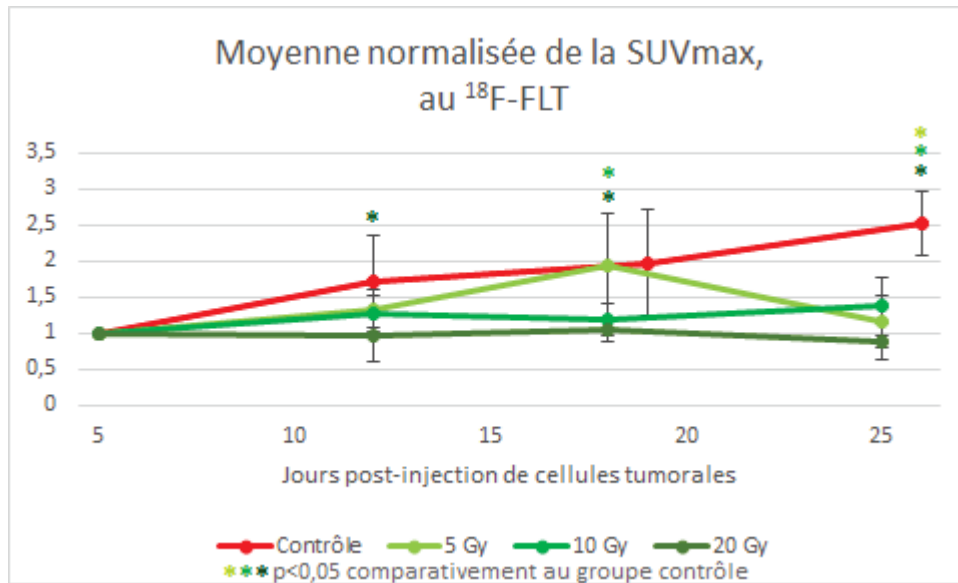


Figure 44: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmax, au ¹⁸F-FLT, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle

3.4.2 SUVmean 40%

La moyenne normalisée de la SUVmean 40% (Figure 45) du groupe traité à 5Gy était de 1 à J6, 1,25 à J12, 1,53 à J18, et 1,48 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation statistiquement significative. La différence avec le groupe contrôle est significative à J25.

La moyenne normalisée de la SUVmean 40% du groupe traité à 10 Gy était de 1 à J6, 1,24 à J12, 1,21 à J18, et 1,32 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation statistiquement significative. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J18 et J25.

La moyenne normalisée de la SUVmean 40% du groupe traité à 20Gy était de 1 à J6, 1,04 à J12, 1,02 à J18, et 0,88 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation significative dans le temps. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J18 et J25.

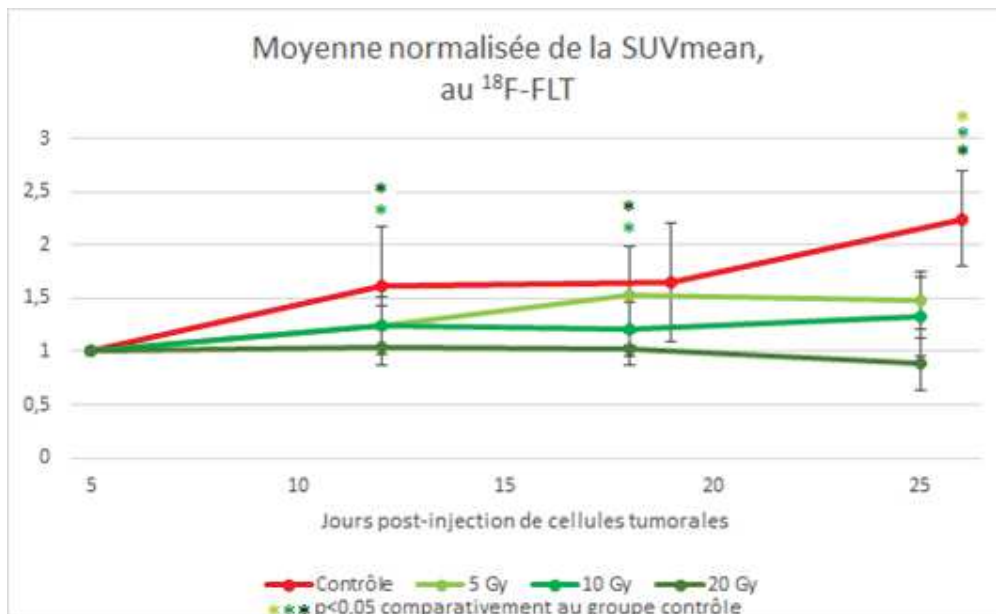


Figure 45: évolution de la moyenne normalisée de la SUVmean 40%, au ¹⁸F-FLT, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle

3.4.3 Volume tumoral 40%

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% (Figure 46) du groupe traité 5Gy était de 1 à J6, 1,43 à J12, 0,78 à J18, et 1,43 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation significative dans le temps. La différence avec le groupe contrôle est significative à J18 et J25.

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% du groupe traité 10 Gy était de 1 à J6, 1,07 à J12, 0,64 à J18, et 1,11 à J25. Ces mesures présentent une décroissance statistiquement significative entre J12 et J18 puis une croissance significative entre J18 et J25. La différence avec le groupe contrôle est significative à J18 et J25.

La moyenne normalisée du volume tumoral 40% du groupe traité 20 Gy était de 1 à J6, 1,05 à J12, 0,95 à J18, et 1,16 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation significative dans le temps. La différence avec le groupe contrôle est significative à J18 et J25.

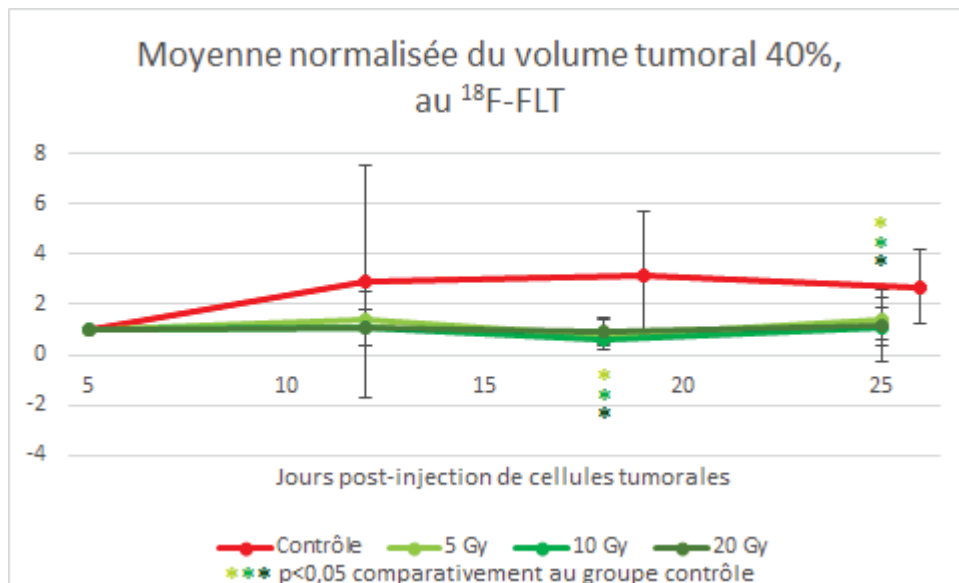


Figure 46: évolution de la moyenne normalisée du volume tumoral 40%, au ¹⁸F-FLT, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle

3.4.4 Index d'activité tumorale

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale (Figure 47) du groupe traité à 5Gy était de 1 à J6, 1,70 à J12, 1,20 à J18, et 2,05 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation significative dans le temps. La différence avec le groupe contrôle est significative à J18 et J25.

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale du groupe traité à 10Gy était de 1 à J6, 1,21 à J12, 0,74 à J18, et 1,50 à J25. Ces mesures présentent une décroissance statistiquement significative entre J12 et J18 puis une croissance significative entre J18 et J25. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J18 et J25.

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale du groupe traité à 20Gy était de 1 à J6, 0,81 à J12, 0,83 à J18, et 0,90 à J25. Ces mesures ne présentent pas de variation significative dans le temps. La différence avec le groupe contrôle est significative à J12, J18 et J25.

La moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale à J25 est statistiquement significative entre le groupe traité à 5Gy et les groupes traités à 10 et 20 Gy d'une part, et entre le groupe traité à 10 Gy et le groupe traité à 20 Gy d'autre part.

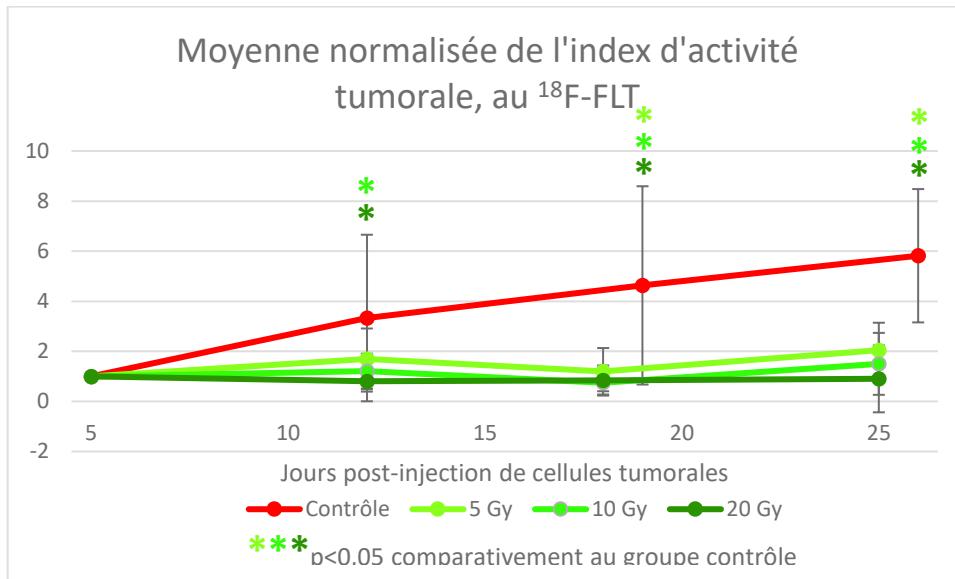


Figure 47: évolution de la moyenne normalisée de l'index d'activité tumorale, au ^{18}F -FLT, des tumeurs traitées par protonthérapie, comparativement au groupe contrôle

Les acquisitions au ^{18}F -FLT après traitement par protonthérapie permettent de visualiser l'efficacité du traitement (Figure 48).

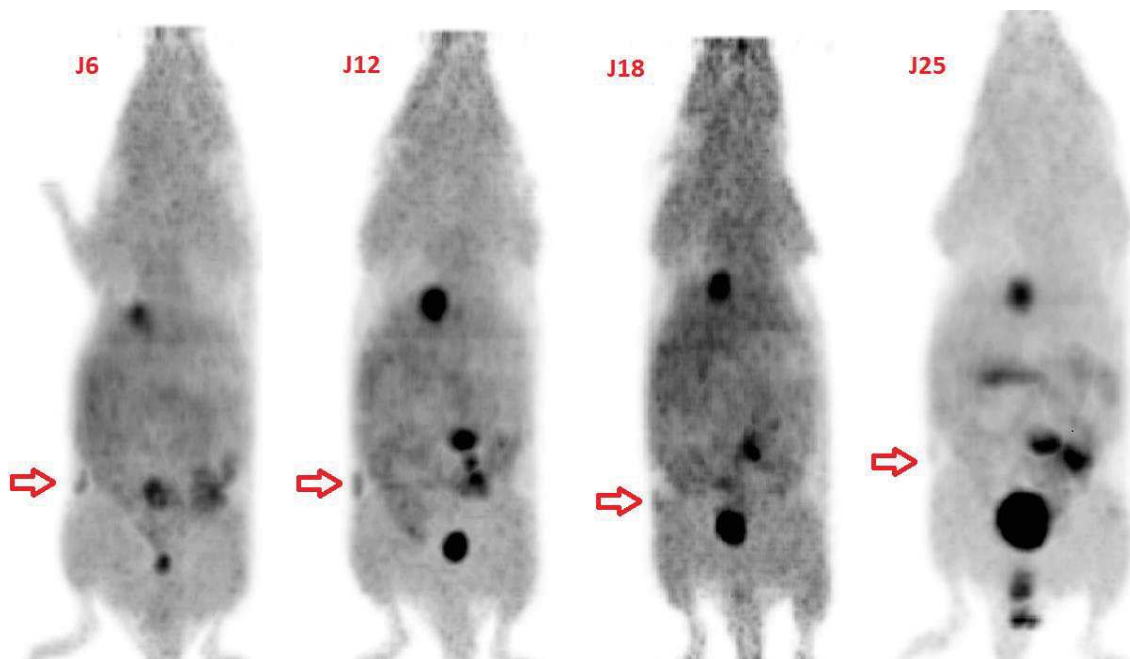


Figure 48: imagerie du petit animal au ^{18}F -FLT au cours du traitement par protonthérapie 20 Gy. La flèche indique la xénogreffe sous-cutanée

En comparaison avec les images au ^{18}F -FDG, l'index d'activité tumorale présente une différence statistiquement significative à la fois entre le groupe traité à 5Gy et les groupes traités à 10 et 20 Gy à

J25, mais également entre le groupe traité à 10 Gy et le groupe traité à 20 Gy à J25, avec une fixation plus importante pour les doses les plus faibles.

4. Potentialisation

4.1. ^{18}F -FDG

Les résultats des mesures de la pente des index d'activité tumorale entre les jours 19 et 26 pour les souris témoins et les protocoles comprenant de la chimiothérapie, et entre les jours 18 et 25 pour les protocoles de protonthérapie seule, sont présentés dans le graphique ci-dessous (Figure 49).

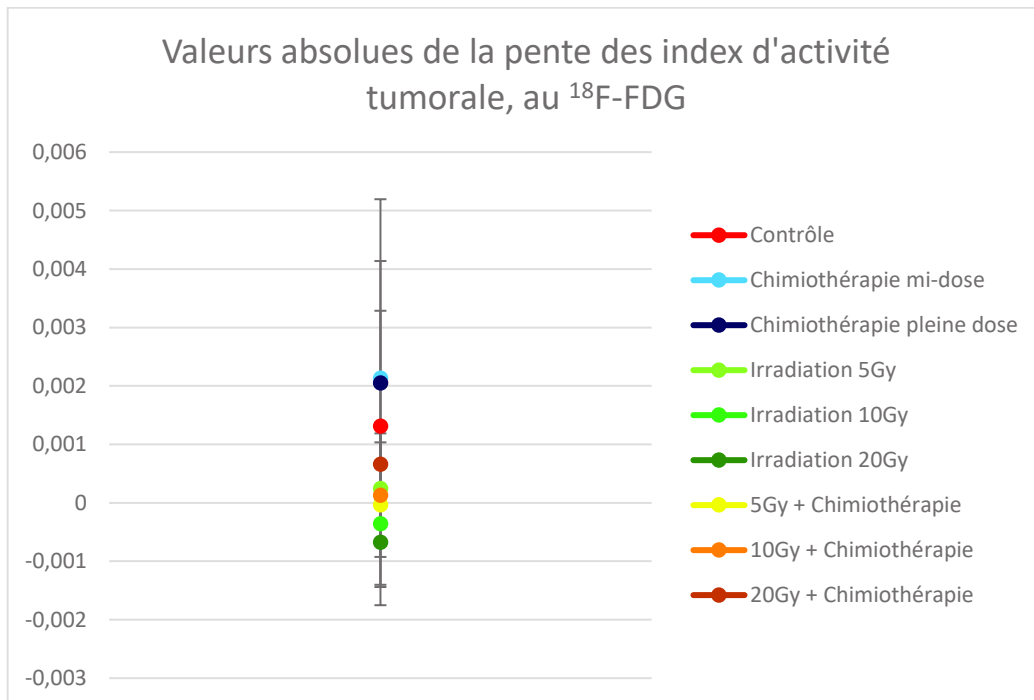


Figure 49: valeurs absolues des pentes des index d'activité tumorale, au ^{18}F -FDG

Les résultats supérieurs à 0 correspondent à une augmentation de la pente, ceux inférieurs à 0, à une diminution. Si l'on compare les groupes entre eux, seuls certains résultats sont statistiquement significatifs (tableau 6).

	5Gy + Chimiothérapie	10Gy + Chimiothérapie	20Gy + Chimiothérapie
Contrôle	∅	∅	>
Chimiothérapie demi-dose	∅	∅	∅
Chimiothérapie pleine dose	∅	∅	∅
Irradiation 5Gy	∅	∅	∅
Irradiation 10Gy	∅	<	∅
Irradiation 20Gy	∅	∅	<

Tableau 6: tableau comparatif statistique des valeurs de mesure des pentes des index d'activité tumorale, au ¹⁸F-FDG

∅ : pas de différence statistiquement significative

> : différence statistiquement significative entre deux groupes, avec pente la plus croissante > pente la moins croissante.

