

Monitoring de l'ablation thermique par ultrasons par les changements d'élasticité: de la thermométrie à la dosimétrie.

— Auteurs : ARNAL Bastien, PERNOT Mathieu, TANTER Mickael

— Institut Langevin, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin 75005 PARIS.

L'utilisation des ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) pour le traitement non invasif nécessite un suivi en temps réel de la formation des lésions pour éviter d'endommager des tissus sains environnants. Dans cette étude, nous montrons la faisabilité d'une approche entièrement basée sur les ultrasons permettant d'imager la température et la formation des lésions en temps réel par l'évaluation quantitative des changements d'élasticité des tissus.

La rigidité des échantillons (module de cisaillement) a été mesurée en utilisant la technique SuperSonic Shear Imaging (SSI) mise en œuvre sur un échographe ultrarapide (Aixplorer, SuperSonic Imagine). La séquence SSI consiste en la génération successive d'ondes de cisaillement à différentes positions latérales en utilisant la force de radiation. La propagation des ondes de cisaillement est imagée à 17000 fps, à partir de laquelle la carte élasticité est calculée.

Tout d'abord, la rigidité des tissus mous *in vitro* change de manière significative au cours d'ablation thermique. Pour les différents organes, cette dépendance en température a été mesurée dans un bain thermostaté. L'élasticité du muscle varie en quatre étapes successives qui sont en accord avec la dénaturation thermique des protéines rapportée dans la littérature. Pour les basses températures (jusqu'à 43°C), la diminution linéaire de l'élasticité permet de récupérer la température. Pour des températures supérieures, le milieu se rigidifie et permet d'imager la formation de la lésion.

Pour le démontrer, le traitement HIFU et le suivi ont été effectués en utilisant un système confocal constitué d'une barrette d'échographie à 8MHz (Vermon) et un transducteur mono-élément 2.5MHz focalisé à 30mm (Imasonic) sur des échantillons *ex vivo*. La thermométrie US, basée sur le speckle tracking a été combinée avec SSI. Les cartes d'élasticité et de température ont été obtenues toutes les 3 secondes pendant le traitement. En dessous de 40°C, les mesures de thermométrie US sont fortement corrélées aux changements d'élasticité. Au delà de 50°C, la formation des lésions induit une forte augmentation (~400%) de l'élasticité. Ainsi, la thermométrie par onde de cisaillement (SWT) et l'imagerie de lésion par onde de cisaillement ont été démontrées simultanément. Par ailleurs, la robustesse aux mouvements de SWT a été montrée. Enfin, la taille des lésions thermiques déterminée sur les cartes de rigidité est fortement corrélée avec le contraste optique des coupes de tissus (+/- 0,15 mm).

Cette technique a été appliquée *in vivo* sur foie de rat. Les mouvements de respiration rendent la quantification difficile. Cependant, la formation de lésions a été observée. L'élasticité dans la lésion thermique a quadruplé après 20 secondes d'exposition. La dimension de la lésion correspond de même à la pathologie macroscopique observée après le sacrifice des animaux. Enfin, un résultat important a été que les changements de rigidité sont liés à la dose thermique *in vivo* sur la patte du rat. Des pattes de rat ont été immergées dans un bain thermostaté. Pour différentes températures appliquées à chaque animal, la rigidité a fortement augmenté après une durée fixée. Ces résultats sont en excellent accord avec le

seuil de la dose thermique démontré par Sapareto *et al.* en 1984 par l'analyse de la fraction de cellules mortes sous exposition thermique. SSI peut donc détecter de manière non invasive le seuil de dose thermique et pourrait être utilisé pour établir la viabilité du tissu traité lors de l'ablation.

SWT est une nouvelle approche fiable pour le monitoring de l'ablation thermique. Contrairement à d'autres méthodes, SSI permet un suivi complet du traitement en fournissant la température et la lésion d'une manière robuste aux mouvements. L'évaluation quantitative de l'élasticité permet de sonder les dommages cellulaires pour mesurer expérimentalement une dose thermique.

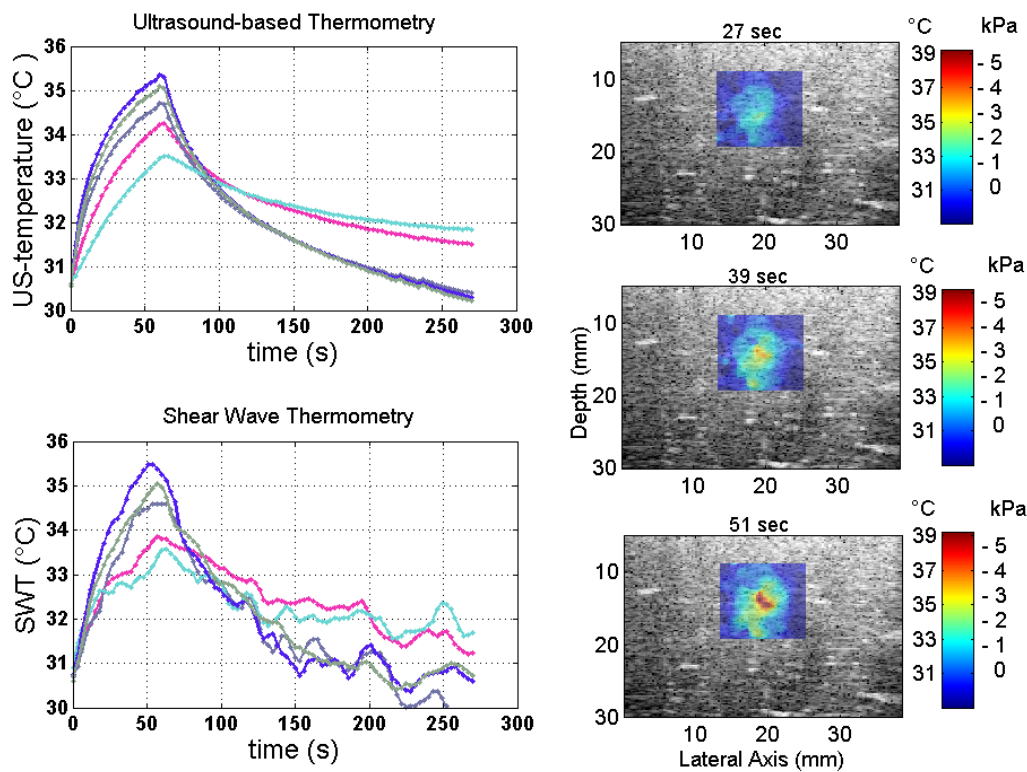


Figure 1 Shear wave thermometry in ex-vivo turkey breast

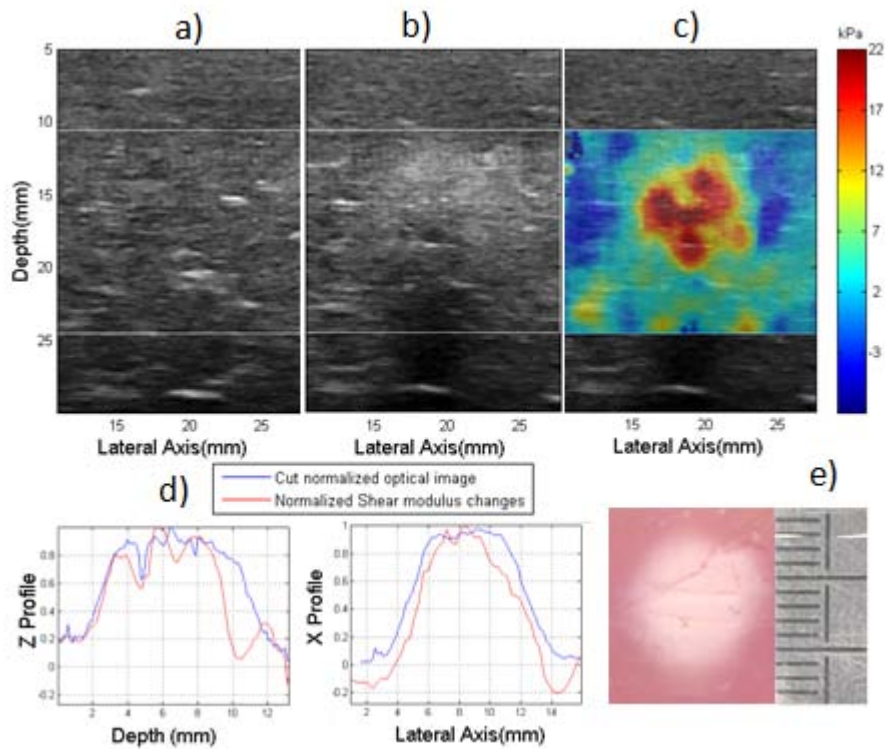


Figure 2 Shear wave imaging and B-mode image: comparison with gross pathology optical image. (a) B-mode image before treatment. (b) Bmode image after thermal relaxation. (c) Shear modulus changes at thermal equilibrium. (d) Depth and lateral profiles of optical contrast and shear wave imaging (in blue: normalized gross pathology scanned profile, in red: normalized shear modulus changes profiles). (e) Scanned image of the gross pathology.

Monitoring de l'ablation thermique par ultrasons par les changements d'élasticité: de la thermométrie à la dosimétrie.

— Auteurs : ARNAL Bastien, PERNOT Mathieu, TANTER Mickael

— Institut Langevin, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin 75005 PARIS.

The use of High Intensity Focused Ultrasound (HIFU) for non invasive therapy requires improving real-time monitoring of the lesion formation during treatment to avoid damage of surrounding healthy tissues. In this study, we show the feasibility of a full ultrasound approach that provides temperature mapping and lesion formation monitoring from the real-time and quantitative assessment of the tissue elasticity changes.

Sample stiffness (shear modulus) was measured using Supersonic Shear Imaging (SSI) implemented on an ultrafast ultrasound scanner (Aixplorer, SuperSonic Imagine). The SSI sequence consists in successive shear waves induced at different lateral positions using radiation force. The shear wave propagation is imaged at 17000 fps, from which the elasticity map is recovered.

First, soft tissue stiffness was shown to significantly change *in vitro* during thermal ablation. For different organs, the temperature dependence of shear modulus was measured in a thermo-controlled bath. Muscle stiffness varies in four successive steps that are consistent with the thermally induced proteins denaturation reported in the literature. For low temperatures (up to 43°C), the linear decrease of the shear modulus enables temperature retrieval. For higher temperatures, the stiffening of the medium allows to image the lesion formation process.

To demonstrate that, HIFU treatment and monitoring were performed using a confocal set made up of a 8MHz ultrasound diagnostic probe (Vermon) and a 2.5MHz single element transducer focused at 30mm (Imasonic) on ex vivo samples. US-thermometry based on speckle tracking was combined with SSI.

