

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Jonathan LAVAUD

Thèse dirigée par **Annie MOLLA (EDCSV)**, INSERM
et codirigée par **Véronique JOSSERAND**

préparée au sein du **Laboratoire CRI IAB - Centre de Recherche
Oncologie/Développement - Institute for Advanced
Biosciences**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Développement d'approches d'imagerie multimodale pour la recherche en oncologie

Development of multimodal imaging approaches for research in oncology

Thèse soutenue publiquement le **11 décembre 2018**,
devant le jury composé de :

Monsieur Thierry Bettinger

Directeur de Recherche, Bracco Suisse SA, Rapporteur

Madame Anabela DaSilva

Directeur de Recherche, Institute Fresnel, Rapporteur

Monsieur Jean-Luc Cracowski

Professeur des universités - praticien hospitalier, Centre Hospitalo-
Universitaire Grenoble Alpes, Président

Monsieur Anikitos Garofalakis

Directeur d'études , Biospace Lab., Examineur



Je tiens tout d'abord à exprimer ma plus grande gratitude au Dr. Véronique Josserand pour son accompagnement et son soutien constant tout au long de ce travail de thèse. Sept ans sont passés depuis le jour où, mes 21 ans et moi, nous avons discuté d'imagerie du petit animal pour la première fois. Merci pour m'avoir apporté ton soutien et ton écoute. Je t'exprime ici ma plus grande reconnaissance et mon plus grand respect.

Je remercie le Dr. Annie Molla qui a également assuré mon accompagnement dans le bon déroulement de mon doctorat et qui a été une alliée précieuse lors de l'écriture de ce manuscrit.

Je remercie le Dr. Anabela DaSilva, le Dr. Thierry Bettinger, le Pr. Jean Luc Cracowski et le Dr. Anikitos Garofalakis pour me faire l'honneur d'avoir accepté de juger ces travaux. Ces quelques mots sont pour moi l'occasion de vous exprimer ma reconnaissance.

Je remercie Lise Laumonier et la société Biospace Lab. pour m'avoir permis de réaliser ce doctorat.

Je remercie toutes les personnes qui ont collaboré de près ou de loin aux différents projets auxquels j'ai eu le plaisir de participer.

Une mention particulière pour les teams canadiennes et européennes de Visualsonics avec qui j'ai toujours eu beaucoup de plaisir à interagir.

Merci à notre beloved¹ chef d'équipe, le Dr. Jean Luc Coll qui m'a accueilli au sein de l'équipe 5, Thérapie ciblée, Diagnostic précoce et Imagerie du cancer au sein du centre de recherche, fraîchement rebaptisé, Institute for Advanced Biosciences (INSERM U1209, CNRS UMR5309, UGA). Merci pour ta joie, ton engouement communicatif pour la science et pour tous les conseils que tu as pu me donner pendant toutes ces années.

Je remercie mes collègues de l'équipe (je ne vais pas faire de liste car elle ne sera pas exhaustive et je voudrais ne blesser personne, vous vous reconnaîtrez !).

Je remercie mes amis d'ici et d'ailleurs pour tous les bons moments passés ensemble.

A special mention for my portugese family who welcomed me during my stay in Toronto [Do ron do].

Je te remercie toi, mon chat, pour avoir été là pour m'aider à supporter mes petits moments de faiblesses mais surtout pour me donner la joie de partager toutes mes aventures avec toi.

A mes sist', les meilleures. Je vous aime.

Pour finir, je tiens à remercier mes parents. D'aussi loin que vous puissiez vivre, vous êtes là, sans relâche, par la pensée (souvent par Whatsapp aussi) pour me guider et m'accompagner dans cette merveilleuse histoire qu'est la vie.

Ca joue !

¹ Source : Tao Jia, 2016.

Table des matières

Introduction	9
I. Recherches bibliographiques	12
1 LE CANCER	12
1.1 L'IMPORTANCE DE LA PRISE EN CHARGE DU CANCER : DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	12
1.1 LES FACTEURS DE RISQUES DU CANCER	13
1.1.1 LES FACTEURS DE RISQUES COMPORTEMENTAUX	13
1.1.2 LES INFECTIONS CHRONIQUES	14
1.1.3 LES EXPOSITIONS PROFESSIONNELLES	14
1.1.4 LA POLLUTION ENVIRONNEMENTALE	14
1.1.5 LES FACTEURS HEREDITAIRES	14
1.2 LA FORMATION DES CANCERS : LA CARCINOGENESE	15
1.2.1 PHASE D'INITIATION DE LA CARCINOGENESE	16
1.2.2 PHASE DE PROMOTION DE LA CARCINOGENESE	19
1.3 L'ANGIOGENESE TUMORALE	20
1.3.1 LES FACTEURS ANGIOGENIQUES	21
a. VEGF	21
b. FGF	22
c. L'hypoxie tumorale	22
o Hif (hypoxic-inducible factor)	24
o Anhydrase carbonique 9 (carbonic anhydrase 9, CA9 ou CA IX)	24
o Glut-1	24
d. La matrice extra-cellulaire (MEC)	25
1.3.2 LES INTEGRINES	25
1.3.2.1 L'intégrine $\alpha\beta3$ et ses ligands	27
1.4 CONCLUSION	28
2 LES MODELES ANIMAUX EN CANCEROLOGIE	28
2.1 LES MODELES INDUITS	29
2.2 LES MODELES TRANSGENIQUES	29
2.3 LES GREFFES SYNGENIQUES	30
2.4 LES GREFFES XENOGENIQUES (OU XENOGREFFES)	30
2.4.1 LES GREFFES ECTOPIQUES	30
2.4.2 LES MODELES ORTHOTOPIQUES	31
2.5 LES PATIENT-DERIVED XENOGRAFTS (PDX)	32
3 L'IMAGERIE BIOMEDICALE EN ONCOLOGIE	34
3.1 LES RAYONS X	36
3.1.1 HISTOIRE ET PRINCIPE DE BASE	36
3.1.2 RADIOGRAPHIE	38
3.1.2.1 Applications	38
3.1.3 TOMODENSITOMETRIE/COMPUTED TOMOGRAPHY (CT)	39
3.1.4 APPLICATIONS	40
3.1.4.1 Le CT pour la recherche préclinique	41

3.1.4.2	Utilisation d'agents de contraste	41
3.1.5	ATOUTS ET LIMITES	42
3.2	LES ULTRASONS	42
3.2.1	HISTOIRE ET PRINCIPES DE BASE	42
3.2.2	L'ÉLEMENT PIEZOELECTRIQUE	42
3.2.3	INTERACTION DES ULTRASONS AVEC LA MATIERE	43
3.2.4	L'EFFET DOPPLER	44
3.2.5	APPLICATIONS BIOMEDICALES	45
3.2.6	UTILISATION D'AGENTS DE CONTRASTE	46
3.2.7	ATOUTS ET LIMITES	46
3.3	L'IMAGERIE OPTIQUE	47
3.3.1	LA BIOLUMINESCENCE	47
3.3.1.1	Histoire et Principe de base	47
3.3.1.2	Applications en cancérologie	49
3.3.1.3	Atouts et limites	50
3.3.2	L'IMAGERIE DE FLUORESCENCE	51
3.3.2.1	Principes de base de la Fluorescence	51
3.3.2.2	Interaction des photons avec les tissus biologiques	52
3.3.2.3	Modalités d'imagerie de fluorescence	56
○	Epi-illumination	56
○	Trans-illumination	57
3.3.2.4	Atouts et limites	60
3.3.2.5	Les fluorochromes	60
3.3.2.6	Les différents types de sondes fluorescentes	61
○	Les sondes non spécifiques	62
○	LES SONDES SPECIFIQUES	62
○	LES SONDES ACTIVABLES	63
3.3.2.7	Applications biomédicales	68
3.4	L'IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE	69
3.4.1	HISTOIRE ET PRINCIPES DE BASE	69
3.4.2	AVANCEES TECHNOLOGIQUES	73
3.4.3	IMAGERIE DU CONTRASTE ENDOGENE	73
3.4.4	IMAGERIE DU CONTRASTE EXOGENE	74
3.4.4.1	Agents de contraste organiques	74
3.4.4.2	Agents de contrastes inorganiques	75
3.4.5	APPLICATIONS BIOMEDICALES	76
3.4.6	ATOUTS ET LIMITES	77
3.5	CONCLUSION SUR LES DIFFERENTES MODALITES D'IMAGERIE BIOMEDICALE	78

II. Travail expérimental **80**

Objectifs de la thèse **80**

i. Caractérisation et validation du couplage de l'imagerie de fluorescence 3D et de l'imagerie microCT **82**

1 COMBINED FLUORESCENCE DIFFUSE OPTICAL TOMOGRAPHY AND MICROCT FOR THE CHARACTERIZATION OF A SET OF RELEVANT PRECLINICAL LUNG CANCER MODELS. {ARTICLE EN PREPARATION} **82**

1.1 INTRODUCTION	84
1.2 METHODS	85
1.2.1 <i>IN VIVO</i> FLUORESCENCE DETECTABILITY BY FDOT/MICROCT	85
1.2.2 CELL CULTURE OF CANCER CELL LINES	85
1.2.3 PRIMARY LUNG CANCER AND LUNG METASTASIS MODELS	85
1.2.4 BIOLUMINESCENCE IMAGING FOR TUMOR GROWTH FOLLOW UP	85
1.2.5 TRACER ADMINISTRATION	86
1.2.6 2D FLUORESCENCE & BIMODAL FDOT/MICROCT IMAGING	86
1.2.7 EX VIVO FLUORESCENCE IMAGING AND HISTOLOGY	87
1.2.8 STATISTICAL ANALYSIS	87
1.3 RESULTS	87
1.3.1 <i>IN VIVO</i> FLUORESCENCE DETECTABILITY BY FDOT/MICROCT	87
1.3.2 ANGIOSTAMP™700 ADMINISTRATION ROUTE FOR PRIMARY LUNG TUMOR IMAGING	88
1.3.3 3D FLUORESCENCE IMAGING OF EARLY LUNG METASTASES	96
1.4 DISCUSSION	100
1.5 CONCLUSION	100
1.6 BIBLIOGRAPHY	102

2 PROJETS COLLABORATIFS **104**

2.1 PROJETS DE DEVELOPPEMENT SUR LE VERSANT D'IMAGERIE BIMODALE FLUORESCENCE 3D/MICROCT.	104
2.1.1 NON-INVASIVE AND QUANTITATIVE ASSESSMENT OF <i>IN VIVO</i> FOETOMATERNAL INTERFACE ANGIOGENESIS USING RGD-BASED FLUORESCENCE.	104
2.1.2 TARGETING CD44 RECEPTOR-POSITIVE LUNG TUMORS USING POLYSACCHARIDE-BASED NANOCARRIERS: INFLUENCE OF NANOPARTICLE SIZE AND ADMINISTRATION ROUTE.	105
2.1.3 ELECTROCHEMOTHERAPY GUIDED BY INTRAOPERATIVE FLUORESCENCE IMAGING FOR THE TREATMENT OF INOPERABLE PERITONEAL MICRO-METASTASES.	106
2.1.4 THE CRITICAL ROLE OF THE ZNF217 ONCOGENE IN PROMOTING BREAST CANCER METASTASIS TO THE BONE.	107
2.2 PROJETS DE DEVELOPPEMENT SUR LE VERSANT MICROCT	108
2.2.1 MYOCONDUCTIVE AND OSTEOCONDUCTIVE FREE-STANFING POLYSACCHARIDE MEMBRANES	108
2.2.2 ASSESSMENT OF POLYELECTROLYTE MULTILAYER FILM COATING LOADED WITH BMP-2 ON TITANIUM AND PEEK IMPLANTS IN THE RABBIT FEMORAL CONDYLE.	109
2.2.3 SURFACE DELIVERY OF TUNABLE DOSES OF BMP-2 FROM AN ADAPTABLE POLYMERIC SCAFFOLD INDUCES VOLUMETRIC BONE REGENERATION.	110

3 INTEGRATION DU MODULE DE FLUORESCENCE 3-D DANS UN APPAREIL D'IMAGERIE PRECLINIQUE MULTIMODALE, PHOTONIMAGER™ OPTIMA DE BIOSPACE LAB. **111**

ii. Imagerie Photoacoustique 112

<u>1 VALIDATION DE L'IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE PAR CONTRASTE ENDOGENE: FROM BENCH TO BEDSIDE. {ARTICLE EN PREPARATION}</u>	112
1.1 INTRODUCTION	114
1.2 MATERIAL & METHODS	114
A. PHOTOACOUSTIC SYSTEMS	114
B. PA MEASUREMENT STABILITY IN PHANTOMS	115
C. <i>IN VIVO</i> PHYSIOLOGICAL PARAMETER ACCURACY	116
D. IN HUMAN PHYSIOLOGICAL PARAMETER ACCURACY	117
1.3 RESULTS	117
A. PA MEASUREMENT STABILITY IN PHANTOMS	117
B. <i>IN VIVO</i> PHYSIOLOGICAL PARAMETER ACCURACY	118
C. IN HUMAN PHYSIOLOGICAL PARAMETER ACCURACY	122
1.4 DISCUSSION	124
1.5 BIBLIOGRAPHY	126
<u>2 EXPLORATION OF MELANOMA METASTASES IN MICE BRAINS USING ENDOGENOUS CONTRAST PHOTOACOUSTIC IMAGING {ARTICLE PUBLIE}</u>	128
<u>3 EXPLORATION OF VASCULAR DYSPLASIA BY PHOTOACOUSTIC IMAGING: AN EXAMPLE ON MULTIPLE BLUE RUBBER BLEB NEVUS {ARTICLE SOUMIS}</u>	135
<u>4 AMELIORATION DES CARACTERISTIQUES DE L'IMAGERIE PA PAR UNE APPROCHE D'ACQUISITION MULTI-ANGLES.</u>	144
4.1 MATERIEL ET METHODES	146
4.1.1 FANTOME	146
4.1.2 CALIBRATION DES PARAMETRES DE ROTATION DE L'IMAGE	146
4.1.3 AGENT DE CONTRASTE PHOTOACOUSTIQUE ET FLUORESCENT	148
4.1.4 EVALUATION DES CARACTERISTIQUES DU MODULE RCI <i>IN VIVO</i>	148
4.1.4.1 Imagerie ultrasonore et photoacoustique	148
4.1.4.2 Imagerie de fluorescence 2D	148
4.1.5 ANALYSES D'IMAGES	148
4.2 RESULTATS	149
4.2.1 EVALUATION DES CARACTERISTIQUES DU MODULE RCI SUR UN MODELE DE FANTOME	149
4.2.2 EVALUATION DES CARACTERISTIQUES DU MODULE RCI <i>IN VIVO</i> DANS DIFFERENTS ORGANES D'INTERET.	150
4.2.2.1 Reins	150
4.2.3 CERVEAU	153
4.3 DISCUSSION	155
<u>5 EVALUATION DE LA PERTINENCE DE L'UTILISATION D'UN MODULE D'ACQUISITION « CORPS ENTIER » EN IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE : BIODISTRIBUTION <i>IN VIVO</i> DU VERT D'INDOCYANINE.</u>	156
5.1 INTRODUCTION	156
5.2 MATERIEL ET METHODES	158
5.2.1 DESCRIPTION DU MODULE WB DEVELOPPE PAR FUJIFILM VISUALSONICS INC.	159
5.2.2 EVALUATION ET CALIBRATION DE L'HOMOGENEITE D'ILLUMINATION DU MODULE WB DANS UN FANTOME.	160
5.2.3 EVALUATION DU MODULE WB POUR REALISER LA BIODISTRIBUTION ET L'ETUDE D'ELIMINATION DU VERT D'INDOCYANINE (ICG) SUR SOURIS SAINES.	161
5.2.4 ANALYSES D'IMAGES	161

5.3	RESULTATS	162
5.3.1	EVALUATION DU MODULE WB ET DE L'HOMOGENEITE D'ILLUMINATION DANS UN FANTOME MIMANT LES PROPRIETES OPTIQUES DE L'ANIMAL.	162
5.3.2	EVALUATION DU MODULE WB POUR REALISER LA BIODISTRIBUTION ET L'ETUDE D'ELIMINATION DU VERT D'INDOCYANINE (ICG) SUR SOURIS SAINES.	162
5.4	DISCUSSION	164

iii. Fluorescence and multispectral photoacoustic imaging for the monitoring of liver metastases development {Article en préparation

167

1	INTRODUCTION	169
2	MATERIAL & METHODS	170
2.1	MOUSE MODEL OF LIVER METASTASES FROM COLORECTAL CANCER	170
2.2	<i>IN VIVO</i> BIOLUMINESCENCE IMAGING	170
2.3	CONTRAST AGENT PREPARATION	171
2.4	CONTRAST AGENT FLUORESCENCE AND PHOTOACOUSTIC DETECTABILITY	171
2.5	ICG BLOOD PHARMACOKINETICS	171
2.6	NON-INVASIVE PHOTOACOUSTIC IMAGING OF THE LIVER	172
2.7	COMBINED 3D FLUORESCENCE AND MICROCT IMAGING	172
2.8	<i>EX VIVO</i> FLUORESCENCE IMAGING AND HISTOLOGY	172
2.9	STATISTICAL ANALYSIS	173
3	RESULTS	174
3.1	MOUSE MODEL OF LIVER METASTASES FROM COLON CANCER	174
3.2	CONTRAST AGENT FLUORESCENCE AND PHOTOACOUSTIC DETECTABILITY	176
3.3	ICG BLOOD PHARMACOKINETICS	177
3.4	ICG LIVER KINETICS	178
3.5	NON-INVASIVE 3D MULTIMODAL IMAGING FOR LIVER METASTASES EXPLORATION: ANGIOSTAMP™800 vs. ICG	179
3.6	<i>IN VIVO</i> MULTISPECTRAL PHOTOACOUSTIC IMAGING	182
4	DISCUSSION	184
5	BIBLIOGRAPHY	187
	Conclusion	190

Liste des figures	193
Liste des tableaux	195
Bibliographie	195

Introduction

Ce manuscrit présente **une revue bibliographique** décrivant les bases de la formation des cancers, l'intérêt des modèles animaux en recherche et développement préclinique ainsi qu'une description des différentes modalités d'imagerie employées en recherche préclinique en oncologie. Les différences, les avantages et les inconvénients de chaque modalité d'imagerie sont ensuite discutés afin d'offrir un panorama des choix possibles dans ce domaine. Une attention plus particulière est portée aux modalités d'imagerie employées dans la partie expérimentale de ce travail de thèse.

Les modèles murins en oncologie sont un lien expérimental majeur entre la recherche fondamentale menée en laboratoire et le traitement des patients dans les services de soins. Que ce soit pour la recherche des bases génétiques de la transformation cellulaire, pour tester l'efficacité d'un nouveau traitement, ou encore pour valider une nouvelle approche d'imagerie à visée diagnostique, les modèles animaux permettent de tester les hypothèses de recherche dans un système biologique complexe (systèmes circulatoires, système immunitaire, organisation tissulaire, interactions tumeurs-microenvironnement, polarité cellulaire...) [1]. La majorité de ces aspects ne pouvant pas être reproduits dans des modèles cellulaires *in vitro*, la validation *in vivo* des hypothèses scientifiques d'un projet de recherche en oncologie demeure une étape essentielle de la translation clinique [2, 3].

L'imagerie *in vivo* du petit animal permet, à la différence des techniques conventionnelles de biopsie, microscopie et anatomopathologie, d'accéder à des paramètres anatomiques, physiologiques et à des processus moléculaires de façon non invasive et ainsi de visualiser et quantifier des événements au cours du temps au sein d'un animal vivant. L'imagerie représente donc aujourd'hui une approche de choix pour la recherche biomédicale ainsi que pour le développement pharmaceutique. Ces 15 dernières années, un large panel de systèmes d'imagerie préclinique a été développé afin de maximiser le potentiel des investigations sur ces modèles de cancer *in vivo*. Chaque modalité d'imagerie présente des caractéristiques spécifiques permettant de répondre à des problématiques diverses. Ainsi, pour chaque questionnement, il est essentiel d'identifier la ou les modalités permettant de répondre de façon optimale à la problématique de l'étude. Selon la modalité utilisée, on aura accès à des informations anatomiques et fonctionnelles comme avec l'IRM, le micro CT et les ultrasons, ou à des informations moléculaires, comme avec les techniques d'imagerie nucléaire et les techniques optiques. Les développements technologiques récents visent à associer plusieurs modalités d'imagerie afin de donner accès à plusieurs types d'informations et ainsi d'affiner les observations biologiques réalisées pour comprendre, avec le plus de précision possible, les mécanismes étudiés. **L'imagerie optique**, et plus particulièrement l'imagerie de fluorescence représente depuis presque 20 ans, une avancée majeure dans le domaine de l'imagerie moléculaire puisqu'elle permet d'accéder de façon non-invasive à des informations moléculaires et fonctionnelles grâce à l'utilisation d'agents de contraste ciblant l'expression de certains bio-marqueurs du développement tumoral. Plus récemment, l'imagerie de fluorescence en 3-D a permis de prendre en compte l'interaction

de la lumière avec les tissus biologiques afin de proposer une approche quantitative des données de fluorescence. Dans le cadre d'une collaboration avec le CEA LETI (Grenoble), OPTIMAL a participé au développement d'une technologie innovante permettant l'imagerie de fluorescence non-invasive et quantitative en 3 dimensions chez le petit animal (TomoFluo). Cet instrument a été installé à l'état de prototype sur le plateau technique d'OPTIMAL et a permis la réalisation d'études biologiques qui ont donné lieu à des publications scientifiques. C'est à ce stade de développement de la technologie TomoFluo qu'a débuté mon travail au laboratoire.

Dans la première partie du travail expérimental, la combinaison de l'imagerie de fluorescence 3-D avec l'imagerie microCT est mise en œuvre dans le but d'apporter une dimension anatomique aux données de fluorescence. Cette méthodologie bimodale est développée et caractérisée *in vivo* chez la souris puis exploitée pour l'exploration de différents modèles animaux de cancers pulmonaires représentant chacun spécifiquement une ou plusieurs étapes du développement tumoral primaire jusqu'à l'invasion métastatique. Les travaux de R&D réalisés dans cette première partie ont également débouché sur de nombreuses collaborations démontrant le fort potentiel de cette approche d'imagerie dans des domaines variés et ces résultats ont été publiés dans des revues internationales. Ces articles sont brièvement décrits dans ce manuscrit.

La société Biospace Lab, qui commercialise une gamme d'instruments issus de technologies brevetées et dédiés à l'imagerie préclinique chez le petit animal, a récemment acquis les droits d'exploitation du brevet relatif à cet instrument (TomoFluo) afin de l'intégrer dans un système d'imagerie optique multimodale. C'est dans ce contexte que j'ai obtenu une bourse de thèse CIFRE (Convention industrielle de formation par la recherche) afin de réaliser la caractérisation de ce système d'imagerie optique multimodale pour des applications biologiques *in vivo* chez le petit animal. L'implémentation du module TomoFluo représente un défi technique important et les nombreux problèmes d'*hardware* et de *software* rencontrés ont retardé le travail de caractérisation *in vivo*. Pour ces raisons, mon sujet de recherche s'est élargi et je me suis impliqué dans la mise en œuvre et le développement d'applications biologiques pour une nouvelle modalité d'imagerie, l'imagerie photoacoustique.

L'imagerie photoacoustique est une technologie très récente qui combine les atouts respectifs de l'imagerie optique (haute sensibilité) et de l'imagerie ultrasonore (haute résolution et capacité à atteindre des tissus à des profondeurs de plusieurs centimètres). La capacité de l'imagerie photoacoustique à générer une image contrastée des tissus en combinant une haute résolution spatiale et la pénétration en profondeur dans les tissus est unique et représente un avantage important par rapport à l'imagerie optique [4, 5]. Un autre aspect intéressant de l'imagerie photoacoustique est sa capacité à collecter des informations fonctionnelles sans nécessairement utiliser d'agents de contraste exogènes [6], *via* le contraste photoacoustique endogène des tissus. Notamment, il est possible d'extraire une carte du contenu en hémoglobine (reflet de la vascularisation) et de l'oxygénation des tissus *in vivo* de façon non-invasive et en temps réel. Toutefois, le recours à, l'utilisation d'agents

de contraste est possible pour obtenir des informations moléculaires spécifiques en complément des informations anatomiques et fonctionnelles évoquées précédemment.