4.2. ¹⁸F-FLT

Les résultats des mesures de la pente des masses tumorales actives sont présentés dans le graphique ci-dessous (Figure 50).

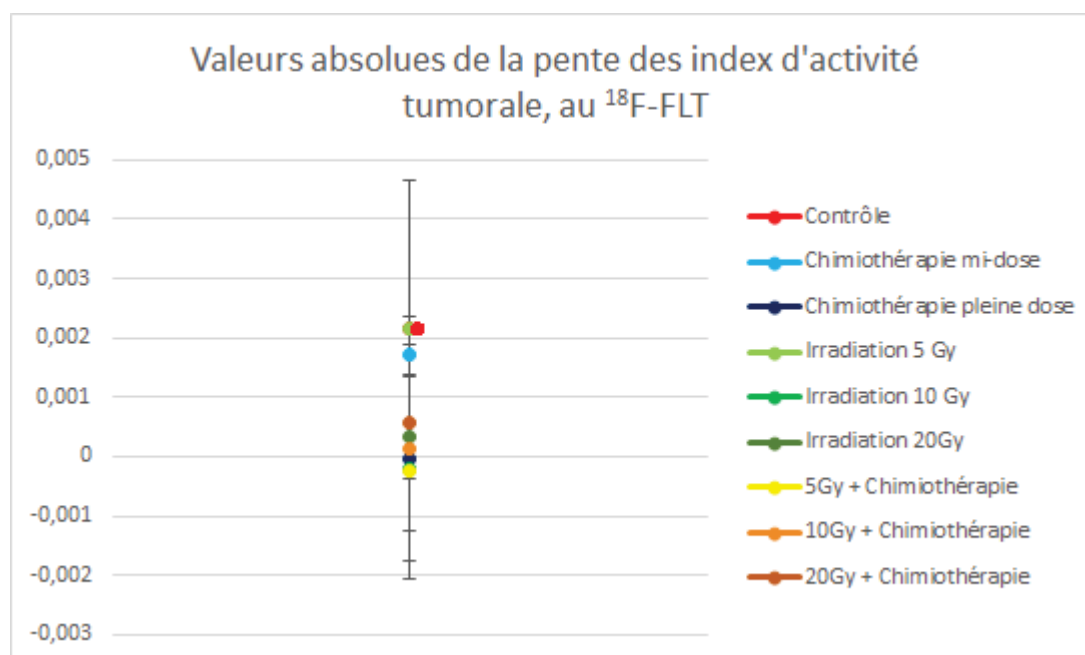


Figure 50: valeurs absolues des pentes des index d'activité tumorale, au ¹⁸F-FLT

Le tableau 7 compare les données entre elles.

	5Gy + Chimiothérapie	10Gy + Chimiothérapie	20Gy + Chimiothérapie
Contrôle	>	>	>
Chimiothérapie demi-dose	∅	∅	∅
Chimiothérapie pleine dose	∅	∅	∅
Irradiation 5Gy	∅	∅	∅
Irradiation 10Gy	∅	∅	∅
Irradiation 20Gy	∅	∅	∅

Tableau 7: tableau comparatif statistique des valeurs de mesure des index d'activité tumorale, au ¹⁸F-FLT

∅ : pas de différence statistiquement significative

> : différence statistiquement significative entre deux groupes, avec pente la plus croissante > pente la moins croissante.

L'étude comparative des mesures des pentes de l'index d'activité tumorale par les protocoles de potentialisation, au ¹⁸F-FDG comme au ¹⁸F-FLT, en comparaison avec les protocoles de chimiothérapie ou protonthérapie seule, est statistiquement significative au ¹⁸F-FDG entre les groupes de traitement par 10 Gy et 10 Gy avec chimiothérapie, et entre les groupes traitement par 20 Gy et 20 Gy avec chimiothérapie. Mais de manière très paradoxale, ces différences sont en faveur des groupes sans chimiothérapie. Il n'y a pas de différence significative pour le traitement par protons, avec ou sans chimiothérapie, pour les images réalisées au ¹⁸F-FLT.

5. Anatomopathologie

Le tableau 8 indique les résultats des mesures réalisées à J21 du Ki-67 des tumeurs (Tableau 8).

Groupe	Ki-67 (en %)
Contrôle	50,6 [44,8 ; 56,4]
Chimiothérapie pleine dose	34 [24,8 ; 43,2]
Irradiation 10 Gy	45 [35,2 ; 55,4]
Irradiation 20 Gy	18 [0,75 ; 36]
10 Gy + chimiothérapie	30 [15 ; 45,8]
20 Gy + chimiothérapie	30 [7,4 ; 36]

Tableau 8: mesures du Ki-67 des xénogreffes d'hépatocarcinome à J21 [Extrêmes].

La mesure du Ki-67 était significativement supérieure dans le groupe contrôle comparativement aux groupes traitement par chimiothérapie dose pleine, traitement par irradiation 20 Gy, traitement par irradiation 10 Gy et chimiothérapie, traitement par irradiation 20 Gy et chimiothérapie.

De même, le Ki-67 est significativement inférieur dans le groupe traité par irradiation 20 Gy comparativement au groupe traité par irradiation 10 Gy, et dans le groupe traité par irradiation 20 Gy avec chimiothérapie, comparativement au groupe traité par chimiothérapie pleine dose seule.

Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les autres groupes, notamment entre le groupe contrôle et le groupe irradiation 10 Gy.

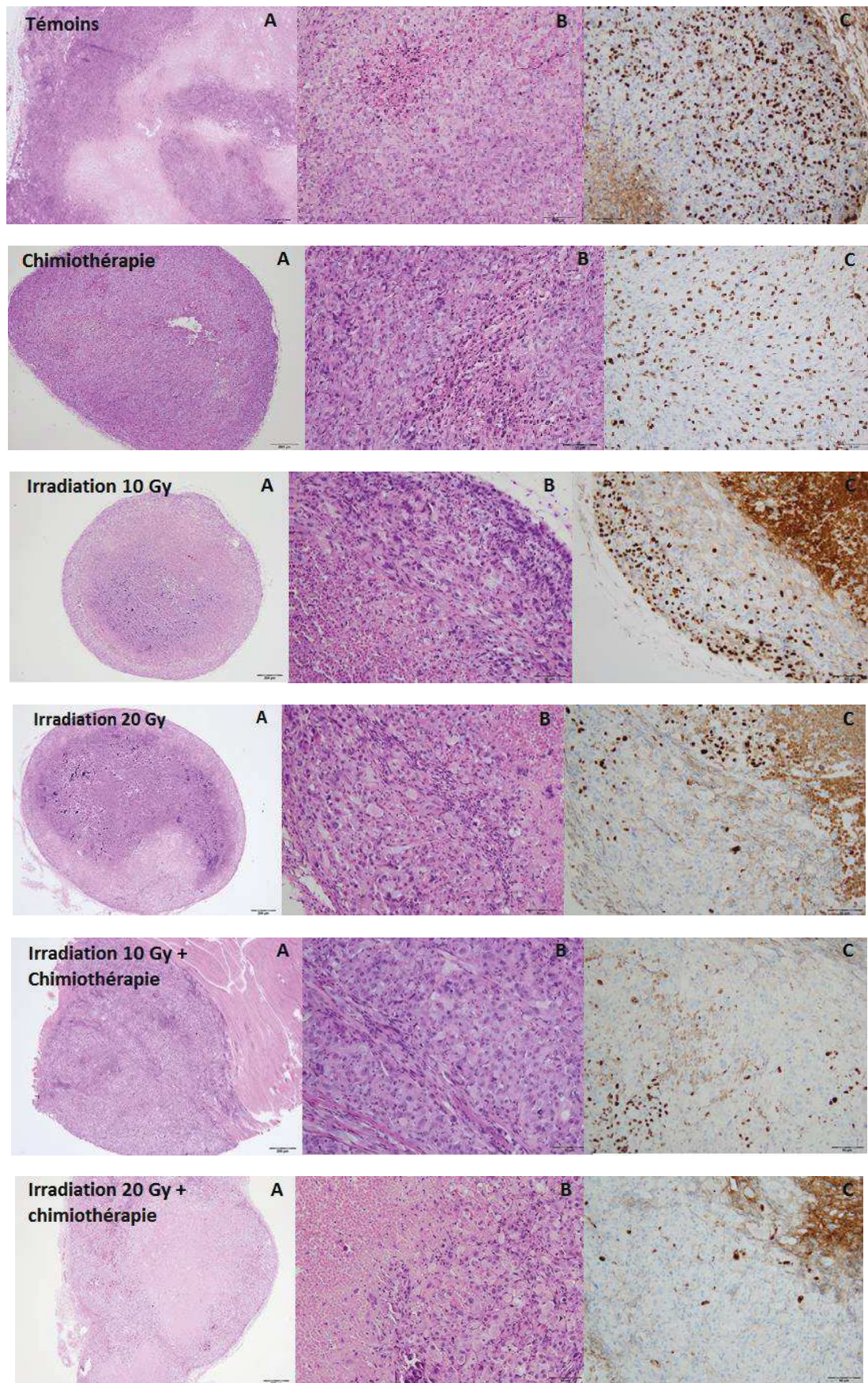


Figure 51: Coupes anatomopathologiques des tumeurs selon les différents types de traitement. A : coloration Hématoxyline-Eosine x 20. B : coloration Hématoxyline-Eosine x 200. C : immunomarquage Ki-67 x 200.

VI. Discussion

1. Intérêts et limites de l'imagerie au ^{18}F -FDG

1.1. Chimiothérapie

Dans nos expérimentations, les mesures de la SUVmax et de la SUVmean 40% des tumeurs traitées par Topotécan est significativement croissante au cours du suivi évolutif. Or, dans notre protocole le traitement par Topotécan est arrêté après deux cycles de 5 jours, soit à J17. L'on pourrait alors considérer que l'augmentation significative de la SUVmax dans le groupe traité à pleine dose, à partir de J19, correspond à une reprise du métabolisme glucidique tumoral après arrêt du traitement par chimiothérapie. Concernant les souris traitées à demi-dose cette augmentation de la fixation du ^{18}F -FDG est significative dès J12, avant l'arrêt de la chimiothérapie. Il pourrait s'agir d'une reprise tumorale évolutive précoce pour une dose insuffisante de chimiothérapie.

Cette observation est également retrouvée sur les mesures du volume tumoral 40% et de l'index d'activité tumorale. De plus, ces deux paramètres mettent en évidence une différence significative entre les mesures réalisées sur les tumeurs traitées à demi-dose et celles traitées à pleine dose. Effectivement, dans le groupe traité à demi-dose l'augmentation du volume tumoral à 40% est supérieure à celle du groupe traité à pleine dose, menant à une différence statistiquement significative entre les groupes à J19. Cette différence est significative dès J12 pour la mesure de l'index d'activité tumorale. La modification de ces paramètres dans nos expérimentations pourrait être le reflet d'un sous-dosage de la chimiothérapie avec reprise évolutive précoce.

Plusieurs études mettent en doute l'intérêt de l'utilisation du ^{18}F -FDG dans le bilan d'extension et le suivi des hépatocarcinomes [25], [139]–[143]. Ces différents articles mettent en lumière la faible sensibilité du ^{18}F -FDG dans la détection d'hépatocarcinomes bien différenciés, à la différence des hépatocarcinomes modérément ou bien différenciés. Dans l'étude de Wu et al. sur 76 patients atteints, cette sensibilité a été calculée à 35,7% pour les hépatocarcinomes bien différenciés contre 72% pour les hépatocarcinomes modérément différenciés.

Dans notre étude, les images réalisées mettent en évidence une hyperfixation relative de la tumeur, individualisable du bruit de fond, et qu'il est possible de délimiter sur les images. La quantification permet de suivre la variation du métabolisme glucidique dans le temps. Quelle que soit la dose employée, la différence entre les souris non traitées et les souris traitées est statistiquement significative. Ce traceur semble donc adapté dans cette indication.

Il est cependant à rappeler que la souche utilisée, Sk-hep 1, présente des caractéristiques anatomopathologiques mésoenchymateuses et donc plutôt peu différenciées. Effectivement, une souche tumorale peut présenter une évolution de ses caractéristiques anatomopathologiques au cours de l'évolution de la pathologie. Ce que l'on appelle la transition épithélio-mésenchymateuse [12] a été décrite comme la transformation d'une cellule présentant des critères anatomopathologique d'un tissu épithélial, polarisée, présentant des jonctions intercellulaires de type E-cadhérine, vers un profil

mésenchymateux non polarisé et présentant des marqueurs de surface de type N-cadhérine et vimentine. Cette transition est associée à un plus haut risque métastatique et à une diminution de la survie globale. Le lien entre marqueurs cellulaires mésenchymateux et fixation du ^{18}F -FDG a été mis en évidence dans l'étude rétrospective de Lee et al. [142] sur 116 patients atteints de CHC ayant réalisé une TEP/TDM au ^{18}F -FDG avant prise en charge chirurgicale. Une hyperfixation intense du radiotraceur est associée à un plus grand risque métastatique et à une plus importante expression des marqueurs cellulaires mésenchymateux. La considération des caractéristiques anatomopathologiques de notre lignée cellulaire permet donc d'expliquer la bonne sensibilité du ^{18}F -FDG dans l'évaluation de nos tumeurs.

Par ailleurs, dans nos expérimentations le ^{18}F -FDG nous permet de visualiser une reprise évolutive précoce après arrêt de la chimiothérapie dans le groupe traité à dose complète et une reprise évolutive plus précoce encore dans le groupe traité à demi-dose. Ce traceur est donc efficient pour déterminer une sous-dose de chimiothérapie dans le suivi de l'hépatocarcinome. Le paramètre le plus pertinent de nos expérimentations est la mesure de l'index d'activité tumorale. Effectivement, la reprise évolutive du groupe traité à demi-dose est observée plus précocement dans ce groupe. L'intérêt de ce paramètre est de considérer la tumeur dans son ensemble en prenant en compte à la fois le niveau de métabolisme glucidique de la tumeur, mais également le volume tumoral restant actif.

1.2. Protonthérapie

Chez les souris traitées par protonthérapie, contrairement à celles traitées par chimiothérapie, les mesures de la SUVmax et de la SUVmean 40% des tumeurs sont décroissantes au cours du temps, exception faite de la SUVmax du groupe traité à 5Gy. Dans nos conditions expérimentales, l'efficacité de la protonthérapie serait supérieure à celle de la chimiothérapie. Dans le groupe traité à 5Gy est observée une croissance significative de la SUVmax en fin d'expérimentation, pouvant traduire, tout comme dans les groupes traités par chimiothérapie, une reprise évolutive.

Les mesures de la SUVmean 40% et de l'index d'activité tumorale permettent de visualiser une fixation significativement plus faible des tumeurs des groupes traités, quelle que soit la dose, par rapport au groupe contrôle, précocement dans le protocole expérimental (dès J12). Ces mesures seraient peut-être plus adaptées au suivi précoce.

De plus, la mesure de l'index d'activité tumorale est la seule à mettre en évidence une différence statistiquement significative entre les souris traitées à 5 Gy et les souris traitées à 10 et 20 Gy, sur la dernière mesure réalisée, avec une mesure supérieure dans le groupe traité à 5Gy. Ainsi, la prise en compte du volume métaboliquement actif au ^{18}F -FDG permettrait de détecter précocement une reprise évolutive tumorale et ainsi de déterminer une sous-dose d'irradiation. D'après ces résultats, qui suggèrent une reprise évolutive pour une irradiation à 5Gy, il semble donc légitime d'avoir cherché à étudier la potentialisation de ces différents traitements et son impact sur l'efficacité thérapeutique à plus long terme.

Concernant les limites de l'imagerie TEP au ^{18}F -FDG, nos expérimentations mettent en évidence une relative majoration de la SUVmax et de la SUVmean 40% des tumeurs traitées à 10 et 20 Gy après irradiation. Effectivement la SUVmax et la SUVmean 40% de ces groupes sont significativement

supérieures à celles des tumeurs irradiées à 5 Gy à J12. A dose d'irradiation plus élevée, l'intensité de fixation du ^{18}F -FDG augmente donc initialement pour rejoindre le niveau de fixation de l'irradiation à 5 Gy à J18. Cette augmentation initiale a été attribuée à une hyperfixation aspécifique du ^{18}F -FDG liée à la réponse inflammatoire locale après irradiation.

En imagerie TEP au ^{18}F -FDG, ce manque de spécificité peut être considéré comme un atout, puisqu'il permet d'étudier des phénomènes non-tumoraux comme l'inflammation ou l'infection [145], [146], ou une limite à l'interprétation. Cette hyperfixation aspécifique était déjà décrite dans les études de traitements antitumoraux par irradiation X. Dans l'étude préclinique de Chung et al. [147] sur la corrélation en la TEP au ^{18}F -FDG et l'activation immunitaire locale après irradiation photon, les auteurs décrivent une hyperfixation du site d'irradiation en rapport avec la stimulation immunitaire dès J1 post-irradiation.