Elasticity and temperature maps were obtained every 3 seconds during treatments. Below 40°C, tissue stiffness was found to reversibly decrease with temperature at the focal zone (-1.4 kPa/°C). US-echo shift based temperature was highly-correlated to stiffness variations. Above 50°C, lesion formation induced a very strong increase (up to fourfold) of the shear modulus in the focal zone. Thus, the same method provides a complete follow-up of the tissue during treatment in two particular regimes: shear wave thermometry (SWT) and shear wave lesion imaging when the thermal threshold was reached. Besides, SWT was shown to be robust to motion. Finally, the size of the thermal lesions determined on the stiffness maps correlated strongly with optical contrast of tissue cuts (+/- 0.15mm).

This technique was applied *in vivo* on rat liver. The fast breathing motions of the liver made the quantification challenging. However, the lesion formation was observed in real-time. A strong shear modulus increase (~ 4 fold) was found in the thermal lesion after 20 seconds of sonication. The lesion dimension that was assessed on the shear modulus map matched with gross pathology performed after the animal sacrifice.

Finally, another important result was that stiffness changes are linked to thermal dose *in-vivo* in the rat leg. Rat legs were immersed in a thermo-controlled bath. Different exposure temperatures were applied for each animal and the shear modulus was found to strongly increase after a given duration. The time temperature dependence established as a function of the shear modulus increase and was shown to be always exponential. These results are in excellent agreement with the the thermal dose threshold demonstrated by Sapareto *et al.* in

1984 by analyzing the fraction of dead cells under thermal exposure. SSI can therefore detect non-invasively the thermal dose threshold and could be used to establish the viability of the treated tissue in thermal therapy.

SWT is a novel reliable approach for ultrasound based monitoring of thermal ablation. Contrary to other methods, SSI can achieve a complete follow up of the treatment by providing temperature and lesion with motion-robustness. The quantitative assessment of shear modulus allows probing thermal cellular damage to measure an experimental thermal dose.

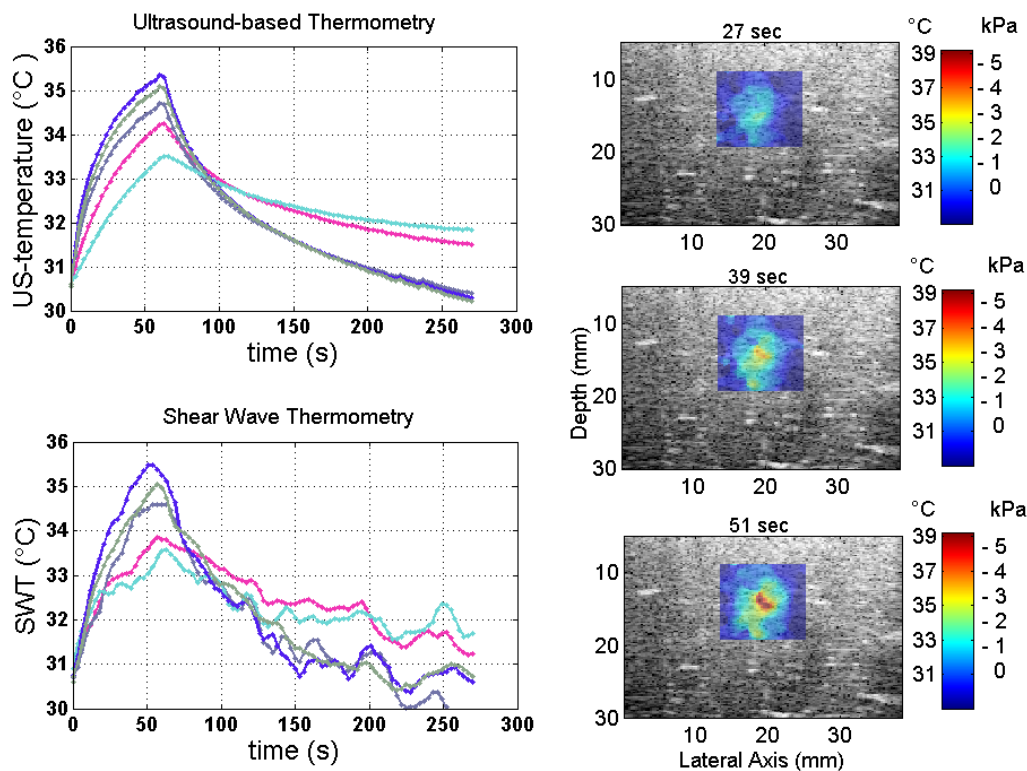


Figure 3 Shear wave thermometry in ex-vivo turkey breast

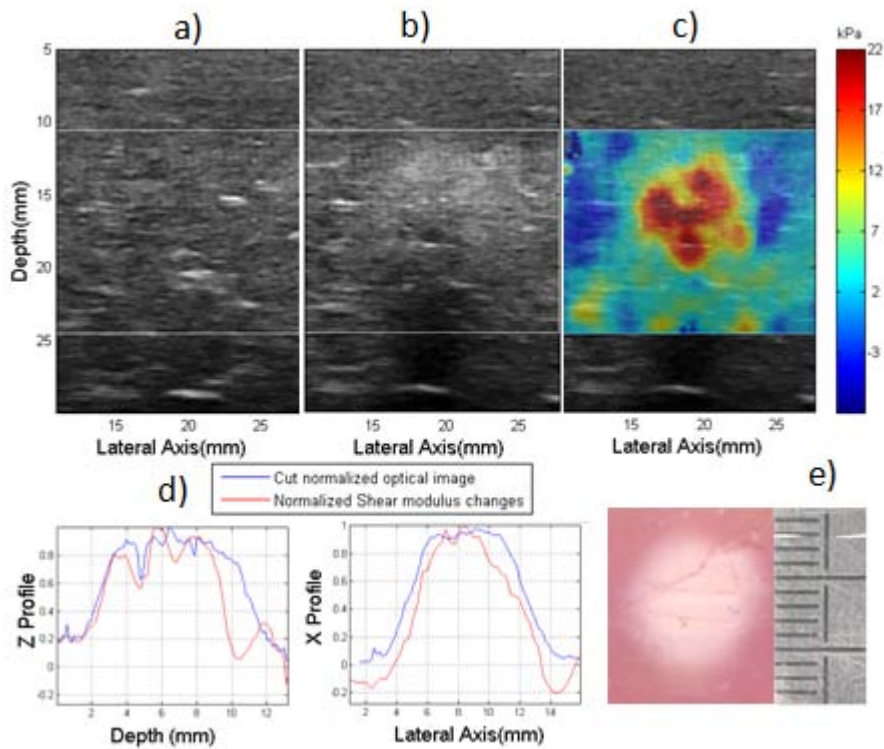


Figure 4 Shear wave imaging and B-mode image: comparison with gross pathology optical image. (a) B-mode image before treatment. (b) Bmode image after thermal relaxation. (c) Shear modulus changes at thermal equilibrium. (d) Depth and lateral profiles of optical contrast and shear wave imaging (in blue: normalized gross pathology scanned profile, in red: normalized shear modulus changes profiles). (e) Scanned image of the gross pathology.

Thérapie focale du cancer de la prostate par laser thermique interstiel: Simulation et planification

BETROUNI Nacim, COLIN Pierre, MARQA Mohamed-Feras, NEVOUX Pierre, VILLERS Arnaud, MORDON Serge

INSERM U703

152, rue du Docteur Yersin

59120 Loos

L'utilisation de techniques ablatives mini-invasives dans la prise en charge des patients porteurs d'un cancer localisé de la prostate pourrait être une option thérapeutique entre la surveillance active et les thérapies radicales. La thermothérapie par laser interstitiel (LITT) pourrait être une des modalités de ce traitement focal. La LITT est une technique basée sur l'émission d'un laser de faible puissance délivrant son énergie lumineuse à l'aide de système optique adapté (diffuseur). La LITT provoque une zone de nécrose de coagulation dont le volume peut être contrôlé en limitant les dommages des structures adjacentes à la tumeur (nerfs, vaisseaux).

Ce résumé décrit les travaux menés dans l'unité INSERM 703 pour la mise au point et l'optimisation de cette technique en s'intéressant notamment aux aspects de planification.

Des approches différentes et complémentaires ont été mises au point. La première concerne les expérimentations *ex vivo* et *in vivo*. En effet, les premières ont permis de définir des paramètres optimaux de puissance et de temps de tir pour avoir une nécrose de taille reproductible. Quand aux secondes, elles ont été conduites sur des rats Copenhague sur lesquels des cellules adénocarcinome prostatique Dunning 3327-AT2 ont été greffées. Ces expérimentations ont permis de prouver qu'un tir de 75 secondes avec une puissance de 5 watts avec une fibre portant une partie diffusante de 1 centimètre permettait d'obtenir un volume reproductible de nécrose de 1 cm³. Par ailleurs, cette étude a également permis de montrer que les volumes mesurés sur l'IRM acquise 48 heures après le traitement étaient équivalents à ceux mesurés en histologie.

Parallèlement, une autre approche de planification a été suivie. Elle concerne la simulation numérique. Ainsi, les modèles théoriques de diffusion de lumière et de chaleur de Arrhenius ont été implémentés et personnalisés en utilisant les propriétés optiques des cellules Dunning 3327-AT2. Le volume estimé de nécrose correspondait à ceux mesurés en IRM durant les expérimentations *in vivo*.

La dernière technique développée est dédiée à la simulation physique par utilisation de fantôme. En effet, l'expérimentation animale offre plusieurs avantages mais ne permet pas de simuler l'insertion et le guidage des fibres dans la prostate pour atteindre la cible repérée en imagerie. Un fantôme a été conçu et fabriqué pour répondre à cet objectif. Il possède les caractéristiques d'une prostate contenant les zones d'intérêt lors d'un traitement par thérapie focale : contours de la glande contenant la lésion à traiter, l'urètre, le rectum, le sphincter strié et les bandelettes vasculo-nerveuses.

Dans un premier temps, seuls les contours de la prostate ont été matérialisés. La représentation de l'anatomie zonale (zone périphérique, zone de transition, zone centrale et stroma fibro-musculaire antérieur) est possible selon la même méthodologie.

Les vésicules séminales n'ont pas été modélisées. Celles-ci ne représentent pas une cible potentielle lors d'un traitement focal.

Les matériaux choisis pour mouler la prostate répondent au cahier des charges suivant : propriétés optiques similaires à ceux des tissus de la prostate et compatibilité imagerie: IRM pour simuler et planifier un traitement et échographique pour guider l'insertion des fibres.

En conclusion, les trois approches suivies dans cette étude permettent d'améliorer les connaissances des effets de ce type de thérapies pour la mener à une utilisation clinique efficace pour le traitement focal de certaines formes de cancer de la prostate.