Dans la seconde partie du travail expérimental, l'évaluation de la fiabilité des mesures réalisées par le système d'imagerie photoacoustique Visualsonics est présentée. L'intérêt des informations biologiques obtenues par mesure du contraste endogène est ensuite étudié dans un modèle de métastases cérébrales de mélanome chez la souris ainsi que chez un patient atteint de malformations vasculaires cutanées.

En parallèle des études biologiques, **des développements technologiques** en imagerie photoacoustique (dispositif pour l'imagerie corps entier et approche tomographique multi-angles) sont mis en œuvre en vue d'améliorer le potentiel applicatif de cette modalité d'imagerie à la recherche préclinique.

Dans la troisième partie, j'ai assemblé les modalités d'imagerie étudiées dans les deux premières parties et combiné les avantages respectifs de l'imagerie de fluorescence 3-D couplée au microCT et de l'imagerie photoacoustique par contrastes endogène et exogène pour caractériser finement le développement tumoral de métastases hépatiques d'origine colique chez la souris.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de la plateforme d'imagerie optique du petit animal OPTIMAL sous la direction des Drs Véronique Josserand, Nicolas Carvou et Annie Molla au sein de l'équipe de recherche du Dr Jean-Luc Coll dont la thématique est « Thérapies ciblées, diagnostic précoce et imagerie du cancer » à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB), centre de recherche labellisé Université Grenoble Alpes (UGA), Inserm (U1209) et CNRS (UMR5309). Ce travail de thèse a été financé par la société Biospace Lab. (Nesles la vallée, France) et l'Agence Nationale de Recherche et de Technologie dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE). Ce travail a été valorisé par huit publications dans des revues internationales à comité de lecture, dont une en premier auteur et par des communications orales et affichées dans des congrès nationaux et internationaux.

I. Recherche Bibliographique

1 Le Cancer

1.1 L'importance de la prise en charge du cancer : données épidémiologiques

Selon les dernières estimations officielles de l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (International Agency for Research on Cancer, IARC) un cancer a été diagnostiqué chez 14,1 millions de personnes et a causé 8,2 millions de décès à travers le monde en 2012 tous sexes confondus (Globocan 2012) (Figure 1). En France, on estime à environ 400 000 le nombre de nouveaux cas de cancer détectés et à 150 000 décès par cancer pour l'année 2017 (INCA 2017). Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués sont ceux du poumon (1,8 millions de cas), du sein principalement chez la femme (1,7 millions de cas) et le cancer colorectal (1,4 millions de cas). Le cancer responsable du plus grand nombre de décès est celui du poumon avec 1,6 millions de décès dans le monde (Globocan 2012).

Le cancer constitue la deuxième cause de décès dans le monde après les maladies cardiovasculaires et a fait 8,8 millions de morts en 2015. Près d'un décès sur 6 est dû au cancer. Cette pathologie est un enjeu de santé publique mondiale majeur, mais également d'une importance cruciale au niveau macro-économique puisqu'on estime à 1,16 milliard de dollars le coût annuel de la prise en charge des cancers (WHO 2018).

Nombre estimé (Incidence et mortalité) des différents types de cancer dans le monde en 2012

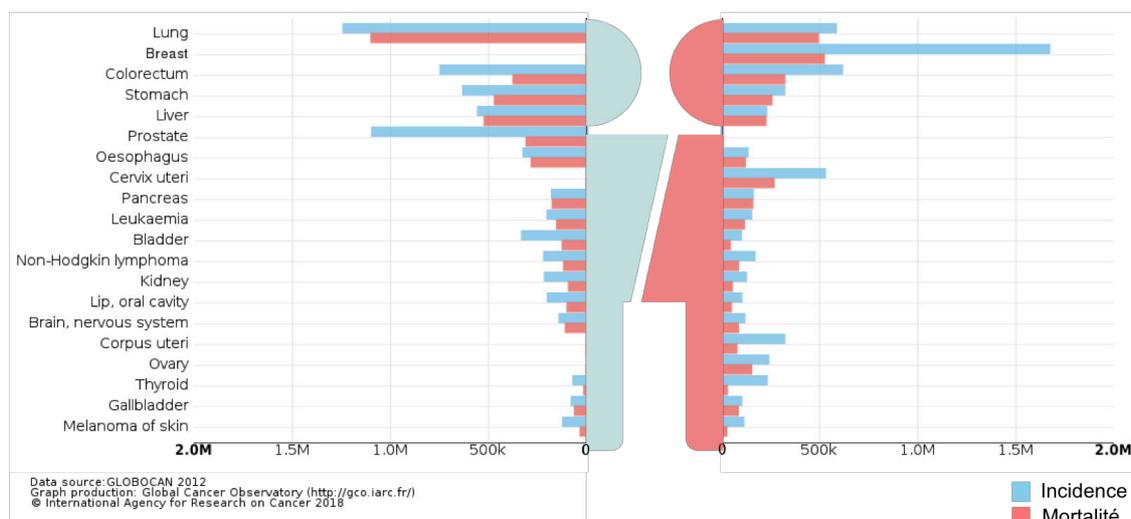


Figure 1 Estimation de l'incidence et de la mortalité en fonction des différentes localisations cancéreuses pour les hommes et les femmes dans le monde en 2012. Source IARC 2018

1.1 Les facteurs de risques du cancer

Le développement du cancer peut résulter de la combinaison de plusieurs facteurs : génétiques, environnementaux et comportementaux.

1.1.1 Les facteurs de risques comportementaux

Le tabac est la principale cause de développement du cancer partout dans le monde (National Center for Chronic disease Prevention and Health Promotion (US) Office on smoking and health). En effet il est, selon les estimations, attribuable à plus de 30 % des cas de cancer pulmonaire, des voies aéro-digestives supérieures (VADS), des reins, de la vessie, du pancréas, de l'estomac, du colon et du rectum, du foie et de la moelle osseuse. [7-10]. Plus particulièrement, 87 % des décès faisant suite à un cancer pulmonaire seraient imputable à la consommation de tabac. Un fumeur a ainsi une probabilité augmentée de 20% comparativement à une personne non fumeuse, de développer un cancer du poumon au cours de sa vie [11]. L'IARC a recensé à ce jour, plus de 60 molécules carcinogènes dans les composants de la cigarette [12].

La deuxième cause comportementale de décès par cancer est la **consommation excessive d'alcool**. Un lien a été établi entre une consommation forte d'alcool (tous types d'alcool confondus) et l'apparition de cancers des VADS, du foie et du tractus digestif [13, 14].

Les mauvaises habitudes alimentaires seraient également une cause de cancer [15]. Plus particulièrement, une consommation excessive de viandes rouges et de sel et un régime pauvre en fruits et légumes augmenteraient le risque de développer un cancer au niveau du tractus digestif, mais également au niveau pulmonaire et mammaire [16].

1.1.2 Les infections chroniques

Certains cancers sont également causés, avec une forte incidence dans les pays en voie de développement, par **des agents infectieux** (15-18 %) comme les bactéries (*Helicobacter pylori* attribuable à de nombreux cancers gastriques) [17], mais également les virus comme le papillomavirus (cancer du col de l'utérus), les virus de l'hépatite B et C (carcinomes hépatocellulaires), le virus d'Epstein-Barr (lymphomes et carcinomes du rhino-pharynx), l'Herpesvirus humain de type 8 (sarcomes de Kaposi), le virus T-lymphotrope humain (leucémies et lymphomes T chez le sujet adulte) et le virus de l'immunodéficience humaine (sarcomes de Kaposi et lymphomes) (IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Hepatitis...). Plus anecdotique, certains parasites sont à l'origine de cancers comme *Opisthorchis viverrini* et *Schistosoma haematobium* pouvant causer respectivement des cholangiocarcinomes et des cancers de la vessie [17].

1.1.3 Les expositions professionnelles

Les expositions professionnelles à des substances cancérigènes seraient attribuables à environ 18 % des cas de cancers broncho-pulmonaires (expositions à l'amiante pour la majorité des cas avérés), entre 5 et 25 % des cas de cancers de la vessie (expositions à des amines aromatiques ou au goudron), environ 25% des cancers naso-sinusiens (expositions aux chlorures de vinyl) et entre 5 et 10 % des leucémies (expositions au benzène ou à des rayonnements ionisants) (http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2003/cancers_pro/rapport_cancer_pro.pdf). Ces expositions sont cependant assez dépendantes du degré d'industrialisation du pays concerné et restent de nos jours très peu référencées.

1.1.4 La pollution environnementale

La pollution environnementale serait à l'origine d'environ 2 % des cancers et principalement des cancers du poumon (IARC Monographs causes of cancer). Les polluants retrouvés sont domestiques (huiles et charbons de cuisson, chauffage) [18] ou atmosphériques (véhicules motorisés, pollution industrielle) [19].

1.1.5 Les facteurs héréditaires

Un autre facteur imputable dans plus de 10 % des cas de cancers est la **prédisposition génétique**. En effet, les personnes avec des antécédents familiaux de cancer pulmonaire auraient entre 2 et 4 fois plus de risque de développer également ce cancer [20].

Certains cancers peuvent en effet être associés à une ou plusieurs altérations génétiques constitutives. Par exemple, le syndrome de Lynch qui est à l'origine d'environ 3 % des cancers colorectaux résulte d'une anomalie des gènes responsables de la réparation de l'ADN (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*). Les patients qui présentent de telles mutations ont un risque de développer dans 30 à 48 % un cancer colorectal, dans 5 à 10 % un cancer de l'ovaire et dans 30 à 54 % un cancer de l'endomètre, avant l'âge de 70 ans. On peut également mentionner que 5 à 10 % des cancers du sein sont liées à une mutation héréditaire du gène *BRCA1* (Breast Cancer Gene 1) ou *BRCA2*. Les patientes qui présentent une de ces deux mutations ont entre 46 à 87 % de risque de développer un cancer du sein au cours de leur vie [21].

1.2 La formation des cancers : la carcinogenèse

La carcinogenèse est un processus qui inclut trois étapes [22] :

- **L'initiation** qui correspond à l'émergence d'anomalies génétiques ou épigénétiques au niveau cellulaire. Ces anomalies apparaissent de façon spontanée par transmission d'un caractère héréditaire ou sont induites par un agent carcinogène (Cf. § précédents). Dans la plupart des cas la cellule endommagée fait une pause et active les systèmes de réparation de l'ADN (ATR, ATM, Parp). Si les dérégulations s'accumulent et impactent un ou plusieurs gènes responsables du maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire (oncogènes et/ou gènes suppresseurs de tumeurs) les cellules peuvent, par perte de l'équilibre entre signaux prolifératifs et antiprolifératifs, se multiplier de façon anarchique.
- **La promotion** est la phase durant laquelle la proportion de clones cellulaires présentant les anomalies s'accroît. Les cellules mères, présentant les anomalies, transmettent, lors de la division cellulaire, ces caractères anormaux aux cellules filles. De plus, de nouvelles mutations apparaissent et permettent aux cellules de détourner le métabolisme à leur profit et d'échapper à tout contrôle de l'organisme.
- **La progression** est la phase avancée du développement pathologique lors de laquelle les cellules perdent leurs caractères de différenciation et forment un amas cellulaire d'architecture anormale qui envahit les structures voisines. Lors de cette phase de développement, les cellules peuvent perdre leur cohésion et entrer dans le flux sanguin et/ou lymphatique pour former des métastases dans des organes distants. Lors de l'ensemble de ce processus, les cellules tumorales acquièrent des propriétés biologiques nouvelles, caractéristiques des cellules cancéreuses et décrites par Hanahan et Weinberg en 2001 [23], puis étendues en 2011 [24] (Figure 2) :

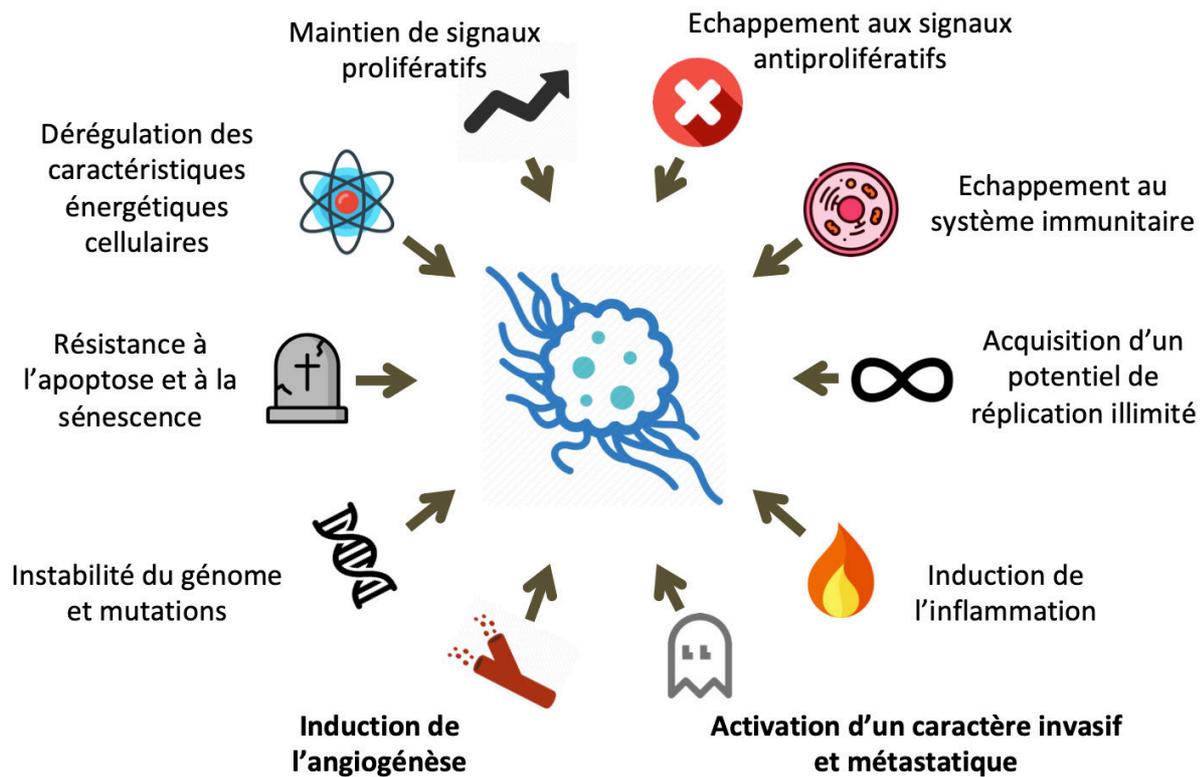


Figure 2 Les caractéristiques biologiques des cellules cancéreuses, d'après Hanahan et Wielberg 2011 [24]

Parmi ces propriétés, comme illustré sur la Figure 2, on peut citer :

- Instabilité du génome et mutations
- Résistance à l'apoptose et à la sénescence
- Dérégulation des caractéristiques énergétiques cellulaires
- Maintien de signaux prolifératifs
- Echappement aux signaux antiprolifératifs
- Echappement au système immunitaire
- Acquisition d'un potentiel de réplication illimité
- Induction de l'inflammation
- Activation d'un caractère invasif et métastatique
- Promotion de l'angiogenèse (création de nouveaux vaisseaux pour alimenter la tumeur en nutriments et en oxygène)

Nous décrivons par la suite les caractéristiques propres à chaque phase de la transformation.

1.2.1 Phase d'initiation de la carcinogenèse

Comme décrit dans le paragraphe précédent, des anomalies génétiques induisent la formation de cancers. Ces anomalies sont présentes principalement sur deux types de gènes : les proto-

oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. La carcinogenèse peut résulter de l'activation d'un proto-oncogène et (ou) de l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur [22].

Les proto oncogènes sont des gènes qui possèdent un potentiel à devenir des oncogènes, c'est-à-dire menant à la formation des tumeurs lorsqu'ils sont mutés. Dans un contexte physiologique, les protéines codées par les proto-oncogènes sont régulées par la cellule, mais elles sont activées de façon anormale lors de la carcinogenèse, leur activation permet à la cellule de se répliquer indépendamment de la présence de signaux extracellulaires et d'activer les voies de prolifération. Par exemple la β -caténine mutée n'est plus ubiquitinylée, donc pas dégradée et elle s'accumule dans le cytoplasme, mais va également être transloquée dans le noyau où elle active l'expression d'un grand nombre de gènes cibles. Cependant, l'activation de ces proto-oncogènes ne représente pas à elle seule une condition suffisante pour induire la carcinogenèse. Il a été montré que l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs est également requise pour empêcher une restauration de l'activité des gènes évoqués ci dessus [22].

Ces gènes suppresseurs de tumeurs (également appelés, pour certains d'entre eux, « gardiens du génome ») sont les garants de l'intégrité de la cellule en cas d'évènements mitotiques aberrants. Deux mécanismes principaux de surveillance sont mis en œuvre, au cours du cycle cellulaire, les voies pRB/p16^{INK4A} et p53/p19^{ARF} [25-27]. Lors de l'activation anormale des voies de prolifération PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase/Protéine Kinase B) et Ras-ERK/MAPK (Mitogen-activated protein kinases), le niveau d'expression des protéines suppresseurs de tumeur augmente et elles inhibent la prolifération et privilégient l'entrée de la cellule en apoptose. Parmi les gènes suppresseurs de tumeurs, certains participent à la réparation de l'ADN comme *BRCA1* et *BRCA2* et leur inactivation induit des cancers du sein et de l'ovaire.

Au cours de la carcinogenèse, l'inactivation de ces voies permet donc à la cellule d'échapper à la mort et lui confère un caractère répliatif illimité [28]. L'immortalisation cellulaire se fait également par le maintien de la longueur des télomères qui permet à la cellule de ne pas être limitée dans le nombre de division. En effet, lors du processus de tumorigenèse, l'activité de la télomérase (enzyme maintenant la longueur des télomères) est élevée. Cette activité télomérase est en lien avec l'inactivation des voies pRB/p16^{INK4A} et p53/p19^{ARF} dans le processus d'immortalisation cellulaire.

Les principaux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs sont répertoriés dans le tableau 1.

Tableau 1 Proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la carcinogenèse

Gène	Localisation chromosomique	Fonction de la protéine	Cancers associés à une mutation du gène
Proto-oncogènes			
<i>Facteurs de croissance</i>			
<i>FGF3</i>	11q13.3		Divers
<i>FGF4</i>	11q13.3		Sarcomes de Kaposi, cancer de l'estomac
<i>PDGFB</i>	22q13.1		Méningiomes, Fibrosarcomes

Récepteurs pour les facteurs de croissance			
<i>CSF1R</i>	5q32		Cancers myéloïdes
<i>EGFR (ERBB)</i>	7q11.2		Divers
<i>ERBB2 (HER2, NEU)</i>	17q12		Cancers du sein, des ovaires
<i>KIT</i>	4q12		Cancers gastro-intestinaux
<i>MET</i>	7q13.2		Cancers du rein
<i>NTRK1</i>	1q23.1		Cancers de la thyroïde
<i>RET</i>	10q11.21		Cancers de la thyroïde
<i>MASI</i>	6q25.3		Carcinomes épidermoïdes
Transducteurs de signal			
<i>ABL1</i>	9q34.12		Leucémies myéloïdes chroniques, Leucémies lymphoblastiques aiguës
<i>FES</i>	15q26.1		N.C.
<i>SRC</i>	20q11.23		Cancers du colon
<i>GNAS</i>	20q13.32		Adénomes hypophysaires
<i>HRAS</i>	11p15.5		Cancers de la vessie et carcinomes thyroïdiens
<i>KRAS</i>	12p12.1		Cancers du sein; des poumons et carcinomes pancréatiques
<i>NRAS</i>	1p13.2		Carcinomes thyroïdiens, cancer colorectaux
<i>P1M1</i>	6q21.2		Lymphomes
<i>RAF1</i>	3p25.2		Cancers de l'estomac, des reins

Gènes suppresseurs de tumeurs			
<i>RB1</i>	13q14.2	Régulateur transcriptionnelle du cycle cellulaire	Rétinoblastome, ostéosarcomes
<i>WT1</i>	11p13	Régulateur transcriptionnelle	Néphroblastomes
<i>TP53</i>	17p13.1	Régulateur transcriptionnelle, arrêt de croissance, apoptose	Sarcomes, cancers du sein, tumeurs cérébrales, 50 % de tous les cancers
<i>NF1</i>	17q11.2	Régulateur négatif de la voie de signalisation RAS	Leucémies juvéniles, neurofibromes, sarcomes, gliomes
<i>NF2</i>	22q12.2	Protéine ERM, régulateur du cytosquelette, régulateur de la protéolyse	Méningiomes
<i>VHL</i>	3p25.3	Régulateur de la protéolyse	Hémangioblastomes, carcinomes rénaux
<i>APC</i>	5q22.2	Se lie et régule l'activité de la bêta-caténine	Cancers du colon
<i>CDKN2A</i>	9p21.3	Stabilise p53	Divers
<i>PTCH1</i>	9q22.32	Récepteur du sonic hedgehog	Médulloblastomes
<i>BRCA1</i>	17q21.31	Régule la transcription, répare l'ADN	Cancers du sein, des ovaires
<i>BRCA2</i>	13q13.1	Régule la transcription, répare l'ADN	Cancers du sein, des ovaires
<i>SMAD4</i>	18q21.2	Transducteur du TGF bêta	Cancers gastro-intestinaux
<i>FHIT</i>	3p14.2	Hydrolase des nucléosides	Cancers des poumons, de l'estomac, des reins et du col de l'utérus
<i>PTEN</i>	10q23.31	Phosphatase	Cancers de la prostate, glioblastome, cancers du sein
<i>TSC2</i>	16p13.3	Régulateur du cycle cellulaire	Cancers du rein, du cerveau
<i>STK11</i>	19p13.3	Sérine/thréonine kinase	Cancers du sein et cancers colorectal
<i>MSH2</i>	2p21	Réparation des décalages de l'ADN	Cancers colorectaux
<i>MLH1</i>	3p22.2	Réparation des décalages de l'ADN	Cancers colorectaux
<i>PMS1</i>	2q32.2	Réparation des décalages de l'ADN	Cancers colorectaux
<i>PMS2</i>	7p22.1	Réparation des décalages de l'ADN	Cancers colorectaux

Les principaux mécanismes impliqués dans l'initiation de la carcinogénèse sont résumés dans la Figure 3.

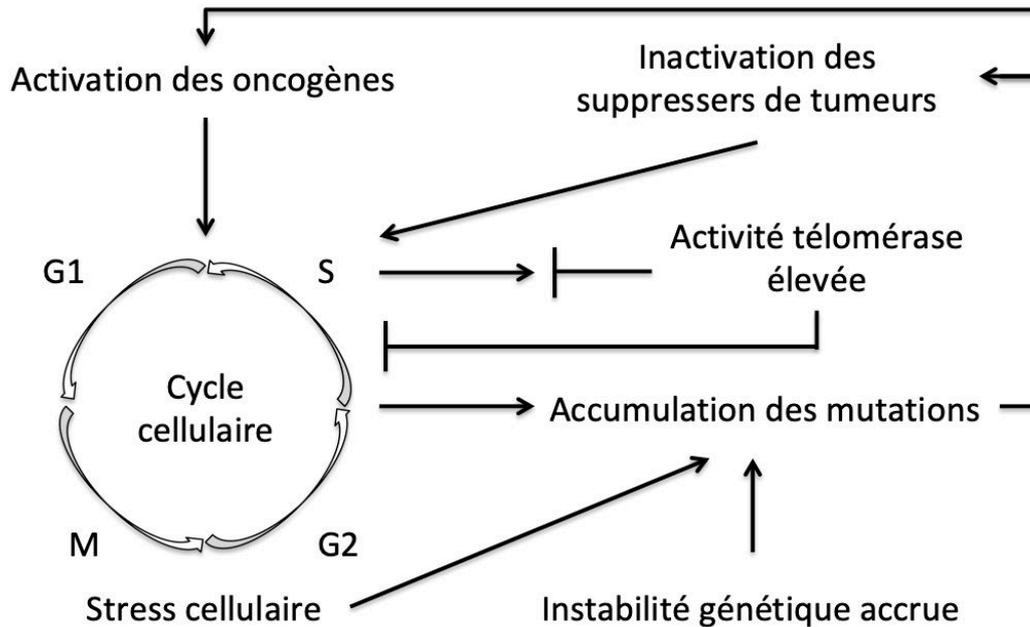


Figure 3 Les mécanismes d'initiation de la carcinogénèse

En résumé, l'accumulation d'instabilité génétique contribue à la formation et à la progression des tumeurs par perte de contrôle de la prolifération et à l'immortalisation cellulaire qui précède la phase de promotion de la carcinogénèse.