Dans l'étude de Hicks et al. [148] chez 73 patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules, traités par chimiothérapie et radiothérapie X concomitantes, l'inflammation des tissus environnants au site de radiothérapie a été visualisée par l'imagerie TEP au ^{18}F -FDG réalisée en réévaluation après traitement. Les auteurs utilisent cette fixation aspécifique comme facteur pronostique de la réponse thérapeutique. Effectivement, les résultats présentés rapportent qu'une augmentation de la fixation du traceur suite à l'inflammation locale serait significativement liée à la radiosensibilité des tissus et à une réponse thérapeutique favorable. Les auteurs n'étaient pas gênés par cette hyperfixation aspécifique pour évaluer la réponse thérapeutique, sous réserve de tenir compte de cette notion dans l'évaluation qualitative des images. Cependant, la réévaluation TEP était réalisée à distance de 2 à 3 mois de la fin du traitement.

Dans l'étude de Ryu et al. [149] chez 26 patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules, traités par chimiothérapie et radiothérapie X concomitantes pré-chirurgicales, la réévaluation TEP/TDM au ^{18}F -FDG avait été réalisée 2 semaines après la fin du traitement néoadjuvant et les résultats étaient comparés à l'analyse anatomopathologique des tumeurs réalisées sur les pièces chirurgicales. Les auteurs rapportent dans l'évaluation précoce par la TEP/TDM au ^{18}F -FDG de la réponse thérapeutique de la tumeur primitive, une sensibilité de 67% et une spécificité de 62%. Les résultats faussement positifs sont attribués à l'inflammation locale post-radiothérapie.

Ce phénomène a également été décrit dans des protocoles d'irradiation par proton comme dans l'étude de Xiang et al. [150] portant sur 83 patients évalués par TEP/TDM au ^{18}F -FDG après chimiothérapie et protonthérapie pour traitement d'un cancer pulmonaire non à petites cellules, le protocole d'irradiation comprenait une dose totale de 74 Gy délivrée à raison de 2 Gy par jour, 5 jours par semaine, pendant 7 semaines d'affilée. L'imagerie TEP était réalisée de 1 à 6 mois après traitement (médiane de 4,2 mois). Les résultats retrouvent une valeur prédictive de la SUVmax de la TEP de réévaluation pour un cut off de 3,6, pour différents paramètres : la survie sans progression locale, la survie sans progression à distance, la survie sans progression globale et la survie globale. Cependant, les auteurs pointent à nouveau la nécessité d'interpréter l'hyperfixation du ^{18}F -FDG en connaissance du champ d'irradiation afin de ne pas confondre la récurrence locale avec l'inflammation post-irradiation.

Ainsi, en radiothérapie X le phénomène inflammatoire accompagnant la réponse thérapeutique locale initiale est connu. Cette inflammation locale existe également en radiothérapie proton même si l'importance du phénomène par rapport à la radiothérapie photon fait encore débat [128], [130],

[151]. Dans notre étude nous avons interprété l'hyperfixation relative du ^{18}F -FDG pour les doses d'irradiation de 10 et 20 Gy, comparativement à l'irradiation 5 Gy, comme une hyperfixation aspécifique induite par l'inflammation locale. Ces résultats sont intéressants puisque cette différence de fixation est réduite dès 18 jours post-injection de cellules tumorales, soit 11 jours après irradiation proton. Il pourrait s'agir d'un délai nécessaire à respecter avant réévaluation thérapeutique par ce traceur TEP, en cas de protonthérapie.

Enfin, en limite de l'évaluation thérapeutique des traitements antitumoraux de l'hépatocarcinome, pourraient être cités les autres sites de fixation aspécifique du ^{18}F -FDG comme le cerveau, le myocarde, le parenchyme hépatique... Effectivement, si l'on compare nos images au ^{18}F -FDG à celles réalisées au ^{18}F -FLT, l'on individualise rapidement une tumeur moins bien individualisée du bruit de fond environnant et une fixation aspécifique environnante pouvant gêner l'interprétation.

2. Intérêts et limites de l'imagerie au ^{18}F -FLT

2.1. Chimiothérapie

Concernant l'ensemble des images réalisées au ^{18}F -FLT, comparativement à celles au ^{18}F -FDG, nos examens retrouvent une intensité de fixation plus élevée et une fixation aspécifique concernant moins de tissus, facilitant la lecture interprétative. Cet avantage avait déjà été décrit dans la littérature et notamment dans l'étude de Wang et al. portant sur l'évaluation tumorale du cancer colorectal chez le petit animal après traitement par irradiation photon [152].

Les images TEP au ^{18}F -FLT chez les souris traitées par chimiothérapie retrouvent une SUVmax et un volume tumoral 40% significativement inférieurs, chez les souris traitées à pleine dose comparativement aux souris témoins, de J12 à J26. Pour les souris traitées à demi-dose cette différence n'est significative qu'à J26. Il pourrait à nouveau s'agir de différence d'efficacité du traitement entre la demi-dose et la pleine dose. La mesure de la fixation au ^{18}F -FLT ne permet pas de visualiser une reprise évolutive tardive après arrêt de la chimiothérapie comme décrite sur les courbes au ^{18}F -FDG. Lorsque est incluse la notion d'index d'activité tumorale, il n'est pas retrouvé de différence statistiquement significative entre les souris traitées et les souris témoins.

Par ailleurs, il existe une fixation parasite liée à la stimulation de l'hématopoïèse splénique et osseuse. Cette fixation peut être attribuée à la stimulation de l'hématopoïèse en cours de chimiothérapie par Topotécan, comme décrit dans l'article de Vélez de Mendizábal et al. [153]. Cette hyperfixation est limitante dans l'exploration de ces organes et peut également varier au cours du temps, en fonction du délai entre le traitement par chimiothérapie et la réalisation de l'imagerie TEP, et altérer la qualité de l'interprétation et de la quantification. Ainsi, il pourrait être conseillé d'attendre un délai de plusieurs semaines avant l'évaluation thérapeutique d'un patient traité par un inhibiteur de la Topoisomérase I ou une autre molécule de chimiothérapie connue pour stimuler la moelle hématopoïétique.

La fixation du ^{18}F -FLT dans nos expérimentations a été considérée comme satisfaisante pour le suivi thérapeutique. Cette observation ne concorde pas avec l'étude de Eckel et al. [154], sur l'imagerie TEP

au ^{18}F -FLT dans l'évaluation du CHC, qui fixait de manière variable le traceur. Les auteurs associent le niveau de fixation au niveau de prolifération et donc à l'agressivité de la tumeur primitive. Dans notre étude, la bonne fixation du traceur est semble-t-il dûe à l'anatomopathologie de ma souche tumorale. Effectivement Sk-hep1 présente des caractéristiques mésenchymateuses, donc plutôt dédifférenciées. Les tumeurs dédifférenciées sont plus agressives. Nos résultats ne sont donc pas en contradiction avec ceux de l'étude de Eckel et al.

Comparativement à la TEP au ^{18}F -FDG, plusieurs études précliniques rapportent une diminution plus précoce de la fixation au ^{18}F -FLT au cours du suivi des tumeurs traitées par inhibiteur de la Topoisomérase I [155], [156]. Cette observation n'a pas été retrouvée dans nos expérimentations.

2.2. Protonthérapie

Contrairement aux images réalisées au ^{18}F -FDG, le ^{18}F -FLT ne présente pas une SUVmax augmentée initialement dans les groupes traités par les irradiations proton à plus forte dose. Effectivement, ce traceur à l'avantage d'être plus spécifique que le ^{18}F -FDG et de ne pas marquer le phénomène inflammatoire. Ainsi, l'évaluation de la prolifération tumorale est possible dans les suites précoces de la radiothérapie aux protons.

Les mesures de l'index d'activité tumorale au ^{18}F -FLT chez les souris traitées par irradiation proton sont particulièrement intéressantes puisque qu'une différence de fixation statistiquement significative est mise en évidence en fin d'expérimentation entre les souris traitées par des doses d'irradiation différentes. Ces différences sont significatives entre le groupe des souris traitées à 5 Gy d'une part, et les groupes de souris traitées à 10 et 20 Gy d'autre part, à J18 et J25, et entre le groupe traité à 10 Gy et le groupe traité à 20 Gy à J25. Plus la dose est élevée, plus la fixation est faible. La mise en évidence de ces différences dépendantes de la dose nous permet de voir dans ce traceur un outil d'évaluation efficace pour déterminer une reprise évolutive précoce après traitement par protonthérapie.

D'autres études décrivaient l'intérêt de ce traceur dans l'évaluation des rechutes précoces. Par exemple, dans l'étude de Lin et al. sur l'imagerie TEP au ^{18}F -FLT dans l'évaluation des tumeurs colorectales chez le petit animal après irradiation proton ou carbone, la réduction de la fixation du ^{18}F -FLT était visualisée plus précocement que la réduction de la taille ou la réduction de prolifération visualisée *in vitro*.

Ainsi le ^{18}F -FLT, traceur de la prolifération tumorale, apporte dans cette étude un avantage sur le ^{18}F -FDG pour l'évaluation post-protonthérapie puisqu'il permettrait de déterminer plus précocement une reprise évolutive. Nos expérimentations mettent en évidence l'intérêt d'un paramètre composite incluant à la fois le niveau de fixation tumorale mais également le volume tumoral actif, ici appelé index d'activité tumorale, pour mesurer des différences plus fines entre les groupes traités à des doses différentes et diagnostiquer précocement dans la prise en charge une dose insuffisante menant à un échappement thérapeutique.

3. Réponse thérapeutique en cas de potentialisation

Nos expérimentations sur la potentialisation des deux types de traitement, chimiothérapie et protonthérapie, étaient basées sur l'évolution croissante ou décroissante de l'index d'activité tumorale entre les mesures réalisées à J19 et J26, à partir du calcul des pentes entre ces deux points. Dans ce protocole expérimental l'irradiation proton en une fraction aux doses de 5, 10 ou 20 Gy était associée au traitement par Topotécan pleine dose. Cette évolution était comparée à celle des traitements par chimiothérapie ou protonthérapie seule.

Nos travaux retrouvent une différence statistiquement significative pour les acquisitions au ^{18}F -FDG, entre les mesures des pentes de l'index d'activité tumorale du traitement par 10Gy seul et 10Gy avec chimiothérapie, et entre les mesures des pentes de l'index d'activité tumorale du traitement par 20Gy seul et 20Gy avec chimiothérapie. Paradoxalement, les pentes des traitements par irradiation seule sont inférieures à celles de l'association. En première interprétation, ces résultats indiqueraient un effet délétère de l'ajout de chimiothérapie. Cependant ces résultats sont à considérer dans leur contexte. Effectivement, il s'agit d'évaluer la progression d'une intensité de fixation en fin de traitement, à un moment défini de la prise en charge. Ainsi, pour un traitement ayant été très efficace dès le début, une pente pourrait rester stable sans pour autant être péjorative, et un traitement moins efficace présentant une pente négative pourrait paraître favorable alors que l'efficacité serait juste retardée.

Cette différence n'est pas retrouvée sur les acquisitions au ^{18}F -FLT.

Nos résultats ne mettent donc pas en évidence un effet potentialisant favorable de la chimiothérapie. A noter que le protocole expérimental a été conçu pour rechercher une différence entre les groupes à un moment précis de l'évolution tumorale, n'étant pas forcément adapté à l'histoire naturelle de la maladie. Effectivement, l'effet potentialisant de l'association radio-chimiothérapie pourrait être efficace sur le risque évolutif à plus long terme.

Des études complémentaires seraient donc nécessaires pour approfondir l'étude de l'intérêt de l'imagerie TEP dans la recherche de reprise évolutive et d'une potentialisation thérapeutique chimio-protonthérapie.

4. Ki-67

Les mesures du Ki-67 des tumeurs prélevées à J21 mettent en évidence une différence statistiquement significative entre le groupe contrôle et les groupes traités, à l'exception du groupe traité par irradiation 10 Gy seule. Le Ki-67 des tumeurs traitées est inférieur à celui des contrôles. Le Ki-67 est considéré comme le marqueur de prolifération de référence en oncologie. Plusieurs données de la littérature [157]–[160] confirment la corrélation entre l'intensité de fixation du ^{18}F -FLT et le Ki-67 des tumeurs. Ces résultats sont concordants avec nos expérimentations puisque la différence significative de fixation entre les groupes traités et les groupes contrôles est confirmée par la mesure du Ki-67.

De même, le Ki-67 est significativement inférieur dans le groupe traité par irradiation 20 Gy comparativement au groupe traité par irradiation 10 Gy, et dans le groupe traité par irradiation 20 Gy avec chimiothérapie, comparativement au groupe traité par chimiothérapie pleine dose seule. Sur nos acquisitions au ^{18}F -FLT, la différence entre le groupe traité par irradiation 20 Gy et le groupe traité par irradiation 10 Gy était mise en évidence sur la mesure de l'index d'activité tumorale à J25. La mesure du Ki-67 permet de confirmer l'utilité de la mesure de l'index d'activité tumorale au ^{18}F -FLT comme marqueur de reprise évolutive pour une sous-dose de protonthérapie.

L'absence de différence entre le groupe contrôle et le groupe traité par irradiation 10 Gy seule pourrait être discutée. Effectivement, dans nos expérimentations par imagerie TEP au ^{18}F -FLT il existait une différence. La mesure du Ki-67 a été réalisée sur un groupe de 4 souris. Il existe peut-être un manque de sensibilité statistique expliquant qu'aucune différence n'a pu être mise en évidence.

Ainsi, l'utilisation de l'imagerie TEP au ^{18}F -FLT comme marqueur de prolifération pourrait apporter un avantage diagnostique dans le suivi du traitement de l'hépatocarcinome. Cela permettrait d'évaluer le caractère agressif d'une tumeur ou de métastases de manière non invasive, et d'éviter la morbidité liée aux gestes biopsiques.

VII. Conclusions et perspectives

L'imagerie TEP chez le petit animal s'est avérée utile dans nos expérimentations pour le suivi du traitement de l'hépatocarcinome que cela soit au ^{18}F -FDG comme au ^{18}F -FLT. Le suivi par imagerie TEP a permis d'individualiser une reprise évolutive sous chimiothérapie ainsi qu'une thérapeutique insuffisante à demi-dose. L'affinité du ^{18}F -FDG pour hépatocarcinome peut être expliquée par le caractère peu différencié de la souche tumorale employée ; Sk-hep1. Son avantage, par rapport au ^{18}F -FLT est l'absence de signal parasite de la moelle hématopoïétique et du parenchyme splénique lié à la stimulation de l'hématopoïèse sous Topotécan. Le ^{18}F -FDG permet également de réaliser le suivi du traitement par protonthérapie mais l'interprétation est gênée en période post-irradiation par l'inflammation locale radio-induite induisant une hyperfixation aspécifique.

L'emploi du ^{18}F -FLT a permis dans nos expérimentations, de visualiser plus précocement une reprise évolutive après protonthérapie. L'utilisation d'un paramètre composite, l'index d'activité tumorale, s'est avérée sensible dans la détection de la reprise tumorale. Il est notable que l'utilisation du paramètre d'interprétation le plus courant en pratique clinique, à savoir la SUVmax, n'aurait pas permis à lui seul de détecter cette reprise tumorale. Cette observation est essentielle puisque l'imagerie TEP de la prolifération permettrait d'évaluer une sous-dose de protonthérapie et d'envisager un traitement de rattrapage. L'avantage de l'emploi du ^{18}F -FLT pour le suivi de l'irradiation proton, par rapport au ^{18}F -FDG, est d'autant plus marqué que ce traceur n'induit pas d'hyperfixation locale aspécifique liée à l'inflammation post-radiothérapie. Les résultats de l'imagerie TEP au ^{18}F -FLT étaient concordants avec les mesures anatomopathologiques du Ki-67, un marqueur référence de la prolifération tumorale. Concernant le suivi du traitement par chimiothérapie, le ^{18}F -FLT n'apporte pas d'avantage par rapport au ^{18}F -FDG, d'autant plus que la fixation aspécifique liée à la stimulation de l'hématopoïèse sous chimiothérapie pourrait être à l'origine d'une perturbation de l'interprétation et de la quantification.