INTERSTITIAL FOCAL LASER ABLATION OF PROSTATE CANCER: IMAGE GUIDED TREATMENT SIMULATION AND PLANNING

BETROUNI Nacim, COLIN Pierre, MARQA Mohamed-Feras, NEVOUX Pierre, VILLERS Arnaud, MORDON Serge

INSERM U703

152, rue du Docteur Yersin

59120 Loos

Focal laser ablation (FLA) is a technique for cancer treatment based on the use of interstitial optical laser fibres to target the tumour. This method has proven its efficiency and starts to be part of the therapeutic arsenal in oncology. Laser sources are growing rapidly and offer a comfortable panel making laser treatment credible. However, the conformation of the treated area to the tumour remains a difficult problem especially when, for large targets several fibers are needed.

This abstract summarizes the development made in the INSERM U703 laboratory to optimise this technique to drive focal treatment for some early stage prostate cancers.

Different and complementary approaches have been developed. The first approach focuses on *ex vivo* and *in vivo* experiments. While the first, conducted on pig liver tissue helped to obtain treatment parameters (power and time) to have a reproducible result, the second, conducted on Copenhagen rats grafted with Dunning prostate adenocarcinoma cells 3327-AT2, proved that a laser shot of 75 seconds at a power of 5 watts using a light diffuser of 1 cm allows obtaining a reproducible necrosis volume of 1 cm³. Moreover, this study also showed that the volumes measured on MRI acquired 48 hours after the treatment were equivalent to those measured on histology.

The second approach concerned numerical simulation. Theoretical models of light diffusion and heat transfer based on the Arrhenius law were implemented and customized using the optical properties of the Dunning AT2-3327 cells. The estimated necrosis volume corresponded to those measured on MRI during the *in vivo* experiments.

The last technique is dedicated to physical simulation using phantoms. Actually, *in vivo* preclinical trials conducted on preclinical models have several advantages but does not allow simulating fibers insertion and guiding in the prostate to reach the target defined on imaging. Thus, a phantom was designed and manufactured to meet this goal. It exhibits the characteristics of a prostate comprising the structures of interest for a focal cancer ablation: gland contours with the lesion to be treated, urethra, rectum, striated sphincter and neurovascular strips.

Initially, only the contours of the prostate have been simulated. Representation of the zonal anatomy (peripheral zone, transition zone, central zone and anterior fibro muscular stroma) is possible using the same methodology.

The seminal vesicles were not modelled. They do not represent a potential target during a focal treatment.

Materials chosen to mould the prostate meet the following specifications: similar optical properties to those of prostate tissue and multimodality imaging compatibility: MRI to simulate and plan treatment and ultrasound to guide the fibers insertion.

In conclusion, the three approaches developed in these experiments allowed to improve the understanding of the effects of this therapy to lead it to an effective clinical use for the treatment of some forms of prostate cancer.

LES COMPLEXES HÉTÉROBI/POLYMÉTALLIQUES AU SERVICE DU DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX THÉRANOSTIQUES

Ewen BODIO, Louis ADRIAENSSENS, Qiang LIU, Semra TASAN, Margot WENZEL, Franck DENAT, Pierre LE GENDRE

Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) - UMR 5260 - Université de Bourgogne - UFR Sciences et Techniques - 9 avenue Alain Savary - BP 47870 - 21078 DIJON Cedex - FRANCE

E-Mail : ewen.bodio@u-bourgogne.fr

Depuis la découverte du cisplatine, nombreux sont les agents thérapeutiques conçus autour des complexes métalliques.^{1,2,3} Les possibilités offertes par de tels systèmes sont innombrables que ce soit par la variation du centre métallique (nature, degré d'oxydation, géométrie de complexation, isotope...) ou celle de ces ligands (caractère organique / inorganique, denticité, préorganisation...).

Devant un tel choix, il est hasardeux de concevoir une molécule dont on peut prédire l'efficacité. En effet, même si différents composés donnent d'excellents résultats, il est, à l'heure actuelle, très difficile de comprendre leur mécanisme d'action : quelles sont leurs cibles, quelles parties du complexe sont actives (agit-il dans son ensemble ou l'activité provient-elle de certains de ses produits de dégradation ?). De même, nous pouvons nous interroger sur l'efficacité de leur vectorisation et de leur accumulation au sein des cellules. Ce sont à ces dernières questions que nous souhaitons répondre dans un premier temps.

Pour cela, nous travaillons sur la conception de complexes hétérobi/polymétalliques composés d'un motif à action thérapeutique et d'un autre à visée d'imagerie (permettant la localisation du composé dans l'organisme).

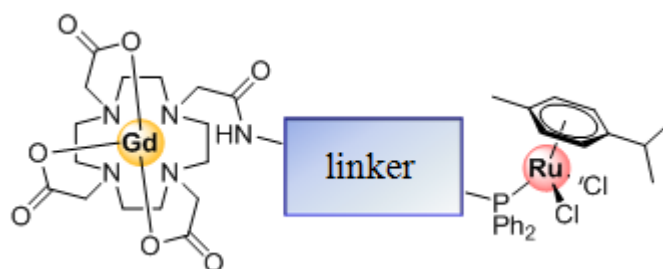


Figure 1 : exemple de complexe bimétallique.

Le premier exemple à l'étude combine un complexe de gadolinium (de type cyclame) qui devrait jouer le rôle d'agent de contraste pour l'IRM et un arène-ruthénium pour ses propriétés anti-cancéreuses potentielles (cf. Figure 1).

¹ Ali, H.; van Lier, J. E. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2379-2450.

² Sharma, V.; Piwnica-Worms, D. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2545-2560.

³ Volkert, W. A.; Hoffman, T. J. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2269-2292.

HETEROBI/POLYMETALLIC COMPLEXES APPLIED TO THERANOSTICS SYNTHESIS

Ewen BODIO, Louis ADRIAENSSENS, Qiang LIU, Semra TASAN, Margot WENZEL,
Franck DENAT, Pierre LE GENDRE

*Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) - UMR 5260 -
Université de Bourgogne - UFR Sciences et Techniques - 9 avenue Alain Savary - BP 47870
- 21078 DIJON Cedex - FRANCE*

E-Mail : ewen.bodio@u-bourgogne.fr

Since cisplatin discovery, numerous therapeutical agents have been designed around metallic complexes.^{4,5,6} Opportunities opened with such compounds are huge: one can vary the metal (type, oxidation state, complexation geometry, isotope...) or change ligands (organic or inorganic backbone, denticity, preorganization structure...).

In view of this widespread choice, it is tricky to conceive a molecule with a predictable efficiency. Indeed, today several compounds display excellent therapeutic results. Nevertheless, it is very hard to understand their mechanism of action: what are their targets, which parts of the complex are active (is the whole compound needed or does biological activity come from one of the degradation products?). We can also wonder if the targeting is really efficient and if the accumulation in cells is sufficient. It is to these last questions we wish to answer first.

We are thus working on the syntheses of heterobi/polymetallic compounds composed of a moiety directed for therapy and of another one designed for imaging (allowing the localization of the compound in the body or in cells).

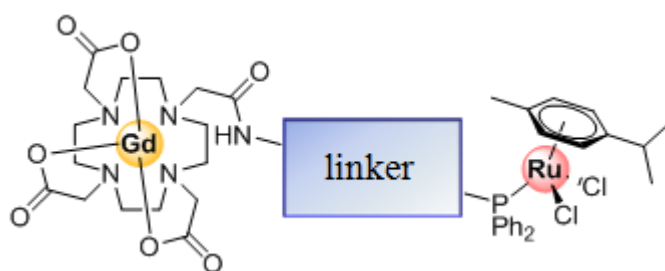


Figure 1: example of a bimetallic complex.

The first studied example associates a gadolinium complex (cyclam like chelating agent) as possible MRI contrast agent and an arene-ruthenium moiety bringing its potential antitumoral properties (cf. Figure 1).

⁴ Ali, H.; van Lier, J. E. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2379-2450.

⁵ Sharma, V.; Piwnica-Worms, D. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2545-2560.

⁶ Volkert, W. A.; Hoffman, T. J. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2269-2292.

LARGUAGE DE CHARGES UTILES IMPORTANTES GRACE A UN ECHOGRAPHE CLINIQUE

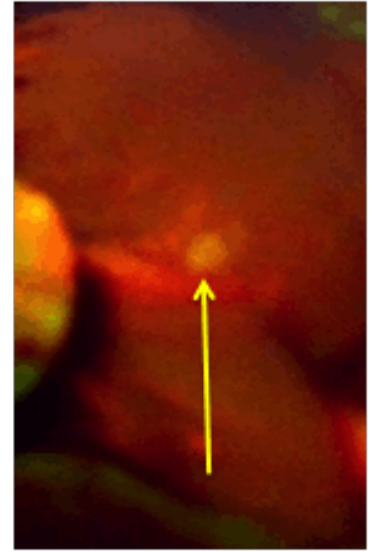
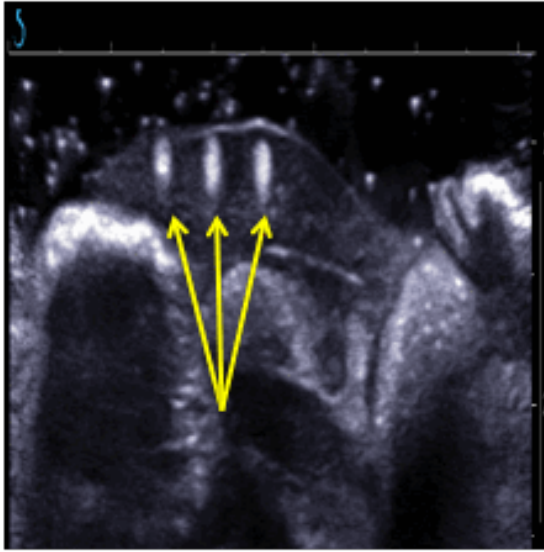
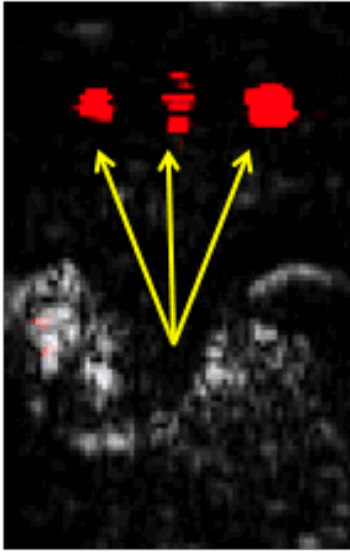
COUTURE Olivier, BRETAGNE Alice, URBAN Alan, TABELING Patrick, TANTER Mickael

L'échographie déclenche localement la conversion de divers agents tels que des microbulles, des liposomes ou des gouttelettes, qui peuvent ensuite libérer leur contenu. Toutefois, ces agents induits acoustiquement souffrent habituellement d'une faible charge ou d'un seuil de pression de conversion élevé. Nous avons proposé une nouvelle gouttelette composite qui porte le marqueur au sein d'une nano-émulsion qui forme au moins 2 / 3 de son volume [Couture et al., IEEE 2009, Medical Physics 2011]. La matrice de la goutte est formée d'huile fluorée, qui agit comme une barrière isolant le contenu de la gouttelette du milieu extérieur. Lorsqu'elle est soumise à une impulsion ultrasonore d'intensité suffisante, l'huile fluorée est convertie, ce qui force le largage du contenu de la gouttelette dans le milieu externe. Afin de garantir que tous les agents se comportent similairement sous l'effet des ultrasons et afin d'éviter les embolies, les gouttelettes sont générées dans un dispositif microfluidique dédié, qui assure leur monodispersité (inférieur à 3%) et une petite taille (inférieure à 5 μm). Cette charge utile peut être libérée avec des ultrasons de basse puissance (impulsions courtes $MI = 0,75$), réalisable par des échographes conventionnels. Ainsi, on peut effectuer avec le même instrument clinique, l'imagerie et le largage de médicament. Une application potentielle serait le tatouage de tissus à réséquer sous contrôle radiologique avant la chirurgie. Notre objectif est de démontrer la libération et le suivi ultrasonore de la fluorescéine chez les rats à des concentrations suffisantes pour être macroscopiquement observables.