1.2.2 Phase de promotion de la carcinogénèse

La phase de promotion correspond à la prolifération anormale de clones cellulaires qui présentent des anomalies géniques. Cette multiplication cellulaire s'accompagne de nouvelles mutations sur l'ADN et souvent d'une instabilité chromosomique accrue. Progressivement les cellules cancéreuses échappent aux différents contrôles de l'organisme (réparation de l'ADN, entrée en sénescence ou en apoptose). Les cellules tumorales acquièrent ainsi une indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération par sécrétion autocrine de facteurs de croissances ainsi que par modulation des signaux d'expression de récepteurs extracellulaires. Cette indépendance additionnée à des conditions défavorables du microenvironnement tumoral participe à l'induction de l'angiogénèse tumorale [29]. La création d'un réseau vasculaire mature et organisé apparaît, en effet, comme un élément essentiel au cours du développement et pour le maintien de l'homéostasie tissulaire, mais est également associée à la promotion du cancer. Cette production de nouveaux vaisseaux apparaît comme une étape clef de l'apport en nutriments et en oxygène à la tumeur. Il est en effet admis qu'une tumeur d'une taille supérieure à 1-3 mm³ devient hypoxique et ne peut pas croître sans la mise en

place de ce réseau vasculaire [30]. Nous décrivons en détail ce processus clé la tumorigenèse dans un chapitre dédié.

1.3 L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est décrite comme le processus de développement de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux existants. Ce phénomène physiologique est également impliqué dans de nombreuses pathologies (arthrite, endométriose, asthme, rétinopathies, psoriasis, allergies, obésité, malformations artério-veineuse (MAV), maladies auto immunes et cancers). Nous décrivons plus particulièrement l'angiogenèse tumorale.

L'angiogenèse dépend de l'équilibre entre des molécules pro-angiogéniques (les facteurs de croissance : VEGF (endothélial vasculaire), FGF (fibroblastique) et EGF (épithélial), et anti-angiogéniques (interférons, angiostatine, endostatine, thrombospondine-1) [24, 31]. Ce processus peut également se mettre en place sous l'influence de stress métaboliques (hypoglycémie, acidose, hypoxie) ou de stress mécaniques comme la pression exercée par la prolifération des cellules tumorales. Lorsque la balance varie en faveur des facteurs « pro-», les cellules endothéliales à proximité du foyer tumoral sont activées et des néo-vaisseaux se forment selon le mécanisme d'angiogénèse par bourgeonnement (Figure 4, droite) décrit ci dessous.

Le VEGF et l'angiopoïétine 2 (Ang-2) sont sécrétés par les cellules de l'endothélium activées, ils augmentent la perméabilité vasculaire et conduisent à une perte de contact cellule-cellule. Les cellules de l'endothélium produisent des protéases qui dégradent la lame basale et ainsi, elles migrent vers l'origine des stimuli angiogéniques par chimiotactisme et prolifèrent sous l'influence des signaux induits par le VEGF lié à son récepteur le VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor). Les cellules endothéliales se différencient en capillaires dépourvus de paroi péri-vasculaire. Les cellules sont ensuite recrutées par le TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1), le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et l'angiopoïétine 1 afin de former un réseau fonctionnel irriguant la zone de tissu en développement. Pour être mature, ce réseau vasculaire nouvellement formé requiert la mise en place d'interactions entre cellules vasculaires et péri-vasculaires et la matrice extracellulaire (MEC) La maturation du réseau vasculaire dépend de divers facteurs de croissance comme le PDGF et le TGF β [32].

Le processus angiogénique constitue une étape essentielle pour le développement des cancers. En effet, de la même façon que les tissus sains, les tumeurs ont besoin d'un réseau vasculaire afin d'être approvisionnées en nutriments et en oxygène, mais également pour évacuer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone. Il existe plusieurs types de mécanismes qui peuvent aboutir à la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux et il a été démontré qu'au-delà d'une certaine taille, une tumeur ne peut pas croître sans néo-angiogenèse. En effet, lorsque les cellules tumorales se multiplient, une partie du foyer tumoral se trouve à distance des vaisseaux existants et la diffusion passive des nutriments et de l'oxygène n'est plus

suffisante pour la tumeur en croissance. Ces cellules deviennent alors hypoxiques et sécrètent les facteurs de transcription nécessaires à la mise en place du maintien de l'homéostasie tumorale tels que l'HIF (Hypoxia inducible factor) [33, 34] ainsi que des facteurs de croissances (VEFG, PDGF, FGF, EGF) (Figure 4). Un « switch angiogénique » se produit et sous l'effet de stimuli, la tumeur va sécréter des facteurs pro-angiogéniques qui permettent de recruter de nouveaux vaisseaux [35-37] (Figure 4).

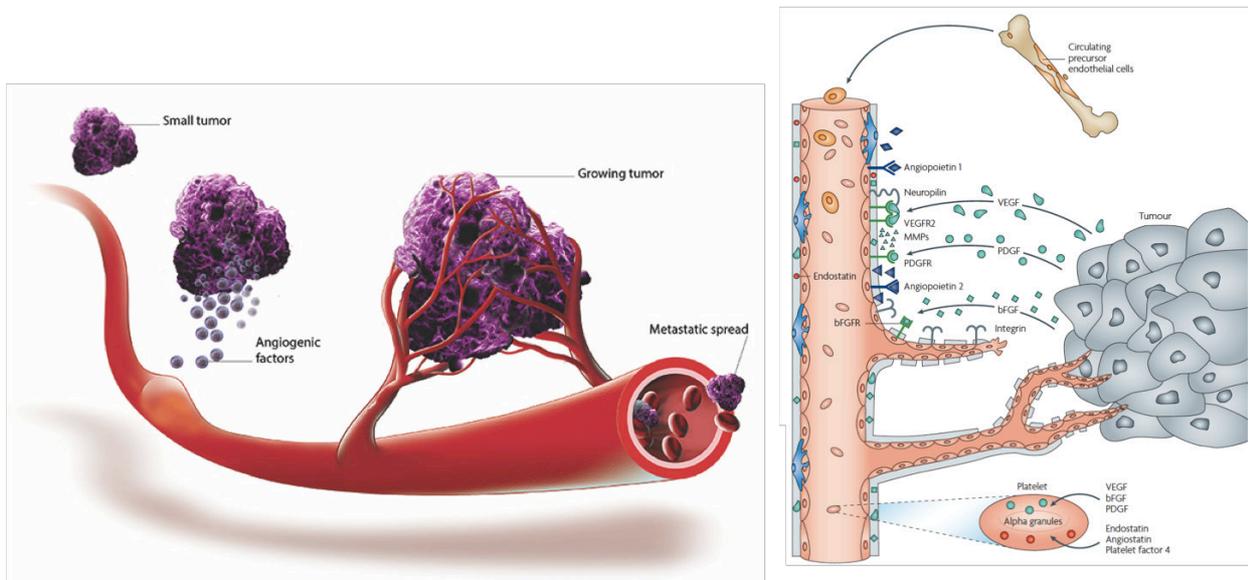


Figure 4 Les étapes principales de la mise en place de l'angiogenèse tumorale ©medicalartwork.co.uk. D'après, Folkman 2007 [38]

1.3.1 Les facteurs angiogéniques

Parmi les facteurs angiogéniques nous nous intéresserons plus particulièrement aux facteurs de croissance VEGF et FGF. Nous décrirons également le rôle de l'hypoxie et la matrice extracellulaire (MEC) dans la mise en place des néo-vaisseaux tumoraux.

a. VEGF

Le terme VEGF regroupe 5 protéines dont VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, IVEGF-D et PIGF (Placental Growth Factor). VEGF-A, est majoritaire et est sécrété par les organes très vascularisés (foie, cœur, glandes surrénales) ou dans une situation pathologique par les cellules tumorales. Le VEGF peut être sécrété lors d'un stress induit par l'hypoxie cellulaire, par certaines cytokines (TGF- α par exemple) ainsi que lors de la transformation et la différenciation cellulaire. Le VEGF est le facteur de croissance impliqué dans la carcinogenèse le mieux caractérisé car il est surexprimé par les cellules tumorales dans de nombreux types de cancer. VEGF, comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents, a un rôle central dans la formation des vaisseaux sanguins dans des conditions aussi bien physiologiques que pathologiques. De plus,

VEGF est mitogène (induction de la mitose) et participe à l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux [39, 40]. Il est capable d'agir de façon synergique avec certaines intégrines ($\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 3$ et sous unité $\beta 1$) dans la voie PI3K [41]. En effet, VEGF est capable d'interagir spécifiquement avec l'un des substrats des intégrines, la vitronectine, et d'être un médiateur de l'adhérence et de la migration cellulaire [42]. Des stratégies thérapeutiques ont ainsi été mises en œuvre pour décroître le taux de VEGF, comme l'anticorps monoclonal, bevacizumab, commercialisé par la société ROCHE sous le nom d'AVASTIN®.

b. FGF

Une vingtaine de protéines sont regroupées sous le nom FGF. Ces protéines ont pour rôle d'agir sur les récepteurs à activité tyrosine kinase, comme FGF1-R et FGFR-2 et d'exercer un effet mitogène et chimiotactique sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les fibroblastes. Il peut également avoir un effet synergique avec VEGF [43].

c. L'hypoxie tumorale

L'hypoxie correspond à un niveau bas et non-physiologique d'oxygène, c'est un phénomène complexe et impliqué fortement dans le développement tumoral.

Généralement, on parle d'hypoxie lorsque le niveau d'oxygène est plus faible que celui du tissu sain environnant, ce niveau dépend du taux initial d'oxygène dans le tissu où se développe la tumeur, du stade de développement et de la taille de la masse tumorale. L'hypoxie tumorale participe à l'angiogenèse tumorale et à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux qui a pour résultat une mobilité accrue des cellules et la formation de métastases. L'hypoxie altère le métabolisme cellulaire et contribue à la résistance des tumeurs à des chimio-thérapies (Figure 5).

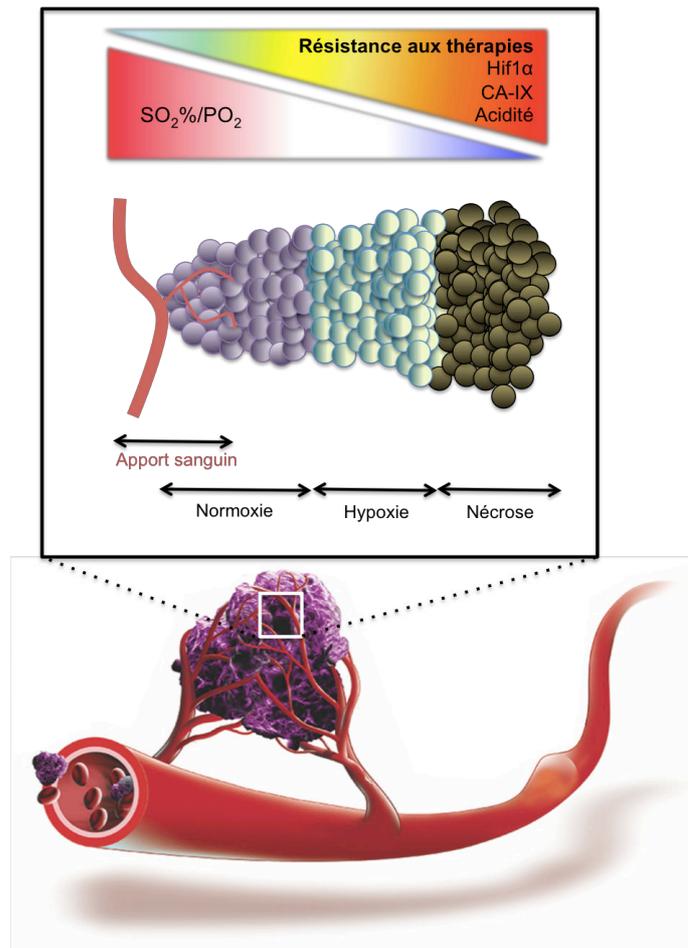


Figure 5 Schéma de la diffusion de l'oxygène au travers du tissu tumoral.
©medicalartwork.co.uk

On peut distinguer trois types d'hypoxie :

- **L'hypoxie chronique** résulte de l'augmentation de la distance entre les cellules tumorales et les vaisseaux sanguins et ne permet pas une diffusion suffisante de l'oxygène (Figure 5). Ce type particulier d'hypoxie s'initie lorsque le foyer tumoral croît rapidement [44].
- **L'hypoxie anémique** résulte de la réduction de l'efficacité du transport de l'oxygène par l'hémoglobine. Un taux en hémoglobine faible pourrait être impliqué dans l'hypoxie tumorale [44, 45].
- **L'hypoxie aiguë** est entraînée par un afflux sanguin insuffisant vers le tissu. Cet effet résulte d'une prolifération rapide et d'une vascularisation tumorale anormale (dilatation et mauvaise organisation du réseau vasculaire, défauts de fenestration endothéliale) qui provoquent une chute de la pression vasculaire et empêche le sang d'être acheminé correctement vers la tumeur [44].

L'hypoxie intervient dans des voies de signalisation cellulaire complexes qui impliquent de nombreux acteurs, tels que le facteur HIF (Hypoxia-Inducible Factor), l'activation des voies de prolifération P13K/AKT, MAPK ou du facteur de transcription NFκB, qui interagissent ensemble

pour faire augmenter ou atténuer les effets de l'hypoxie. L'ensemble des voies de prolifération, de survie, d'apoptose, de métabolisme, de migrations et d'inflammation sont impliquées. Parmi les facteurs essentiels nous décrivons Hif (Hypoxic-Inducible Factor), l'anhydrase carbonique 9 et un transporteur du glucose Glut1.

- *Hif (hypoxic-inducible factor)*

L'adaptation cellulaire à l'hypoxie se fait par l'intermédiaire d'une famille de régulateurs transcriptionnels « HIF ». L'induction de l'hypoxie et la stabilisation des sous-unités d'HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α) sont régulées par des « capteurs d'oxygène », les enzymes PHD et FIH-1 dont l'activité est oxygène-dépendante. Dans une cellule oxygénée, les sous unités HIF- α sont hydrolysées par ces enzymes. Lorsque le niveau d'oxygène diminue, les enzymes sont inactivées et l'hydrolyse d'HIF- α est inhibée. Les sous unités HIF- α non dégradées sont ensuite transloquées dans le noyau, où elles sont dimérisées en sous unités HIF- β qui se lient à l'ADN afin d'initier la transcription de gènes des voies de signalisation adaptatives ; La prolifération tumorale est ainsi stimulée *via* le VEGF et l'induction de l'angiogenèse. Hif régule aussi le pH intracellulaire *via* l'anhydrase carbonique 9 (CAIX), le métabolisme du glucose *via* le transporteur de glucose GLUT-1 qui est surexprimé en réponse au statut hypoxique des tumeurs [46], mais également la prolifération, la survie cellulaire et l'apoptose. De plus, HIF présente un récepteur modifié qui lui permet de se lier au facteur von Hippel-Lindau, un facteur de la suppression tumorale, et d'empêcher ainsi sa dégradation. HIF est donc indirectement un facteur favorisant la croissance tumorale [47].

- *Anhydrase carbonique 9 (carbonic anhydrase 9, CA9 ou CA IX)*

Cette enzyme catalyse la réaction entre un anion HCO_3^- (bicarbonate) et le CO_2 (dioxyde de carbone). Son expression est régulée par la pression en oxygène, lorsque la pression en oxygène se trouve en dessous de 20 mm de Mercure, le niveau d'expression de l'enzyme augmente [48, 49]. En conditions hypoxiques, CAIX joue un rôle dans l'acidification de la tumeur, c'est un facteur de mauvais pronostic pour les patients puisque son action entraverait l'efficacité de certains traitements.

- *Glut-1*

Glut-1 est un complexe protéique transmembranaire qui est impliqué dans le transport du glucose dans la cellule. Sous l'effet de l'hypoxie, la respiration cellulaire est accélérée et afin de palier la consommation importante de glucose, le transporteur est sur-exprimé. Comme pour CAIX, l'identification de ce marqueur est un facteur de mauvais pronostic puisqu'il induit une faible réponse à certains traitements [50, 51].

d. La matrice extra-cellulaire (MEC)

La MEC est un facteur important lors de la mise en place de l'angiogenèse tumorale car elle fournit les points d'ancrage essentiels aux cellules endothéliales lorsque celles-ci migrent. La MEC est composée de collagène I et IV, de lamine, de protéoglycanes mais aussi de fibronectine, de fibrine et de fibrinogène qui ont le rôle de guides pour les cellules qui migrent. Les interactions cellules endothéliales (CE)/MEC changent de façon critique lors de l'angiogenèse. La coupure du collagène IV qui est lié à l'intégrine $\alpha 1\beta 1$, découvre un site de fixation à l'intégrine $\alpha \beta 3$. De la même façon, la MMP-2 (métalloprotéinase matricielle-2), une protéinase, dégrade le collagène de type I, crée un site de fixation pour l'intégrine $\alpha \beta 3$ et permet ainsi la migration cellulaire [52]. La MEC participe à la formation vasculaire lors de la mise en place de l'angiogenèse tumorale et son remodelage (alternant entre les phases de destruction et de reconstruction), elle favorise la prolifération, la différenciation et la migration des cellules de l'endothélium. Sa destruction permet notamment le relargage de nombreux facteurs de croissance pro-angiogéniques, tels que FGF, VEGF ou TGF β [31].

La MEC est remodelée par des enzymes comme les métalloprotéases matricielles (MMPs). Les MMPs sont des protéases excrétées qui interviennent spécifiquement dans la dégradation de la MEC et sont maintenant décrites comme impliquées dans le clivage de récepteurs cellulaire, le relargage de ligands pro-apoptotiques (ligand FAS) et l'inactivation de certaines chemokines et cytokines [53]. Elles interviennent dans la prolifération cellulaire, la migration, la différenciation, mais aussi dans l'angiogenèse. Les MMPs sont dans un premier temps synthétisées sous forme de précurseurs inactifs et leur activité est régulée par les TIMPs (Tissue inhibitors of MMP) ainsi que par des cytokines [54]. Dans le cas des tumeurs, les sous types MMP 2 et MMP 9 ont une expression augmentée au niveau des sites invasifs [55]. Le remodelage de la MEC peut entraîner des changements dans ses interactions avec les cellules [56]. Dans le cas des interactions entre cellules endothéliales, les molécules impliquées dans ces jonctions sont notamment les vascular-endothelial cadherine (VE cadherine) et les Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1). La VE-Cadherine est présente dans les jonctions inter cellulaires créant la lumière et la perméabilité vasculaire [57, 58]. La VE-cadherine est en contact, *via* la β -caténine, avec le cytosquelette d'actine. Ces liaisons permettent la stabilisation des vaisseaux et le VEGF participe à la déstabilisation de ces jonctions [59].

1.3.2 Les intégrines

Les intégrines, récepteurs hétérodimériques (Figure 6-A) transmembranaires interagissent avec la MEC et sont impliqués dans l'adhérence cellulaire [37, 60-62]. Les intégrines sont composées d'une sous unité α et d'une sous unité β . Il existe 18 α et 8 β qui peuvent former 24

combinaisons différentes (Figure 6-B). Selon leur composition, elles interagissent préférentiellement avec le collagène, la laminine, la fibronectine ou la vitronectine [63]. Le motif RGD (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) de reconnaissance est commun à de nombreux ligands.

Les intégrines au contact de la matrice se regroupent dans la membrane pour former des clusters, qui constituent les zones d'adhérence ou contact focaux. Ces clusters d'intégrine recrutent des protéines adaptatrices telles que la paxilline, la taline et la tensine, activent les GTPases Rho, rac et cdc42, ce qui a pour conséquence l'assemblage des filaments d'actine et la réorganisation du cytosquelette. Par la modification de la distribution spatiale des intégrines à sa surface, la cellule est capable de générer les forces d'adhérence, mais également d'assurer sa mobilité. En effet il a été observé que la présence des intégrines augmentait au front migratoire de la cellule [64] alors qu'elle diminuait au niveau de la partie arrière. Les intégrines à l'arrière de la cellule sont endocytées, et recyclées à l'avant de la cellule créant ainsi de nouveaux points d'attaches cellulaires [65].

Ces complexes intégrines ne possèdent pas de site catalytique mais sont capables de transmettre des signaux intracellulaires pour coordonner les interactions des cellules avec la MEC [62]. Inversement, les intégrines interprètent des signaux extracellulaires. Elles participent par exemple à la régulation de la production d'inositol-3-phosphate, à la régulation acido-basique et à l'induction des flux calciques. Ces signaux induisent la réorganisation du cytosquelette d'actine, la mobilité des intégrines dans la membrane plasmique, mais également activent les voies de survie cellulaire, telles que Src-FAK (Src-Focal adhesion kinase) ou encore les voies Ras-ERK/MAPK et PI3K/AKT. Les intégrines peuvent également activer des voies anti-apoptotiques.

Ces récepteurs sont massivement exprimés par un grand nombre de cellules. Par exemple les intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sur les plaquettes, $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ sur les leucocytes ou encore $\alpha\text{4}\beta\text{7}$ sur les cellules T mémoires [66]. Les intégrines ont donc différents rôles au cours du développement, de l'agrégation plaquettaire, de l'immunité, mais également lors de l'angiogenèse et la transformation cellulaire. L'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, récepteur de la vitronectine a un rôle majeur dans l'angiogenèse normale et tumorale [60, 61].

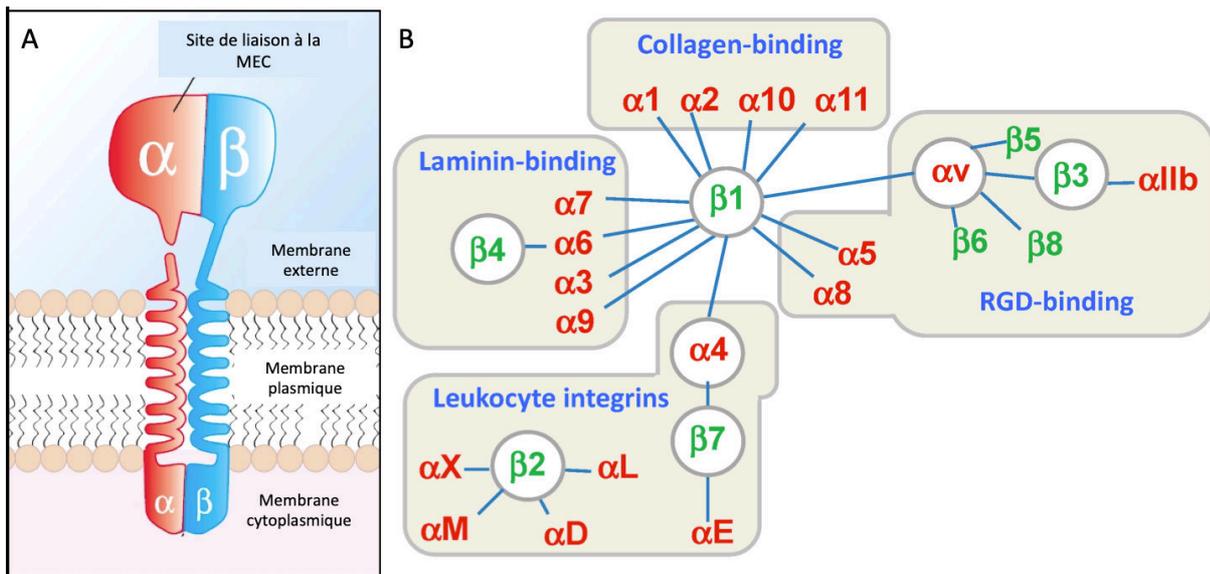


Figure 6 Schéma général d'une intégrine (A) et des différentes combinaisons de sous unités α et β (B). D'après <http://www.amdbook.org> et [67]

1.3.2.1 L'intégrine $\alpha\beta3$ et ses ligands

Cette intégrine est en effet fortement exprimée à la surface des cellules endothéliales activées lors du processus angiogénique alors qu'elle ne l'est pas ou peu à la surface des cellules endothéliales quiescentes. Elle est fortement surexprimée à la surface d'un large panel de cellules tumorales pulmonaires, cérébrales, mammaires, ovariennes et dermiques [68-71]. Elle joue un rôle dans la migration des cellules tumorales et l'invasion. L'intégrine $\alpha\beta3$ est décrite comme un marqueur des cancers agressifs et métastatiques [72-74] et son niveau d'expression est corrélé avec la formation de métastases [75].