L'observation par imagerie TEP de la reprise tumorale évolutive, et donc de la relative insuffisance thérapeutique, a mené à la recherche d'une éventuelle potentialisation entre ces deux traitements. Le protocole d'étude était basé sur un comparatif de l'évolution de l'intensité de fixation des deux traceurs, sur les dernières mesures, au moment où avait été individualisée la reprise évolutive dans les expérimentations menées sous chimiothérapie ou protonthérapie seules. Ces expérimentations n'ont pas permis d'individualiser un avantage thérapeutique en faveur des associations proto-chimiothérapie comparativement aux traitements par chimiothérapie et protonthérapie seules. Cependant, ces observations étant très dépendantes du type de traitement, des doses employées, des protocoles d'administration et du moment de l'observation, la recherche d'un effet potentialisant des thérapeutiques nécessiterait un complément d'investigation.

Comme nous l'avons vu, plusieurs paramètres peuvent influencer le suivi par imagerie TEP de l'hépatocarcinome. Tout d'abord la souche tumorale. Effectivement, nous avons fait le choix de travailler avec sk-Hep1, une souche peu différenciée présentant des caractéristiques anatomopathologiques mésenchymateuses. Une revue de la littérature [25], [26], [139]–[143], [152], [154] nous a permis de rationaliser l'utilisation de ces deux traceurs, ^{18}F -FDG et ^{18}F -FLT, dans l'évaluation de ce type de tumeur. Nos résultats confirment que l'imagerie TEP avec ces traceurs nous permet de réaliser le suivi évolutif de cette pathologie. Il est cependant légitime de s'interroger sur l'efficacité de suivi de ces mêmes traceurs sur d'autres souches d'hépatocarcinome plus différenciées comme HepG2 ou Hep3B. HepG2 est une souche d'hépatocarcinome bien différencié, issue de la

biopsie hépatique d'un homme Caucasien de 15 ans, présentant des caractéristiques épithéliales. Hep3B est une souche d'hépatocarcinome bien différencié, issue d'un homme de 8 ans atteint d'hépatite B.

De la même manière, d'autres traceurs TEP pourraient être envisagés. Effectivement, si l'on considère que le niveau d'oxygénation de la tumeur est un facteur pronostique de réponse aux traitements par chimiothérapie et radiothérapie, il serait justifié de poursuivre les investigations avec des traceurs TEP de l'hypoxie comme le ^{18}F -MISO ou le ^{18}F -FAZA. L'apoptose tumorale pourrait également être étudiée (ML10). Des études rapportant la majoration de l'apoptose cellulaire dans le traitement par irradiation protons comparativement à l'irradiation photons [161]–[164], il serait intéressant de visualiser ce phénomène *in vivo*, en comparaison à l'irradiation photons. Enfin, nous pourrions compléter l'étude tumorale par de l'imagerie à la ^{18}F -Choline. Ce traceur a été décrit dans la littérature comme plus sensible que le ^{18}F -FDG dans le suivi évolutif des CHC bien différenciés. L'étude de Castilla-Lièvre et al. [165] sur l'apport de l'association de deux examens TEP, au ^{18}F -FDG et à la ^{18}F -Choline, met en évidence une sensibilité augmentée jusqu'à 93% dans le diagnostic des CHC, lorsque ces examens sont combinés. Il serait donc pertinent d'étudier l'apport dans le suivi de notre souche sk-hep1, ou bien d'autres souches tumorales d'hépatocarcinome plus différenciées, au cours du traitement par chimiothérapie et protonthérapie.

Concernant la chimiothérapie, nous avons fait le choix d'utiliser dans notre protocole une chimiothérapie cytotoxique classique, le Topotécan. Actuellement, les recommandations de bonne pratique du traitement de l'hépatocarcinome émises par la Société Nationale Française de Gastroentérologie le 19/03/2019, l'European Association for the Study of the Liver et l'European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EALS-EORTC) orientent vers l'utilisation de thérapeutiques ciblées comme le Sorafénib ou le Lenvatinib [61]. Un protocole d'étude de l'utilité de l'imagerie TEP dans l'évaluation de ce type de thérapeutique, associée à une irradiation proton, serait utile puisqu'il s'agit de l'avenir de la thérapeutique systémique de l'hépatocarcinome.

De même, le protocole de protonthérapie pourrait être affiné avec une délivrance en plusieurs fractions, se rapprochant plus de la réalité clinique.

Enfin, comme stipulé ci-dessus, le protocole d'étude de la potentialisation chimiothérapie/protonthérapie nécessiterait d'être complété. Notre étude n'a pas mis en évidence de potentialisation thérapeutique de la chimiothérapie avec la protonthérapie, à l'instant *t* étudié. Plusieurs paramètres pourraient varier comme les doses de traitement, mais surtout la rythmicité de délivrance en avançant ou retardant un traitement par rapport à l'autre, en fractionnant la protonthérapie ou en échelonnant l'imagerie TEP, notamment à la recherche de signes de reprise évolutive plus tardive.

Ainsi, ce travail de recherche a permis de poser, à partir des expérimentations menées chez le petit animal, les bases du suivi thérapeutique de l'hépatocarcinome par imagerie TEP. L'utilisation d'un radiotracer de la prolifération, le ^{18}F -FLT, semble tout à fait pertinente dans cette indication. Au vu de l'évolution de la Médecine Nucléaire, notamment de l'offre grandissante en matière de radiotraceurs, la poursuite de ces travaux est nécessaire afin d'enrichir la diversité des outils diagnostiques, d'améliorer la précision d'interprétation et d'affiner les protocoles de suivi au cas par cas.

ANNEXE I : Interaction rayonnement/matière

1. Interaction des photons avec la matière

1.1. La diffusion de Thomson-Rayleigh

Lors de cette interaction le rayonnement incident ne cède aucune énergie au milieu, seul le trajet du rayonnement est modifié. Comme la diffusion se fait principalement vers l'avant, le principal effet de la diffusion de Rayleigh sera d'augmenter la diffusion angulaire du faisceau incident. La probabilité d'interaction par diffusion Rayleigh est très faible et décroît rapidement avec l'augmentation de l'énergie du faisceau incident.

1.2. L'effet photo-électrique

Lors de l'interaction par effet photo-électrique, le photon incident cède toute son énergie à un électron du cortège électronique de l'atome cible. Ce dernier est alors éjecté du cortège électronique avec une énergie cinétique qui dépend de l'énergie du photon incident ($h\nu_0$) et de l'énergie de liaison (E_l) de cet électron à l'atome :

$$E_{\text{cin } e^-} = h\nu_0 - E_l$$

La probabilité d'interaction est d'autant plus élevée que l'électron est lié.

L'atome se trouve alors dans un état excité et peut retourner à son état fondamental selon deux processus :

- La désexcitation radiative. Le trou électronique laissé par l'électron expulsé sera comblé par un électron d'une couche moins liée. Le surplus d'énergie sera émis sous forme de rayonnement de fluorescence. Le spectre de fluorescence est caractéristique du matériau irradié.
- La désexcitation non-radiative par expulsion d'un photoélectron dit électron Auger. L'électron Auger correspond à un électron externe ayant absorbé le surplus d'énergie, qui sera expulsé à son tour du cortège électronique. La probabilité de production d'un électron Auger diminue avec l'augmentation de la masse de l'atome.

1.3. La diffusion Compton

Le photon incident cède dans cette interaction toute son énergie à un électron périphérique du cortège électronique, dit électron Compton. Cet électron est éjecté et un photon diffusé est créé. L'énergie du photon diffusé ($h\nu_1$) dépend de l'énergie du photon incident ($h\nu_0$) et de l'énergie de l'électron Compton (E_c), selon la loi de conservation de l'énergie :

$$h\nu_1 = h\nu_0 + E_c$$

L'énergie du photon diffusé ($h_{\nu 1}$) dépend également de l'angle de diffusion θ :

$$h_{\nu 1} = \frac{h_{\nu 0}}{1 + (1 - \cos\theta) \frac{h_{\nu 0}}{m_e c^2}}$$

Avec m_e , masse de l'électron en kg ; c , célérité de la lumière en m/s ; $m_e c^2 = 511 \text{ keV}$

La direction de l'électron Compton est dépendante de l'énergie du photon incident.

La section efficace différentielle de diffusion d'un photon incident d'énergie $h_{\nu 0}$ à un angle θ , par unité d'angle solide, est donnée par la formule de Klein-Nishina :

$$\frac{d\sigma(h_{\nu 0}, \theta)}{d\Omega} = \frac{r_e^2}{2} \left(\frac{1 + \cos^2 \theta}{(1 + \alpha(1 - \cos\theta))^2} + \frac{\alpha^2(1 - \cos\theta)^2}{(1 + \alpha(1 - \cos\theta))^3} \right)$$

Avec r_e le rayon classique de l'électron $r_e = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \times \frac{e^2}{m_e c^2}$, et $\alpha = \frac{h_{\nu 0}}{m_e c^2}$

1.4. La création de paires

Le photon incident se matérialise en un électron et un positon, de même masse et de même énergie cinétique, lorsqu'il passe à proximité d'un noyau. Pour que cette réaction soit possible, le photon incident doit avoir une énergie au moins égale à l'énergie de repos de l'électron et du positon, soit 1,02 Mev. L'excédent d'énergie du photon incident est cédé sous forme d'énergie cinétique à l'électron et au positon. Cette interaction est prédominante lorsque le photon incident est très énergétique. La section efficace d'interaction par création de paires est proportionnelle à la densité du milieu irradié (Z^2).

Dans un second temps, le positron va s'annihiler avec un électron du milieu et donner naissance à deux photons de 511keV émis à 180° l'un de l'autre. Cette émission photonique particulière est à l'origine de l'imagerie par émission de positon.

2. Interaction des rayonnements particuliers avec la matière.

2.1. Interaction des électrons avec la matière

Les électrons sont des particules chargées légères. A forte énergie (>10MeV), l'électron cède son énergie au milieu par rayonnement, appelé rayonnement de freinage ou Bremstrahlung. Ce rayonnement est émis lorsque l'électron subit un changement de vitesse au voisinage du champs électromagnétique d'un atome. L'électron est alors dévié de sa trajectoire initiale et émet un rayonnement de type X. L'intensité du rayonnement de freinage est proportionnelle à $(Z_{\text{milieu}}^2 / M_{\text{particule}}^2)$.

La part de perte d'énergie sous forme radiative dépend de l'énergie cinétique de l'électron (E_c) et du numéro atomique Z du matériau ralentisseur :

$$\frac{\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{radiatif}}}{\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{ionisation}}} = \frac{ZEc}{800}$$

A faible énergie l'électron entre en contact avec les atomes et cède son énergie soit par collision inélastique avec les noyaux (excitation ou ionisation), soit par collision élastique avec les noyaux ou les électrons. L'ionisation correspond à la perte d'un ou plusieurs électrons par le cortège électronique. Le phénomène d'excitation entraîne un état instable du cortège électronique mais sans arrachement d'un électron. Le retour à l'état de base est fait via l'émission de photons. La collision élastique avec les noyaux n'induit pas d'émission de rayonnement. La collision élastique avec les électrons est très faiblement probable.

Le parcours R, est défini par la distance parcourue dans la matière par la particule avant que son énergie ne soit totalement absorbée. Il est défini par :

$$R = \int_0^R dx = \int_0^{E_0} \left(\frac{dE}{dx}\right)^{-1} dE$$

S'agissant d'une particule légère, plus l'énergie sera perdue, plus sa trajectoire sera aléatoire avec possibilité de rétrodiffusion. L'on définit donc le parcours projeté Rp de l'électron qui correspond à son parcours projeté sur un axe orienté par sa direction d'incidence.

2.2. Interaction des particules chargées lourdes avec la matière

2.2.1 Collision inélastique avec les électrons : excitation, ionisation et capture électronique

La perte d'énergie par excitation ou ionisation sont les processus prédominants de la perte d'énergie d'une particule chargée lourde lors d'une collision avec les électrons atomiques. La trajectoire de la particule lourde n'est quasiment pas modifiée par cette interaction. Par contre, l'électron va subir une modification de sa configuration. Lors de l'excitation, il passera à un niveau énergétique supérieur et donc moins lié à l'atome. La désexcitation pourra se faire soit sur le mode radiatif, avec émission d'un photon, soit par émission d'un électron Auger. Lors de l'ionisation l'électron est éjecté du cortège électronique.

La capture électronique correspond au transfert des électrons de l'atome cible vers la particule chargée incidente.

2.2.2 Collision élastique avec les noyaux.

Ce processus est négligeable à haute vitesse, mais prédomine à basse vitesse d'interaction. Il s'agit d'un choc entre le noyau d'un atome et la particule chargée incidente. Lors de cette interaction, le transfert d'énergie s'effectue par échange de quantité de mouvement entre la cible et la particule incidente. L'énergie cinétique totale est conservée. La collision élastique va contribuer à la déflexion angulaire de la particule chargée à faible vitesse et à une part importante de sa perte d'énergie en fin de parcours. Les dégâts infligés au milieu sont alors maximaux.

Le parcours d'une particule lourde chargée dans la matière est globalement rectiligne. La perte d'énergie et déviation de la trajectoire initiale étant faibles lors des collisions inélastiques avec les électrons.

ANNEXE II : Les dommages cellulaires

3. Lésions cytoplasmiques et membranaires

Le cytosquelette peut être altéré après irradiation induisant une désorganisation de l'architecture cellulaire. L'irradiation de la membrane cellulaire est à l'origine d'une peroxydation des acides gras et de lésions des protéines incluses dans la membrane avec pour résultante la perturbation des échanges de la cellule avec le milieu environnant (flux ioniques, récepteurs membranaires et cascades métaboliques...) [166]. L'irradiation des acides gras membranaires peut induire la formation de résidus de phospholipides, malonedialdéhyde ou 4-hydroxynonanal, à l'origine de pontages de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) avec les protéines de proximité comme par exemple les histones. L'irradiation membranaire peut également être à l'origine d'une activation de la sphingomyélinase, qui va hydroxyler la sphingomyéline membranaire en céramide. Cette hydroxylation est interprétée comme un signal de mort cellulaire par la cellule et déclenchera la cascade apoptotique, expliquant notamment l'apoptose radio-induite [167].

4. Lésions de l'ADN

L'ADN est particulièrement sensible à l'irradiation. Du fait de sa structure complexe (Figure 52), il peut présenter différents types de lésions : rupture de brin, altération des bases ou des sucres. Les mécanismes de réparation de l'ADN sont nombreux et permettent de réparer une partie de ces lésions. Cependant, une réparation aberrante peut-être à l'origine de nouvelles anomalies.

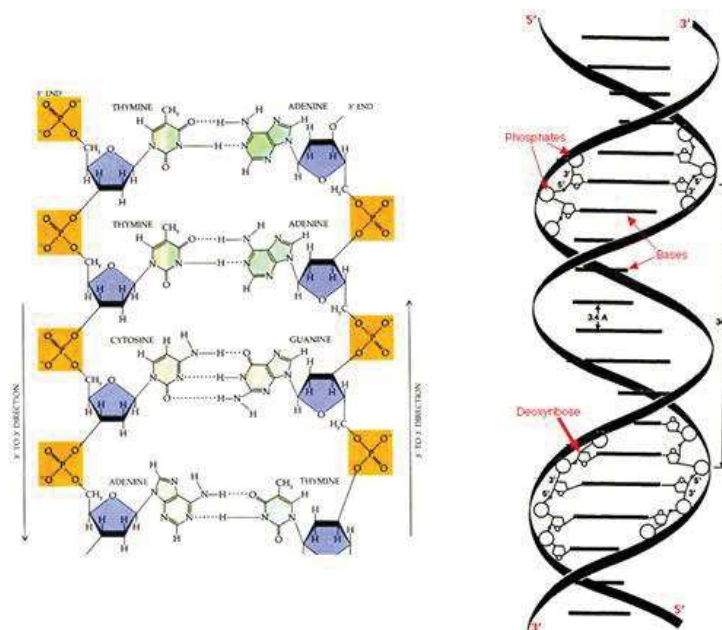


Figure 52: structure de l'ADN [Université Pierre et Marie Curie – Paris]

4.1. Ruptures de brin

Le rayonnement ionisant peut induire soit la rupture d'un seul brin de l'hélice d'ADN, dite simple brin, ou des deux brins, dite double-brin. La rupture simple brin peut survenir soit au niveau de la liaison phosphate-désoxyribose, soit au niveau de la liaison base-désoxyribose.

Une rupture double brin est une rupture des deux chaînes d'ADN à des sites distants de moins de 20 nucléotides, elle est le plus souvent le résultat d'une interaction avec les radicaux produits lors du dépôt d'énergie d'une seule particule. La probabilité de formation d'une rupture double brin à partir de radicaux issus de deux trajectoires distinctes est inférieure à 10^{-8} . Les ruptures double brin sont plus rares, que les rupture simple brin. On considère que pour 1Gy délivré au tissu, 40 ruptures double brin seront induites contre 500 à 1000 ruptures simple brin [168], [169]. De même, les ruptures double brin sont plus difficilement réparables et induisent donc plus fréquemment la mort cellulaire.