La veine fémorale de rats Sprague-Dawley est cathétérisée avant l'injection d'un bolus de 100 μL de gouttelettes composites remplies avec de la fluorescéine (4 μm de diamètre). Une barrette de 5MHz connectée à un échographe (Aixplorer, SuperSonic Imagine, France) est placée sur le foie. Ensuite, une série d'impulsions de 5 cycles est focalisée sur trois régions, à une distance focale de 2 cm, intercalées avec des ondes planes d'imagerie (cadence de 6000 Hz). Les zones hyperéchogènes résultantes ont ensuite été suivies pendant 60 minutes. Le foie est récolté et fixé dans une solution PAF 4%. Les échantillons sont coupés en tranches de 100 μm et observés par microscopie confocale.

La libération dans le foie est observable après une impulsion unique de 5 cycles à un MI de 1,25. Cette observation est effectuée par imagerie différentielle par ondes planes émises avant et 150 ms après l'impulsion ciblée de libération (figure de gauche), révélant un contraste de 27 dB. Cette région très échogène est possiblement formée par la conversion des gouttelettes d'huile fluorée en gaz et s'observe aussi à l'aide d'un Bmode conventionnelle pendant plusieurs minutes après la libération (figure du centre). Après l'exposition du foie, le site de libération le plus superficiel est observable à l'œil nu sous un éclairage bleu avec des filtres d'orange (à droite).

Cette étude démontre que de grandes quantités de marqueurs optiques peuvent être délivrées dans le foie grâce aux gouttelettes composites. Par ailleurs, l'imagerie ultrasonore ultrarapide permet de suivre le processus de largage.



DELIVERY OF LARGE PAYLOADS INDUCED BY AN ULTRASOUND IMAGING SCANNER

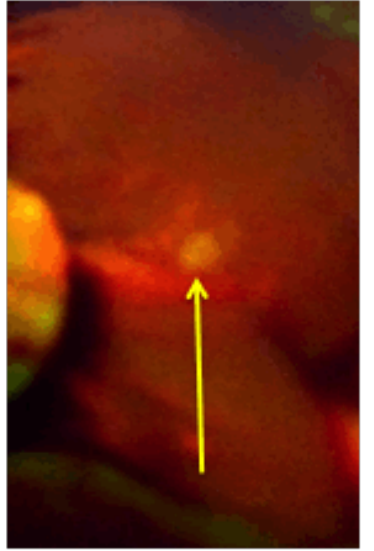
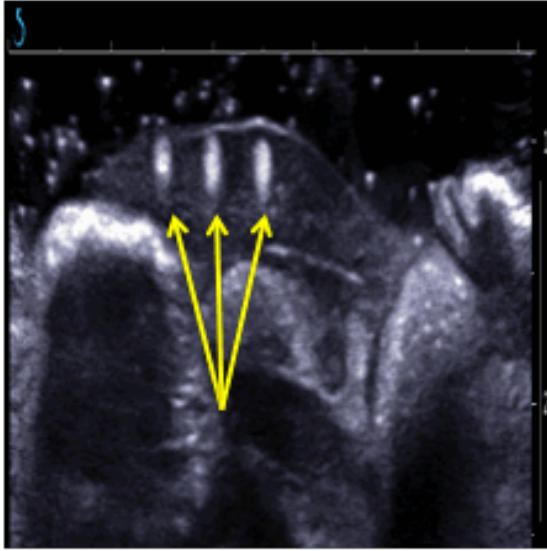
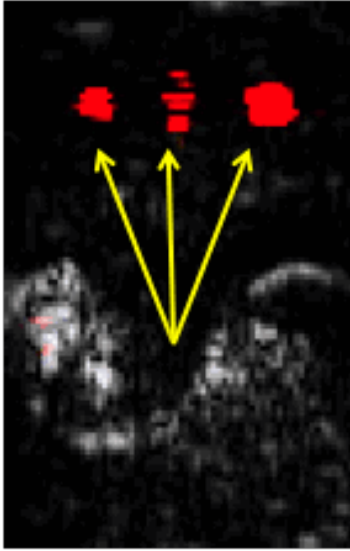
COUTURE Olivier, BRETAGNE Alice, URBAN Alan, TABELING Patrick, TANTER Mickael

Ultrasound has been shown to locally trigger the conversion of various agents such as microbubbles, liposomes or droplets, which can then release their content. However, these acoustically induced agents usually suffer either from low carrying capacity or from high energy threshold for their conversion. We proposed a new composite droplet which carries the marker within a nano-emulsion that comprise at least 2/3 of its volume [Couture et al., IEEE 2009 and Medical Physics 2011]. The droplet's matrix is formed of perfluorocarbon oil, which acts as a barrier isolating the content of the droplet from the external medium. The oil is converted when subjected to an ultrasound pulse of sufficient intensity, and thus force the delivery of the content of the compound droplet in the external medium. To guarantee that they all behave similarly toward the ultrasound release system and to avoid embolism, the droplets are generated in a dedicated microfluidic device, which ensures monodispersity (below 3%) and small sizes (below 5 μm). This payload can be released with low ultrasound power (short pulses at $MI=0.75$), attainable by conventional ultrasound scanners. Hence, with the same clinical instrument, both imaging and drug delivery can be performed. A potential application would be to tattoo tissues to be resected under radiological guidance before surgery. Our objective is to demonstrate the release of fluorescein in rats at sufficient concentrations to be macroscopically observable, along with its ultrasound targeting and monitoring.

The femoral vein of Sprague-Dawley rats was catheterized and craniotomy was performed. A 5MHz array was connected to an ultrasound system (Aixplorer, Supersonic Imagine, France) and mounted over the liver. A bolus of 100 μL of composite droplets filled with fluorescein (monodispersed at 4 μm in diameter) was injected in the femoral vein. Then, a series of 5 cycle pulses were focused in three regions at a focal distance of 2 cm, interleaved with imaging plane waves at a frame rate of 6000 Hz. Monitoring of the resulting hyperechoic regions was done for 60 minutes afterward. Then, the liver were harvested and fixed overnight in 4% PAF solution. The samples were sliced in 100 μm slices and observed using confocal laser microscopy.

The release within the liver was observable after a single 5 cycles pulses at a MI of 1.25. This observation was done by differential imaging between plane-wave insonifications performed before and 150 μs after the release focused pulse (left figure), which showed a contrast of 27 dB. This hyperechoic region could be induced by the conversion of the droplets to gas, which was then monitored using conventional Bmode for several minutes after the release (centre figure). After exposition of the liver, the most superficial release site was observable by eye under blue illumination with orange filters (right figure).

This study demonstrates that large amount of optical marker can be delivered within the liver with composite particles. Moreover, this release can be monitored through ultrafast imaging even after a single release pulse.



LA THEORIE DES POSSIBILITES POUR LA SEGMENTATION DES VOLUMES D'INTERET EN TEP

DEWALLE-VIGNION Anne-Sophie, BETROUNI Nacim, VERSHEURE Leslie, MAKNI Nasr, HUGLO Damien, STUTE Simon, VERMANDEL Maximilien

Adresse : Inserm U 703, Thérapies Interventionnelles Assistées par l'Image et la Simulation, Institut Hippocrate, 152 rue Dr Yersin, CHRU de Lille, 59120 Loos Cedex

La Tomographie par Emission de Positons au 18F-fluorodésoxyglucose (TEP 18F-FDG) est une technique d'imagerie nucléaire dont l'intérêt en oncologie ne cesse de croître. La prise en charge cancérologique tant sur le plan du bilan d'extension que sur le plan de l'évaluation de la réponse thérapeutique requiert un contourage précis et reproductible des volumes d'intérêt (VOI pour Volume Of Interest : tumeurs, lymphomes, métastases...). Malheureusement, la résolution spatiale faible et le niveau de bruit souvent élevé des images TEP rendent le contourage manuel peu reproductible. De nombreuses méthodes (semi-) automatiques de segmentation ont été proposées mais aucune n'est actuellement considérée comme un standard. La majorité de ces méthodes associe à chaque voxel une valeur binaire : 1 si le voxel appartient au VOI et 0 dans le cas contraire. De telles méthodes ne prennent donc pas en compte la transition irrégulière et graduelle entre les tissus sains et le VOI due à la faible résolution spatiale des images TEP. Par ailleurs, le contraste des images TEP est généralement faible.

Pour s'affranchir de ces deux limites, nous proposons une nouvelle approche qui repose sur de solides bases mathématiques issues de la théorie des possibilités. Cette approche porte sur deux points clés. D'une part, l'utilisation de la technique de projection du maximum d'intensité (MIP pour Maximum Intensity Projection) permet de disposer de données plus contrastées que les images TEP natives. D'autre part, un algorithme basé sur la théorie des possibilités permet la prise en compte de l'incertitude, induite par la faible résolution spatiale des images TEP, via l'utilisation de degrés d'appartenance.

Une 1^{ère} évaluation de la méthode a été effectuée sur des images acquises sur le fantôme NEMA NU 2-2001 contenant 6 sphères (diamètre 1 ; 1,3 ; 1,7 ; 2,2 ; 2,8 et 3,7 cm). Deux rapports signal sur bruit de fond (SBR pour Signal to Background Ratios) de 8,9 puis de 4,3 ont été considérés. Trois niveaux de bruit obtenus en modifiant la durée d'acquisition par position de lit (1, 2 puis 5 minutes) ont été étudiés. Hormis pour la sphère de plus petit diamètre qui est à la limite de la résolution spatiale, les résultats reflètent une bonne estimation des volumes. Une relative stabilité aux variations du niveau de bruit et de SBR a été observée, ce qui tend à démontrer la robustesse de la méthode.