Son association avec le FGF entraîne l'activation de la voie de signalisation NF- κ B, mais induit également des flux calciques, propices à la réorganisation du cytosquelette. Dans des conditions hypoxiques, il a été montré que cette intégrine pouvaient interagir directement avec l'un des récepteurs du VEGF, le VEGFR-2 et modifier sa signalisation [76, 77]. Il a également été décrit que, dans les cancers, les voies de signalisations induites par le VEGF régulaient, en retour, l'activation des intégrines $\alpha\beta3$ présentes sur les tumeurs et les cellules endothéliales [78].

L'intégrine $\alpha\beta3$ se lie spécifiquement à certains composants de la MEC comme la vitronectine et la fibronectine. Le motif Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) a été identifié en 1984 par Pierschbacher and Ruoslahti [79] comme étant le plus petit motif peptidique capable de lier des cellules à la MEC. La structure cristallographique de l'intégrine $\alpha\beta3$ liée à une molécule de cilengitide (un peptide qui présente le motif RGD) [80] a permis de définir les interactions entre l'intégrine et ce peptide. Ces travaux ont ensuite facilité la synthèse de peptides présentant une forte affinité pour cette intégrine. Ce motif synthétique a pu ensuite être présenté à la surface de différentes molécules ou particules (de façon mono- ou multi-valente) sous sa forme linéaire ou cyclique. La forme cyclique de ce motif semble, en effet, avoir une meilleure affinité pour l'intégrine

angiogéniques car il cible spécifiquement le réseau vasculaire tumoral et inhibe la croissance des tumeurs primaires et des métastases [81-83].

1.4 Conclusion

Les chapitres précédents ont montré l'implication de multiples acteurs moléculaires dans le développement du cancer. La recherche fondamentale tente de comprendre les mécanismes physiopathologiques du cancer et la recherche appliquée cherche à identifier des cibles moléculaires pertinentes pour des stratégies diagnostiques et thérapeutiques innovantes. Ces travaux ont recours à des lignées cellulaires cancéreuses en culture et à des banques de tissus prélevés chez des patients. *In fine*, la validation des hypothèses formulées sur les mécanismes mis en jeu requiert de façon incontournable l'utilisation de modèles animaux reproduisant le plus fidèlement possible tout ou partie des étapes du développement tumoral et de l'invasion métastatique.

2 Les modèles animaux en cancérologie

La recherche et développement (R&D) de nouvelles thérapies anti-cancéreuses représente un effort continu dans la durée (plus de 10 ans en moyenne pour un composé) associé à un fort risque financier puisque le budget nécessaire depuis le concept de laboratoire jusqu'à la mise sur le marché d'un nouveau composé est estimé à environ 1 milliard de dollars [84, 85]. Cet effort est particulièrement soutenu en cancérologie puisque le nombre de médicaments contre le cancer a quintuplé depuis les années 80.

Pour la recherche fondamentale comme pour la R&D de nouvelles approches diagnostiques et/ou thérapeutiques en oncologie il est indispensable d'avoir recours à des modèles animaux reproduisant les caractéristiques biologiques de la pathologie humaine.

Toutefois, bien qu'il existe une très grande variété de modèles animaux pour l'oncologie, avec divers niveaux de sophistication, il est important de garder en mémoire qu'ils ne sont qu'une représentation imparfaite de la réalité de la pathologie cancéreuse humaine.

Le développement tumoral est, en général, plus homogène et plus rapide dans les modèles murins en comparaison de la diversité et de l'hétérogénéité observées dans la pathologie humaine (§ cancer). Cela étant, appréhender et interpréter de manière appropriée les modèles animaux offrent des avantages pratiques importants et permettent de répondre à des questions scientifiques incontournables [86-90].

Ces modèles animaux sont des outils extrêmement importants pour :

- Etudier les mécanismes physiopathologiques du cancer,
- Etudier les mécanismes de résistances aux chimio- et radio-thérapies,
- Identifier de nouvelles cibles diagnostiques et/ou thérapeutiques,

- Evaluer et caractériser de nouveaux agents diagnostiques et/ou thérapeutiques afin d'en déterminer la spécificité, l'efficacité et l'innocuité.

Les modèles animaux peuvent se décomposer en plusieurs catégories présentant différents niveaux de complexité de mise en œuvre (et de coût) et parmi lesquelles il faut savoir choisir le meilleur compromis entre complexité et capacité à répondre à la question scientifique posée.

2.1 Les modèles induits

Dans l'idée de reproduire le plus fidèlement possible l'oncogenèse liée à l'environnement ou au comportement, des modèles animaux des cancers peuvent être induits par un agent chimique carcinogène administré de façon chronique aux animaux. On peut par exemple avoir recours à hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), à des hydrocarbures ou encore directement à de la fumée de cigarette pour créer ces modèles animaux[91]. La mise en œuvre de ces modèles est longue et complexe, et la variabilité inter individus, comme chez l'homme, est très grande.

2.2 Les modèles transgéniques

Les modèles transgéniques représentent des outils particulièrement puissants pour étudier des processus biologiques complexes liés à la dérégulation de cibles génétiques et/ou moléculaires impliquées dans le développement du cancer. Ces modèles sont obtenus par transgénèse classique ou ciblée, ce qui a pour effet une invalidation ou un gain de fonction. Ils permettent ainsi l'obtention d'un profil génétique et moléculaire contrôlé directement *in vivo* chez des animaux immunocompétents [88, 92-94]. Ces dernières années, de nombreux modèles ont été développés et décrits comme ayant un impact conséquent en oncologie, pour la découverte de nouveaux agents thérapeutiques ainsi que pour la compréhension générale des mécanismes qui régissent le cancer. On citera à titre d'exemple le modèle murin de cancer pulmonaire induit par une mutation de l'oncogène *K-ras*, le modèle *Lox-STOP-Lox-K-Ras2*. La mutation de du gène *K-ras* entraîne l'apparition spontanée de tumeurs pulmonaires. Ce modèle est assez représentatif de la pathologie humaine de carcinome broncho-alvéolaire où ce gène est souvent retrouvé muté (20 à 30 % des cas) [95]. L'un des biais de ce type de modèles est qu'il ne met en jeu qu'une, deux ou au maximum trois mutations alors que la réalité de l'oncogenèse implique la dérégulation d'une cascade de gènes et de protéines. Par exemple, le modèle *Lox-STOP-Lox-K-Ras2*, provoque effectivement le développement d'un cancer bronchique non à petites cellules, mais contrairement à la réalité clinique, ne met pas en jeu de mutation du récepteur à l'EGF.

Les modèles transgéniques présentent des contraintes du fait des variations de fréquence et d'homogénéité du développement tumoral inter-individu. En cela ces modèles se rapprochent

de la diversité observée chez l'homme mais ce sont des modèles complexes et coûteux à mettre en œuvre et à maintenir (entretien des géniteurs, gestion des accouplements, génotypes). Dans ces modèles le cancer se développe sous l'effet d'un contexte génétique particulier, les tumeurs se développent *in situ* et sont par conséquent non détectables/mesurables par un simple examen clinique non invasif. Le suivi de l'apparition des tumeurs et de leur développement nécessite donc soit de sacrifier de nombreux lots d'animaux, soit d'avoir recours à l'imagerie non invasive qui permet un suivi longitudinal des animaux au cours du temps [3].

2.3 Les greffes syngéniques

Une approche beaucoup plus simple consiste à greffer des lignées de cellules ou des fragments tumoraux d'origine murine de façon ectopiques ou orthotopiques chez un animal immunodéprimé ou immunocompétent. Les souches d'animaux immunocompétents permettent des études sur l'influence du système immunitaire (SI) sur la tumeur implantée. Il est ainsi possible de tester l'efficacité de traitements visant à stimuler le SI. En revanche, ces modèles produisent peu de métastases et la croissance des tumeurs est plus lente [89].

2.4 Les greffes xénogéniques (ou xénogreffes)

Elles sont établies par implantation de lignées cellulaires cancéreuses humaines voire de fragments de tumeurs humaines chez un animal immunodéprimé.

C'est dans les années 1970 qu'a été rapporté la possibilité de greffer un tissu tumoral d'origine humaine chez un animal athymique *nu/nu*, pour aboutir à la formation d'une tumeur mixte c'est-à-dire constituée de cellules cancéreuses humaines et d'un microenvironnement tumoral murin (cellules endothéliales et immunitaires, fibroblastes, pericytes) [86, 87, 89, 90]. Ainsi les biomarqueurs tumoraux exprimés par les cellules cancéreuses sont de nature humaine et pourront donc être reconnus spécifiquement par des agents ciblant conçus pour l'homme.

2.4.1 Les greffes ectopiques

Les greffes ectopiques consistent à implanter une lignée cellulaire cancéreuse ou un fragment de tumeur en un site différent du site naturel de développement de la tumeur, le plus souvent en sous-cutané. Les xénogreffes ectopiques sont faciles et peu coûteuses à mettre en œuvre, reproductibles, avec un accès à un très large éventail de lignées cellulaires cancéreuses. Un autre intérêt majeur réside également dans la facilité à suivre le développement ou la régression tumorale de façon non invasive par une simple mesure externe au pied à coulisse.

Ainsi, ces modèles sont très utilisés pour :

- Evaluer l'efficacité thérapeutique d'un composé candidat pour la régression tumorale,

- Mettre au point les doses thérapeutiques et le planning d'administration,
- Evaluer la cinétique de la captation tumorale d'un composé d'intérêt marqué en fluorescence.

Cependant ce type de modèle présente une pertinence et une prédictibilité clinique très limitées [3, 92, 96, 97] compte tenu :

- Des caractéristiques génétiques, phénotypiques et histologiques,
- De l'absence d'hétérogénéité intra tumorales,
- D'un développement non physiologique de la tumeur dans le tissu hôte lié à des interactions limitées avec le microenvironnement tumoral et notamment avec les cellules endothéliales, les cellules de la réponse inflammatoire, les fibroblastes et les protéines matricielles [92, 98-100].

Ces limitations sont en partie dues au mode d'implantation sous cutanée, mais sont également inhérentes aux lignées cellulaires employées [99, 100]. En effet, les institutions publiques ont établi au cours des deux dernières décennies, un catalogue de lignées cellulaires parfaitement caractérisées et répertoriées (NCI-60) [101] ou encore l'Encyclopédie des lignées de cellules tumorales [102] pour être distribuées aux laboratoires de recherche par l'American Type Culture Collection (ATCC). La plupart de ces lignées cellulaires ont été maintenues, des décennies durant, dans des milieux de culture enrichis, en monocouche, en l'absence des autres types cellulaires du microenvironnement et dans des conditions non physiologiques d'apport en oxygène. Ces conditions de culture résultent en une sélection artificielle de clones cellulaires indifférenciés présentant une grande capacité proliférative qui ne sont pas représentatifs de l'hétérogénéité tumorale primaire [87, 99, 100, 103]. Ce maintien prolongé dans des conditions non physiologiques pourrait impacter la fidélité génétique de la lignée cellulaire établie par rapport à la tumeur primaire dont elle est issue. De nombreuses études ont montré que bien que les mutations du patrimoine génétique d'importance soient maintenues dans les lignées cellulaires [104], son maintien en culture conduit à une perte plus ou moins importante du profil génétique d'origine [99, 100, 103]. Par ailleurs, la capacité métastatique de ce type de modèle tumoral est extrêmement faible voire inexistante [87, 92, 105] en grande partie en raison de l'absence d'interaction des cellules tumorales avec le microenvironnement. Ce manque d'interactions exerce des influences positives ou négatives sur la croissance tumorale, la survie cellulaire, la différenciation, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), l'angiogenèse et la surveillance immunitaire. La modification de ces « balises » de la progression tumorale entraîne la perte de la capacité de la tumeur primaire à envahir d'autres organes à distance [24, 105, 106].

2.4.2 Les modèles orthotopiques

Ces modèles sont établis par implantation d'une lignée cellulaire cancéreuse ou d'un fragment tumoral dans le tissu d'origine de la tumeur. De même que pour les greffes ectopiques,

l'utilisation de lignées cellulaires implique une certaine perte génétique liée à la sélection clonale de cellules hautement prolifératives, néanmoins ces modèles reproduisent de façon plus pertinente les interactions des cellules tumorales avec le microenvironnement [87, 89, 105, 107-110] et par suite les conditions de la prise tumorale primaire et de la dissémination métastatique. De plus, les constituants du microenvironnement (cellules de l'inflammation, fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales, cytokines, chemokines et cellules de la matrice) n'influencent pas seulement la prolifération tumorale, l'angiogenèse, l'invasion et le développement de métastases, mais sont aussi capables d'altérer la réponse des tumeurs à des traitements anticancéreux [105-107, 110]. Tandis que la croissance tumorale des modèles sous cutanés peut être suivie très simplement au pied à coulisse, les modèles orthotopiques, comme les modèles transgéniques, requièrent l'utilisation de l'imagerie non invasive pour explorer des zones profondes de l'animal (voir § imagerie) et effectuer un suivi longitudinal au cours du temps. Ainsi, les modèles animaux orthotopiques nécessitent une mise au point et une caractérisation avancées pour reproduire le plus fidèlement possible les mécanismes physiopathologiques d'un type de cancer donné, mais une fois ce travail réalisé ce sont des modèles calibrés et reproductibles qui constituent des outils de choix pour étudier la physiopathologie du cancer et évaluer de nouvelles stratégies diagnostiques ou thérapeutiques.

2.5 Les Patient-Derived Xenografts (PDX)

Pour établir ces modèles, un fragment tumoral provenant d'un patient est directement implanté chez la souris, sans dissociation tissulaire ni passage en culture. La souris implantée qui développe une tumeur constitue alors en quelque sorte un avatar de ce patient source. La tumeur développée chez la souris peut être à son tour prélevée et coupée en plusieurs fragments qui seront implantés chez de nouvelles souris. Après plusieurs passages de souris en souris, les profils génétique, phénotypique et histologique sont finement caractérisés et doivent être totalement conformes aux caractéristiques des cellules du patient donneur. Dans ces modèles l'implantation peut être sous cutanée ou bien orthotopique, le niveau de complexité s'élevant alors davantage [111-114]. Il est ainsi possible de constituer une banque de souris représentative de l'hétérogénéité de la population humaine atteinte d'un certain type de cancer. Ces modèles sont particulièrement complexes à mettre en œuvre, à caractériser et à maintenir d'autant qu'ils ne font réellement de sens que s'ils rendent effectivement compte de la diversité clinique humaine, ce qui implique l'utilisation d'un très grand nombre d'animaux. Les caractéristiques des différents modèles présentés dans les paragraphes précédents sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 Les différents types de modèles animaux utilisés en oncologie. D'après [85]

Type de greffe		Espèce animal employée	Caractéristiques primaires	Utilisation(s)	Avantages	Inconvénients	Pertinence clinique	
Ectopique	Xénogénique, syngénique	Sous cutanée	Rongeurs immunodéprimés et immunocompétents	Implantation ectopique de lignée de cellules, Localisation de croissance tumorale non physiologique	Etudes de Biodistribution/pharmacocinétique, efficacité anti tumorale d'un composé, crible de nouvelles thérapies	Modèle simple de mise en œuvre et peu coûteux, accès à de nombreuses lignées cellulaires.	Pas de similarités histologiques et phénotypiques avec la pathologie clinique, peu d'hétérogénéité tumorale, pas de production de métastases, microenvironnement d'origine non respecté	
		Intraveineuse						
		Intraperitonéale						
Orthotopique	Xénogénique, syngénique	Dans l'organe d'origine de la lignée cellulaire	Rongeurs immunodéprimés et immunocompétents	Implantation de lignées de cellules dans l'organe d'origine, respect du microenvironnement tumoral, dissémination métastatique	Etude de la biologie de la pathologie à différents stades de développement, études de survie, efficacité anti tumorale d'un composé candidat à un stade plus avancé.	Représentatif de la physiopathologie réelle, microenvironnement tumoral respecté, production de métastases	Difficile de mise en œuvre (expertise technique), non respect de l'hétérogénéité tumorale, peu des similarités histologiques avec la pathologie clinique, nécessité d'avoir recours à l'imagerie pour suivre le développement tumoral	Modérée (bonne pour l'étude du développement tumoral complet)
PDX	Xénogénique	Sous cutanée ou dans l'organe d'origine du fragment tumoral	Rongeurs immunodéprimés	Implantation directe d'un fragment tumoral du patient	Validation d'un traitement sur la tumeur d'origine (hétérogénéité tumorale respectée), efficacité anti tumorale d'un composé candidat à un stade plus avancé.	Préservation des caractéristiques génétiques, histologiques et phénotypiques de la tumeur originelle, potentielle production de métastases, maintien du microenvironnement tumoral	Accès limité à des pièces de résection chirurgicale d'origine humaine, préparation coûteuse, long de mise en œuvre, développement des tumeurs lents	Excellente
Transgénique			Rongeurs immunocompétents	Développement et croissance spontanée d'une tumeur dans son organe d'origine	Impact d'un système immunitaire complet sur tout le processus de la progression tumorale, efficacité anti tumorale d'un composé candidat à un stade plus avancé.	Similarités phénotypiques, histologiques et génétiques avec la pathologie clinique, conditions physiologiques de développement	Développement des tumeurs très hétérogène, coûteux, difficultés liées à la production et au maintien des animaux, nécessité d'avoir recours à l'imagerie pour suivre le développement tumoral	Bonne (réponse thérapeutique)
Induits par substances carcinogènes			Rongeurs immunocompétents	Développement tumoral en réponse à un agent carcinogène	Efficacité anti tumorale d'un composé candidat à un stade plus avancé.	Similarités biochimiques et phénotypiques avec la pathologie clinique, pertinent étiologiquement, microenvironnement préservé	Long de mise en œuvre, coûteux, utilisation de produits dangereux pour la santé des manipulateurs, nécessité d'avoir recours à l'imagerie pour suivre le développement tumoral	Limitée

3 L'imagerie biomédicale en oncologie

Depuis le développement des premiers instruments d'imagerie pour l'utilisation clinique, l'imagerie biomédicale connaît un essor considérable. Elle fait désormais partie intégrante de l'arsenal diagnostique du clinicien. Les modalités couramment utilisées dans la pratique clinique actuelle sont la radiographie et la tomодensitométrie (rayons X), l'Imagerie par Résonance Magnétique [41], l'échographie et les techniques nucléaires, la Tomographie par Emission de Positron (TEP) et la Tomographie par Emission Mono-Photonique (TEMP). L'imagerie intervient au moment du diagnostic mais également pour le suivi de l'efficacité thérapeutique.

Ces dernières années les instruments d'imagerie clinique ont tous été adaptés afin de pouvoir être utilisables à des fins de recherche préclinique et plus particulièrement chez le petit animal. De nombreuses prouesses technologiques ont été réalisées dans le but de faire correspondre la résolution spatiale, la résolution temporelle et les limites de sensibilité avec la taille et les contraintes liées à l'utilisation de rongeurs. Depuis presque 20 ans, l'imagerie *in vivo* du petit animal permet en effet d'accéder à des informations anatomiques, fonctionnelles et moléculaires en temps réel au sein d'un seul et même animal tout au long du développement d'une pathologie. Les différentes modalités d'imagerie, seule ou en association, représentent des outils puissants pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les pathologies humaines [115, 116] ainsi que pour le développement pharmaceutique de nouveaux candidats diagnostiques et/ou thérapeutiques.

En recherche préclinique, l'imagerie du petit animal apparaît comme étant une alternative précieuse aux techniques de biopsie et d'anatomopathologie employées auparavant et qui nécessitaient l'utilisation et le sacrifice d'un grand nombre d'animaux. De par cet aspect, l'imagerie s'inscrit dans une volonté d'éthique animale décrite par Russell et Burch en 1959 et mise en place par la suite par les différents gouvernements européens et par l'union européenne, elle-même, afin de Réduire, Remplacer et Raffiner (règle des 3R) l'utilisation d'animaux à des fins de recherche [117-119].

Certaines modalités ont par ailleurs été spécialement conçues pour la recherche préclinique, c'est le cas de l'imagerie de bioluminescence et de l'imagerie de fluorescence 3-D corps entier. D'autres modalités, pour le moment majoritairement utilisées en recherche préclinique, possèdent un très fort potentiel translationnel, c'est le cas de l'imagerie de fluorescence intra-opératoire et de l'imagerie photoacoustique (PA).

Chaque modalité d'imagerie présente des caractéristiques techniques qui lui sont propres (résolutions spatiale et temporelle, sensibilité) et fournissent différents types d'informations. On distinguera les modalités d'imagerie anatomique qui fournissent des informations essentiellement morphologiques ou fonctionnelles (débit sanguin, perméabilité vasculaire,

oxygénation tissulaire) et les modalités d'imagerie moléculaire qui permettent l'observation de la distribution d'une molécule exogène au sein de l'organisme traçant le niveau d'expression ou d'activité d'un biomarqueur d'intérêt (Figure 7). Ces différentes modalités d'imagerie présentent des avantages et des inconvénients qui seront détaillés dans le chapitre suivant, mais un point important réside dans le choix de la modalité d'imagerie adéquate ou dans la combinaison de plusieurs modalités complémentaires pour répondre à la question scientifique ou médicale posée. Force est de constater que de nombreux développements récents ont eu pour but d'intégrer plusieurs modalités d'imagerie au sein d'un même appareil. L'imagerie multimodale apparaît en effet comme un outil d'une incroyable puissance puisqu'elle pourrait permettre d'avoir accès, au sein du même sujet et de façon simultanée à plusieurs types d'informations.

Dans cette partie, une revue des principaux dispositifs d'imagerie biomédicale employés en oncologie sera faite. Les technologies d'imagerie nucléaire et par résonance magnétique qui n'ont pas été utilisées dans la partie expérimentale ne seront pas développées.