Les radicaux OH• sont les plus fréquemment en cause dans les mécanismes de ruptures de brin. Celles-ci sont donc plus fréquentes dans les cellules bien oxygénées que dans les cellules hypoxiques [170].

4.2. Altération des bases et des sucres

Les bases puriques et pyrimidiques peuvent être oxydées, engendrant des modifications chimiques de leur structure. Les deux produits majeurs sont la 5,6-dihydroxy-5,6-dihydroxythymidine (ThdGly) et la 8-oxo-7,8-dihydro-2''-désoxyguanosine (8-oxodG). Les altérations des sucres sont moins fréquentes. Il s'agit d'oxydations suivies d'hydrolyses. Ces réactions s'accompagnent de la libération de la base et éventuellement d'une rupture de la liaison phosphodiester qui lie deux nucléotides entre eux.

4.3. Pontages

Il existe différents types de pontages induits par les rayonnements ionisants : ADN-ADN intrachâînes, ADN-ADN interchâînes et ADN-protéines. Le nombre de pontages dans une cellule irradiée à 1Gy par un rayonnement de faible TEL est estimé à 150.

4.4. Dommages multiples localisés

Les dommages multiples localisés sont constitués par l'accumulation de dommages focalisés tels que décrits précédemment, sur un fragment d'ADN. On considère qu'ils sont induits le long de la trajectoire d'un unique rayonnement ionisant [171], [172]. La proportion de ces lésions augmente avec le TEL du rayonnement ionisant. La détection peut être difficile étant donné la rapidité de réparation d'une partie des lésions induites.

4.5. Altération des chromosomes

L'irradiation du matériel génétique peut mener à des réarrangements des chromosomes. Un chromosome normal est constitué, après la réplication de l'ADN et avant la division cellulaire (interphase), de deux chromatides identiques liés au niveau du centromère (Figure 53).

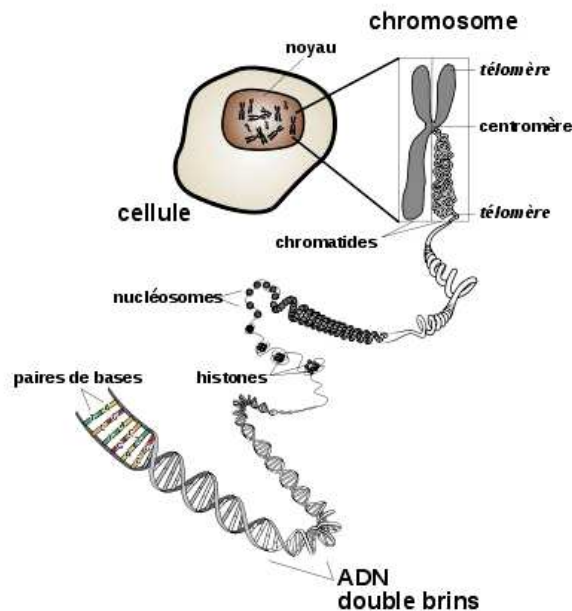


Figure 53: structure du chromosome [Wikipédia]

Si l'altération a lieu avant la phase S de réplication, elle concernera les deux chromatides sœurs, on parle d'aberration chromosomique. A contrario si l'altération a lieu une fois les chromatides dupliqués, elle ne concernera qu'une seule des deux chromatides, on parle d'aberration chromatidique. Les réarrangements des chromosomes après irradiation peuvent se produire soit au sein d'un même chromosome, on parle de réarrangements intra-chromosomiques, soit entre deux chromosomes différents, on parle de réarrangements inter-chromosomiques.

4.5.1 Réarrangements intra-chromosomiques

Une délétion est une perte d'un fragment de chromosome. Elle peut être située au milieu d'une chromatide, dite interstitielle, ou concerner la distalité de la chromatide, dite terminale. Lorsqu'une délétion sépare des fragments terminaux de deux chromatides sœurs, il peut se former des anneaux d'ADN. Une inversion correspond au déplacement d'un fragment au sein d'une chromatide.

4.5.2 Réarrangements inter-chromosomiques

Ils peuvent correspondre à une translocation réciproque c'est-à-dire un échange de matériel entre deux chromosomes. Des remaniements plus complexes peuvent avoir lieu comme les aberrations dicentriques incluant des échanges terminaux avec création d'un chromosome à deux centromères et

de fragments périphériques (Figure 54). Les rayonnements ionisants à TEL élevé sont habituellement pourvoyeurs d'aberrations chromosomiques complexes [173].

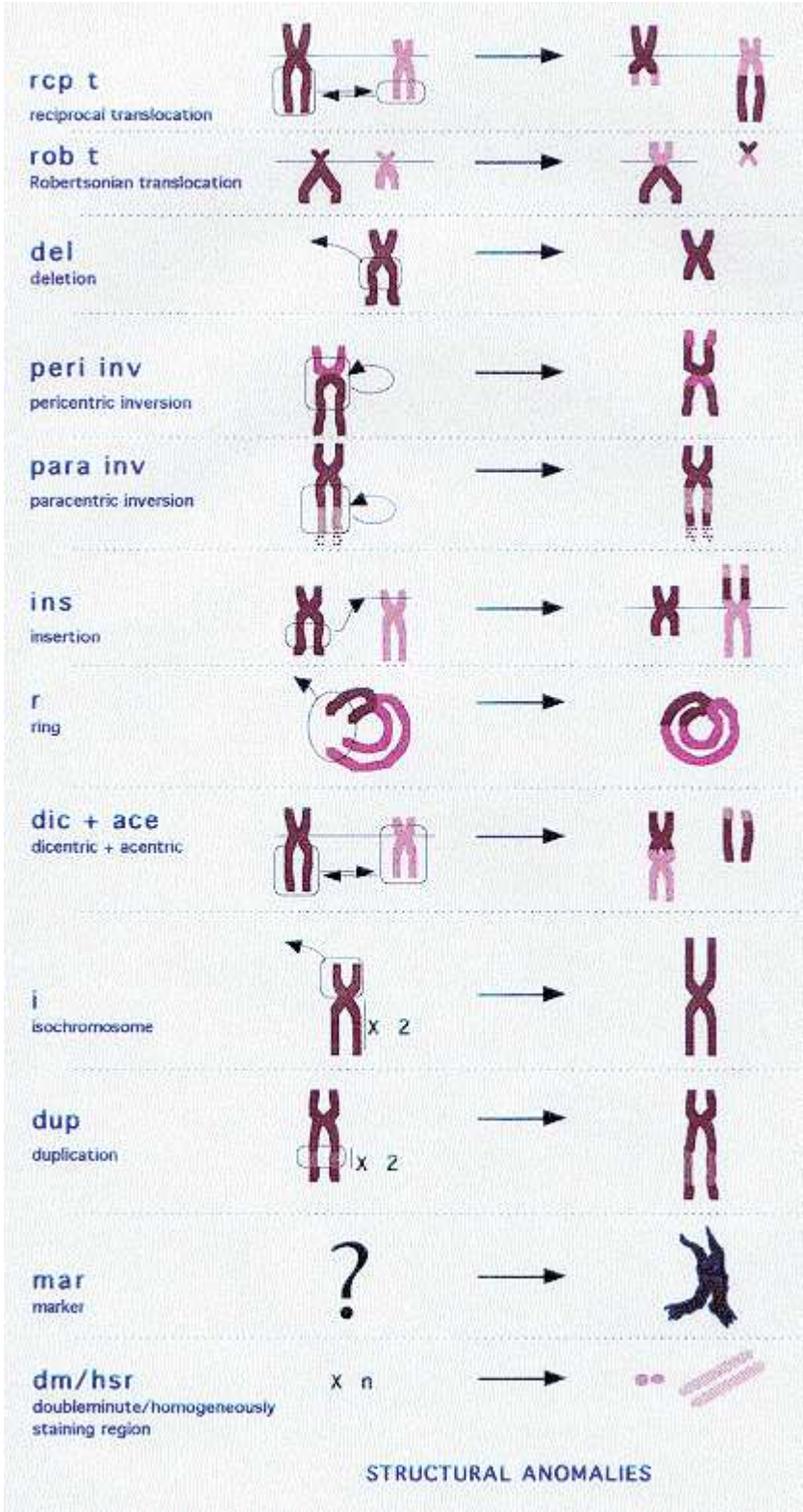


Figure 54: exemples de remaniements inter-chromosomiques [Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology]

4.6. Effets épigénétiques

Il ne s'agit pas d'une altération directe des bases ou de la structure de l'ADN. Les changements épigénétiques sont à l'origine d'une modification de l'expression des gènes. Ils peuvent agir sur la méthylation de l'ADN ou induire des réactions chimiques sur les molécules participant à la lecture du code génétique. Ainsi la méthylation, l'acétylation ou la phosphorylation des histones influent sur l'état d'ouverture de la chromatine et sur les possibilités de transcription.

4.7. Effet Bystander

Il sert à décrire les effets induits par les rayonnements ionisants sur les cellules du voisinage des cellules irradiées. Ce phénomène n'est pas encore parfaitement caractérisé et serait indépendant de la dose délivrée entre 0,5 et 5Gy [174]. Plusieurs mécanismes ont été évoqués : l'implication des jonctions intercellulaire, la transmission de signaux entre les cellules. Le rôle de la signalisation intercellulaire par des médiateurs de type calciques ou des réactifs oxygène-induits ont été évoqués dans l'apoptose radio-induite parmi les cellules non-irradiées [174].

ANNEXE III : Mécanismes de réparation de l'ADN

Afin de préserver le code génétique, les êtres humains disposent de plusieurs mécanismes de réparation des aberrations de l'ADN. Ces mécanismes sont mis en jeu suite à une irradiation cellulaire. Effectivement, le taux d'erreur d'un brin d'ADN non corrigé est en moyenne de 10^{-4} à 10^{-7} , alors qu'il est de 10^{-9} après le passage des systèmes de réparation. Le type de réparation dépend du type de lésion. Une réparation peut être fidèle c'est-à-dire restaurer la séquence d'ADN originelle ou infidèle. Une réparation infidèle induit une ou plusieurs erreurs dans la séquence d'ADN.

5. Réparation par excision de base (Base Excision Repair, BER)

Ce mécanisme permet de réparer les cassures simple brin, les altérations des bases et les sites abasiques. Initialement, une glycosylase va reconnaître une base anormale et couper la liaison entre la base et le sucre créant ainsi un site anucléotidique (site AP). Le sucre reste en place. Puis l'AP endonucléase (Apurinic/apyrimidinic endonuclease) va créer une brèche. Une polymérase sera recrutée pour polymériser un ou plusieurs nucléotides à partir du brin d'ADN homologue. Une desoxyribose phosphodiesterase retire le sucre laissé en place par la glycosylase, et une ligase reforme la liaison phosphodiester.

6. Réparation par excision de nucléotides (Nucleotide Excision Repair, NER)

Ce mécanisme permettra de réparer les lésions de l'ADN en retirant plusieurs nucléotides encadrants la lésion (Figure 55). Les protéines de la famille XP sont impliquées, associées au facteur de transcription TFIIH. Dans un premier temps la lésion est reconnue par une protéine xpC. Puis est recruté xpA qui participe au recrutement des autres protéines du complexe NER. Dans un second temps sont recrutées des hélicases, xpD et xpB, qui ouvrent l'hélice formée par les deux brins d'ADN pour permettre l'accès aux endonucléases. Les endonucléases xpG et xpF vont exciser plusieurs nucléotides. Une ADN polymérase va resynthétiser le brin exciser en utilisant le brin homologue comme matrice. Une ADN ligase referme le brin d'ADN.

Nucleotide excision repair (NER)

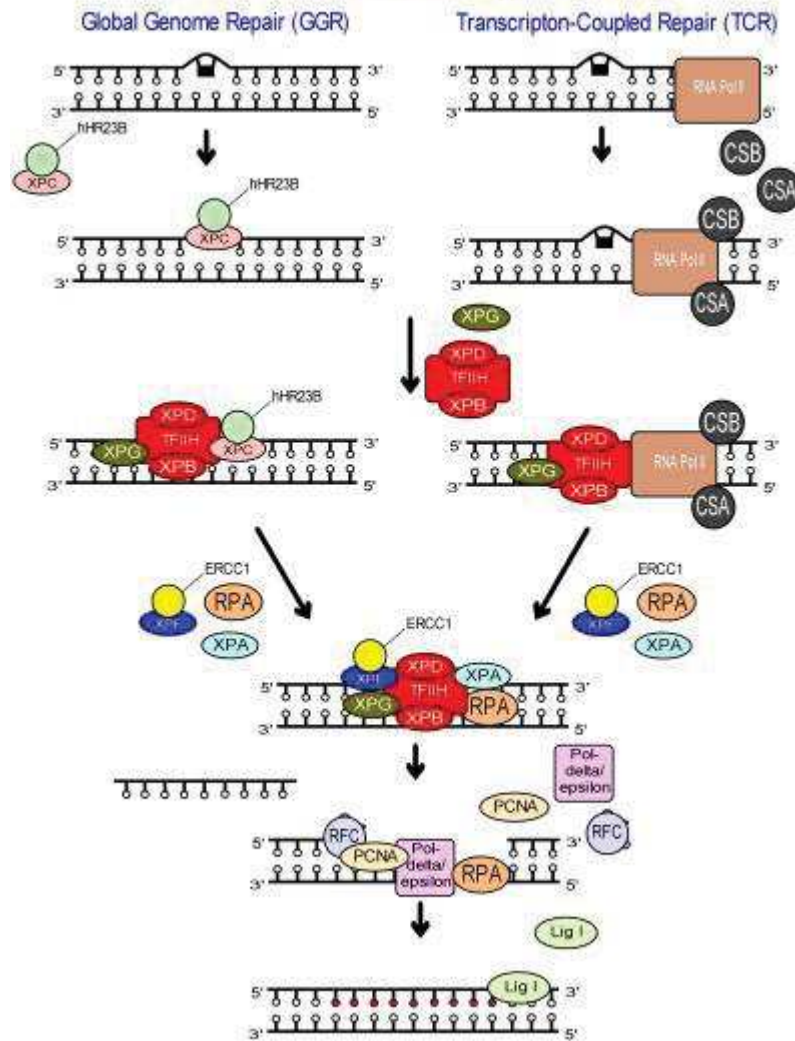


Figure 55: mécanismes de la réparation par excision de nucléotides

Elle permet de réparer des lésions volumineuses. On distingue deux types de mécanismes de réparation par excision de nucléotides : la réparation globale (Global genome NER) qui agit sur l'ensemble du génome, et la réparation couplée à la transcription (Transcription coupled NER) qui agit sur les brins d'ADN transcrits. Sur le brin en cours de transcription la réparation se fera en même temps que la transcription et sera plus rapide. La réparation d'un brin non-transcrit est plus lente.

7. Réparation des mésappariements de bases (Mismatch Repair, MMR)

Ce mécanisme permet de réparer les petites délétions ou additions. Il nécessite la reconnaissance du brin le plus anciennement synthétisé qui sera utilisé comme référence par rapport au brin néosynthétisé. Le brin matrice est reconnu grâce aux méthylations des adénines. Initialement la

protéine Mut S reconnaît le mésappariement (Figure 56) sur le brin néosynthétisé, puis Mut L se lie et active l'endonucléase Mut H. Mut H coupe en aval de l'erreur. Puis s'actionnent une exonucléase et une hélicase qui retirent le brin néosynthétisé jugé erroné. L'ADN-polymérase I resynthétise le brin sur la base du brin homologue et une ligase referme l'hélice.

Etant donné que ce mécanisme se base sur l'utilisation du brin le plus anciennement synthétisé comme référence, il est possible que certaines erreurs radioinduites sur ce dernier soient fixées dans le code génétique par réparation du brin néosynthétisé non-muté.