Une 2^{nde} évaluation a été effectuée sur des données obtenues par simulation Monte Carlo via le simulateur GATE. Lors des simulations, l'activité de fond était constante alors que les tumeurs préalablement segmentées sur les images TDM étaient introduites dans les poumons avec des activités croissantes : SUV de 1,5 ; 2,5 ; 4,5 et 6. Hormis pour le SUV de 1,5 considéré comme non pathologique en routine clinique, une bonne estimation des volumes a été obtenue.

Une comparaison avec des méthodes connues réalisée sur les données simulées est venue compléter cette évaluation. Cette comparaison a montré la pertinence de la méthode, classée 1^{ère} ex æquo, et a également permis de souligner sa simplicité de mise en œuvre, aucune étape préalable de calibration n'étant nécessaire.

Les premiers résultats étant satisfaisants, de nouveaux développements sont envisagés et l'étape de validation va être étendue à des données cliniques pour lesquelles nous disposons de plusieurs délimitations manuelles. Par ailleurs, le formalisme présenté ici peut facilement être adapté aux modalités d'imagerie 3D pour lesquelles les structures à segmenter apparaissent en hyper signal.

POSSIBILITY THEORY FOR VOLUME SEGMENTATION OF PET IMAGES

DEWALLE-VIGNION Anne-Sophie, BETROUNI Nacim, VERSHEURE Leslie, MAKNI Nasr, HUGLO Damien, STUTE Simon, VERMANDEL Maximilien

Address : Inserm U 703, Thérapies Interventionnelles Assistées par l'Image et la Simulation, Institut Hippocrate, 152 rue Dr Yersin, CHRU de Lille, 59120 Loos Cedex

¹⁸F-fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography (¹⁸F-FDG PET) has become an essential technique in oncology. Initial staging, treatment planning, as well as therapeutic evaluation require accurate tumor volume measurement. Due to the poor spatial resolution and the usually high noise level of PET images, accurate manual delineation is difficult and poorly reproducible. Numerous (semi-) automatic methods for volume of interest (VOI: tumors, metastasis...) segmentation on PET images have been investigated in the literature. Most of these methods do not take into account the uncertainty and inaccuracy inherent in the image. Indeed, they associate a binary value (1 if the voxel belongs to the VOI and 0 otherwise) to each voxel of the PET volume, whereas the transition between healthy tissues and VOI is usually gradual and irregular, partially due to the poor spatial resolution of the images. Moreover, PET image contrast is mostly poor. Taking into account these constraints, we have proposed a new approach based on a consistent possibility framework. This approach is based on two key points. First, the segmentation approach involved Maximum Intensity Projections (MIP) in order to overcome the usually poor PET image contrast. Then, a possibility theory-based algorithm was developed to take uncertainty into account and to enable membership degrees (ranging in $[0; 1]$) instead of binary values ($\{0,1\}$).

A first evaluation was performed on the NEMA NU-2001 phantom containing 6 spheres (1, 1.3, 1.7, 2.2, 2.8, and 3.7 cm diameter). Two different signal-to-background ratios (SBR) of 8.9 and 4.3 were considered. Three different statistical qualities of the images were considered by varying the duration time per bed position: 1, 2, and 5 minutes. Except for the 1 cm diameter sphere, which is at the resolution limit, the results reflect a good estimation of the volumes. Relative robustness both to changes in SBR and to changes in noise (namely in image statistical quality) was observed.

A 2nd evaluation was performed on data obtained by simulation according to the simulation toolkit GATE. The data was simulated from patients according the same background activity whereas real tumors, preliminary delineated on CT scans, were introduced into the lungs with increasing SUV: 1.5, 2.5, 4.5, 6. Except SUV 1.5, which is not usually considered as pathological in clinical practice, good estimation and localization of the volumes were obtained.

Finally, a comparison with other standard methods, such as adaptive thresholding, was done on simulated data. This comparison shows that the proposed method is one of the two best methods in term of volume estimation and robustness to changes in SBR. Moreover, the proposed method does not require any calibration step or background ROI selection contrary to the 2nd best method. It is thus independent of

drift effects and maintenance, and is even independent from PET facilities, which ensures reproducibility and allows objective follow-up.

The first satisfying results unable further developments to be explored to improve the efficiency of the algorithm. Moreover the validation step should be extended to include clinical data. As no ground truth is available for such data, we chose to use a set of manual delineations performed by different experts as the reference for comparison. Then, according to the method foundation, the proposed framework may be adapted to any 3-D image modality whom the data to be segmented are in hyper signal.

Plateforme de simulation Monte Carlo GATE pour l'hadronthérapie couplée à l'imagerie.

Auteurs : JAN Sébastien et SARRUT David

CEA Service Hospitalier Frédéric Joliot, 4 place du général leclerc 91401 Orsay

CREATIS; CNRS UMR5220; Centre Léon Bérard, Lyon, France.

Introduction

La simulation par méthode Monte Carlo est devenue incontournable pour de nombreuses applications médicales, en particulier en imagerie et en radiothérapie. En imagerie, la modélisation est utilisée pour la conception de nouveaux appareillages, leur optimisation, l'étude des divers paramètres affectant la qualité des images acquises, la validation des méthodes de compensation d'effets parasites et le développement de nouveaux algorithmes de reconstruction. En radiothérapie, les simulations Monte Carlo interviennent dans l'élaboration d'un plan de traitement, en simulant la distribution du dépôt de dose au sein des tumeurs et des organes, ainsi que dans la mise au point de nouveaux protocoles d'irradiation. C'est dans ce contexte qu'est développée et utilisée, depuis 2002, la plateforme de simulation GATE [1][2], coordonnée techniquement par le Service Hospitalier Frédéric Joliot du CEA et développée par la collaboration internationale OpenGate.

Matériels et Méthodes

Les travaux présentés ici s'articulent autour des couplages fondamentaux et essentiels qui existent entre la thérapie des cancers par des rayonnements ionisants (externe ou interne) et l'imagerie dont une vocation est de caractériser la qualité du traitement. A ce jour, la plateforme GATE est le seul outil de calcul Monte Carlo qui permet d'étudier ce vaste champ d'application. Dans le cadre de l'hadronthérapie couplée à l'imagerie, nous proposons d'utiliser GATE pour étudier la relation entre la dose déposée et l'image acquise par un Tomographe à Emission de Positons (TEP) exploitant les rayonnements secondaires de l'irradiation même. Une irradiation d'un patient par faisceaux balayés est simulée de manière réaliste à partir d'une modélisation validée. Les résultats de cette étude visent à fournir des informations guidant la conception de détecteurs TEP dédiés au contrôle de la dose délivrée au patient, pour identifier les protocoles de contrôle de dose les plus prometteurs et ainsi estimer la précision qu'il sera possible d'atteindre avec ces imageurs TEP. Nous présenterons les premiers résultats de simulations GATE hyperréalistes d'une irradiation par ions carbone (^{12}C) d'une tumeur pulmonaire suivie de l'acquisition TEP. Ces simulations ont été réalisées sur un supercalculateur de 1000 CPUs (Centre de Calcul Recherche et Technologie).

Résultats

Les figures 1 et 2 illustrent les résultats d'une simulation de 3 faisceaux de ^{12}C multi-énergie (modélisation d'un pic de Bragg modulé par cumul de faisceaux fins). Une caméra TEP commerciale (Siemens HR+) a été précisément modélisée pour obtenir une acquisition TEP post-irradiation de 10 minutes. Celle-ci permet de reconstruire la distribution des radio-isotopes ^{11}C et ^{15}O produits par la multifragmentation du ^{12}C et par collision sur des atomes ^{16}O .

Des résultats sur la relation dose déposée / qualité du contrôle par imagerie TEP seront présentés et discutés. Ils permettent dès à présent de dire qu'en présence d'un tel protocole de traitement, une image TEP ferait sens en terme de contrôle qualité du traitement à partir d'une dose déposée à la tumeur supérieure à 0.9 Gy.

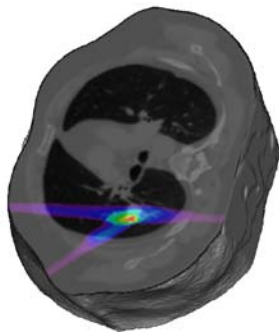


Figure 1 : Carte de dose délivrée à la tumeur par les ions de ^{12}C

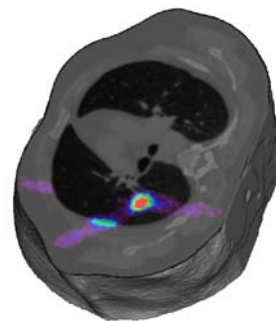


Figure 2 : Image TEP reconstruite de la distribution des radio-isotopes de ^{11}C

Conclusions et perspectives

Au-delà des premiers résultats de ces simulations à grandes échelles qui permettront à termes de définir les zones pour lesquelles un contrôle thérapeutique en ligne par l'imagerie TEP sera possible, nous exposerons les futurs enjeux associés à la GATE. Ces aspects concernent d'une part les applications en immothérapie et d'autre part l'optimisation des temps de calcul liée à l'utilisation d'un code de calcul Monte Carlo.

Références

- [1] Jan S, Santin G, Strul D, et al "GATE: a simulation toolkit for PET and SPECT" Physics in Medicine and Biology, 2004, 49 4543–61
- [2] Jan S, Benoit D, Becheva E, Carlier T, Cassol F, Descourt P, Frisson T, Grevillot L, Guigues L, Maigne L, Morel C, Perrot Y, Rehfeld N, Sarrut D, Schaart DR, Stute S, Pietrzyk U, Visvikis D, Zahra N, Buvat I "GATE V6: a major enhancement of the GATE simulation platform enabling modelling of CT and radiotherapy" Phys Med Biol. 2011 Feb 21;56(4):881-901

The GATE Monte Carlo simulation platform hadronthérapie and imaging monitoring

Auteurs : JAN Sébastien et SARRUT David

CEA Service Hospitalier Frédéric Joliot, 4 place du général leclerc 91401 Orsay

CREATIS; CNRS UMR5220; Centre Léon Bérard, Lyon, France.

Introduction

Monte Carlo simulations are essential for many medical applications, especially for imaging and radiotherapy. Numerical approaches for imaging applications are used to design new devices, to optimize and study the effect of acquisition parameters on the image quality. They are also extremely useful to validate and assess compensation methods and image reconstruction techniques. For radiotherapy applications, Monte Carlo simulations are used to develop planning treatments so as to optimize the dose distribution in tumor and organs at risk. In this research context, the GATE [1][2] simulation platform has been developed and used since 2002 by the OpenGATE collaboration for which the CEA/SHFJ is the technical coordinator.