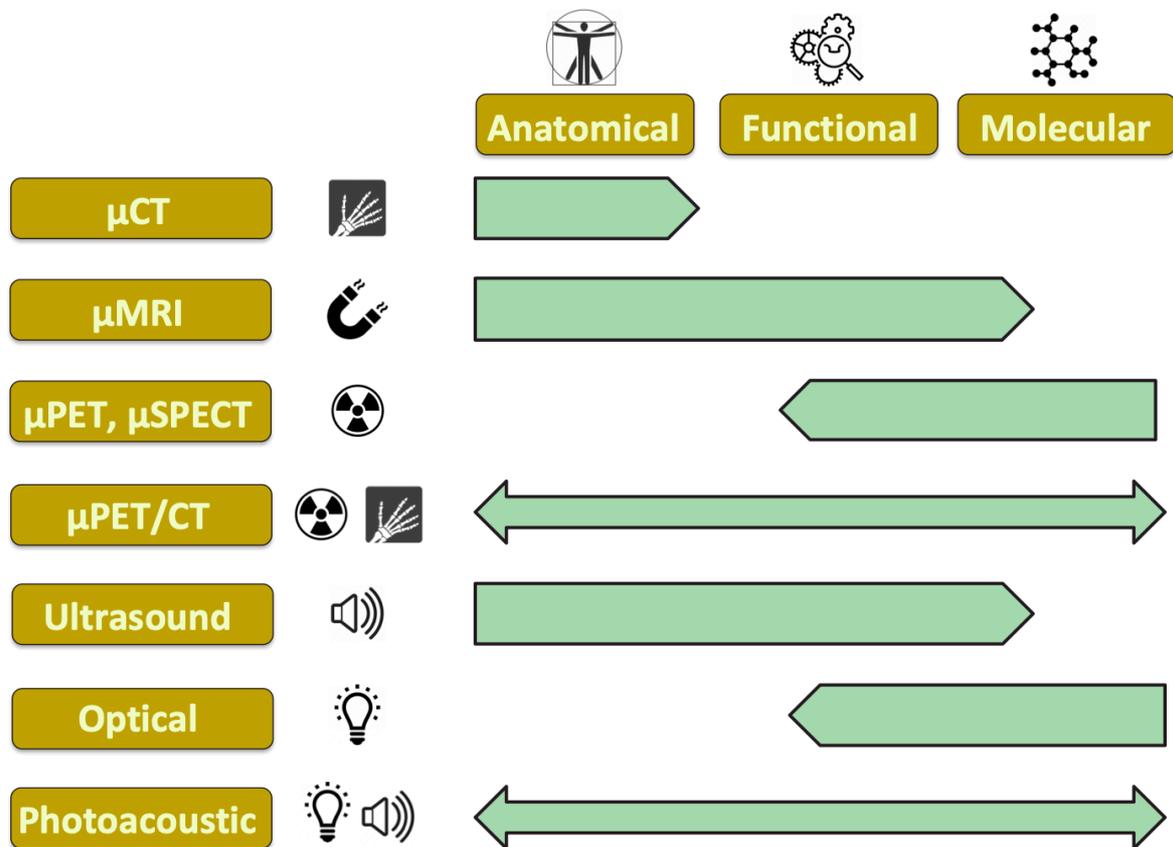


Figure 7 Illustration des différentes modalités d'imagerie en fonction du type d'informations biologiques collectées (© OPTIMAL)

3.1 Les rayons X

3.1.1 Histoire et principe de base

L'imagerie par les rayons X est une des techniques d'imagerie historiques et ce type de rayonnement électromagnétique a été utilisé en imagerie biomédicale depuis sa découverte par W. Röntgen en 1895. Röntgen a d'ailleurs reçu le prix Nobel de physique pour ses travaux en 1901. Depuis la première image de la main de l'épouse de W. Röntgen (Figure 8), les techniques d'imagerie utilisant les rayons X sont largement employées pour les applications cliniques. Les rayons X permettent d'observer l'anatomie interne grâce à l'interaction des rayons X avec les tissus biologiques.



Figure 8 La première radiographie de la main de l'épouse de Wilhelm Röntgen en 1895.
Source : NIH National Library

Dans la gamme d'énergie utilisée en imagerie par rayons X (20 à 130 keV), on distingue 2 types d'interactions principales avec la matière, et il s'agit plus précisément d'interactions avec les atomes :

- **L'effet Compton (Figure 9 gauche)** est l'interaction prédominante du rayonnement avec les atomes de faible numéro atomique et pour des énergies incidentes allant de 26 keV à 30 MeV, [120] qui sont les énergies utilisées dans le domaine biomédical. Cet effet apparaît lorsque l'énergie du photon X incident excède l'énergie de liaison des électrons dans le nuage atomique

[121]. Plus spécifiquement, cet effet intervient lorsque le rayonnement incident interagit avec un électron de la couche de valence de l'atome. Ce phénomène a pour effet l'éjection d'un électron et la diffusion du rayonnement incident accompagnée d'une perte d'énergie. Etant donné que l'électron impliqué est un électron de la couche externe du nuage électronique, l'énergie de liaison à l'atome est faible et peut donc être ignorée. Parallèlement, le photon X diffusé peut traverser les tissus environnants sans interaction de diffusion ou d'absorption.

- **Au cours de l'effet photoélectrique (Figure 9 droite)** l'énergie du photon incident est absorbée par un électron du nuage électronique de l'atome et cet électron est éjecté [121].

L'effet photoélectrique peut être considéré comme un événement « tout ou rien » car il ne survient que lorsque l'énergie du rayonnement X incident est égale ou supérieure à l'énergie d'ancrage de l'électron à sa couche électronique. De plus, on parlera d'effet photoélectrique si et seulement si l'électron est décroché d'une couche électronique interne. Si l'électron est éjecté d'une couche de valence ou une couche externe on parlera alors **d'effet Compton**. La conséquence de cet effet est que les électrons des couches supérieures vont se rapprocher de l'atome, ce qui engendre une perte d'énergie libérée sous forme de photons X caractéristiques [122]. La probabilité d'apparition de l'effet photoélectrique décroît lorsque le numéro atomique de l'atome considéré diminue et lorsque l'énergie du rayonnement X incident augmente. Par conséquent, dans les applications cliniques, cet effet n'a que très peu de chances de survenir étant donné que les tissus mous sont majoritairement composés d'atomes de faible numéro atomique tels que l'Hydrogène (H) présent en grande quantité dans le corps humain. De plus, l'utilisation d'une plus grande énergie incidente diminuera d'avantage la probabilité de créer cet effet. Bien que ce type d'interactions tissu/matière soit très bénéfique pour le contraste et la qualité de l'image, les électrons de faible énergie n'atteignent que très rarement le détecteur et sont absorbés par les tissus, ce qui entraîne des radiations ionisantes pour les patients. Cet effet peut être majoritaire pour les sources inférieures 50 keV.

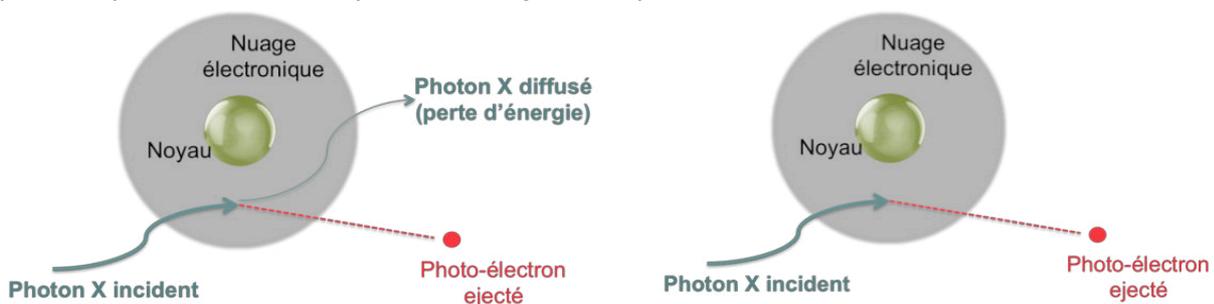


Figure 9 Schémas de l'effet Compton (gauche) et de l'effet photoélectrique (droite)

Compte tenu de ces caractéristiques, il faut adapter l'énergie des rayons X à l'organe exploré :

- 25-50 keV : zone où les différences entre les contrastes des différents tissus est la plus grande. Les rayons X ne pénètrent que superficiellement le tissu. Les tissus mous peuvent être discriminés, mais les os restent complètement opaques. L'effet photoélectrique domine dans cette plage d'énergie et les radiations engendrées sont grandes.

- 60-70 keV : les rayons X pénètrent plus profondément les tissus. Les deux effets (photoélectrique et Compton) sont à peu près similaires. La distinction entre l'os minéralisé et l'os spongieux peut être faite.
- 100-130 keV : le rayonnement X est très pénétrant. L'effet Compton est majoritaire. Dans ce cas le contraste de l'image est très faible, mais cela permet, par exemple, d'observer aisément les poumons sans être gêné par le cœur ou par les côtes.

3.1.2 Radiographie

Dans sa configuration minimale, la source de rayons X et le détecteur sont placés de façon statique de chaque côté du sujet à observer : c'est la radiographie. Le rayonnement passe à travers une partie ou la totalité du sujet observé. L'atténuation différentielle de ce rayonnement incident par la matière donne le contraste de l'image. Les techniques utilisant les rayons X sont des techniques d'imagerie par transmission : une source émet un faisceau de photons de type X qui traversent un objet ou un sujet à analyser avant de finir leur course sur un détecteur. Les photons de type X peuvent être produits par un tube à rayons X. Il s'agit d'une enceinte sous vide constituée d'une anode et d'une cathode. Un faisceau d'électrons, obtenu depuis la cathode chauffée par un courant électrique, est accéléré vers une anode par une différence de potentiel de quelques dizaines de kiloVolts. Lors du bombardement des électrons sur l'anode, une partie de leur énergie cinétique est transformée en photons X. Le détecteur convertit le signal électromagnétique en signal électrique. Le métal utilisé pour fabriquer l'anode peut être de nature variée, conférant ainsi des propriétés différentes aux photons émis. Dans l'utilisation médicale, les anodes sont généralement à base de Tungstène (éventuellement en alliage avec le Rhénium) ou de Molybdène [123]. En imagerie médicale, les détecteurs de rayons X sont constitués de capteurs de type CCD (Charge Coupled Device : dispositif à transfert de charges) ou CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) et d'un scintillateur qui convertit les photons X en photons de la gamme spectrale visible.

3.1.2.1 Applications

La radiographie reste de nos jours l'un des examens les plus pratiqués cliniquement du fait de sa simplicité d'utilisation, de son faible coût et de la relative innocuité pour les patients. Elle est notamment utilisée pour la détection de pathologies pulmonaires telles que les pneumopathies et le cancer, des perforations ou obstructions intestinales, les fractures osseuses, mais aussi pour la dentisterie. On citera également, un examen de surveillance utilisée en routine, la mammographie. La mammographie est une radiographie réalisée spécifiquement sur les seins afin de diagnostiquer de façon précoce et de suivre l'évolution des cancers mammaires. Depuis

les années 2000, de vastes programmes de prévention et de dépistage sont organisés par les pouvoirs publics et ont permis la réduction de la mortalité liée à ce type de cancer (Figure 10).

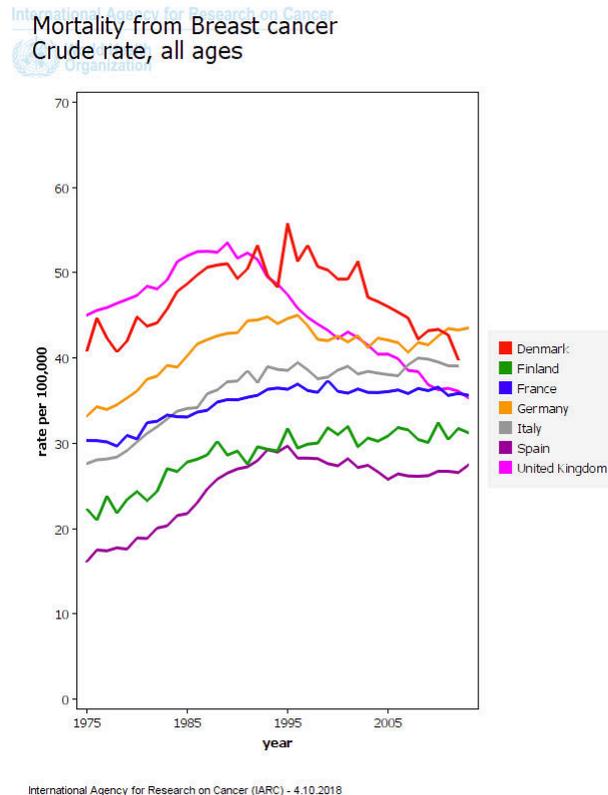


Figure 10 Mortalité lié au cancer du sein (IARC-WHO)

Malgré cela, la radiographie est une technique d'imagerie plane (image 2-D) ce qui limite la précision de l'information et présente l'inconvénient lorsque le sujet observé est en trois dimensions de générer des ombres créées par les différentes épaisseurs de matières traversées. De ce fait, le contraste de l'image qui en résulte est faible.

3.1.3 Tomodensitométrie/Computed Tomography (CT)

Bien que les premières tentatives de créer un dispositif d'imagerie rayons X en 3 dimensions datent des années 40, le premier tomographe (CT en anglais pour Computed Tomography) clinique n'a été développé qu'en 1967 avec le développement, par Sir G. Hounsfield, d'un ordinateur capable d'analyser les informations collectées sous différents angles d'acquisitions [124]. Le CT permet alors d'avoir accès à des informations anatomiques sur les organes mous (abdomen, cerveau). Allan Cormack et G. Hounsfield ont reçu le Prix Nobel pour leurs travaux en 1979 et, en l'honneur de G. Hounsfield, l'unité représentant l'atténuation des rayons X par la matière a été baptisée « unité Hounsfield » (HU) (Figure 11)

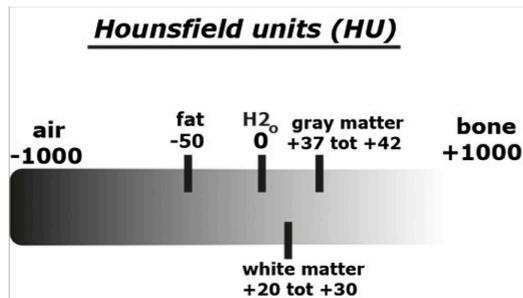


Figure 11 Echelle Hounsfield pour l'analyse et la segmentation des images rayons X

De la même façon que pour la radiographie, lors d'un examen CT, le sujet est placé entre une source de rayons X et un détecteur. La différence réside dans le fait que la source et le détecteur se déplacent autour du sujet pour réaliser des acquisitions multiples sous différents angles afin de permettre la reconstruction de l'objet en trois dimensions.

La première génération de scanner à rayons X produisait des images de résolution médiocre et nécessitait de temps d'acquisitions très longs. La source réalisait une série de 160 projections en faisant une translation linéaire, puis source et détecteur tournaient de 1° autour du sujet et une deuxième série de 160 projections étaient réalisées et ceci jusqu'à 180°. Afin de réduire les temps d'acquisition, une deuxième génération de scanner a vu le jour. Son principe était quasiment identique au précédent à la différence près que les sources de rayons X employées avaient pour caractéristique de projeter des photons X en couvrant un angle de 10°. Même si cette génération était 15 fois plus rapide que la précédente, elle n'en restait pas moins assez lente. Un des inconvénients était l'encombrement spatial de la source et des détecteurs qui ne permettait généralement de faire des acquisitions que au dessus de la tête des sujets.

Afin de gagner encore en temps d'acquisition et étendre le champ d'applications des systèmes CT, une troisième génération a été créée. L'ouverture de la source X a été agrandie pour permettre d'imager une coupe entière d'un sujet en une seule fois (entre 40° et 60°). De plus la source et le détecteur pouvaient bouger conjointement, ce qui réduisait encore un peu les temps d'acquisition. Cette génération de scanner est encore aujourd'hui utilisée.

L'inconvénient majeur de cette technologie est que le détecteur employé doit être composé de 400 à 1000 éléments afin de couvrir l'angle d'incidence de la source, mais également que ce mouvement de « rotation/rotation » entraîne la production d'artefacts visibles sur l'image bien connu sous le nom de « ring artifacts ».

La quatrième génération de CT a ainsi eu pour but d'éliminer ces artefacts en plaçant les détecteurs en cercle, tout autour du sujet à imager.

3.1.4 Applications

Les scanners cliniques peuvent atteindre des résolutions de l'ordre de 500 µm et sont utilisés pour la visualisation des traumatismes crâniens, pour la détection de lésions viscérales (foie, rate, reins, pancréas) et aussi pour les examens sur les parties de l'anatomie susceptibles de bouger telles que le cœur ou les poumons [125]. L'angiographie est un examen clinique qui nécessite

l'injection d'agents de contraste non spécifiques à base d'iode qui circulent longtemps dans le réseau vasculaire. Cet examen permet notamment l'évaluation de lésions au niveau vasculaire (sténoses obstructives, plaques calcifiées, plaques d'athéromes).

3.1.4.1 Le CT pour la recherche préclinique

Ce n'est qu'en 1999 que le premier scanner dédié au petit animal a vu le jour. Il a été créé par des chercheurs de l'université de Duke aux Etats-Unis afin d'observer les modifications anatomiques induites sur des souris génétiquement modifiées [126].

Cette modalité d'imagerie permet d'obtenir des images anatomiques de haute résolution (entre 5 et 10 μm). Elle permet notamment la visualisation des os mais aussi des poumons (en se basant sur le contraste de l'air) (Figure 12)

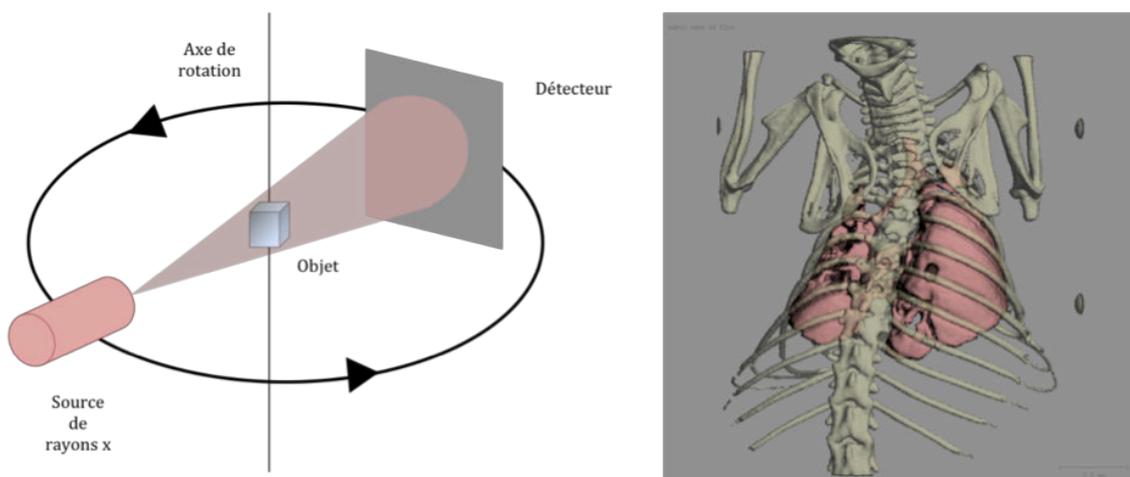


Figure 12 Schéma d'un tomodensitomètre (CT) de 4^{ème} génération et exemple de reconstruction d'image microCT en 3D d'une souris transgénique mutée pour le gène *Kras* ayant développé des adénocarcinome pulmonaire (©OPTIMAL)

3.1.4.2 Utilisation d'agents de contraste

Comme dans la pratique clinique il est également possible de réaliser divers examens radiologiques en injectant des agents de contraste ciblés ou non, essentiellement à base d'iode. Hyafil *et al.* rapportent l'utilisation de nanoparticules pour imager les macrophages infiltrant dans le cas de lapins présentant des plaques d'athérosclérose [127]. Plus récemment, certaines équipes de recherches ont utilisé des nanoparticules à base d'or pour l'imagerie du cancer à un niveau cellulaire et moléculaire (en ciblant l'EGFR) [128-130] ou encore des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec un antigène de membrane spécifique de la prostate et chargées avec de la doxorubicine [131].

3.1.5 Atouts et limites

Cette modalité d'imagerie présente de nombreux avantages comme sa relative rapidité d'acquisition (varie selon la résolution choisie et les zones du corps à scanner), la résolution spatiale (jusqu'à 10 μm pour les scanners précliniques et 500 μm pour les équipements cliniques), sa relative simplicité de mise en œuvre et son coût relativement peu élevé (entre 150 et 500 K€) qui favorise sa disponibilité dans tous les hôpitaux et dans les cabinets de radiologie. L'une des limitations principales est l'exposition des patients/animaux à des rayonnements ionisants, ce qui limite le nombre d'examens possible dans une période de temps donnée.

Une autre limitation est le faible contraste des tissus mous aux énergies utilisées et la faible sensibilité de détection des agents de contrastes (de l'ordre du millimolaire) qui de plus peuvent présenter une certaine toxicité [129, 132].

3.2 Les Ultrasons

3.2.1 Histoire et principes de base

C'est en 1794 que Lazzaro Spallanzani, psychologue italien, étudie les chauves-souris et découvre que malgré leur cécité, ces animaux nocturnes sont capables de voler dans leur environnement sans heurter d'obstacles. Afin de comprendre le système biologique leur permettant de naviguer, il obstrua la bouche de chauves-souris et remarqua qu'elles n'étaient alors plus capables de naviguer sans rencontrer d'obstacles. Charles Jurin réalisa le même type d'expérience en enduisant les bouches et les oreilles des animaux de cire et montra que cela les empêchait de voler correctement.

Sans réellement le savoir, les deux chercheurs avaient découvert les ultrasons. L'idée de base de l'imagerie ultrasonore est qu'en émettant une pulsation dans une direction donnée, l'onde acoustique va rebondir sur les obstacles qu'elle va rencontrer et revenir vers la source. En se basant sur les différents paramètres de cette onde de retour, tels que le temps de retour et l'intensité, il est alors possible d'extraire des informations sur les obstacles rencontrés.

3.2.2 L'élément Piézoélectrique

Ce sont les frères Dussik qui ont contribué à l'une des plus grandes avancées dans le domaine de l'imagerie ultrasonore et plus précisément sur l'effet pyroélectrique. En effet, il a été montré que lorsque l'on chauffait certains types de cristaux, un potentiel voltaïque (électrique) pouvait être généré dans ce cristal [133]. De la même façon, lorsque l'on applique une force (compression, torsion ou tension) à la place du chauffage, on peut observer l'apparition d'un courant électrique dans le cristal employé [121].

Il est également possible de réaliser l'effet inverse en appliquant un courant électrique à un cristal, celui-ci va alors se déformer (expansion et contraction) à une fréquence donnée [133]. En augmentant le courant électrique et en le modulant en fréquence, il est donc possible de créer des vibrations de plus haute fréquence et ainsi générer des ondes ultrasonores.

Dans les systèmes d'imagerie biomédicale, les transducteurs piézoélectriques sont composés de différents matériaux tels que le titanate de zirconite (PZT) [121]. Les transducteurs sont fabriqués à partir de plusieurs éléments uniques.

Les transducteurs employés sont alors capables de travailler à des hautes fréquences de l'ordre du MHz. (Figure 13-A et B)

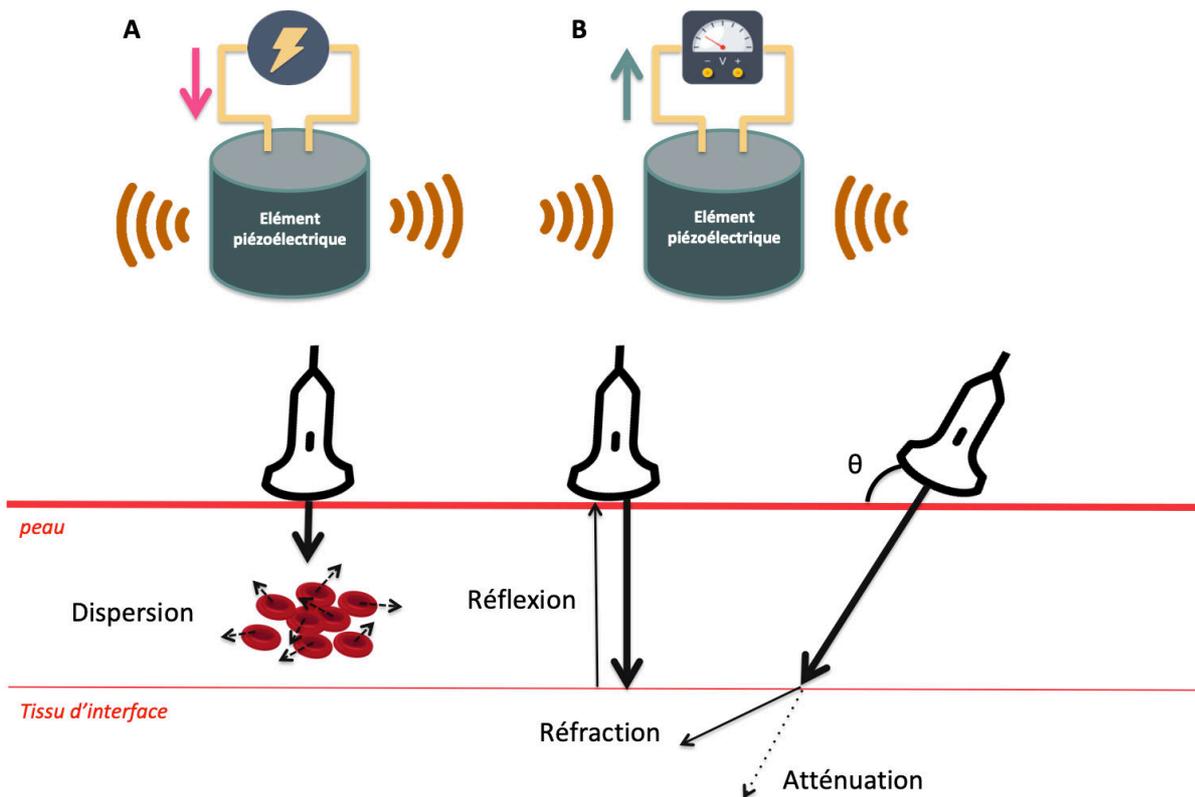


Figure 13 L'élément piézoélectrique émet des ultrasons lorsqu'un courant électrique lui est appliqué et produit de l'électricité lorsqu'il reçoit des ultrasons.