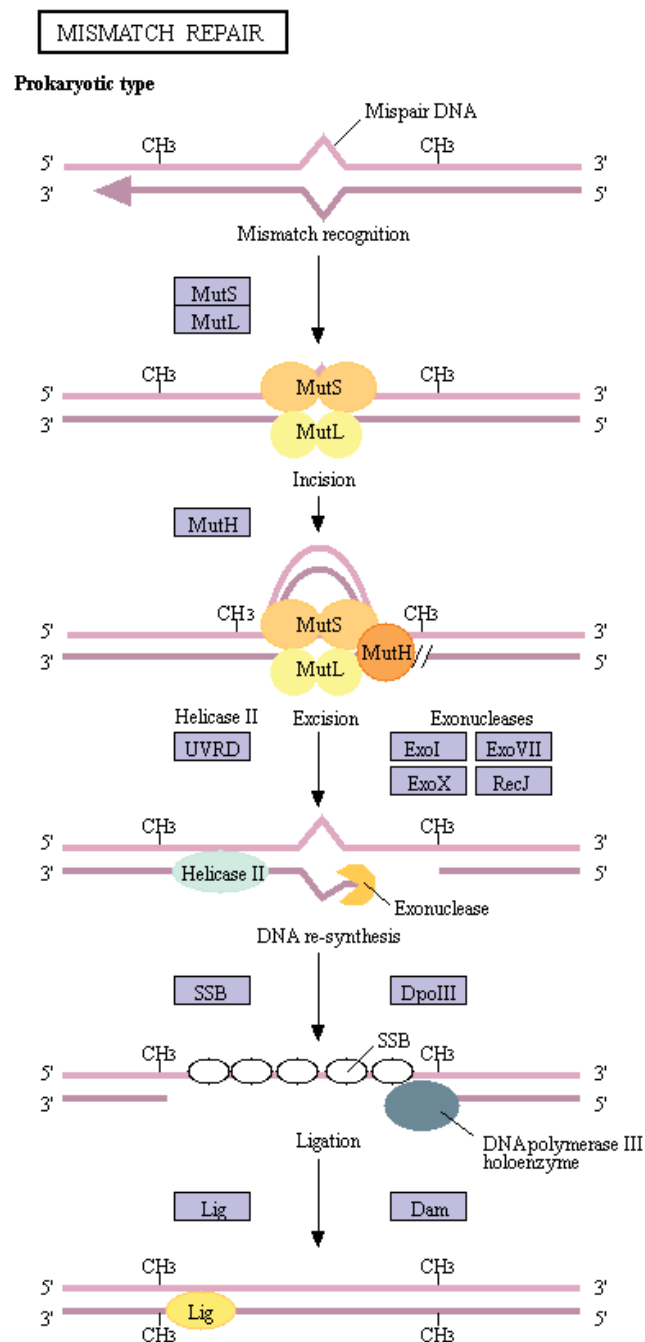


Figure 56: mécanismes de la réparation des mésappariements de bases [Kanehisa Laboratories]

8. Réparation par suture non-homologue (Non Homologous End-Joining, NHEJ)

Ce mécanisme permet de réparer les cassures double-brin (Figure 57). Il est dit non-conservatif car ne permet pas de restaurer la séquence d'ADN originelle mais simplement la continuité du brin d'ADN. La protéine Ku70/80 prend en charge ce type de réparation. Ku 60/70 active une protéine DNA-PKcs qui régule la phosphorylation des autres protéines impliquées dans la réparation par suture non-homologue. C'est le cas de la protéine Artémis, une endonucléase et exonucléase 5'-3', qui va traiter les extrémités de la cassure pour les rendre compatibles avec la liaison à de nouveaux nucléotides. Puis des polymérase μ et λ peuvent ajouter des acides nucléiques aux extrémités. Sachant que ce processus ne se base pas sur un brin matrice, il est potentiellement pourvoyeur de mutations. Enfin, une ligase relie les deux extrémités.

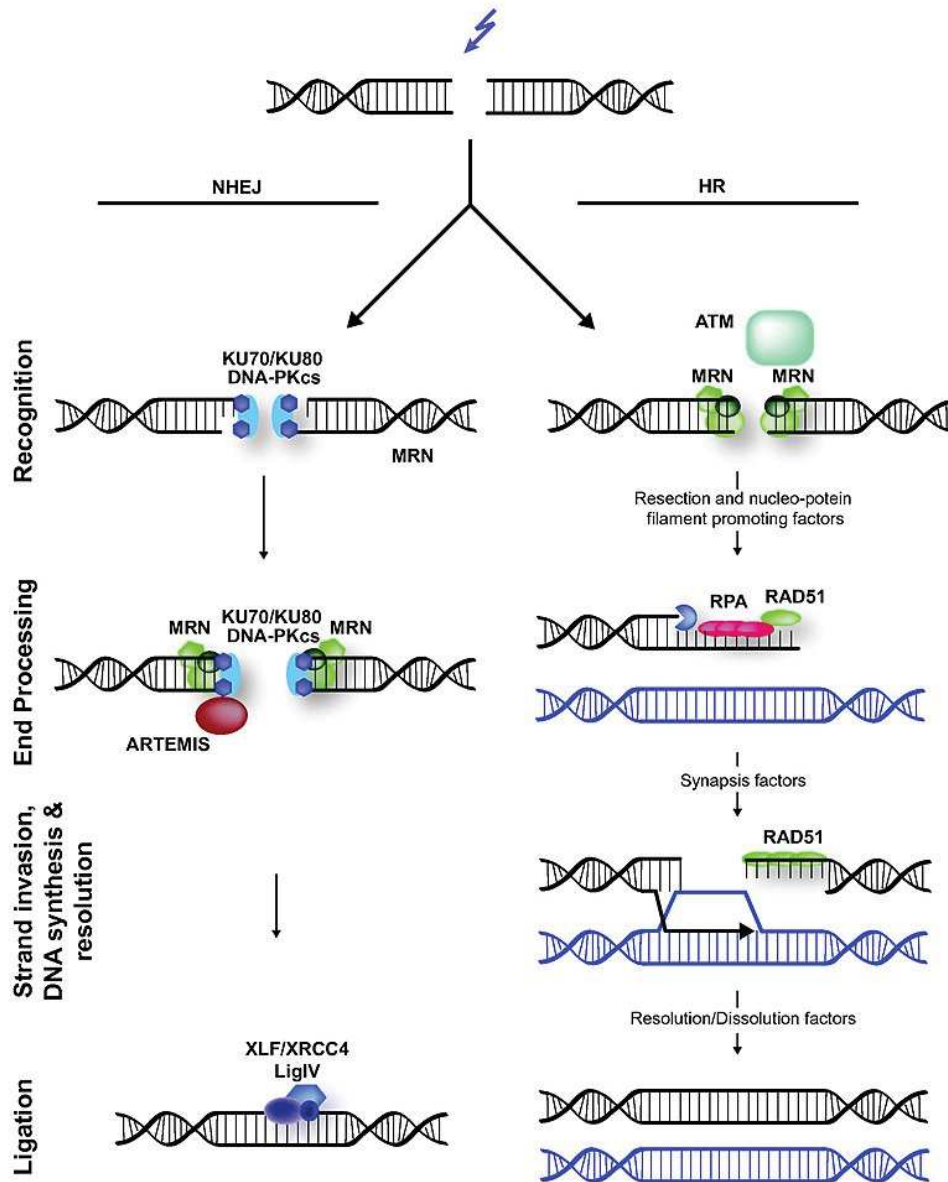


Figure 57: mécanismes de la réparation par suture non-homologue et de la réparation par recombinaison homologue [Hannes Lans, Jurgen A Marteijn and Wim Vermeulen - BioMed Central]

9. Réparation par recombinaison homologue (RH)

Ce mécanisme permet également de réparer les cassures double-brin. A la différence de la réparation par suture non-homologue, l'utilisation de la séquence homologue à la région de cassure permet une réparation fidèle (Figure 57).

La reconnaissance initiale de la cassure est faite par le complexe MRN (MRE11, Rad50, Nbs1) qui se lie aux deux extrémités de la cassure. La résection du brin d'ADN implique plusieurs protéines. Dans un premier temps, MRE11 et CtIP induisent la résection, puis l'exonucléase EXO1, le complexe BLM-RMI1-

TOP1 avec l'endonucléase DNA2, poursuivent la résection. Le brin d'ADN ainsi exposé est protégé par la protéine RPA pour empêcher la formation de structures secondaires.

La protéine RAD51 se lie à un brin d'ADN réséqué et recherche des régions d'homologie. La reconnaissance d'une région homologue permet la formation d'une boucle en D, par l'appariement du brin 3' de la cassure avec la région homologue. Le brin 3' de la cassure utilise le brin homologue comme matrice pour resynthétiser l'ADN manquant. Dans un second temps, le brin 3' ainsi néo-synthétisé peut servir de matrice à la resynthèse de son brin homologue. C'est la voie de synthèse dépendante de l'hybridation de brin.

Il existe une seconde voie de réparation dite de réparation des cassures double brin (DSBR). Le facteur de recombinaison BRCA2 capture la seconde extrémité du brin d'ADN à réparer, qui sera associé au second brin de la région homologue matrice, formant une double jonction de Holliday. De nouveau, la région homologue est utilisée comme matrice pour la synthèse des brin réparés.

ANNEXE IV : Effectifs de souris par groupe

¹⁸ F-FDG	Nombre de souris
Contrôle	6
Topotecan demi-dose	15
Topotecan pleine dose	11
Irradiation 5 Gy	5
Irradiation 10 Gy	6
Irradiation 20 Gy	7
¹⁸ F-FLT	
Contrôle	9
Topotecan demi-dose	6
Topotecan pleine dose	8
Irradiation 5 Gy	6
Irradiation 10 Gy	13
Irradiation 20 Gy	9

Bibliographie :

- [1] Société Française de Médecine Nucléaire, "RECOMMANDATIONS DE BONNE PRATIQUE CLINIQUE POUR L'UTILISATION DE LA TEP EN CANCÉROLOGIE." 09-May-2018.
- [2] Société Française de Médecine Nucléaire, "THESAURUS - RECOMMANDATIONS DE BONNE PRATIQUE CLINIQUE POUR L'UTILISATION DE LA TEP EN CANCÉROLOGIE," 09-May-2018. [Online]. Available: https://www.sfmn.org/drive/SFMN/GUIDES%20DE%20PROCEDURES/GuidesEtRecommandation_PublicWeb/RBP%20utilisation%20TEP%20en%20cancerologie%20thesaurus_V1.pdf. [Accessed: 24-Jun-2019].
- [3] Institut National du Cancer (INCa), "Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015-2016. Etat des lieux et enjeux." Jul-2016.
- [4] Institut National du Cancer, "La Protonthérapie, indications et capacité de traitement, juin 2016, appui à la décision," *Sept. 2016*.
- [5] F. Binder-Foucard, "Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim," Jul-2013. [Online]. Available: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2013/Estimation-nationale-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-entre-1980-et-2012>. [Accessed: 13-Mar-2019].
- [6] FNORS, "Cancers du foie et des voies biliaires," May-2012. [Online]. Available: https://www.fnors.org/uploadedFiles/publicationsFnors/cancer_Foie_Fnors_2012/1Cancers_du_foie_et_des_voies_biliaires_Fnors_Juin2012.pdf. [Accessed: 24-Jun-2019].
- [7] J. I. Yu *et al.*, "Initial clinical outcomes of proton beam radiotherapy for hepatocellular carcinoma," *Radiat. Oncol. J.*, vol. 36, no. 1, pp. 25–34, Mar. 2018.
- [8] T. H. Kim *et al.*, "Phase I Dose-Escalation Study of Proton Beam Therapy for Inoperable Hepatocellular Carcinoma," *Cancer Res. Treat.*, vol. 47, no. 1, pp. 34–45, Jan. 1970.
- [9] S. Apisarnthanarax, S. R. Bowen, and S. E. Combs, "Proton Beam Therapy and Carbon Ion Radiotherapy for Hepatocellular Carcinoma," *Semin. Radiat. Oncol.*, vol. 28, no. 4, pp. 309–320, Oct. 2018.
- [10] M. Hata *et al.*, "Proton Beam Therapy for Hepatocellular Carcinoma Patients with Severe Cirrhosis," *Strahlenther. Onkol.*, vol. 182, no. 12, pp. 713–720, Dec. 2006.
- [11] Y. Sorin *et al.*, "Effectiveness of Particle Radiotherapy in Various Stages of Hepatocellular Carcinoma: A Pilot Study," *Liver Cancer*, vol. 7, no. 4, pp. 323–334, 2018.
- [12] T. Chiba, "Proton Beam Therapy for Hepatocellular Carcinoma: A Retrospective Review of 162 Patients," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 10, pp. 3799–3805, May 2005.
- [13] M. Mizumoto *et al.*, "Proton Beam Therapy for Hepatocellular Carcinoma: A Review of the University of Tsukuba Experience," *Int. J. Part. Ther.*, vol. 2, no. 4, pp. 570–578, Mar. 2016.
- [14] T. C. Ling, J. I. Kang, D. A. Bush, J. D. Slater, and G. Y. Yang, "Proton therapy for hepatocellular carcinoma," *Chin. J. Cancer Res.*, vol. 24, no. 4, pp. 361–367, Dec. 2012.
- [15] G. S. Yoo, J. I. Yu, and H. C. Park, "Proton therapy for hepatocellular carcinoma: Current knowledges and future perspectives," *World J. Gastroenterol.*, vol. 24, no. 28, pp. 3090–3100, Jul. 2018.
- [16] N. N. Sanford *et al.*, "Protons versus Photons for Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Liver Decompensation and Overall Survival," *Int. J. Radiat. Oncol.*, Jan. 2019.
- [17] I. Buvat, "Les limites du SUV," *Médecine Nucl.*, vol. 31, no. 4, pp. 165–172, Apr. 2007.
- [18] J. W. Keyes, "SUV: standard uptake or silly useless value?," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 36, no. 10, pp. 1836–1839, Oct. 1995.
- [19] J. A. Thie, "Understanding the standardized uptake value, its methods, and implications for usage," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 45, no. 9, pp. 1431–1434, Sep. 2004.

- [20] R. Boellaard, N. C. Krak, O. S. Hoekstra, and A. A. Lammertsma, "Effects of noise, image resolution, and ROI definition on the accuracy of standard uptake values: a simulation study," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 45, no. 9, pp. 1519–1527, Sep. 2004.
- [21] O. Warburg, "On respiratory impairment in cancer cells," *Science*, vol. 124, no. 3215, pp. 269–270, Aug. 1956.
- [22] E. K. J. Pauwels and F. J. Cleton, "Positron-emission tomography with [18F] fluorodeoxyglucose," p. 11.
- [23] R. Hustinx, F. Bénard, and A. Alavi, "Whole-body FDG-PET imaging in the management of patients with cancer," *Semin. Nucl. Med.*, vol. 32, no. 1, pp. 35–46, Jan. 2002.
- [24] Y. Yamamoto *et al.*, "Detection of Hepatocellular Carcinoma Using 11C-Choline PET: Comparison with 18F-FDG PET," *J. Nucl. Med.*, vol. 49, no. 8, pp. 1245–1248, Jul. 2008.
- [25] J.-N. Talbot *et al.*, "Detection of Hepatocellular Carcinoma with PET/CT: A Prospective Comparison of 18F-Fluorocholine and 18F-FDG in Patients with Cirrhosis or Chronic Liver Disease," *J. Nucl. Med.*, vol. 51, no. 11, pp. 1699–1706, Nov. 2010.
- [26] J.-N. Talbot *et al.*, "PET/CT in patients with hepatocellular carcinoma using [18F]fluorocholine: preliminary comparison with [18F]FDG PET/CT," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 33, no. 11, pp. 1285–1289, Oct. 2006.
- [27] K. Chen and X. Chen, "Positron Emission Tomography Imaging of Cancer Biology: Current Status and Future Prospects," *Semin. Oncol.*, vol. 38, no. 1, pp. 70–86, Feb. 2011.
- [28] E. T. McKinley *et al.*, "Limits of [18F]-FLT PET as a Biomarker of Proliferation in Oncology," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 3, Mar. 2013.
- [29] L. M. Kenny *et al.*, "Quantification of Cellular Proliferation in Tumor and Normal Tissues of Patients with Breast Cancer by [¹⁸F]Fluorothymidine-Positron Emission Tomography Imaging: Evaluation of Analytical Methods," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 21, pp. 10104–10112, Nov. 2005.
- [30] O. Jacobson and X. Chen, "Interrogating Tumor Metabolism and Tumor Microenvironments Using Molecular Positron Emission Tomography Imaging. Theranostic Approaches to Improve Therapeutics," *Pharmacol. Rev.*, vol. 65, no. 4, pp. 1214–1256, Sep. 2013.
- [31] D. Soloviev, D. Lewis, D. Honess, and E. Aboagye, "[18F]FLT: An imaging biomarker of tumour proliferation for assessment of tumour response to treatment," *Eur. J. Cancer*, vol. 48, no. 4, pp. 416–424, Mar. 2012.
- [32] L. Kenny, R. C. Coombes, D. M. Vigushin, A. Al-Nahhas, S. Shousha, and E. O. Aboagye, "Imaging early changes in proliferation at 1 week post chemotherapy: a pilot study in breast cancer patients with 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine positron emission tomography," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 34, no. 9, pp. 1339–1347, Aug. 2007.
- [33] B. S. Pio *et al.*, "Usefulness of 3'-[F-18]Fluoro-3'-deoxythymidine with Positron Emission Tomography in Predicting Breast Cancer Response to Therapy," *Mol. Imaging Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 36–42, Jan. 2006.
- [34] A. K. Buck *et al.*, "Imaging Proliferation in Lung Tumors with PET: 18F-FLT Versus 18F-FDG," *J. Nucl. Med.*, vol. 44, no. 9, pp. 1426–1431, Jan. 2003.
- [35] J. Schwarzenberg *et al.*, "3'-Deoxy-3'-18F-Fluorothymidine PET and MRI for Early Survival Predictions in Patients with Recurrent Malignant Glioma Treated with Bevacizumab," *J. Nucl. Med.*, vol. 53, no. 1, pp. 29–36, Jan. 2012.
- [36] Z. Li, Y. Yu, H. Zhang, G. Xu, and L. Chen, "A meta-analysis comparing 18F-FLT PET with 18F-FDG PET for assessment of brain tumor recurrence," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 36, no. 7, pp. 695–701, Jul. 2015.
- [37] Q.-T. Le, "An Evaluation of Tumor Oxygenation and Gene Expression in Patients with Early Stage Non-Small Cell Lung Cancers," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 5, pp. 1507–1514, Mar. 2006.
- [38] J. A. Bertout, S. A. Patel, and M. C. Simon, "The impact of O₂ availability on human cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, no. 12, pp. 967–975, Dec. 2008.
- [39] N. C. Denko, "Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, no. 9, pp. 705–713, Sep. 2008.