Material and method

The work presented here is based on the relation between cancer therapy by ionizing radiation (external or internal) and imaging devices to characterize the quality of treatment. Actually, the GATE Monte Carlo simulation platform is the only numerical tool to study this kind of research activities. In the field of hadrontherapy combined with imaging, we propose to use GATE to study the relationship between deposited dose and Positron Emission Tomography (PET) image quality used as therapy control. A patient irradiation is simulated using a validated model of a realistic pencil beam scanning. The results of this study are intended to provide information to guide the design of dedicated PET detectors for therapeutic control, to identify the best protocols to control and follow the deposited dose and finally to estimate the efficiency by using PET imaging for therapeutic control in the case of hadrontherapy treatment. We will present the first results of hyperrealistic GATE simulations including a carbon ions (^{12}C) irradiation of a lung tumor followed by a full PET acquisition. These simulations were performed on a supercomputer of 1000 CPUs (Computing Center for Research and Technology).

Results

Figures 1 and 2 show the results of a simulation of 3 ^{12}C beams with a multi-energy definition (to model a Bragg peak modulated beam). A commercial PET scanner (Siemens HR +) was specifically modeled to obtain a PET image with a post-irradiation acquisition of 10 minutes.

This allows to reconstruct the distribution of radio-isotopes ^{11}C and ^{15}O produced by multifragmentation of ^{12}C and ^{16}O atom collisions. The results of the dose deposited versus the quality control by PET imaging will be presented and discussed. These first results illustrate that in the case of this kind of treatment protocol, a PET image would make sense as a quality control process from a deposited dose to the tumor greater than 0.9 Gy.

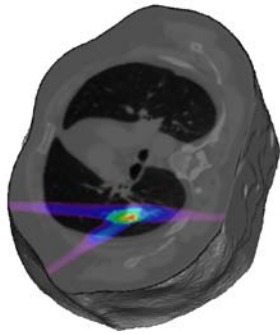


Figure 1 : Dose map delivered by ^{12}C beams

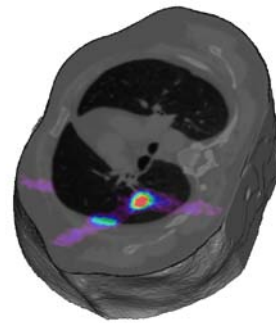


Figure 2 : PET image of the ^{11}C distribution produced by the ^{12}C multifragmentation

Conclusions and perspectives

Beyond the initial results of these large-scale simulations that allow defining the areas for which a therapeutic control line by PET imaging will be possible, we will discuss the future challenges associated to the GATE developments. These focus firstly on immo-therapy applications and are also related to the optimization of computing time related to the use of a Monte Carlo approach.

References

- [1] Jan S, Santin G, Strul D, et al "GATE: a simulation toolkit for PET and SPECT" *Physics in Medicine and Biology*, 2004, 49 4543–61
- [2] Jan S, Benoit D, Becheva E, Carlier T, Cassol F, Descourt P, Frisson T, Grevillot L, Guigues L, Maigne L, Morel C, Perrot Y, Rehfeld N, Sarrut D, Schaart DR, Stute S, Pietrzyk U, Visvikis D, Zahra N, Buvat I "GATE V6: a major enhancement of the GATE simulation platform enabling modelling of CT and radiotherapy" *Phys Med Biol*. 2011 Feb 21;56(4):881-901

CHIRURGIE ASSISTEE PAR IMAGERIE POUR L'ELECTRO-CHIMIOETHERAPIE DES TUMEURS

JOSSERAND Véronique*^{1,2}, KERAMIDAS Michelle*^{1,2}, RIGHINI Christian^{1,2,3}, BELLARD Elisabeth^{4,5}, GOLZIO Murielle^{4,5}, TEISSIE Justin^{4,5} and COLL Jean-Luc^{1,2}

*Ces auteurs ont contribute également à ce travail.

¹ CRI-INSERM U823, Thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

² Université Joseph Fourier, Grenoble, France

³ CHU de Grenoble, Grenoble, France

⁴ CNRS; IPBS Toulouse, France.

⁵ Université de Toulouse; UPS; IPBS; Toulouse, France

Introduction: Dans la plupart des cancers, la résection des tumeurs est la 1ere indication thérapeutique avant la chimiothérapie ou la radiothérapie à condition que la tumeur soit opérable. La survie du patient dépend en grande partie de la résection de la tumeur primaire et également de la possibilité d'enlever les métastases ou de traiter par chimiothérapie

Dans ce travail, nous avons développé un modèle de micro-métastases très proche de la situation clinique dans laquelle les métastases apparaissent secondairement à la résection de la tumeur primaire. Ce modèle expérimental offre l'avantage d'être contrôlé par imagerie multimodale non-invasive (bioluminescence, fluorescence 3D et CT) aussi bien pour la croissance de la tumeur primaire que pour l'invasion métastatique. Ce modèle a été utilisé pour évaluer une nouvelle approche thérapeutique combinant le repérage de la tumeur par imagerie et l'électro-chimiothérapie (ECT), c'est-à-dire l'utilisation de pulses électriques (PE) pour augmenter la captation de la bleomycine.

Méthodes : Des souris BALB/C sont injectées avec des cellules d'adénocarcinome luc+ (TS/Apc-pGL3) sous la capsule rénale. Après 7 jours le rein tumoral est retiré. Après 6 jours l'imagerie multimodale permet l'évaluation de l'invasion métastatique péritonéale. Les souris sont alors randomisées en 3 groupes (n = 5) (G1: ECT; G2: contrôle Bleo; G3: Contrôle PE) et sont injectées par voie intraveineuse par du RAFT-(cRGD)₄-Fluo pour l'imagerie de fluorescence des tumeurs le jour suivant. A J15, les souris de G1 et G2 reçoivent une injection intraveineuse de bléomycine (5 mg/kg) tandis que G3 reçoit seulement du NaCl. 5 min plus tard, les souris subissent une chirurgie abdominale sous le champ de vision de la sonde portable Fluobeam[®]700 pour la localisation et le comptage des métastases. Pour G1 et G3, chaque métastase visible est immédiatement soumise à l'électrostimulation. Après la chirurgie, la progression ou la régression tumorale est suivie par imagerie de bioluminescence non-invasive 2 fois par semaine jusqu'au sacrifice de la souris pour raisons éthiques.

Résultats : Etude de survie: A J18 la charge tumorale dans G2 (contrôle Bleo) a explosé (+590%) et toutes les souris de ce groupe sont mortes prématurément (<21 jours). Pour G1 (ECT) et G3 (contrôle PE) les souris sont mortes entre J24 et J27 ce qui correspond à 9

jours supplémentaires par rapport à G2 (contrôle Bleo). La survie globale des souris n'a pas été significativement améliorée pour G1 (ECT) par rapport à G3 (contrôle PE).

Progression métastatique: 4 jours après la chirurgie abdominale (J18) la charge tumorale pour G1 (ECT) et G3 (contrôle PE) était diminuée de 45% et 5% respectivement. Après J18 la charge tumorale a augmenté de nouveau pour les 2 groupes mais à J24 elle était encore 2,3 fois plus faible pour G1 que pour G3.

Conclusions: Nous avons développé un modèle de micro-métastases dans lequel les métastases apparaissent secondairement à la résection de la tumeur primaire. Le développement de la tumeur primaire et l'invasion de métastases ont été finement caractérisés par l'imagerie multimodale. Nous avons évalué une nouvelle approche thérapeutique combinant la localisation des tumeurs guidée par imagerie et l'électrochimiothérapie et nous avons démontré l'efficacité du traitement ECT pour ralentir l'invasion des métastases.

IMAGE-GUIDED SURGERY FOR TUMOR-TARGETED ELECTRO-CHEMOTHERAPY

JOSSERAND Véronique*^{1,2}, KERAMIDAS Michelle*^{1,2}, RIGHINI Christian^{2,3}, BELLARD Elisabeth^{4,5}, GOLZIO Murielle^{4,5}, TEISSIE Justin^{4,5} and COLL Jean-Luc^{1,2}

*These authors contributed equally to this work.

¹ CRI-INSERM U823, Thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

² Université Joseph Fourier, Grenoble, France

³ CHU de Grenoble, Grenoble, France

⁴ CNRS; IPBS Toulouse, France.

⁵ Université de Toulouse; UPS; IPBS; Toulouse, France

Introduction: In most cancers tumor resection is the first therapeutic indication before chemotherapy or radiotherapy on condition that the tumor is removable. The patient survey largely depends on the primary tumor resection exhaustiveness and also possibly on metastasis removal or adjuvant chemotherapy.

In the present work we developed a micro-metastases model very close to the clinical situation in which metastases appear secondarily to primary tumor resection. This experimental model offers the advantage to be finely controlled since both primary tumor growth and metastases invasion are monitored with non invasive multimodal imaging (bioluminescence, 3D fluorescence and CT). The model was used to evaluate a new therapeutic approach combining image-guided tumor location and electrochemotherapy (ECT) i.e. the use of electric pulses (EP) to enhance bleomycine uptake.

Methods: BALB/C mice were injected with luciferase positive adenocarcinoma cells (TS/Apc-pGL3) into the left kidney capsule. Seven days later (D8) the tumorous kidney was removed. Six days later (D14) multimodal imaging (bioluminescence, 3D fluorescence and CT) allows the evaluation of metastases peritoneal invasion. Mice were then randomized in 3 groups (n = 5) (G1: ECT (Bleo+electro); G2: Bleo Control; G3: EP Control) and all mice received an i.v. injection of RAFT-(cRGD)₄-AlexaFluor700 for tumor fluorescence imaging the following day. At day 15, mice from G1 and G2 received an i.v. injection of low amount of Bleomycin (5mg/kg in 0.15M NaCl) whereas G3 received EP only. Five minutes later, mice underwent an abdominal surgery under the field of view of the portative Fluobeam[®]700 (Fluoptics) for image-guided metastases location and counting. For G1 and G3, each spotted metastasis was immediately subjected to EP. After surgery recovery, metastases progression or regression was followed by non invasive bioluminescence twice a week until mice sacrifice for ethical considerations.

Results: Survival study: At D18 tumor burden in G2 (Bleo control) had exploded (590% increase) and all mice from this group died prematurely (<21 days). For both G1 (Bleo+EP) and G3 (EP control) mice died between D24 and D27 which is up to 9 days after mice from G2 (Bleo control). The overall mice survival was not statistically different in G1 (Bleo+EP) in comparison to G3 (EP control). **Metastases Progression:** Four days after the abdominal surgery (D18) tumor burden in G1 (Bleo+EP) and G3 (EP control) was decreased by 45%

and 5% respectively. After D18 tumor burden picked up again for both G1 and G3, but at D24 tumor burden in G1 (Bleo+EP) was still 2.3 fold smaller than in G3 (EP control).