Illustration des différentes interactions des ultrasons avec la matière (dispersion, réflexion, réfraction et atténuation)

3.2.3 Interaction des ultrasons avec la matière

L'impédance acoustique décrit la résistance du matériel traversé par une onde ultrasonore. Plus l'impédance est élevée plus le tissu traversé est résistant [133] (Figure 13). Dans l'imagerie ultrasonore, le premier phénomène observé est la quantité d'ondes qui sont renvoyées vers le transducteur. Si un tissu à une impédance forte, il sera imperméable aux ondes ultrasonores, qui vont se répercuter sur le tissu en question et revenir en majorité vers le transducteur [121]. Cette propriété des tissus est intéressante pour imager certaines structures telles que les

calculs rénaux qui ont une forte impédance, mais cela peut se révéler un inconvénient lorsque la cible se trouve derrière une structure de forte impédance, elle se retrouve masquée et donc invisible. De façon générale on peut dire que plus le tissu est dense, plus son impédance est forte. Lorsqu'une onde ultrasonore se propage dans les tissus, 4 types de phénomènes ondulatoires interviennent et sont à prendre en compte dans la correction et l'interprétation des images :

La réflexion : à l'interface entre deux milieux d'impédances différentes les ondes ultrasonores sont réfléchies. C'est le phénomène majoritaire intervenant dans la production d'images échographiques. Il permet de détecter les différences d'impédance des tissus observés et donc de mettre en évidence les différentes structures qui le composent.

L'atténuation : lorsqu'une onde ultrasonore se propage dans un milieu, son énergie réduit, elle est absorbée. Il est donc nécessaire de maximiser l'énergie reçue par le transducteur afin de produire une image de bonne qualité. L'atténuation des ultrasons est une fonction de la fréquence des ondes utilisées. Elle est exprimée en dB/cm et de manière générale on peut considérer cette atténuation à 0,5 dB/cm par tranche de 1 MHz. Il apparaît donc que plus la fréquence utilisée est haute, moins la distance d'observation sera profonde.

La diffusion : ce phénomène intervient lorsque l'on observe des tissus avec une texture non lisse (foie, reins, viscères) et entraîne la formation d'échos multiples à l'interface entre deux tissus. Ce phénomène n'étant pas majoritaire, il sera quasiment négligeable en terme d'impact sur la formation de l'image.

La réfraction : ce phénomène intervient lorsque le transducteur n'est pas placé de façon perpendiculaire aux structures observées. Une partie des ondes ultrasonores incidentes va être réfractée dans le milieu et créer, de façon anecdotique, une double image et des zones floues sur les bords de l'image.

3.2.4 L'effet doppler

L'imagerie de flux peut être réalisée en utilisant l'imagerie Doppler qui repose sur l'effet du même nom qui a été découvert par Christian Doppler au XIXe siècle. Il a postulé et confirmé expérimentalement que la fréquence d'un son était plus faible quand la source se déplaçait loin du récepteur et plus forte lorsque la source se déplaçait vers lui. Ce type d'effet est d'ailleurs décrit, non pas seulement pour les ondes sonores mais également pour tous les types d'ondes électromagnétiques. Pour imager le flux sanguin, le contraste par effet Doppler résulte du mouvement des éléments sanguins qui circulent dans les vaisseaux. On distingue ainsi le sang qui circule en s'éloignant du transducteur et celui qui circule s'en rapprochant.

3.2.5 Applications biomédicales

L'imagerie ultrasonore est utilisée dans de nombreux domaines cliniques et précliniques, en chirurgie interventionnelle (injections guidées, biopsie, en cardiologie, gynécologie, obstétrique, traumatologie, rhumatologie, angiologie et dermatologie [121] (Figure 14).

Cette technologie d'imagerie est avant tout une modalité d'imagerie anatomique mais permet également d'avoir accès à des informations fonctionnelles et moléculaires *via* l'injection d'agents de contraste.

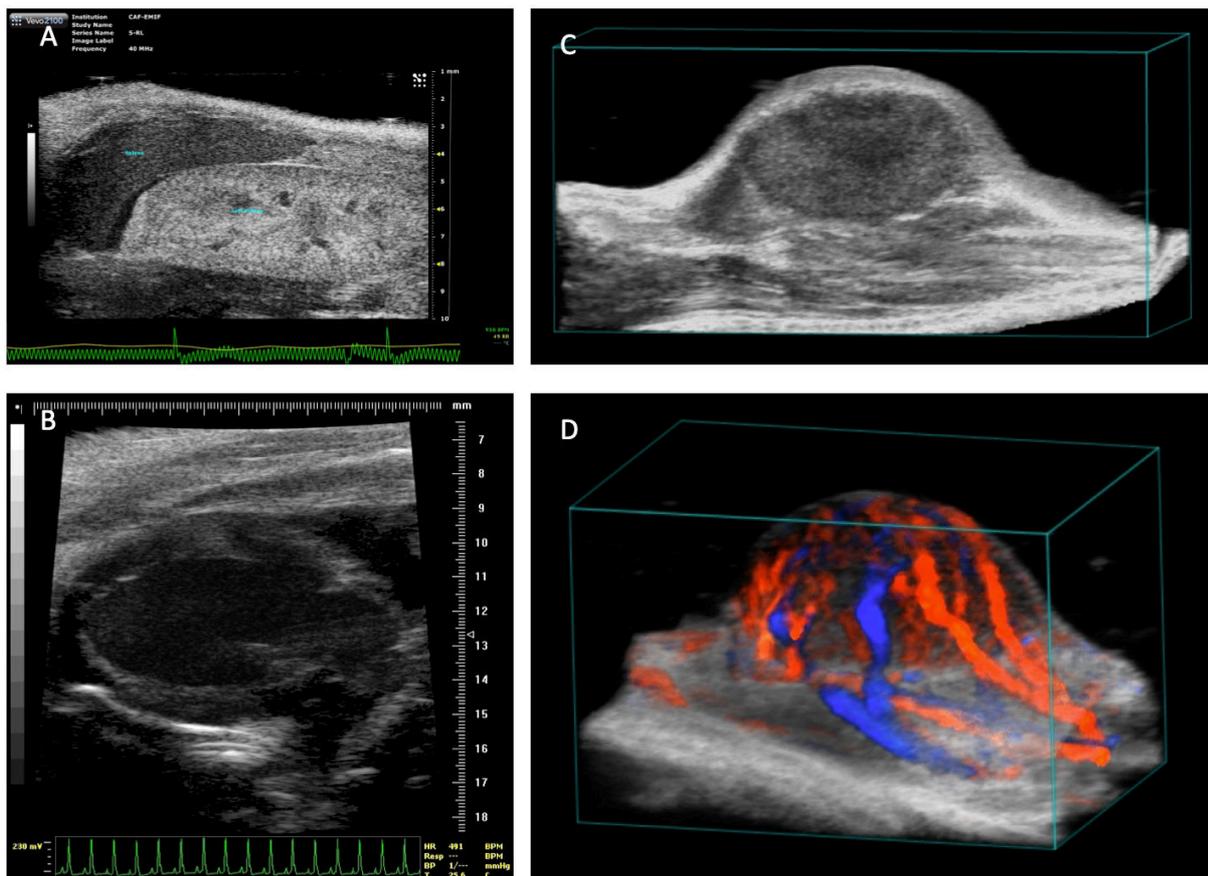


Figure 14 Exemple d'illustrations de différentes applications de l'imagerie par ultrasons

A Image B-mode (anatomique) d'organes abdominaux (rate et du rein) → Anatomie abdominale

B Image B-mode du cœur en vue, Grand axe → Cardiologie

C Image B-mode d'une tumeur sous cutanée → Oncologie

D Image Doppler couleur de la vascularisation d'une tumeur sous cutanée → Oncologie

©Université de Lausanne et Visualsonics inc;

3.2.6 Utilisation d'agents de contraste

Bien que l'échographie soit essentiellement une modalité d'imagerie anatomique, des agents de contraste sont développés pour améliorer le contraste dans certaines circonstances.

Les microbulles sont des particules composées d'une coque (faite de lipides, de protéines ou de polymères) dans lesquelles est encapsulé un gaz (généralement du perfluoropropane, de l'hexafluorure soufré ou de l'azote). Ces microbulles ont la propriété d'être largement plus réfléchissantes que le sang, principalement par leur capacité à entrer en résonance lorsqu'elles se trouvent dans un flux ultrasonore. Ces microbulles mesurent généralement entre 1 et 4 μm et sont injectées par voie intraveineuse afin d'augmenter le contraste échogène dans les tissus dans lesquels elles se distribuent.

L'utilisation de microbulles non ciblées a largement été rapportée dans la littérature. On mentionnera l'utilisation de ces agents de contraste pour l'évaluation de la perfusion tumorale, qui permet par exemple de suivre les effets de traitements anti-angiogéniques (microbulles MicroMarker commercialisées par la société Visualsonics) ou encore de calculer le volume et le débit sanguin tumoral (microbulles Qontrast commercialisées par Bracco).

Ces agents de contraste, lorsqu'ils sont greffés avec des ligands spécifiques, sont capables de mettre en évidence la cible moléculaire spécifique du ligand utilisé.

En clinique, une large cohorte de patients a été incluse dans une étude multicentrique française pour l'utilisation des microbulles non ciblées (Sonovue[®]) pour la détection et le suivi après traitement ciblé contre le VEGFR (Avastin[®]) de lésions hépatiques, de cancers du sein métastatiques, de mélanomes, de cancer du côlon, de cancer gastro-intestinaux et de carcinomes rénaux.

En recherche préclinique, les microbulles BR55 commercialisées par la société Bracco ciblent spécifiquement le VEGFR-2 [134].

D'autres microbulles sont greffées par un anticorps dirigé contre la sous-unité α_v des intégrines et peuvent être utilisées pour visualiser l'angiogenèse tumorale.

Même si de nombreuses microbulles ciblées sont utilisées en recherche (des essais cliniques sont en cours sur la pertinence de l'utilisation de microbulles ciblant spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$), aucune n'ont pour l'instant obtenue l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour des applications chez l'homme [135].

3.2.7 Atouts et limites

Les principaux atouts de l'échographie sont : son faible coût, sa disponibilité dans tous les hôpitaux et de nombreux cabinets médicaux, sa portabilité, sa **résolution temporelle** (de l'ordre de la **minute**) et **spatiale** (d'environ 200 μm , jusqu'à <30 μm pour les systèmes précliniques utilisant des fréquences comprises entre 10 MHz et 50 Mhz et 2 mm pour les systèmes cliniques avec des fréquences de 1 MHz), son innocuité et sa **sensibilité** (10^{-6} à 10^{-9} mole/litre) lorsque l'on utilise des agents de contraste [136].

La principale limite de l'imagerie ultrasonore est son incapacité à imager des tissus à proximité d'os ou d'air qui entraînent la formation d'importants artefacts.

La sonde échographique doit être placée directement au contact du tissu, sans interface avec l'air, ce qui nécessite l'utilisation d'un gel.

Cette technique est souvent décrite comme opérateur-dépendante, mais le fait est qu'elle requiert surtout une grande expertise de l'opérateur autant pour l'acquisition que pour l'analyse des images.

3.3 L'imagerie Optique

3.3.1 La bioluminescence

3.3.1.1 Histoire et Principe de base

La bioluminescence est un phénomène de production et d'émission de lumière par un organisme vivant *via* une réaction chimique. Le mécanisme général de la bioluminescence résulte de l'activité d'une enzyme dont l'oxydation du substrat conduit à la production de lumière par conversion d'une énergie chimique en énergie lumineuse. La bioluminescence est un phénomène biologique présent chez de très nombreux organismes animaux ou végétaux (700 genres dont 80% sont des espèces marines) et une trentaine de couples enzyme/substrat a été identifiée [137].

Le système qui est le plus utilisé pour des applications en recherche est celui de la luciole nord-américaine (*Photinus pyralis*). Dans le système de la luciole (Figure 15 haut), la première réaction catalysée par la luciférase est l'activation de la luciférine avec formation de luciféryl adénylate liée à l'enzyme. Cette réaction est réversible et libère le pyrophosphate inorganique. La luciféryl adénylate formée est oxydée par l'oxygène moléculaire et donne un peroxyde très instable, l'oxyluciférine, qui va rapidement se cycliser après une libération d'AMP. Cette molécule, dans un état électronique excité, retourne à l'état stable par une réaction de décarboxylation. Cette réaction entraîne l'émission d'un photon lumineux (pic d'émission à 560 nm), et produit du CO₂. L'enzyme se libère ensuite pour catalyser une autre réaction [138]. D'autres organismes utilisent la luciférine comme substrat, c'est le cas de certains coléoptères (*Pyrophorus plagiophtalamus*) ou vers luisants qui émettent une lumière verte (540 nm) à orange (630 nm) [139]. D'autres systèmes bioluminescents mettent en jeu un substrat différent, comme par exemple la coelenterazine qui présente comme avantage par rapport au système luciférase/luciférine de ne pas nécessiter d'ATP. Le premier système luciférase/coelenterazine décrit a été celui de *Oplophorus gracilirostris* une crevette vivant en profondeur dans l'océan [140] et dont le pic d'émission est à 454 nm. Ce système est également présent chez l'anémone de mer *Renilla reniformis* dont le couple *Renilla* luciférase/coelenterazine est actuellement très utilisé pour des applications *in vitro* (pic d'émission à 480 nm). Récemment a été développé une luciférase artificielle inspirée du

système présent chez *Oplophorus gracilirostris* [141]. Cette luciférase baptisée NanoLuc® présente un poids moléculaire réduit et est codée par un gène de taille restreinte ce qui facilite l'intégration du gène dans le génome, favorise une expression stable de l'enzyme et minimise l'impact sur le fonctionnement cellulaire. Elle utilise un substrat très proche de la coelenterazine, la furimazine. Le génie génétique a permis le séquençage des gènes codant pour les différents types de luciférase et l'optimisation de plasmides codant pour des enzymes présentant le meilleur rendement d'émission de lumière possible (gènes luc, luc2, luc2P, luc2CP luc +, commercialisés par la société Promega). Ces plasmides peuvent être insérés dans des bactéries, des virus ou des cellules eucaryotes qui vont exprimer l'enzyme et produire de la lumière en présence du substrat. Le gène de la luciférase peut alors être utilisé comme un gène rapporteur. Un gène rapporteur est un gène dont la protéine produite possède une caractéristique lui permettant d'être observée, voire quantifiée, en laboratoire *in vitro* ou *in vivo*. Le gène rapporteur peut être placé sous la dépendance d'un promoteur d'intérêt ou encore fusionné à un autre gène d'intérêt dont on souhaite étudier l'expression et la régulation. De très nombreuses constructions ont ainsi été établies et utilisées *in vitro* dans des modèles cellulaires mais également *in vivo* dans des souris transgéniques. (Figure 15 bas)

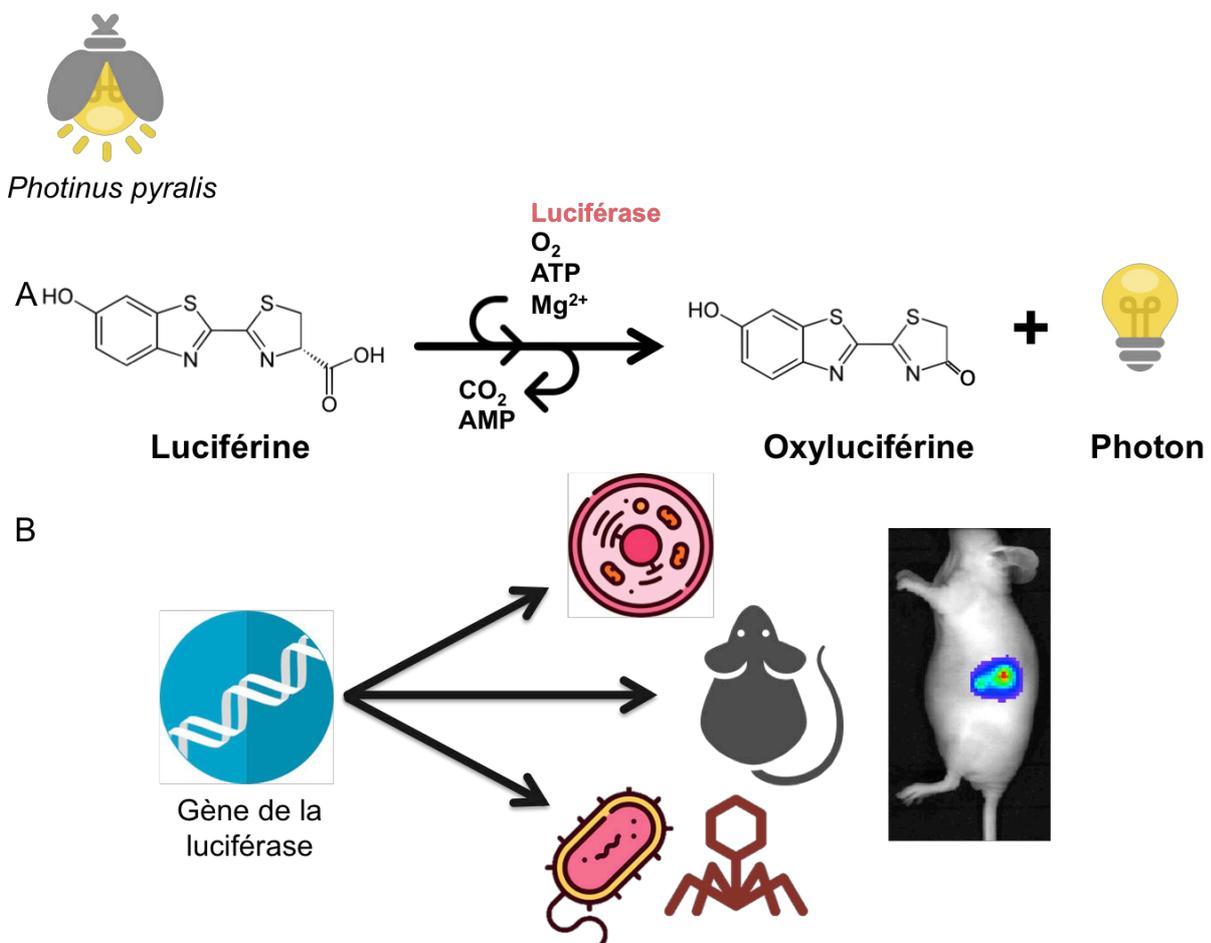


Figure 15 Description de la technique de bioluminescence dans le système *Photinus pyralis*

A Réaction de bioluminescence : la première réaction, catalysée par la luciférase, est l'activation de la luciférine par l'ATP (Adénosine Triphosphate) en luciférine adénylate

liée à l'enzyme. La luciféryl adénylate formée est ensuite oxydée par l'oxygène moléculaire (O₂) et donne l'oxyluciférine. Cette molécule, dans un état électronique excité, retourne à l'état stable avec émission de lumière et formation de CO₂ et d'AMP

B Différentes applications de la réaction de bioluminescence : le gène de la luciférase peut être intégré à différents organismes (cellules, bactérie, virus, rongeurs).

A droite : illustration d'une image de bioluminescence d'une souris porteuse d'une tumeur splénique (cellules luciférase positives) (©Optimal, IAB, Grenoble)

3.3.1.2 Applications en cancérologie

Les premières utilisations des systèmes luciférase/luciférine ont été des tests pour mesurer les niveaux d'ATP [142]. Cette technique a notamment permis de détecter les niveaux d'ATP dans le sang *in vivo* pour le diagnostic d'insuffisance rénale, de fibroses kystiques, de cancer (Abraham 2003), mais également pour tester différentes stratégies thérapeutiques sur des biopsies provenant de patients atteints de cancer ovarien [143], du col de l'utérus [144], du sein [145, 146], de mélanomes [147, 148] ou de cancer du foie [149]. Ces techniques sont très sensibles puisque les limites de sensibilité de détection d'ATP sont entre 0.2 et 200 nM (nanomole/litre).

La bioluminescence est désormais utilisée dans de nombreuses applications en recherche biomédicale pour les maladies neuro-dégénératives [150], les maladies infectieuses [151-154], les maladies cardio-vasculaires [155-158], le diabète [159-162] et bien sûr le cancer [163-167]. Les systèmes bioluminescents les plus utilisés pour l'oncologie sont ceux de *P. pyralis*, *P. plagiophtalamus*, *R. Reniformis*, *G. princeps* et *NanoLuc*[®] [168]. L'utilisation de la bioluminescence en cancérologie permet notamment le suivi de la prolifération tumorale. Pour ce faire, les cellules tumorales sont modifiées par génie génétique afin d'exprimer stablement le gène de la luciférase puis elles sont implantées chez des animaux. Dans ces modèles bioluminescents de cancer, l'émission de lumière est corrélée à l'expression du gène luc et, par extrapolation, au nombre de cellules tumorales vivantes exprimant le gène (Figure 15). Cette technique est donc un procédé de choix pour la caractérisation non invasive de modèles tumoraux chez la souris. Elle permet la détection précoce du développement tumoral primaire et le suivi longitudinal de l'apparition de métastases mais également l'évaluation de nouvelles molécules à visée thérapeutiques anticancéreuses [169, 170].

Par ailleurs, des **modèles animaux transgéniques bioluminescents** ont été développés.

Pour ces modèles, le gène rapporteur de la luciférase est sous le contrôle d'un promoteur d'intérêt. Pour l'oncologie par exemple ont été développées les souris NFκB-luc et VEGF-luc. Ces souris permettent de visualiser l'expression de NFκB (impliqué dans l'inhibition de l'apoptose) ou du VEGF (facteur de croissance vasculaire impliqué dans l'angiogenèse) de façon indirecte *via* le suivi de l'expression de la luciférase au sein de l'animal [171, 172].

D'autres modèles transgéniques ont été développées pour exprimer la luciférase sous le contrôle d'un promoteur dépendant de la prolifération ; c'est le cas des souris Nf1+/- ; Trp+/- (NPcis) qui développent spontanément des neurofibromatoses. Ainsi les tumeurs sont luminescentes et il est possible de suivre leur prolifération ou leur régression [173].

Les principaux inconvénients de ces modèles résident dans leur coût de mise au point et d'élevage qui est très élevé mais également dans le bruit de fond tissulaire qu'ils peuvent présenter à l'état basal, suite à une activation non spécifique du promoteur.

Des développements récents mettent en œuvre un système de transfert de l'énergie vers un fluorophore par Transfert d'Énergie par Résonance de Bioluminescence (BRET pour Bioluminescence Resonance Energy Transfert en anglais). A l'instar du FRET (Förster Resonance Energy Transfert), utilisé en fluorescence, le couple luciférase/luciférine est ici le donneur et un fluorochrome est l'accepteur. Généralement, l'enzyme est couplée à une protéine d'intérêt et le fluorochrome avec une autre protéine qui interagit avec la première. L'observation d'un signal fluorescent indique alors l'interaction entre les deux protéines. Les développements récents mettent en jeu un système R-luc (substrat coelenterazine) et une protéine GFP (Green Fluorescent Protein). D'autres designs plus complexes impliquent des Quantum Dots (QDs).