- [40] P. J. Blower, J. S. Lewis, and J. Zweit, "Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 23, no. 8, pp. 957–980, Nov. 1996.
- [41] F. Dehdashti *et al.*, "In vivo assessment of tumor hypoxia in lung cancer with ⁶⁰Cu-ATSM," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 30, no. 6, pp. 844–850, Jun. 2003.
- [42] G. Janoray, I. Barillot, and G. Calais, "Évaluation de la réponse thérapeutique après radiothérapie stéréotaxique des lésions tumorales hépatiques," *Cancer/Radiothérapie*, vol. 18, no. 4, pp. 320–324, Jul. 2014.
- [43] S. Thureau, S. Mezzani-Saillard, R. Modzelewski, A. Edet-Sanson, B. Dubray, and P. Vera, "Intérêt de la TEP au FDG pour la radiothérapie des cancers bronchiques," *Cancer/Radiothérapie*, vol. 15, no. 6–7, pp. 504–508, Oct. 2011.
- [44] R. Jeraj, T. Bradshaw, and U. Simon i, "Molecular Imaging to Plan Radiotherapy and Evaluate Its Efficacy," *J. Nucl. Med.*, vol. 56, no. 11, pp. 1752–1765, Nov. 2015.
- [45] A.-S. Baumann *et al.*, "Recommandations communes avec l'AFEF," p. 36.
- [46] A. I. Gomaa, S. A. Khan, M. B. Toledano, I. Waked, and S. D. Taylor-Robinson, "Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis," *World J. Gastroenterol.*, vol. 14, no. 27, p. 4300, 2008.
- [47] A. Tang, O. Hallouch, V. Chernyak, A. Kamaya, and C. B. Sirlin, "Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis," *Abdom. Radiol.*, vol. 43, no. 1, pp. 13–25, Jan. 2018.
- [48] G. Fattovich, T. Stroffolini, I. Zagni, and F. Donato, "Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors," *Gastroenterology*, vol. 127, no. 5 Suppl 1, pp. S35-50, Nov. 2004.
- [49] Y. Hoshida, B. C. Fuchs, and K. K. Tanabe, "Prevention of hepatocellular carcinoma: potential targets, experimental models, and clinical challenges," p. 55, 2013.
- [50] F. Turati *et al.*, "Alcohol and liver cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies," *Ann. Oncol.*, vol. 25, no. 8, pp. 1526–1535, Aug. 2014.
- [51] Y.-C. A. Lee, C. Cohet, Y.-C. Yang, L. Stayner, M. Hashibe, and K. Straif, "Meta-analysis of epidemiologic studies on cigarette smoking and liver cancer," *Int. J. Epidemiol.*, vol. 38, no. 6, pp. 1497–1511, Dec. 2009.
- [52] S. D. Ryder, "Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in adults," *Gut*, vol. 52, no. 90003, p. 1iii–8, May 2003.
- [53] A. G. Singal, A. Pillai, and J. Tiro, "Early Detection, Curative Treatment, and Survival Rates for Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients with Cirrhosis: A Meta-analysis," *PLoS Med.*, vol. 11, no. 4, p. e1001624, Apr. 2014.
- [54] H. Van Vlierberghe *et al.*, "BASL guidelines for the surveillance, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma," *Acta Gastro-Enterol. Belg.*, vol. 67, no. 1, pp. 14–25, Mar. 2004.
- [55] Haute Autorité de Santé, "Recommandations professionnelles : surveillance des malades atteints de cirrhose non compliquée et prévention primaire des complications." Sep-2007.
- [56] N. Ganne-Carrié, "Comment améliorer le dépistage de l'Hépatocarcinome ?," p. 10.
- [57] C. K. Kim, J. H. Lim, and W. J. Lee, "Detection of hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules in cirrhotic liver: accuracy of ultrasonography in transplant patients.," *J. Ultrasound Med.*, vol. 20, no. 2, pp. 99–104, Feb. 2001.
- [58] L. Bolondi, "Screening for hepatocellular carcinoma in cirrhosis," *J. Hepatol.*, vol. 39, no. 6, pp. 1076–1084, Dec. 2003.
- [59] L. Bolondi *et al.*, "Characterization of small nodules in cirrhosis by assessment of vascularity: The problem of hypovascular hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, vol. 42, no. 1, pp. 27–34, Jul. 2005.
- [60] E. Caturelli, G. Ghittoni, P. Roselli, and M. Anti, "Sensitivity rates in characterizing hepatocellular carcinomas," *AJR Am. J. Roentgenol.*, vol. 185, no. 4, pp. 1079-1080; author reply 1080-1081, Oct. 2005.
- [61] European Association for the Study of the Liver and European Organisation for Research and Treatment of Cancer, "EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma," *J. Hepatol.*, vol. 56, no. 4, pp. 908–943, Apr. 2012.

- [62] M. Sherman, "Alphafetoprotein: an obituary," *J. Hepatol.*, vol. 34, no. 4, pp. 603–605, Apr. 2001.
- [63] International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia, "Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: A report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia," *Hepatology*, vol. 49, no. 2, pp. 658–664, Feb. 2009.
- [64] A. Forner *et al.*, "Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, vol. 47, no. 1, pp. 97–104, Jan. 2008.
- [65] T. Roskams and M. Kojiro, "Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis," *Semin. Liver Dis.*, vol. 30, no. 1, pp. 17–25, Feb. 2010.
- [66] J. M. Llovet and J. Bruix, "Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008," *J. Hepatol.*, vol. 48, pp. S20–S37, 2008.
- [67] A. Colli *et al.*, "Accuracy of Ultrasonography, Spiral CT, Magnetic Resonance, and Alpha-Fetoprotein in Diagnosing Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. CME," *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 101, no. 3, pp. 513–523, Mar. 2006.
- [68] J.-F. Blanc, "Thésaurus National de Cancérologie Digestive, Chapitre 7, Carcinome hépatocellulaire," 19-Mar-2019. [Online]. Available: https://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/TNCD/tncd_chap-07-chc_19-03-2019-vf.pdf. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [69] J. Chalaye *et al.*, "Positron emission tomography/computed tomography with 18F-fluorocholine improve tumor staging and treatment allocation in patients with hepatocellular carcinoma," *J. Hepatol.*, vol. 69, no. 2, pp. 336–344, Aug. 2018.
- [70] K. Hasegawa *et al.*, "Comparison of the Therapeutic Outcomes Between Surgical Resection and Percutaneous Ablation for Small Hepatocellular Carcinoma," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 21, no. S3, pp. 348–355, Jun. 2014.
- [71] C.-C. Yeh *et al.*, "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs are associated with reduced risk of early hepatocellular carcinoma recurrence after curative liver resection: a nationwide cohort study," *Ann. Surg.*, vol. 261, no. 3, pp. 521–526, Mar. 2015.
- [72] J. M. Llovet, J. Fuster, J. Bruix, and Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Group, "Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: Resection versus transplantation," *Hepatology*, vol. 30, no. 6, pp. 1434–1440, Dec. 1999.
- [73] S. Jonas, "Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis," *Hepatology*, vol. 33, no. 5, pp. 1080–1086, May 2001.
- [74] M. B. Schoenberg *et al.*, "Resection or Transplant in Early Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis," *Dtsch. Aerzteblatt Online*, Aug. 2017.
- [75] D. Grant, R. A. Fisher, M. Abecassis, G. McCaughan, L. Wright, and S.-T. Fan, "Should the liver transplant criteria for hepatocellular carcinoma be different for deceased donation and living donation?" *Liver Transpl.*, vol. 17, no. S2, pp. S133–S138, Oct. 2011.
- [76] R. A. Fisher *et al.*, "Hepatocellular Carcinoma Recurrence and Death Following Living and Deceased Donor Liver Transplantation," *Am. J. Transplant.*, vol. 7, no. 6, pp. 1601–1608, Jun. 2007.
- [77] Y. K. Cho, J. K. Kim, M. Y. Kim, H. Rhim, and J. K. Han, "Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies," *Hepatology*, vol. 49, no. 2, pp. 453–459, Feb. 2009.
- [78] G. Germani, M. Pleguezuelo, K. Gurusamy, T. Meyer, G. Isgrò, and A. K. Burroughs, "Clinical outcomes of radiofrequency ablation, percutaneous alcohol and acetic acid injection for hepatocellular carcinoma: A meta-analysis," *J. Hepatol.*, vol. 52, no. 3, pp. 380–388, Mar. 2010.
- [79] C. Bouza, T. López-Cuadrado, R. Alcázar, Z. Saz-Parkinson, and J. M. Amate, "Meta-analysis of percutaneous radiofrequency ablation versus ethanol injection in hepatocellular carcinoma," *BMC Gastroenterol.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2009.
- [80] T. Jiang, Z.-C. Zeng, P. Yang, and Y. Hu, "Exploration of Superior Modality: Safety and Efficacy of Hypofractionated Image-Guided Intensity Modulated Radiation Therapy in Patients with

- Unresectable but Confined Intrahepatic Hepatocellular Carcinoma," *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 2017, pp. 1–8, 2017.
- [81] Y.-C. Kuo *et al.*, "Volumetric intensity-modulated Arc (RapidArc) therapy for primary hepatocellular carcinoma: comparison with intensity-modulated radiotherapy and 3-D conformal radiotherapy," *Radiat. Oncol.*, vol. 6, no. 1, p. 76, 2011.
- [82] J. C.-H. Cheng *et al.*, "Dosimetric analysis and comparison of three-dimensional conformal radiotherapy and intensity-modulated radiation therapy for patients with hepatocellular carcinoma and radiation-induced liver disease," *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 56, no. 1, pp. 229–234, May 2003.
- [83] L. Wang *et al.*, "A Novel Monoclonal Antibody to Fibroblast Growth Factor 2 Effectively Inhibits Growth of Hepatocellular Carcinoma Xenografts," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 11, no. 4, pp. 864–872, Apr. 2012.
- [84] M. Feng and E. Ben-Josef, "Radiation Therapy for Hepatocellular Carcinoma," *Semin. Radiat. Oncol.*, vol. 21, no. 4, pp. 271–277, Oct. 2011.
- [85] M. Feng, T. B. Brunner, and E. Ben-Josef, "Stereotactic Body Radiation Therapy for Liver Cancer: Effective Therapy With Minimal Impact on Quality of Life," *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 93, no. 1, pp. 26–28, Sep. 2015.
- [86] H. Kato *et al.*, "Results of the first prospective study of carbon ion radiotherapy for hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis," *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 59, no. 5, pp. 1468–1476, Aug. 2004.
- [87] S. Dehne *et al.*, "Combination of Photon and Carbon Ion Irradiation with Targeted Therapy Substances Temsirolimus and Gemcitabine in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines," *Front. Oncol.*, vol. 7, Mar. 2017.
- [88] S. E. Combs *et al.*, "Phase i study evaluating the treatment of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) with carbon ion radiotherapy: The PROMETHEUS-01 trial," *BMC Cancer*, vol. 11, no. 1, Dec. 2011.
- [89] M. Hata *et al.*, "Proton beam therapy for hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus," *Cancer*, vol. 104, no. 4, pp. 794–801, Aug. 2005.
- [90] R. Salem *et al.*, "Radioembolization for Hepatocellular Carcinoma Using Yttrium-90 Microspheres: A Comprehensive Report of Long-term Outcomes," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 1, pp. 52–64, Jan. 2010.
- [91] L. M. Kulik *et al.*, "Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis," *Hepatology*, vol. 47, no. 1, pp. 71–81, Nov. 2007.
- [92] P. Hilgard *et al.*, "Radioembolization with yttrium-90 glass microspheres in hepatocellular carcinoma: European experience on safety and long-term survival," *Hepatology*, vol. 52, no. 5, pp. 1741–1749, Nov. 2010.
- [93] J. G. Wall, J. K. Benedetti, M. A. O'Rourke, R. B. Natale, and J. S. Macdonald, "Phase II trial to topotecan in hepatocellular carcinoma: A Southwest Oncology Group study," p. 4.
- [94] J. Taïeb *et al.*, "Gemcitabine plus oxaliplatin for patients with advanced hepatocellular carcinoma using two different schedules: GEMOX in Hepatocellular Carcinoma," *Cancer*, vol. 98, no. 12, pp. 2664–2670, Dec. 2003.
- [95] C. S. Fuchs *et al.*, "A phase II trial of gemcitabine in patients with advanced hepatocellular carcinoma," *Cancer*, vol. 94, no. 12, pp. 3186–3191, Jun. 2002.
- [96] E. M. O'Reilly *et al.*, "A Phase II study of irinotecan in patients with advanced hepatocellular carcinoma," *Cancer*, vol. 91, no. 1, pp. 101–105, Jan. 2001.
- [97] T.-S. Yang, Y.-C. Lin, J.-S. Chen, H.-M. Wang, and C.-H. Wang, "Phase II study of gemcitabine in patients with advanced hepatocellular carcinoma," *Cancer*, vol. 89, no. 4, pp. 750–756, Aug. 2000.
- [98] A. Forner, J. M. Llovet, and J. Bruix, "Hepatocellular carcinoma," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 379, no. 9822, pp. 1245–1255, Mar. 2012.
- [99] G. Y. Lee *et al.*, "Phase II Study to Topotecan and Cisplatin in Advanced Hepatocellular Carcinoma," *Korean J. Intern. Med.*, vol. 18, no. 2, pp. 104–108, Jun. 2003.

- [100] P. Chastagner *et al.*, "In Vivo Potentiation of Radiation Response by Topotecan in Human Rhabdomyosarcoma Xenografted into Nude Mice," p. 8.
- [101] J. Tannenbaum and B. T. Bennett, "Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose," *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, vol. 54, no. 2, p. 13, 2015.
- [102] M. Gardès-Albert, "Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?," 2003. [Online]. Available: http://www.helioexplongee.fr/cariboost_files/Radicaux_20Libres.pdf. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [103] E. Lartigau, S. Dewas, and L. Gras, "L'effet Oxygène, une cible ancienne toujours d'actualité ?," *Cancer/Radiothérapie*, vol. 12, no. 1, pp. 42–49, Jan. 2008.
- [104] C. Borner, "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions," *Mol. Immunol.*, vol. 39, no. 11, pp. 615–647, Jan. 2003.
- [105] V. Gire, "La sénescence : Une barrière télomérique à l'immortalité ou une réponse cellulaire aux stress physiologiques ?," *médecine/sciences*, vol. 21, no. 5, pp. 491–497, May 2005.
- [106] *Prescribing, recording, and reporting photon beam therapy*. Oxford: Oxford Univ. Press, 2007.
- [107] J. Gueulette *et al.*, "Proton RBE for early intestinal tolerance in mice after fractionated irradiation," *Radiother. Oncol.*, vol. 61, no. 2, pp. 177–184, Nov. 2001.
- [108] J. Gueulette *et al.*, "RBE variation as a function of depth in the 200-MeV proton beam produced at the National Accelerator Centre in Faure (South Africa)," *Radiother. Oncol.*, vol. 42, no. 3, pp. 303–309, Mar. 1997.
- [109] J. Gueulette *et al.*, "Relative biologic effectiveness determination in mouse intestine for scanning proton beam at Paul Scherrer Institute, Switzerland. Influence of motion," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 62, no. 3, pp. 838–845, Jul. 2005.
- [110] L. E. Gerweck and S. V. Kozin, "Relative biological effectiveness of proton beams in clinical therapy," *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, vol. 50, no. 2, pp. 135–142, Feb. 1999.
- [111] H. Paganetti and M. Goitein, "Radiobiological significance of beamline dependent proton energy distributions in a spread-out Bragg peak," *Med. Phys.*, vol. 27, no. 5, pp. 1119–1126, May 2000.
- [112] H. Paganetti *et al.*, "Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 53, no. 2, pp. 407–421, Jun. 2002.
- [113] H. Paganetti, "Proton Relative Biological Effectiveness - Uncertainties and Opportunities," *Int. J. Part. Ther.*, vol. 5, no. 1, pp. 2–14, 2018.
- [114] I. L. Ibañez *et al.*, "Induction and rejoining of DNA double strand breaks assessed by H2AX phosphorylation in melanoma cells irradiated with proton and lithium beams," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 74, no. 4, pp. 1226–1235, Jul. 2009.
- [115] V. Calugaru, C. Nauraye, G. Noël, N. Giocanti, V. Favaudon, and F. Méglin-Chanet, "Radiobiological characterization of two therapeutic proton beams with different initial energy spectra used at the Institut Curie Proton Therapy Center in Orsay," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 81, no. 4, pp. 1136–1143, Nov. 2011.
- [116] M. R. H. Estécio *et al.*, "LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability," *PLoS One*, vol. 2, no. 5, p. e399, May 2007.
- [117] J. G. Herman, "Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 9, no. 5, pp. 359–367, Oct. 1999.
- [118] O. Galm, J. G. Herman, and S. B. Baylin, "The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies," *Blood Rev.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2006.
- [119] H. E. Carraway *et al.*, "Promoter hypermethylation in sentinel lymph nodes as a marker for breast cancer recurrence," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 114, no. 2, pp. 315–325, Mar. 2009.
- [120] A. M. Ristic-Fira *et al.*, "Response of a Human Melanoma Cell Line to Low and High Ionizing Radiation," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1095, no. 1, pp. 165–174, Jan. 2007.
- [121] C. Di Pietro *et al.*, "Cellular and molecular effects of protons: Apoptosis induction and potential implications for cancer therapy," *Apoptosis*, vol. 11, no. 1, pp. 57–66, Jan. 2006.