Conclusions: We developed a micro-metastases model in which metastases appear secondarily to primary tumor resection. Primary tumor development and metastases invasion were finely characterized by multimodal imaging. Then we evaluated a new therapeutic approach combining image-guided tumor location and electro-chemotherapy. We demonstrated the strong effectiveness of the ECT treatment to slow down metastases invasion.

PHOTOLYSE DE COMPOSES ORGANIQUES PAR LE RAYON X PERMETTANT LA LIBERATION SELECTIVE DE COMPOSES AUX CHOIX, DANS DES ESPACES BIOLOGIQUES INACCESSIBLES PAR DES METHODES NON-INVASIVES, DETECTABLES PAR IRM.

PETIT Morgane¹, BORT Guillaume², DOAN Bich-Thuy³, SICARD Cécile⁴, OGDEN David⁵, SCHERMAN Daniel³, FERROUD Clotilde², Peter I. Dalko Peter I.^{1*}

1- *Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, Université Paris Descartes, Paris, France.*

2- *Service de Transformations Chimiques et Pharmaceutiques, Conservatoire national des arts et métiers Paris, France.*

2- *Unité de pharmacologie chimique et génétique, et d'Imagerie /ENSCP Chimie-Paristech, UMR 8151, U1022, Paris, France*

L'utilisation des techniques d'imagerie multimodales en tandem en complément de traitements thérapeutiques ouvre de nouvelles perspectives dans de nombreux domaines médicaux. L'imagerie fluorescente peut être exploitée, par exemple, pour guider l'intervention chirurgicale. Dans cette approche, l'imagerie optique fournit en temps réel des informations complémentaires qui facilitent le praticien à réaliser une exérèse complète des tumeurs. Ainsi, une méthode théranostique qui permettrait le ciblage et la libération de composés avec une sélectivité stéréospatiale accrue pourrait considérablement augmenter les perspectives de cette technique. Dans ce contexte, nous avons développé une nouvelle approche qui permet la libération de composés suite à un signal externe tel que le rayon X, ou gamma [1]. Par cette méthode, des tissus, ou autre milieu biologique jusqu'alors inaccessible par des techniques non-invasives, peuvent être ciblés. L'agent chimiothérapeutique peut être introduit, par exemple, dans le corps sous forme masquée et donc non toxique et peut être libéré avec un contrôle stéréo-spatial accru [2]. Le composé activable est constitué d'un complexe organolanthanide (III) ou gadolinium-DOTA (l'antenne), attaché à un dérivé de quinoléine, photoactivable par des rayons UV [2]. Dans le cas d'une excitation par un rayons X, ou gamma, l'antenne transfère une part de l'énergie à la quinoléine induisant ainsi une fragmentation sélective. Comme pour d'autres agents de contraste d'IRM, le complexe de gadolinium-DOTA peut être détecté, et la distribution des composés peut être suivie *in vivo* par des méthodes d'IRM. Alors que les composés cagés ont été développés principalement comme outils de recherche en biologie moléculaire, physiologie cellulaire et en neurosciences [2], l'application des cages aux rayons X pourrait dépasser les frontières de la biologie moléculaire et être utilisée à terme dans un but thérapeutique. Ce même principe pourrait être utilisé pour la photolibération de composés dans des expériences sur l'animal entier. Chimiquement il n'y a pas de limitation concernant la nature du ligand libéré, ce qui soulève la perspective d'une large utilisation dans l'administration de médicaments. Nous considérons cette méthode comme un pas en avant dans la thérapie photodynamique qui est aujourd'hui limitée à la génération et à la libération de radicaux hydroxyle qui entraînent des dommages oxydatifs.

Références:

- [1] (a) M. Petit, G. Bort, D. Ogden, C. Sicard, P. I. Dalko, EU Patent Appl., **2010**. (b) M. Petit, G. Bort, BT Doan, D. Ogden, C. Sicard, D. Scherman, C. Ferroud, P.I. Dalko, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, Article first published online: 30 AUG 2011 DOI: 10.1002/anie.201105350 inside cover of the week <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201105350/abstract>.
- [2] (a) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042; (b) A. Specht, F. Bolze, Z. Omeran, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *HFSP J.* **2009**, *3*, 255–264; (c) H.-M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427; (d) G. C. R. Ellis-Davies, *Nature Meth.* **2007**, *4*, 619–628; (e) D. Warther, S. Gug, A. Specht, F. Bolze, J. F. Nicoud, A. Mourot, M. Goeldner, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7753–7758.

X-RAY PHOTOLYSIS TO RELEASE LIGANDS FROM 'CAGED' REAGENTS BY AN INTRAMOLECULAR MRI-SENSITIVE ANTENNA

PETIT Morgane¹, BORT Guillaume², DOAN Bich-Thuy³, SICARD Cécile⁴, OGDEN David⁵, SCHERMAN Daniel³, FERROUD Clotilde², Peter I. Dalko Peter I.^{1*}

1- *Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, Université Paris Descartes, Paris, France.*

2- *Service de Transformations Chimiques et Pharmaceutiques, Conservatoire national des arts et métiers Paris, France.*

2- *Unité de pharmacologie chimique et génétique, et d'Imagerie /ENSCP Chimie-Paristech, UMR 8151, U1022, Paris, France*

The tandem use of multimodal imaging technologies with therapeutic modalities opens novel perspectives for image-guided therapy. For example, fluorescence is exploited as a possible technique for image-guided surgical resection. Optical imaging provides real-time information about surgical margins, thereby, extending the surgeon's vision ensuring complete surgical resection of tumors. Theranostic methods allowing selective site- or tissue-specific targeting and remote controlled release of a desired compound would extend considerably the perspective of this field.

We developed a conceptually novel X-ray activable photodevice that permits the rapid liberation of compounds in media such as biological tissues transparent to X-rays.[1] This in principle overcomes the deficiency of poor penetration of light used for the activation of "caged compounds".[2] A chemotherapeutic agent could be introduced to the body in a masked and thus nontoxic form and can be liberated at a right place and time in a high stereospatial control. The photodevice is based on an organolanthanide(III) complex, tethered as an antenna to an *UV-light* activable quinoline derivative. Upon X-ray excitation, energy/electron transfer from the antenna to the photolabile quinoline results in the release of the ligand. Noteworthy, gadolinium DOTA derivatives act also as an MRI contrast agent and as with other Gd(III) contrast agents, the distribution of the caged molecules can be followed *in vivo* by standard MRI methods raising the prospect of targeted liberation of biologically active ligands. Conventional caged ligands are used principally as research tools in molecular biology, cell physiology and neuroscience. The X-ray cages may permit application to currently inaccessible locations *in vivo*, thus extending the applications of photorelease to deep tissues in whole animal experiments. Chemically there are no restrictions on the nature of the ligand that can be released, raising the prospect of wide use in drug delivery. We consider this method as a step forward in PDT (photodynamic therapy) that is actually limited to the generation and release of hydroxyl radicals upon irradiation combined with the oxidative damages.

References:

- [1] (a) M. Petit, G. Bort, D. Ogden, C. Sicard, P. I. Dalko, EU Patent Appl., **2010**. (b) M. Petit, G. Bort, BT Doan, D. Ogden, C. Sicard, D. Scherman, C. Ferroud, P.I. Dalko, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, Article first published online: 30 AUG 2011 DOI: 10.1002/anie.201105350 inside cover of the week <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201105350/abstract>.

[2] (a) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042; (b) A. Specht, F. Bolze, Z. Ocran, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *HFSP J.* **2009**, *3*, 255–264; (c) H.-M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427; (d) G. C. R. Ellis-Davies, *Nature Meth.* **2007**, *4*, 619–628; (e) D. Warther, S. Gug, A. Specht, F. Bolze, J. F. Nicoud, A. Mourot, M. Goeldner, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7753–7758.

CONTROLE SPATIO-TEMPOREL DE L'INHIBITION DE L'EXPRESSION GENIQUE IN VIVO

PINEL Karine¹; DEBEISSAT Christelle²; GENEVOIS Coralie³; COUILLAUD Franck¹

1- Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques – UMR 5536

2- Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle – UMR 5231

3- Unité Mixte de service – UMS 3428

Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

La plupart des cancers sont associés à des dérégulations de l'expression des gènes ce qui constitue un réel challenge thérapeutique. Les découvertes récentes dans le domaine de l'interférence ARN (ARNi) permettent d'envisager une réduction ou une suppression de l'expression d'un gène spécifique. Il est cependant indispensable de limiter l'inhibition au tissu pathologique et de ne pas affecter l'expression dans les tissus sains de l'organisme. Notre stratégie thérapeutique consiste à induire le mécanisme d'ARNi en utilisant un microARN placé sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur thermo-inductible, le promoteur Hsp70B. L'expression du microARN est alors contrôlée par une hyperthermie qui peut être réalisée par des méthodes physiques non invasives, au moment choisi et à l'endroit désiré. La faisabilité de cette approche est abordée *in vitro*, en utilisant des cellules en culture et *in vivo*, sur des xénogreffes sous-cutanées chez la souris, en ciblant le gène de la luciférase firefly (LucF). L'inhibition est provoquée par l'activation d'un micro-ARN spécifique de la LucF (miRLuc), elle est visualisable au luminomètre ou par imagerie de bioluminescence (BLI).

En transfectant simultanément des vecteurs codant pour la LucF et des vecteurs comprenant la cassette du miRLuc exprimée constitutivement, l'inhibition de l'expression de la LucF est possible. Pour optimiser l'inhibition, le nombre de copies du miRLuc et le nombre de cibles ont été augmentés. Ainsi, nous avons obtenu un pourcentage d'inhibition supérieur à 90%. Lorsque le miRLuc est placé sous le contrôle du promoteur Hsp70B, l'hyperthermie (45°C, 8 min) permet l'expression du microARN. L'inhibition est alors transitoire et maximale 46 heures après le chauffage.

Les expériences *in vivo* ont ensuite été menées chez la souris. Pour cela, des lignées cellulaires U87 ont été génétiquement modifiées pour exprimer constitutivement la LucF ainsi que 4 copies du miRLuc sous le contrôle du promoteur thermo-inductible. Une deuxième lignée comprenant cette fois-ci un microARN ne ciblant aucun gène a été générée pour constituer un contrôle. Les lignées cellulaires d'intérêt et contrôle ont permis de générer des tumeurs sous-cutanées sur des souris immunodéficientes sur les pattes arrières gauche et droite respectivement. La bioluminescence témoigne de la croissance tumorale. L'expression du miRLuc est induite par hyperthermie en plongeant les deux pattes dans un bain-marie (45°C, 8 min). Les tumeurs exprimant le miRLuc de façon thermo-inductible montrent une diminution significative du signal de bioluminescence par rapport à la tumeur contra-latérale. Cette diminution est observable deux jours après le chauffage et jusqu'à deux semaines.