3.3.1.3 Atouts et limites

La bioluminescence est une technique d'une extrême **sensibilité** : la luciférase exprimée dans des cellules sous la dépendance d'un promoteur fort peut permettre la détection de quelques cellules *in vitro* et de quelques dizaines de cellules placées en sous cutané *in vivo* chez la souris [174]. Elle n'émet que des radiations non ionisantes (photons). Le cout des équipements est faible (>150K €) et ne nécessite pas d'infrastructure complexe. L'acquisition d'une image 2D corps entier ne prend que quelques minutes et ne nécessite pas de post traitement.

Cette technique n'est évidemment pas utilisable chez l'homme, les cellules du patient n'exprimant pas la luciférase.

Cette technique présente plusieurs limites qu'il est important de bien connaître pour l'utiliser profitablement. L'une des limites majeures de la bioluminescence *in vivo* concerne la quantification. L'intensité du signal détecté n'est pas directement proportionnelle à l'intensité du signal émis ; ceci est dû aux interactions des photons lumineux avec les tissus traversés : **l'absorption** et la **diffusion**.

Ainsi, plus la source lumineuse est profonde plus le signal est atténué et diffus, et ces facteurs dépendent de la nature des tissus traversés.

Par voie de conséquence :

- L'imagerie de bioluminescence est essentiellement une modalité en 2 dimensions (même si des efforts de recherche et développement tentent de compiler plusieurs acquisitions 2D pour reconstituer une image 3D, cette reconstruction reste essentiellement qualitative).
- Il n'est pas envisageable d'utiliser la bioluminescence chez des sujets d'une épaisseur supérieure à 2 cm.
- La bioluminescence ne donne que très peu d'indications sur la forme et sur la localisation

spatiale précise de la source, sa résolution est donc très basse (jusqu'à plusieurs mm selon la localisation du signal).

Par ailleurs, la bioluminescence est dépendante du métabolisme. En effet elle nécessite la présence de la luciférine, d'ATP et d'O₂. Donc si l'une de ces molécules est en quantité insuffisante, l'émission lumineuse n'est pas quantitativement représentative de l'expression du gène luciférase. Il peut donc se poser *in vivo* un problème d'accès de la luciférine aux cellules exprimant la luciférase, dans des zones qui ne sont pas vascularisées par exemple. Un autre aspect critique concerne l'hypoxie, lorsque les tumeurs grossissent par exemple, leur zone centrale devient hypoxique et les cellules tumorales passent d'un métabolisme aérobie (utilisant de l'O₂) à un métabolisme anaérobie et la synthèse d'ATP est plus faible. Ainsi l'émission de bioluminescence est réduite par le déficit en O₂ et ATP et il n'existe plus de corrélation entre le signal et le volume tumoral [175].

3.3.2 L'imagerie de Fluorescence

L'imagerie de fluorescence est une modalité d'imagerie moléculaire utilisée depuis très longtemps en microscopie qui présente également un fort potentiel pour des applications *in vivo*.

3.3.2.1 Principes de base de la Fluorescence

Le diagramme de Jablonski (Figure 16 (a)) décrit les processus impliqués dans la création de doublets électroniques excités ainsi que l'émission de fluorescence qui en résulte. Le fluorochrome absorbe un photon d'énergie $h\nu_{EX}$ émis par une source lumineuse de type laser ou encore lumière blanche filtrée.

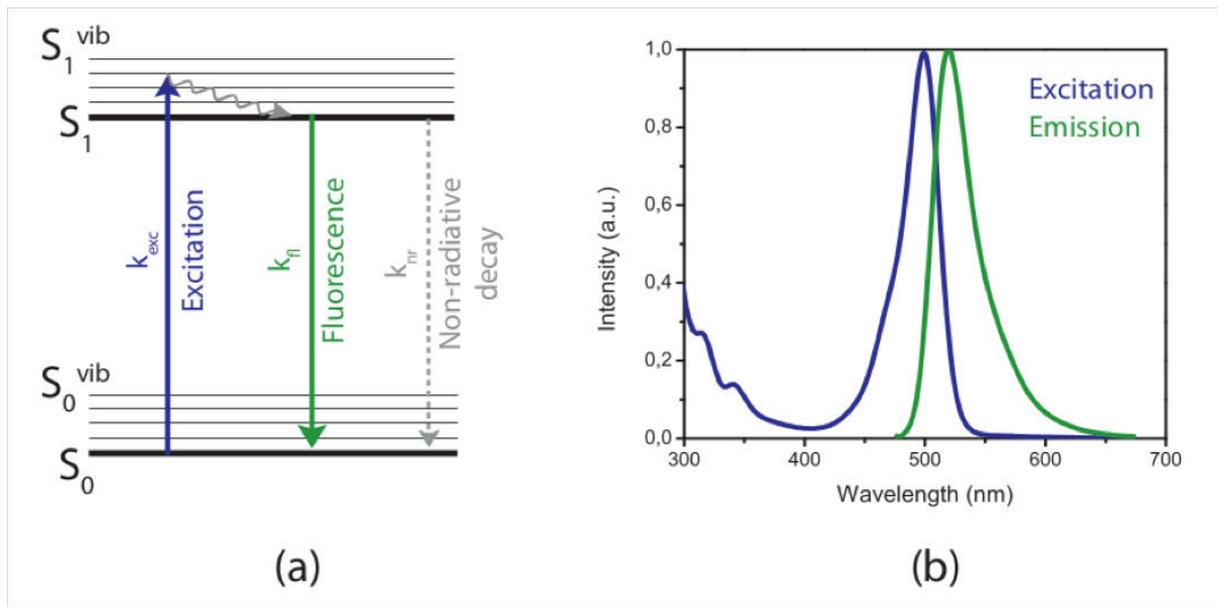


Figure 16 Diagramme de Jablonski (a) qui illustre la transition énergétique observable dans l'imagerie de fluorescence. Spectre d'excitation et d'émission de la molécule d'AlexaFluor488.

Ce photon doit avoir une longueur d'onde λ définie pour permettre le passage à un état excité des électrons délocalisés (Etat S_1'). L'état S_1' dure un temps de l'ordre de la nanoseconde, temps durant lequel le fluorochrome interagit fortement avec son environnement proche et subit des changements conformationnels. L'énergie de l'état S_1' est ensuite cédée en partie sous forme de chaleur ou bien par transfert d'énergie entre les fluorochromes. Le fluorochrome possède donc une énergie interne (S_1) plus faible que l'énergie (S_1') initiale. Enfin, le fluorochrome retrouve son état énergétique initial en émettant un photon d'énergie $h\nu_{EM}$ inférieure à l'énergie du photon d'excitation. Cette différence d'énergie (Stokes shift) est due à la dissipation d'énergie durant la deuxième étape. La longueur d'onde du photon émis par le fluorochrome est donc généralement supérieure à la longueur d'onde d'excitation (Figure 16 (b)). On notera cependant que certains composés sont capables de faire de l'up-conversion, c'est-à-dire que la longueur d'onde d'émission est inférieure à celle d'excitation [176].

3.3.2.2 Interaction des photons avec les tissus biologiques

Comme précédemment évoqué pour la bioluminescence, lors d'une imagerie de fluorescence les photons d'excitation et les photons d'émission sont soumis à des interactions avec les tissus biologiques qu'ils doivent traverser. Ces interactions rendent extrêmement complexes l'obtention d'une image qualitative et quantitative. Les photons sont sujets à **l'absorption** et à **la diffusion** par les tissus biologiques qui sont anisotropes, possèdent des indices de réfraction propres et présentent une **auto-fluorescence**. Ainsi, la sensibilité de détection des photons varie selon leur longueur d'onde [177].

L'absorption : Ce phénomène est lié à la présence dans les tissus de composants naturels

absorbants (eau, oxy- et déoxy-hémoglobine, lipides, mélanine, collagène) [178]. L'absorption est très forte dans le visible, diminue dans la zone proche infrarouge puis augmente à nouveau au-delà de 900 nm où l'eau devient très absorbante. (Figure 17)

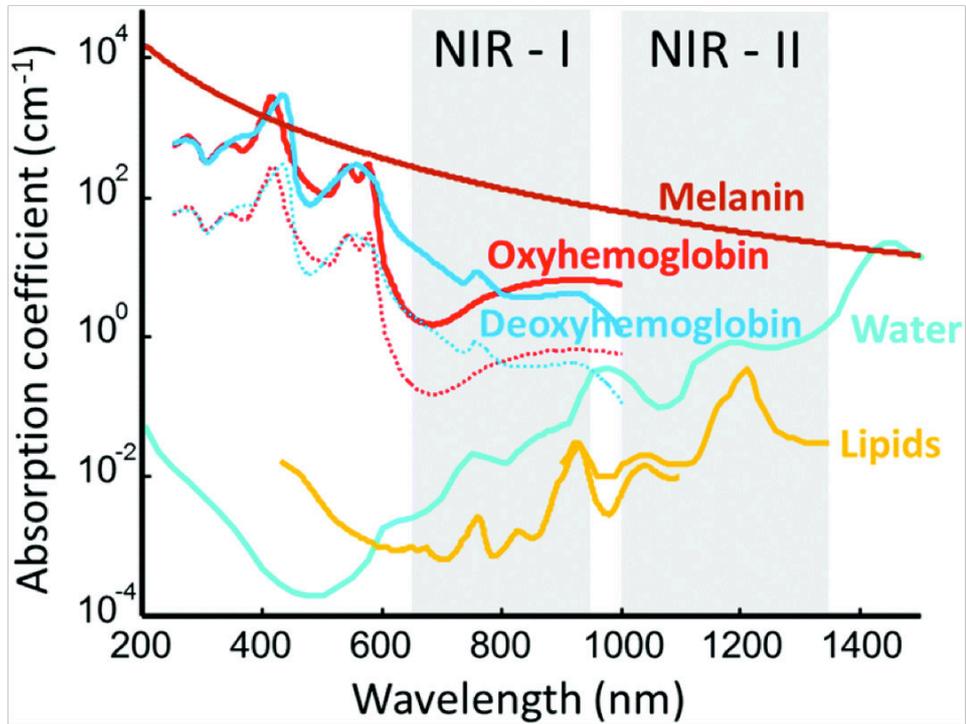


Figure 17 Spectres d'absorption des composants endogènes des tissus biologiques dans les longueurs d'ondes visibles (200nm-700nm), dans la fenêtre proche infrarouge-I (NIR-I de 700 à 950nm) et dans la deuxième fenêtre proche infrarouge (NIR-II de 1000 à 1400 nm)

La diffusion : Ce phénomène est lié à l'indice de réfraction des tissus traversés par les photons. Plus l'épaisseur de tissus traversée est grande, plus les photons seront déviés de leur trajectoire balistique. Cet aspect est également dépendant de la longueur d'onde [179].

Du fait de la combinaison des phénomènes d'absorption et de diffusion, il a été montré en mode transmission, c'est-à-dire avec une excitation qui traverse l'animal avant d'atteindre le détecteur, qu'environ 10^4 fois plus de photons sont transmis à 670 nm qu'à 532 nm [180] (Figure 18).

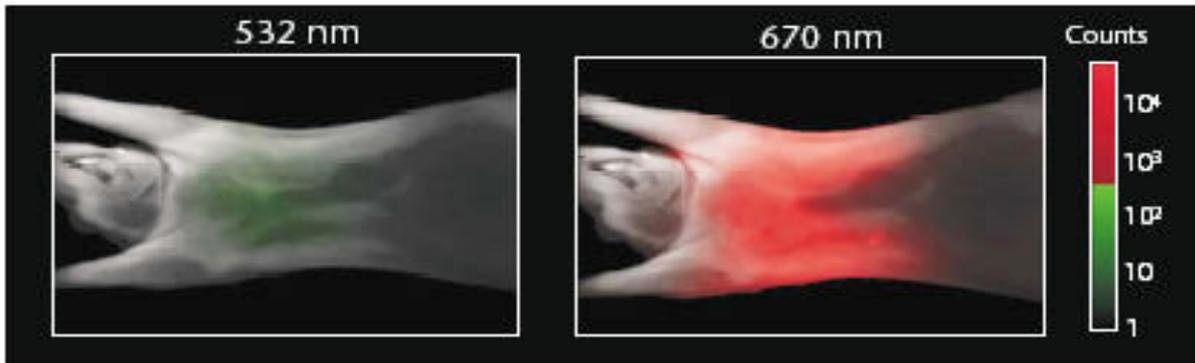


Figure 18 Illustration de l'augmentation du nombre de photons traversant le petit animal dans la fenêtre proche infrarouge.

L'auto-fluorescence : les tissus biologiques contiennent de nombreux fluorochromes naturels (tyrosine, tryptophane, élastine, collagène, flavines, porphyrines, chlorophylle...) [181] dont le signal de fluorescence propre, particulièrement fort dans les longueurs d'onde visibles, représente un bruit de fond et limite la sensibilité de détection de la fluorescence d'intérêt. Ainsi les viscères, la peau, l'intestin grêle et l'urine présentent une auto-fluorescence très importante dans le visible. Ce phénomène diminue progressivement lorsqu'on se déplace vers des longueurs d'onde plus élevées. Ainsi, l'utilisation du proche infrarouge permet de s'affranchir presque totalement de l'auto-fluorescence tissulaire (Figure 19).

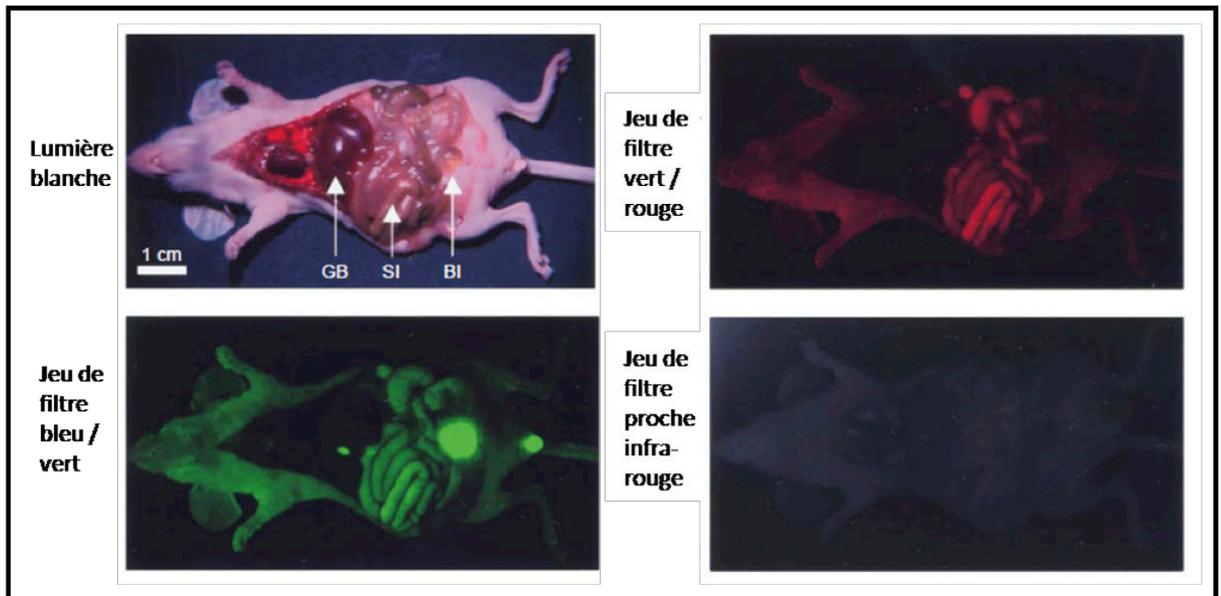


Figure 19 Auto-fluorescence des organes de la souris dans différentes configurations de jeu de filtres.

L'auto-fluorescence des tissus du rongeur (GB : vésicule biliaire; SI : petit intestin; BI : Vessie) ont été imagées en utilisant des filtres (excitation/émission) différents :

Bleu/vert : 460-550nm (ex)/ 505-560nm (em)

Vert/rouge : 525-555-nm (ex)/ 590-650nm (em)

NIR : 725-775nm (ex)/ 790/830nm (em).

D'après [177]

En combinant les contraintes de l'absorption, de la diffusion et de l'auto-fluorescence, la fenêtre proche infrarouge de 630 à 900 nm apparaît donc la plus propice à l'imagerie de fluorescence *in vivo* [177].

Depuis peu, des travaux de recherche s'intéressent à la deuxième fenêtre infrarouge (NIR-II) comprise entre 850 et 1700 nm (Figure 17) également appelée SWIR pour ShortWave InfraRed. Cette fenêtre présente un fort potentiel pour l'imagerie biomédicale car elle est associée à une forte diminution du phénomène de diffusion de la lumière.

Les preuves de concept ont été publiées par l'équipe de Hongjie Dai qui a montré une impressionnante amélioration de la résolution spatiale, y compris à quelques mm de profondeur, améliorant ainsi significativement la détection de la micro-vascularisation sanguine intracrânienne ainsi que sur des artères fémorales ischémiques [182, 183] après injection intraveineuse de nanotubes de carbone.

En utilisant une configuration d'imagerie appropriée (excitation = 808 nm, caméra SWIR InGaAs pour Indium Gallium Arsenide) ces travaux ont montré une résolution spatiale atteignant 10 μm assortie d'une résolution temporelle très élevée permettant l'imagerie temps réel des battements cardiaques chez la souris (environ 5 images/sec) [183-186]. Cette nouvelle fenêtre

spectrale présente ainsi un fort potentiel pour la visualisation des réseaux vasculaires (sanguin et lymphatique) ainsi que pour la chirurgie guidée par imagerie SWIR [187].

3.3.2.3 Modalités d'imagerie de fluorescence

Le principe de l'imagerie de fluorescence *in vivo* consiste à illuminer le tissu avec un laser, des LEDs ou de la lumière blanche filtrée et de collecter la fluorescence émise grâce à une caméra munie de filtres appropriés. On distingue 2 approches d'imagerie: l'épi-illumination et la trans-illumination.

- Epi-illumination

L'épi-illumination consiste à illuminer et à collecter la lumière émise du même côté de l'objet, (en référence aux techniques de microscopie, cette approche est aussi appelée fluorescence par réflectance). La lumière d'excitation qui atteint la surface de l'animal peut se propager sur quelques millimètres, les photons peuvent diffuser dans les tissus et exciter les fluorochromes situés sous la surface. La lumière de fluorescence réémise par le fluorochrome est collectée avec une caméra munie de filtres (Figure 20). L'épi-illumination présente plusieurs avantages : Simple à développer et à utiliser en routine (criblage), plusieurs animaux peuvent être imagés en même temps et les acquisitions sont rapides (de quelques ms à quelques secondes maximum). Elle ne nécessite pas de calculs mathématiques ni de reconstruction d'images, l'obtention des images est instantanée. De ce fait c'est une imagerie en temps réel qui permet de réaliser des études pharmacocinétiques *in vivo* sur corps entier.

Pour ces raisons, cette modalité est la plus répandue et a permis de très nombreuses études biologiques. Par contre c'est une approche d'imagerie à 2 dimensions et du fait des phénomènes, d'absorption et de diffusion décrits plus haut, elle n'est que semi-quantitative. En effet, bien que l'intensité de la fluorescence émise dépende de manière linéaire de la concentration en fluorochrome, le signal collecté dépend lui de façon non linéaire de la profondeur du foyer, de ses propriétés optiques et de celles des tissus environnants. Deux foyers de concentration en fluorochrome identiques n'auront donc pas la même intensité de fluorescence collectée en épi-illumination s'ils sont à deux profondeurs distinctes dans des tissus de natures différentes ou plus ou moins vascularisés (impact de l'hémoglobine) [192].

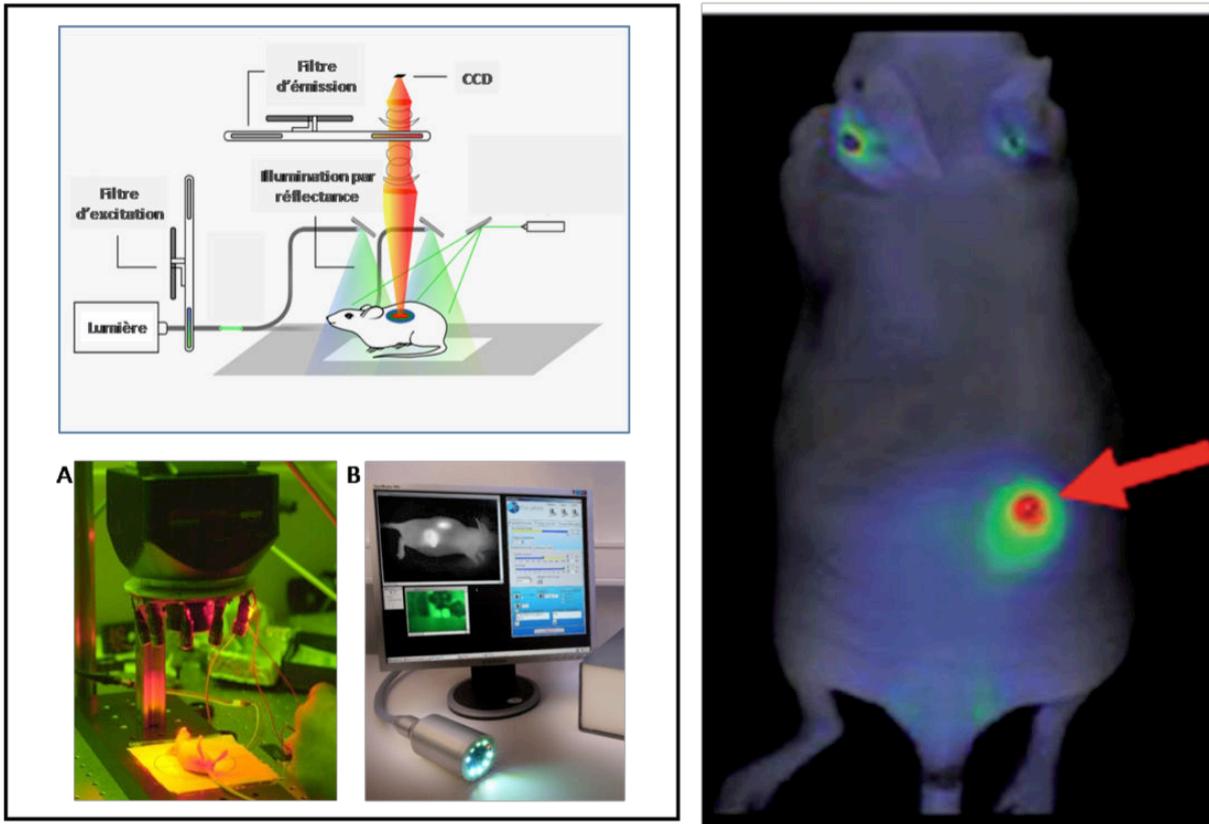


Figure 20 Système d'imagerie de fluorescence par réflectance (2D)

En haut à gauche : schéma de représentation d'un système d'imagerie de fluorescence en épi-illumination. Les traceurs fluorescents sont injectés dans l'animal puis sont excités par une source de lumière à une longueur d'onde donnée (lumière blanche filtrée, laser, LEDs). Le signal fluorescent d'émission est capté par une caméra (CCD) équipée de filtres spécifiques de ces rayonnements lumineux d'émission.

A Système d'imagerie en épi-illumination.

A Système d'imagerie en épi-illumination.

A droite exemple d'imagerie de fluorescence 2D d'une souris porteuse d'une tumeur sous cutanée d'après [188].

- Trans-illumination

Dans cette approche technique la source lumineuse (généralement un laser) illumine l'objet à imager du côté opposé au détecteur (généralement une caméra CCD).

La trans-illumination permet de limiter l'impact de l'auto-fluorescence (Figure 21) et de prendre en compte l'inhomogénéité des tissus et les phénomènes d'absorption et de diffusion [189] pour corriger les images de fluorescence collectées et obtenir une image qualitative et quantitative en 3 dimensions au moyen d'algorithmes mathématiques dédiés.