- [122] H. Narang *et al.*, “Differential activation of mitogen-activated protein kinases following high and low LET radiation in murine macrophage cell line,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 324, no. 1–2, pp. 85–91, Apr. 2009.
- [123] Lee, “Proton induces apoptosis of hypoxic tumor cells by the p53-dependent and p38/JNK MAPK signaling pathways,” *Int. J. Oncol.*, Jan. 1992.
- [124] K. B. Lee, J.-S. Lee, J.-W. Park, T.-L. Huh, and Y. M. Lee, “Low energy proton beam induces tumor cell apoptosis through reactive oxygen species and activation of caspases,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 40, no. 1, pp. 118–129, 2008.
- [125] G. H. Jang, J.-H. Ha, T.-L. Huh, and Y. M. Lee, “Effect of proton beam on blood vessel formation in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos,” *Arch. Pharm. Res.*, vol. 31, no. 6, pp. 779–785, Jun. 2008.
- [126] P. Grabham, P. Sharma, A. Bigelow, and C. Geard, “Two distinct types of the inhibition of vasculogenesis by different species of charged particles,” *Vasc. Cell*, vol. 5, no. 1, p. 16, Sep. 2013.
- [127] S. Girdhani, R. Sachs, and L. Hlatky, “Biological effects of proton radiation: what we know and don’t know,” *Radiat. Res.*, vol. 179, no. 3, pp. 257–272, Mar. 2013.
- [128] E. H. Kajioka, M. L. Andres, X. W. Mao, M. F. Moyers, G. A. Nelson, and D. S. Gridley, “Hematological and TGF-beta variations after whole-body proton irradiation,” *Vivo Athens Greece*, vol. 14, no. 6, pp. 703–708, Dec. 2000.
- [129] F. Pagès, J. Galon, M.-C. Dieu-Nosjean, E. Tartour, C. Sautès-Fridman, and W.-H. Fridman, “Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored,” *Oncogene*, vol. 29, no. 8, pp. 1093–1102, Feb. 2010.
- [130] K. N. Rithidech, P. Reungpatthanaphong, L. Honikel, A. Rusek, and S. R. Simon, “Dose-rate effects of protons on in vivo activation of nuclear factor-kappa B and cytokines in mouse bone marrow cells,” *Radiat. Environ. Biophys.*, vol. 49, no. 3, pp. 405–419, Aug. 2010.
- [131] A. Altmeyer *et al.*, “Cell Death After High-LET Irradiation in Orthotopic Human Hepatocellular Carcinoma In Vivo,” *In Vivo*, vol. 25, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2011.
- [132] S. C. Heffelfinger, H. H. Hawkins, J. Barrish, L. Taylor, and G. J. Darlington, “SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin,” *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.*, vol. 28A, no. 2, pp. 136–142, Feb. 1992.
- [133] J. R. Eun *et al.*, “Hepatoma SK Hep-1 cells exhibit characteristics of oncogenic mesenchymal stem cells with highly metastatic capacity,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e110744, 2014.
- [134] J. E. Glasgow and R. W. Colman, “Fibronectin Synthesized by a Human Hepatoma Cell Line,” *Cancer Res.*, vol. 44, no. 7, pp. 3022–3028, Jul. 1984.
- [135] S. P. Flanagan, “‘Nude’, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse,” *Genet. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 295–309, Dec. 1966.
- [136] B. Ng *et al.*, “Radiosensitization of Tumor-targeted Radioimmunotherapy with Prolonged Topotecan Infusion in Human Breast Cancer Xenografts,” p. 7.
- [137] S. Guichard, A. Montazeri, E. Chatelut, I. Hennebelle, R. Bugat, and P. Canal, “Schedule-dependent Activity of Topotecan in OVCAR-3 Ovarian Carcinoma Xenograft: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation,” p. 8.
- [138] P. Marchand *et al.*, “Automated and efficient radiosynthesis of [18F]FLT using a low amount of precursor,” *Nucl. Med. Biol.*, vol. 43, no. 8, pp. 520–527, Aug. 2016.
- [139] J. Trojan and G. Herrmann, “Fluorine-18 FDG Positron Emission Tomography for Imaging of Hepatocellular Carcinoma,” vol. 94, no. 11, p. 6, 1999.
- [140] C.-I. Ho, S. Chen, D. W. C. Yeung, and T. K. C. Cheng, “Dual-Tracer PET/CT Imaging in Evaluation of Metastatic Hepatocellular Carcinoma,” *J. Nucl. Med.*, vol. 48, no. 6, pp. 902–909, Jun. 2007.
- [141] M. A. Khan *et al.*, “Positron emission tomography scanning in the evaluation of hepatocellular carcinoma,” *J. Hepatol.*, vol. 32, no. 5, pp. 792–797, May 2000.
- [142] M. Lee, J. Y. Jeon, M. L. Neugent, J.-W. Kim, and M. Yun, “18F-Fluorodeoxyglucose uptake on positron emission tomography/computed tomography is associated with metastasis and

- epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 34, no. 3–4, pp. 251–260, Apr. 2017.
- [143] A. R. HAUG, "Imaging of primary liver tumors with positron-emission tomography," *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, no. 3, Jul. 2017.
- [144] M. A. Huber, N. Kraut, and H. Beug, "Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 17, no. 5, pp. 548–558, Oct. 2005.
- [145] C. Love, M. B. Tomas, G. G. Tronco, and C. J. Palestro, "FDG PET of Infection and Inflammation," *RadioGraphics*, vol. 25, no. 5, pp. 1357–1368, Sep. 2005.
- [146] M. Revest, S. Patrat-Delon, A. Devillers, P. Tattevin, and C. Michelet, "Contribution of 18fluoro-deoxyglucose PET/CT for the diagnosis of infectious diseases," *Médecine Mal. Infect.*, vol. 44, no. 6, pp. 251–260, Jun. 2014.
- [147] Y.-H. Chung *et al.*, "Diffusion-weighted MRI and 18F-FDG PET correlation with immunity in early radiotherapy response in BNL hepatocellular carcinoma mouse model: timeline validation," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 46, no. 8, pp. 1733–1744, Jul. 2019.
- [148] R. J. Hicks *et al.*, "Early FDG-PET imaging after radical radiotherapy for non–small-cell lung cancer: Inflammatory changes in normal tissues correlate with tumor response and do not confound therapeutic response evaluation," *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 60, no. 2, pp. 412–418, Oct. 2004.
- [149] J.-S. Ryu, N. C. Choi, A. J. Fischman, T. J. Lynch, and D. J. Mathisen, "FDG–PET in staging and restaging non-small cell lung cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy: correlation with histopathology," *Lung Cancer*, vol. 35, no. 2, pp. 179–187, Feb. 2002.
- [150] Z.-L. Xiang, J. Erasmus, R. Komaki, J. D. Cox, and J. Y. Chang, "FDG uptake correlates with recurrence and survival after treatment of unresectable stage III non-small cell lung cancer with high-dose proton therapy and chemotherapy," *Radiat. Oncol. Lond. Engl.*, vol. 7, p. 144, Aug. 2012.
- [151] S. Girdhani, R. Sachs, and L. Hlatky, "Biological Effects of Proton Radiation: What We Know and Don't Know," *Radiat. Res.*, vol. 179, no. 3, pp. 257–272, Mar. 2013.
- [152] H. Wang *et al.*, "Monitoring early responses to irradiation with dual-tracer micro-PET in dual-tumor bearing mice," *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 16, no. 43, pp. 5416–5423, Nov. 2010.
- [153] N. Vélez de Mendizábal *et al.*, "A Semi-physiological-Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model to Describe the Effects of Topotecan on B-Lymphocyte Lineage Cells," *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 3, pp. 431–441, Mar. 2010.
- [154] F. Eckel *et al.*, "Imaging of Proliferation in Hepatocellular Carcinoma with the In Vivo Marker 18F-Fluorothymidine," *J. Nucl. Med.*, vol. 50, no. 9, pp. 1441–1447, Jan. 2009.
- [155] S. R. Mudd *et al.*, "Pharmacodynamic Evaluation of Irinotecan Therapy by FDG and FLT PET/CT Imaging in a Colorectal Cancer Xenograft Model," *Mol. Imaging Biol.*, vol. 14, no. 5, pp. 617–624, Oct. 2012.
- [156] M. M. Jensen and A. Kjaer, "Monitoring of anti-cancer treatment with 18F-FDG and 18F-FLT PET: a comprehensive review of pre-clinical studies," p. 26.
- [157] B. Sanghera *et al.*, "FLT PET-CT in evaluation of treatment response," *Indian J. Nucl. Med. IJNM Off. J. Soc. Nucl. Med. India*, vol. 29, no. 2, pp. 65–73, 2014.
- [158] H. Keen *et al.*, "An Evaluation of 2-deoxy-2-[18F]Fluoro-D-Glucose and 3'-deoxy-3'-[18F]-Fluorothymidine Uptake in Human Tumor Xenograft Models," *Mol. Imaging Biol.*, vol. 14, no. 3, pp. 355–365, Jun. 2012.
- [159] H.-J. Meyer, A. Wienke, and A. Surov, "Correlations Between Imaging Biomarkers and Proliferation Index Ki-67 in Lymphomas: A Systematic Review and Meta-Analysis," *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, vol. 19, no. 6, pp. e266–e272, Jun. 2019.
- [160] G. Shen, H. Ma, F. Pang, P. Ren, and A. Kuang, "Correlations of 18F-FDG and 18F-FLT uptake on PET with Ki-67 expression in patients with lung cancer: a meta-analysis," *Acta Radiol. Stockh. Swed. 1987*, vol. 59, no. 2, pp. 188–195, Feb. 2018.
- [161] C. Di Pietro *et al.*, "Cellular and molecular effects of protons: Apoptosis induction and potential implications for cancer therapy," *Apoptosis*, vol. 11, no. 1, pp. 57–66, Jan. 2006.

- [162] H. Narang *et al.*, "Differential activation of mitogen-activated protein kinases following high and low LET radiation in murine macrophage cell line," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 324, no. 1–2, pp. 85–91, Apr. 2009.
- [163] Lee, "Proton induces apoptosis of hypoxic tumor cells by the p53-dependent and p38/JNK MAPK signaling pathways," *Int. J. Oncol.*, Jan. 1992.
- [164] K. B. Lee, J.-S. Lee, J.-W. Park, T.-L. Huh, and Y. M. Lee, "Low energy proton beam induces tumor cell apoptosis through reactive oxygen species and activation of caspases," *Exp. Mol. Med.*, vol. 40, no. 1, p. 118, 2008.
- [165] M.-A. Castilla-Lièvre *et al.*, "Diagnostic value of combining ¹¹C-choline and ¹⁸F-FDG PET/CT in hepatocellular carcinoma," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 43, no. 5, pp. 852–859, May 2016.
- [166] G. Stark, "The effect of ionizing radiation on lipid membranes," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1071, no. 2, pp. 103–122, Jul. 1991.
- [167] I. Corre, M. Guillonneau, and F. Paris, "Membrane Signaling Induced by High Doses of Ionizing Radiation in the Endothelial Compartment. Relevance in Radiation Toxicity," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 11, pp. 22678–22696, Nov. 2013.
- [168] M. Tubiana, "Dose–effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: The joint report of the Académie des Sciences (Paris) and of the Académie Nationale de Médecine," *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 63, no. 2, pp. 317–319, Oct. 2005.
- [169] M. Tubiana, A. Aurengo, D. Averbeck, and R. Masse, "Recent reports on the effect of low doses of ionizing radiation and its dose–effect relationship," *Radiat. Environ. Biophys.*, vol. 44, no. 4, pp. 245–251, Mar. 2006.
- [170] I. R. Radford, "Effect of radiomodifying agents on the ratios of X-ray-induced lesions in cellular DNA: use in lethal lesion determination," *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, vol. 49, no. 4, pp. 621–637, Apr. 1986.
- [171] D. T. Goodhead, "Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 65, no. 1, pp. 7–17, Jan. 1994.
- [172] D. T. Goodhead, "Energy deposition stochastics and track structure: what about the target?," *Radiat. Prot. Dosimetry*, vol. 122, no. 1–4, pp. 3–15, 2006.
- [173] R. M. Anderson, D. L. Stevens, and D. T. Goodhead, "M-FISH analysis shows that complex chromosome aberrations induced by α -particle tracks are cumulative products of localized rearrangements," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 19, pp. 12167–12172, Sep. 2002.
- [174] F. M. Lyng, C. B. Seymour, and C. Mothersill, "Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis," *Br. J. Cancer*, vol. 83, no. 9, pp. 1223–1230, Nov. 2000.

Résumé

Mon travail de thèse a pour objectif de caractériser à l'aide de l'imagerie par Tomographie par Emission de Positons (TEP) au ^{18}F -FDG et au ^{18}F -FLT, chez le petit animal, l'évolution de l'hépatocarcinome en cours de traitement par chimiothérapie, protonthérapie et potentialisation.

Le modèle animal correspondait à une xénogreffe sous-cutanée d'une souche d'hépatocarcinome, sk-hep1, chez la souris *nude*. La chimiothérapie par Topotécan était administrée aux doses de 12,5mg/kg ou 6,25mg/kg. Le protocole de protonthérapie comprenait une irradiation en une fraction de 5 Gy, 10 Gy ou 20 Gy. Les acquisitions TEP au ^{18}F -FDG et au ^{18}F -FLT étaient réalisées une fois par semaine.

Les deux types d'imagerie TEP ont montré un intérêt pour le suivi du traitement par chimiothérapie, permettant de déterminer une sous-dose de Topotécan. Pour le suivi de la protonthérapie, le ^{18}F -FLT était plus avantageux puisqu'il permettait d'individualiser une reprise tumorale pour les doses d'irradiation les plus faibles. Dans l'étude de la potentialisation, l'imagerie TEP n'a pas permis de mesurer un avantage thérapeutique du traitement par proto-chimiothérapie concomitante.

Mots clé : TEP, ^{18}F -FDG, ^{18}F -FLT, hépatocarcinome, protonthérapie

Résumé en anglais

My thesis work consisted of closely monitor tumoral response of hepatocarcinoma inoculated to mice, using ^{18}F -FDG and ^{18}F -FLT PET imaging during chemotherapy, protontherapy and both.

Tumoral model was Sk-hep1 cells xenograft inoculate in subcutaneous tissue to female 8-week-old athymic *nude* mice. Chemotherapy protocol included Topotecan deliver at 12,5mg/kg or 6,25mg/kg. Protontherapy was delivered in one fraction of 5 Gy, 10 Gy or 20 Gy. ^{18}F -FDG and ^{18}F -FLT PET imaging were performed once a week.

Both ^{18}F -FDG and ^{18}F -FLT imaging permitted to follow chemotherapy efficacy, and to observe an insufficient dose of Topotecan at 6,25mg/kg. ^{18}F -FLT was better to observe tumoral escape with lower doses of protontherapy. Concerning proto-chemotherapy protocol, TEP imaging could not individualize significant difference in favor of potentiation.

Key words : PET, ^{18}F -FDG, ^{18}F -FLT, hepatocarcinoma, protontherapy