Ces expériences préliminaires indiquent la faisabilité de notre approche. Celle-ci pourra être utilisée pour cibler un gène dans une optique thérapeutique et ouvre des perspectives cliniques de par l'utilisation de méthodes courantes telles que les ultrasons focalisés, les radiofréquences et les lasers pour contrôler localement l'hyperthermie.

SPATIO-TEMPORAL CONTROL OF GENE SILENCING *IN VIVO*

PINEL Karine¹; DEBEISSAT Christelle²; GENEVOIS Coralie³; COUILLAUD Franck¹

1- Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques – UMR 5536

2- Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle – UMR 5231

3- Unité Mixte de service – UMS 3428

Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Abnormal regulation of gene expression is the hallmark of cancer, and constitutes a huge therapeutic challenge. The recent discovery of RNA interference (RNAi) mechanisms provides a way to reduce or inhibit virtually any overexpressed gene. It's however crucial to limit inhibition to the tumor without affecting surrounding healthy tissues. In the current project, RNAi was induced using a microRNA placed under transcriptional control of a thermo-inducible promoter, the heat shock 70B promoter. Spatially resolved, non-invasive physical methods provide a way to activate the Hsp70B promoter and thus, to control gene silencing by local hyperthermia. By targeting firefly luciferase (LucF) expression with a specific microRNA (miRLuc), *in vitro* and *in vivo* feasibility of such an approach was studied using cell lines and xenograft subcutaneous tumors in mice and bioluminescence imaging (BLI) techniques.

Plasmids encoding for constitutive expression of LucF and constitutive expression of miRLuc were co-transfected in U87 human glioblastoma cells. LucF activity was inhibited by the miRLuc expression. Both, the number of miRLuc copies encoded by the plasmid and the number of miRLuc targets were shown to be important parameters for maximal inhibition (up to 90% inhibition) of LucF enzymatic activity. By placing miRLuc under transcriptional control of Hsp70B promoter, inhibition was induced by hyperthermia (45°C, 8 min) and became transient with maximum inhibition occurring 46 hours after heating.

In vivo experiments were performed using a U87 cell line stably transformed for constitutive expression of LucF and thermo-inducible expression of 4 miRLuc copies. A U87 cell line expressing LucF and a thermo-inducible unrelated microRNA was used as control. LucF-targeted and control cell lines were used to generate subcutaneous xenograft tumors on immunodeficient mice on left and right legs, respectively. Tumor growth was monitored by bioluminescence. MiRLuc expression was induced by hyperthermia by putting both legs in a water-bath (45°C, 8 min). Tumors expressing the thermo-inducible miRLuc exhibited a significant decrease in the BLI signal as compared to the contra-lateral control tumors starting two days later that tested for two weeks.

Our data, although preliminary, indicate the *in vivo* feasibility of thermo-inducible control of specific gene inhibition within tumors. This strategy could be used to target a therapeutic-relevant gene and open the way for clinical perspectives using currently available methods such as focused ultrasound, radiofrequency and laser for local control of hyperthermia.

SYNTHESES ET EVALUATIONS DE VECTEURS PEPTIDIQUES ACTIVABLES POUR L'IMAGERIE TUMORALE

WENK Christiane H. F. ^{1,2,3*}, JOSSERAND Véronique ^{1,2}, DUMY Pascal ^{2,3}, BOTURYN Didier ^{2,3}, Coll Jean-Luc ^{1,2*}

¹ CRI-INSERM U823, Cibles diagnostiques ou thérapeutiques et vectorisation de drogues dans les cellules tumorales, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

² Université Joseph Fourier, Grenoble, France

³ CNRS, UMR-5250, Département de Chimie Moléculaire, Grenoble, France

* Contact: Christiane.Wenk@ujf-grenoble.fr

Jean-Luc.Coll@ujf-grenoble.fr

Résumé :

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur protéique transmembranaire surexprimé lors de la néoangiogénèse tumorale. Ces ligands sélectifs sont des peptides contenant la séquence tripeptidique « RGD ». Ils sont extrêmement utilisés pour la thérapie anticancéreuse et le diagnostic du cancer. Nous avons montré que la présentation multimérique du ligand cyclopentapeptide c[-RGDfK-] sur un châssis moléculaire cyclodécapeptidique (Figure 1-a) augmente l'affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ mais surtout permet l'endocytose du complexe récepteur-ligand ce qui en fait un vecteur anticancéreux attrayant pour l'imagerie médicale (Boturyn et al. 2004 ; Garanger et al. 2005).

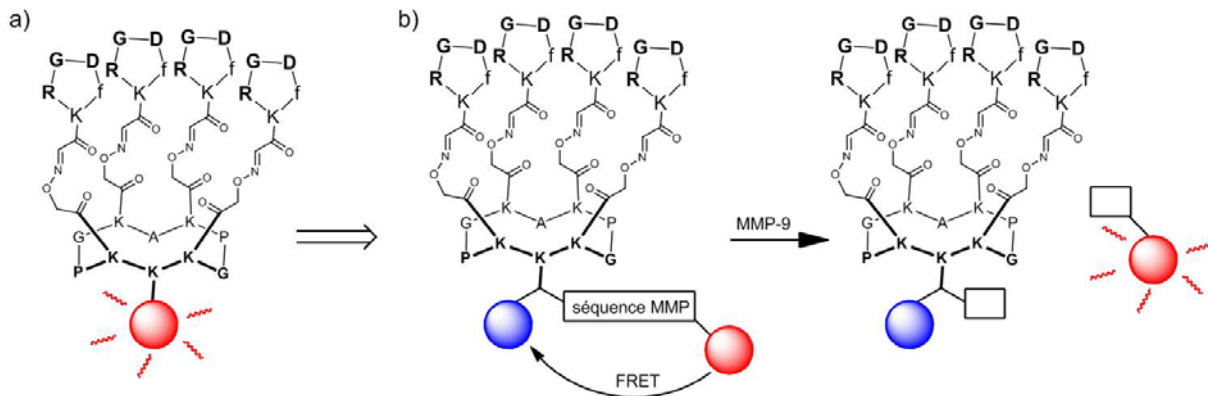


Figure 1. Structure des vecteurs peptidiques présentant un cluster de ligands « RGD ». a) composé fluorescent, b) composé fluorescent activable.

Ayant montré l'efficacité de cette macromolécule biologique pour le ciblage des tumeurs, le but de ce projet est de combiner un deuxième élément de ciblage tel qu'un site de coupure aux enzymes surexprimés dans l'environnement tumoral. Nous avons donc lié à notre châssis moléculaire un site de coupure de ces enzymes (Figure 1-b). Celui-ci permet le quenching de la fluorescence de notre chromophore par FRET. La dégradation enzymatique du site de coupure permet de récupérer la fluorescence uniquement au niveau de la tumeur.

Nous présenterons des résultats qui démontrent que cette molécule permet un diagnostic plus sensible et plus spécifique d'une zone tumorale.

SMART-PROBES FOR NEAR-INFRARED IMAGING OF CANCER

WENK Christiane H. F.^{1,2,3*}, JOSSERAND Véronique^{1,2}, DUMY Pascal^{2,3}, BOTURYN Didier^{2,3}, COLL Jean-Luc^{1,2*}

¹CRI-INSERM U823, Cibles diagnostiques ou thérapeutiques et vectorisation de drogues dans les cellules tumorales, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

²Université Joseph Fourier, Grenoble, France

³CNRS, UMR-5250, Département de Chimie Moléculaire, Grenoble, France

* Contact: Christiane.Wenk@ujf-grenoble.fr

Jean-Luc.Coll@ujf-grenoble.fr

Abstract:

The integrin $\alpha_v\beta_3$ is a receptor over-expressed during angiogenesis and by certain tumors. Its well known ligand is the cyclic tripeptide "RGD". It was already demonstrated that by grafting four c[RGDfK-] on a cyclodecapeptidic template, the affinity for the integrine $\alpha_v\beta_3$ is increased. Hence this molecule called RAFT-c(RGD)4 represents an attractive cancer-targeting probe for medical imaging. (Boturyn et al. 2004 ; Garanger et al. 2005).

The aim of the project now is the chemical design of an innovative fluorescent molecule based on the RAFT-c(RGD)4 for the diagnosis and the therapy of cancer by combining a second targeting element, which is a cleavable cassette for tumor-overexpressed enzymes. This should increase the tumor specificity. The principle is that the fluorescence of the molecular complex is quenched while remaining intact and it will be turned on as soon as the peptide bond of the cleavage cassette is cut by the enzyme. We will present our results showing that this molecule can be used as a shuttle, releasing this agent in the cancerous environment.

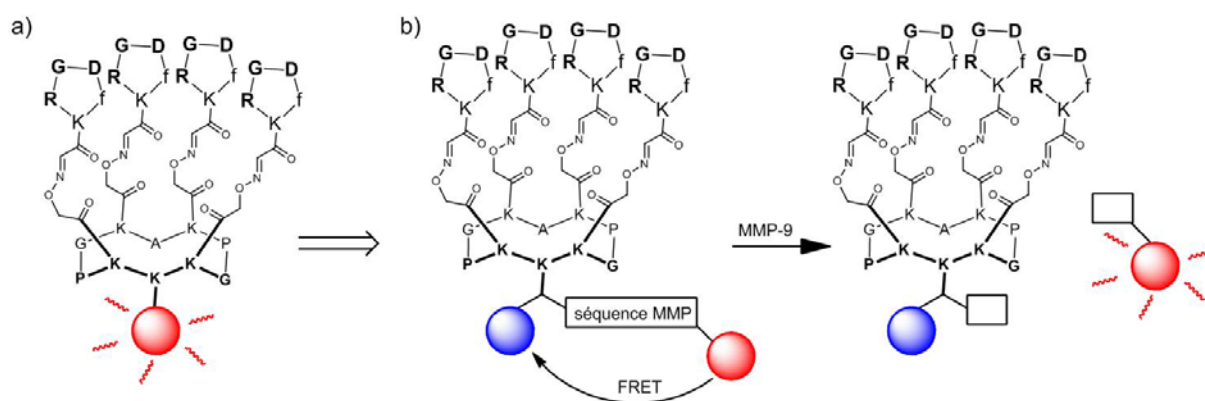


Figure 1. Structure of the peptide vectors presenting a cluster of the ligand « RGD ». a) fluorescent compound, b) activatable fluorescent compound.