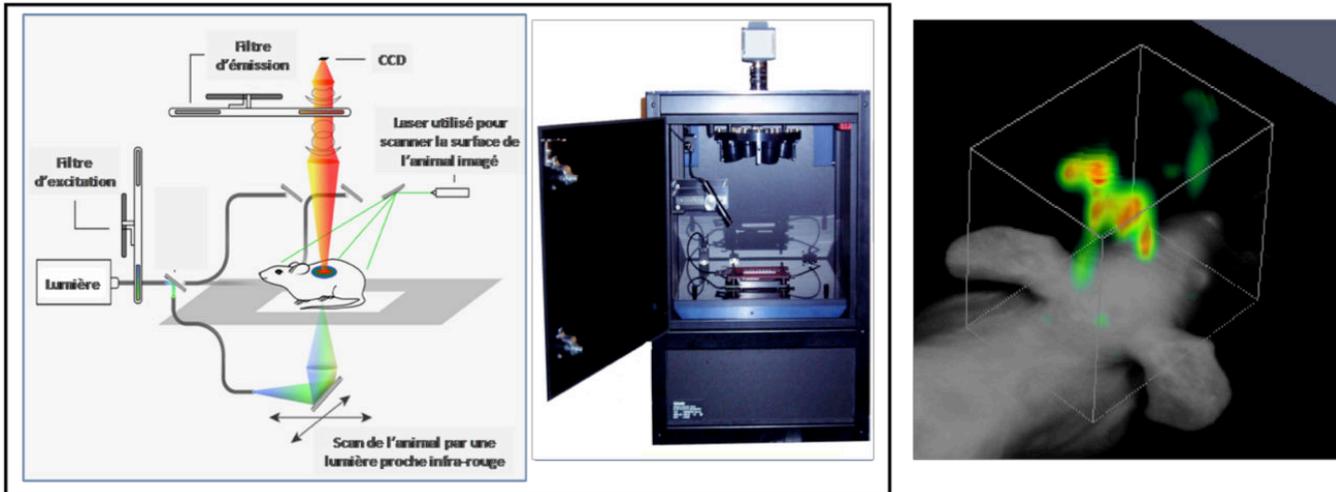


Figure 21 Système d'imagerie de fluorescence par transmission (3D)

L'acquisition est réalisée par trans-illumination. La souris est scannée par le dessous à l'aide d'une source lumineuse laser NIR, la lumière transmise et la fluorescence émise sont recueillies par une caméra (CCD) placée au dessus de l'animal. Après un balayage de la surface d'intérêt par un deuxième laser et grâce à l'utilisation d'un algorithme de traitement de ce signal fluorescent il est possible d'obtenir des reconstructions de la position dans l'espace de la source de fluorescence.

A gauche Schéma de représentation d'un système d'imagerie de fluorescence en trans-illumination et photographie d'un système prototype de fluorescence 3D (fDOT, Cyberstar, France)

A droite : Image de fluorescence 3D de la distribution intracérébrale d'un composé thérapeutique candidat (©OPTIMAL, Grenoble, France).

Le développement et la commercialisation des systèmes d'acquisitions de fluorescence tridimensionnels ont rapidement évolué depuis une vingtaine d'années. De nombreux systèmes ont été décrits depuis le début des années 2000.

On peut classer les différentes approches tomographiques selon la nature de la modulation de l'énergie lumineuse d'excitation, Continuous Wave (CW), Frequency domain (FD) et Time domain (TD). Bien que les différentes approches aient été caractérisées sur des modèles de fantômes, [190] c'est la technologie CW qui a été la plus décrite pour son utilisation in vivo.

Cette approche est basée sur l'illumination du sujet d'étude par une source de lumière dite continue, c'est-à-dire qui ne subit aucune modulation ni d'intensité ni de fréquence. Dans les systèmes CW on distingue plus particulièrement trois types d'approches tomographiques :

- Les systèmes « fixes », c'est-à-dire sans mouvements de la source ou de l'animal sont généralement composés de sources lumineuses multiples [191, 192] dont certaines ont été intégrées dans un dispositif d'imagerie anatomique de type IRM [193].
- Les dispositifs qui mettent en œuvre un déplacement de l'animal (rotation à 360°) et une source lumineuse d'excitation fixe [194-196].

○ Les systèmes pour lesquels l'animal reste en position fixe avec une source lumineuse qui se déplace. Pour ce type de systèmes, deux approches technologiques majeures ont été publiées et ont abouti à la création d'appareils tomographiques désormais disponibles sur le marché (commercialisés respectivement par Perkinelmer et Biospace Lab.). Dans ces deux approches l'animal est positionné sur un support et la source lumineuse d'excitation se déplace selon les axes x,y afin de scanner une partie de l'animal préalablement définie par le manipulateur.

Le premier système a été décrit dans les années 2000 par Vasilis Ntziachristos [197] et est maintenant commercialisé par la société PerkinElmer sous le nom de FMT (Fluorescence Mediated Tomography ; modèles 2000 ou 4000 selon le nombre de longueurs d'ondes lasers). Ce système effectue un balayage laser pour mesurer la fluorescence (lumière filtrée) ainsi qu'une mesure de transmission (lumière non filtrée). Les mesures de transmission sont utilisées pour corriger la mesure de fluorescence sur chaque point de balayage.

Ce système a montré sa capacité à imager des tumeurs mammaire implantées de façon sous cutanée, des tumeurs pulmonaires sur des modèles transgéniques mutés pour le gène K-Ras, sur un modèle de remodelage osseux [198] sur des plaques d'athéromes [199] ou encore réaliser la biodistribution de différents agents de contraste utilisés en imagerie fluorescente [200].

Le deuxième système est celui du Tomographe Optique de Fluorescence en milieux diffus ou, en anglais, fDOT pour fluorescence Diffuse Optical Tomography qui a été développé au sein d'une collaboration entre le CEA LETI et la plateforme Optimal à Grenoble [201-205]. Cette approche technologique utilise un laser continu qui effectue un balayage de la zone d'intérêt de proche en proche tandis que sont acquises successivement en chaque point des mesures de fluorescence et des mesures de transmission de la lumière d'excitation (Figure 22).

Un algorithme de reconstruction algébrique utilise les mesures de transmission de la lumière d'excitation pour établir une carte d'hétérogénéité du milieu et corriger le modèle de propagation de la lumière pour reconstruire la distribution et l'intensité des sources fluorescentes en 3D.

Cette méthode a été évaluée et validée sur fantômes puis sur des modèles animaux de cancer du poumon et de glioblastome [201-204]. Elle a montré sa capacité à permettre de distinguer plusieurs foyers fluorescents de concentrations en fluorophores différentes localisés à différentes profondeurs au sein d'un organisme vivant.

Cette technologie de fluorescence 3D a été combinée avec de l'imagerie nucléaire (TEP) et des rayons x [206] et sa capacité à localiser et quantifier la distribution d'un agent de contraste multimodal dans des tissus profonds à des concentrations variant entre 1 μ M et 3 nM a été démontrée par une excellente corrélation ($r^2=0.95$) entre les 2 modalités d'imagerie.

Le principe et les algorithmes de reconstruction du fDOT ont récemment été intégrés dans le

système OPTIMA de la société Biospace Lab. (Nesles-la-vallée, France) qui combine ainsi la bioluminescence (2D et multi-view), la fluorescence (2D et 3D) et la radiographie, et ont fait l'objet d'une partie de ce travail de thèse.

De façon générale et bien que les technologies d'imagerie de fluorescence en trois dimensions soient des outils de haute sensibilité pour l'obtention d'informations moléculaires *in vivo*, le signal est localisé avec une assez faible résolution (Cf. § atouts et limites) ce qui rend l'interprétation du positionnement anatomique du signal délicate. C'est pourquoi, certains groupes de recherches se sont intéressés à une intégration multimodale de la fluorescence 3D avec des technologies d'imagerie IRM [193, 207] et microCT [195, 196, 198, 200, 208-212] afin de replacer l'information moléculaire obtenue dans un contexte anatomique précis mais également d'introduire des informations permettant la correction du signal fluorescent en fonction de la nature du tissu dans lequel il se trouve.

3.3.2.4 Atouts et limites

L'imagerie de fluorescence présente potentiellement une très forte **sensibilité** et une très haute **résolution** qui permettent de visualiser en **temps réel** des phénomènes moléculaires. Toutefois la sensibilité et la résolution dépendent toutes deux de la profondeur de la source fluorescente. Ainsi, l'approche 2-D est seulement **semi-quantitative** et sa **résolution spatiale** se dégrade avec la profondeur. L'imagerie de fluorescence tomographique permet la localisation des foyers fluorescents en 3-D et la quantification des niveaux de fluorescence. Par contre cette approche n'est pas en temps réel, sa **résolution** est assez faible (1 mm au mieux) et se limite à des objets peu épais (<2cm) ce qui restreint son utilisation aux petits animaux de laboratoire. Cette modalité d'imagerie, comme les autres modalités d'imagerie moléculaire, ne fournit pas d'information anatomique permettant de localiser précisément le signal. C'est pourquoi il apparaît nécessaire de coupler cette modalité d'imagerie avec une autre capable de fournir des renseignements anatomiques de l'animal observé. L'imagerie de fluorescence est relativement peu coûteuse tant pour l'achat des équipements que pour le fonctionnement qui ne nécessite pas d'infrastructure particulière. Elle n'utilise pas de radiations ionisantes mais elle requiert la plupart du temps l'utilisation d'agents de contrastes fluorescents qui peuvent potentiellement présenter une toxicité.

3.3.2.5 Les fluorochromes

On distingue différents types de fluorochromes dont les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont compatibles avec une détection *in vivo* chez le petit animal (voir § Fluorescence).

Un fluorochrome est caractérisé par quatre paramètres dont il faut tenir compte lors d'un choix pour une utilisation *in vivo* :

- **Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission** : le spectre d'excitation correspond aux longueurs d'onde pour lesquelles un fluorochrome excité réémet une partie de cette énergie sous forme de lumière. Le spectre d'émission est l'intensité d'émission à différentes longueurs d'onde quand le fluorochrome excité retourne à des niveaux d'énergie inférieurs.
- **Le coefficient d'extinction** (ou absorption molaire, noté ϵ) relie la quantité de lumière absorbée à une longueur d'onde donnée à la concentration du fluorochrome en solution ($M^{-1}.cm^{-1}$). Il doit être le plus grand possible (exemples pour l'ICG et l'IRDYE800, $\epsilon = 115\ 110\ M^{-1}.cm^{-1}$ et $\epsilon = 240\ 000\ M^{-1}.cm^{-1}$ respectivement).
- **Le rendement quantique** (noté ϕ) qui correspond à l'efficacité relative de la fluorescence soit le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Il doit être le plus élevé, donc le plus proche possible de 1 (exemples pour l'ICG et l'IRDYE800, $\phi = 0.13$ et $\phi = 0.15$ respectivement).
- **La durée de vie à l'état excité** (noté τ) qui est le temps moyen où la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état basal (nanosecondes). Il faut choisir une durée de vie à l'état excité qui n'est pas trop faible afin d'être en mesure de capter les photons émis (exemples pour l'ICG et l'IRDYE800, $\tau = 0.036\ ns$ et $\tau = 0.35\ ns$ respectivement).

3.3.2.6 Les différents types de sondes fluorescentes

On parle de traceurs ou marqueurs fluorescents ou encore de sondes optiques.

Les fluorochromes peuvent être utilisés seuls ou bien greffés à un ligand présentant une spécificité pour un récepteur ou une activité biologique (récepteurs, enzyme, pH, oxygénation).

Dans ce contexte on peut classer les agents fluorescents en trois catégories (Figure 22):

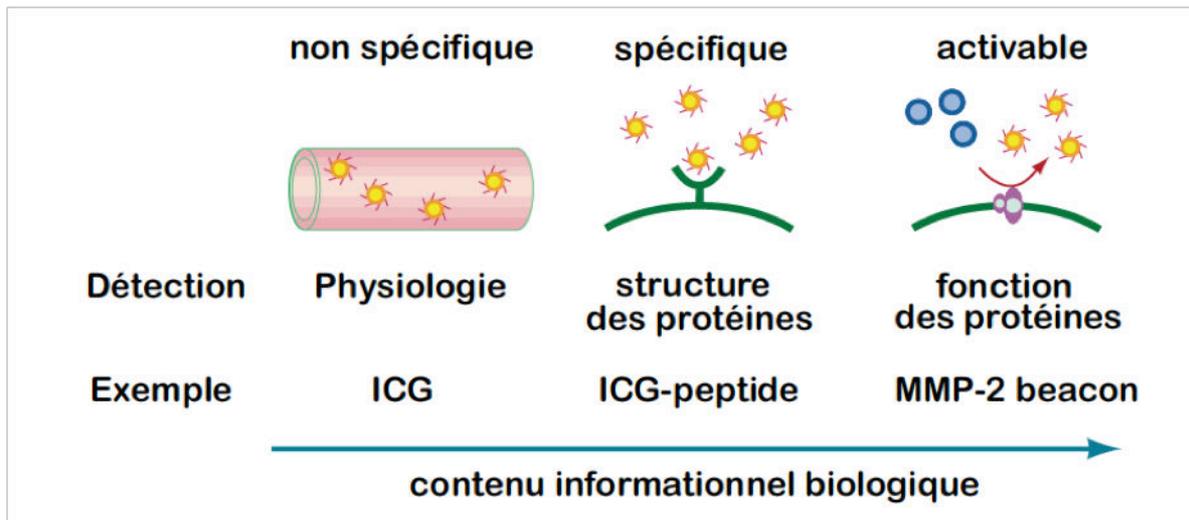


Figure 22 Les différents types de sondes utilisées en imagerie de fluorescence

D'après [213]

○ **Les sondes non spécifiques**

Ce sont des composés fluorescents qui ne présentent pas d'affinité particulière pour une cible moléculaire. Ils sont utilisés pour leur capacité à circuler dans l'organisme. Un des représentants de cette catégorie est l'**ICG** (indocyanine green) qui est l'un des rares agents de contraste utilisable chez l'homme (approuvé par la Food & Drug Administration, FDA, en 1959). Cet agent de contraste est un colorant non-ciblé qui est utilisé pour l'évaluation de la fonction hépatique et cardiaque en clinique [214, 215]. Plus récemment, il a été décrit pour la détection de tumeurs dans des modèles expérimentaux [216-220] mais également en clinique, pour l'aide à la chirurgie du cancer du foie [221-223], de la carcinose péritonéale [224], du cancer de l'ovaire [225], du cancer des voies aériennes digestives supérieures [226] et du cancer du poumon [227].

Des agents lipophiles comme le 1,1-dioctadecyltetraméthyl indotricarbocyanine iodide (**DiR**) ou le 1,1-dioctadecyl tetraméthylindodicarbocyanine, 4- chlorobenzenesulfonate salt (**DiD**) sont des agents de contraste fluorescents proche infrarouge (pic d'émission max à 780 nm et 665 nm respectivement) qui peuvent s'insérer, de par leur lipophilie, dans les membranes plasmiques et permettent ainsi de marquer des cellules *in vitro* [228] avant de les injecter *in vivo* pour réaliser le suivi dynamique de leur distribution dans l'organisme.

Ce type d'approche peut également être mis en œuvre en fixant de façon covalente des fluorochromes sur les fonctions NH_2 présentes sur la membrane cellulaire.

○ **Les sondes spécifiques**

Elles sont constituées d'un fluorochrome couplé à un ligand ayant la capacité de se fixer spécifiquement à certaines structures biologiques présentes de façon dérégulée (sous

exprimées ou sur exprimées) sur les cellules tumorales (intégrines, VEGF/VEGFR, Cathepsines, récepteurs à l'antigène Carcino-Embryonnaire (CEA), Antigène Spécifique de la Prostate (PSA), EGF/EGFR, ERBB2 (ou HER2), IGF1R, récepteurs à la Somatostatine, G-Protein Coupled Receptors Récepteurs couplés à la protéine G). Les marqueurs fluorescents sont caractérisés par leur spécificité en considérant le rapport entre le nombre de marqueurs fixés à leur cible et le nombre de marqueurs circulant ou fixés ailleurs.

Différents types de ligands peuvent être utilisés : des protéines (anticorps ou fragments d'anticorps), des peptides ou encore de petites molécules (sucres par exemple).

Pour exemple les traceurs utilisés dans la partie expérimentale de ce mémoire, le RAFT-(cRGD)₄-AlexaFluor[®]700 et le RAFT-(cRGD)₄-800 (dont le nom commercial est Angiostamp[™]700 et Angiostamp[™]800; Fluoptics) sont basés sur une plateforme cyclodecapetidique portant sur une face 4 copies du peptide cyclisé RGDfK assurant la reconnaissance et la fixation des intégrines $\alpha\beta 3$ et sur la face opposée un fluorophore proche infrarouge permettant sa visualisation en imagerie de fluorescence. Ces traceurs ont été développés et caractérisés par notre équipe et ont démontré leur capacité à cibler spécifiquement l'intégrine $\alpha\beta 3$ dans les tumeurs [229-232] dans des modèles animaux de cancer du poumon [202], de l'ovaire [233], de sarcomes [234], de carcinomes péritonéaux [235, 236], de cancers des voies aéro-digestives supérieures [237] et de métastases agressives de cancer du sein [238]. Il a également démontré son efficacité pour l'aide à la chirurgie pour la résection de sarcomes chez le chat [239] ainsi que pour le suivi gestationnel chez la souris [240].

○ Les sondes activables

Les sondes optiques aussi appelées « smart probes » (pour sondes intelligentes) sont des composés dont la fluorescence est inhibée dans leur état initial puis activée par un phénomène biologique (par exemple une catalyse enzymatique ou un changement de pH) [241-243]. De nombreuses sondes ont été développées pour leur intérêt dans le ciblage spécifique des différents processus moléculaires qui surviennent lors du développement du cancer :

- Prolifération cellulaire : Ki67, récepteurs de l'acide folique
- Hypoxie : CAIX
- Invasion : Cathepsines, MMPs
- Inflammation : COX-2
- Apoptose : Caspase 3, Caspase 7, Caspase 9

Ces sondes sont composées du ligand ou d'un composé synthétique homologue présentant une affinité importante avec l'enzyme d'intérêt. Sur ce ligand, est greffée une molécule fluorescente. Un avantage majeur de ce type de composés est leur très faible bruit de fond circulant. Un autre atout considérable est le phénomène d'amplification du signal qui est

engendré par la catalyse de plusieurs marqueurs par une même enzyme contrairement aux marqueurs spécifiques pour lesquels le rapport marqueur/cible est de 1.

Les différents types de sondes spécifiques et activables sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 Les différents types de sondes spécifiques et activables utilisées en imagerie de fluorescence.

Processus d'intérêt dans le développement de cancer	Type de sonde (spécifique/activable)	Nom de la sonde (nom de(s) l'entreprise(s) commercialisant la sonde)	Biomarqueur ciblé	Ligand utilisé	Fluorophore(s) utilisé(s)	Quencher	Applications
Métabolisme	Activable*	NIR-2DG (PerkinElmer/LI-COR)	Glucose oxydase	2-déoxy-D-glucose	Cy5.5		Tumeurs stromales gastro-intestinales
					ICG		
					IRDye		
Prolifération		BombesinRsense680 (PerkinElmer)	Thymidine kinase	Analogue du peptide 7-amino acid bombesin	Alexafluor680		cancer colorectal (s.c.)
		ICG-FA	Recepteur du folate	Acide folique	ICG		
		FA-ICGA-PLGA Nps lipidiques					
Hypoxie	Activable	Hypoxisense680 (PerkinElmer)	CAIX (HIF1-alpha)		Alexafluor680		Gliome humain
							Cancer colorectal
							Cancer du sein
Invasion	Activable	GB137	Cathepsine B	Acylométhyle kétone (AMOK)	Cy5.5	QAY21	
		ProSense680 (PerkinElmer)	Cathepsine B, L, S, et Plasmine		Alexafluor680		cancer ovarien et cancer ORL
		CY5.5-DPGC-CathE	Cathepsine E		Cy5.5	DPGC	cancer du pancréas
		MMPsense (PerkinElmer)	MMPs (2, 3, 7, 9, 12, 13)		AlexaFluor645/680/750		carcinomes ORL
		MT1-MMP	MMPs (2, 9)		Cy5.5	BHQ3	
		CTX: Cy5.5	MMP 2	Chlorotoxine	Cy5.5		gliome, meduloblastome, prostate, saromes
		MMP-Cy5.5			Cy5.5		
		MMP2-TMR			Rhodamine		
		MMP7-Cy5.5	MMP 7		Cy5.5		
		MMP13-Cy5.5	MMP9		Cy5.5		
MMP2-TIMP-Cy5.5	MMP2		Cy5.5				
AF489	MMP 2, 9		Cy5.5		Sarcome d'Ewing, fibrosarcomes, cancer du sein		
Inflammation	Activable	Xenolight Rediject COX-2 (PerkinElmer)	COX-2				Cancer colorectal
		NANQ-IMC6		Indométhacine	NANQ		
		SLX-Lipo-Cy5.5	Sialyl-LewisX carbohydrate (leucocytes)	E-Sélectine	Cy5.5		Tumeur ascitiques d'Ehrlich
		ProSense750			AlexaFluor750		Polypose intestinale

		(PerkinElmer)					
		PFC-NIR				Cy5.5	Carcinose mammaire
Apoptose	Activable	TCAPQ647	Caspase 3	DEVD (séquence aminoacide)	Alexafluor645	QSY21	
		AB50-Cy5	Caspase 3, 7		Cy5.5		Cancer coloectal
		AB50-Cy5			Cy5.5		
Angiogénèse	Spécifique	Cypate-e-linear RGD	intégrine alphavbeta3	Tripeptide RGD (Arg, Gly, Asp)	Cypate		Adenocarcinome pulmonaire
		IRD800-linear-RGD			IRD800		Glioblstome
		IRD800-cyclic-RGD			IRD800		Glioblastome
		Cy5.5-cyclic-RGD			Cy5.5		Glioblastome
		CLIO-Cy5.5-cRGD			Cy5.5		Carcinome mammaire
		QD705-RGD			QD705		Glioblastome
		111In-DTAP-IRD800-RGD			IRD800		Mélanome
		Integrin trace (Intrace)			ICG		
		Cy7-tetrameric-RGD			Cy7		Glioblastome
		64Cu-DOTA-Cy5.5-RGD-knottin			Cy5.5		Caricome mammaire et glioblastome
		Integrinsense (PerkinElmer)			AlexaFluor645/680/750		Carcinome colorectal et sarcome d'Ewing
		Angiostamp™700/800 (Fluoptics)			AlexaFluor700/?		Glioblastome, cancer colorectal, cancer de la prostate, carcinose péritoneales
		Cy5.5-VEGF			Cy5.5	VEGF	Tumeur mammaire
		QD645-VEGF	QD645				
Bevacizumab-IRDye800	IRDye800CW	Bévacizumab	Carcinose ovarienne				
Marqueur cellulaire tumoral	Spécifique		Antigène Oncofoetal (CEA)	Anticorps monoclonal anti CEA	Cy5.5		
					AlexaFluor488		
					DY-676		
			QD820				
		Alpha-foetoprotéine (AFP)	Anticorps monoclonal anti AFP	QD590		Cancer hépatocellulaire	
Marqueur cellulaire tumoral	Activable	PSA 750 FAST (PerkinElmer)	Prostate Specific Antigen (PSA)	Anticorps anti PSA			Cancer de la prostate
					QD		
					IRDye800CW		
					IRD800RS		
					Cy5.5		
					Cy 7		
	ICG						

Marqueur cellulaire tumoral	Spécifique		EGFR	Cetuximab	Cy5.5			
					QD840			
					Bodipy FL		Cancer du sein	
					Affibody	Cy5.5		
				AlexaFluor680				
				IRD800				
				QD580				
Marqueur cellulaire tumoral	Activable		ERBB2 (HER2)	Trastuzumab	Cy5.5	oui	Sarcome	
					Rhodamine			
					ICG			
					QD800			
					AlexaFluor680/750			
				HER2sense (PerkinElmer)		NIR fluorophore (em : 661nm)		Tumeur mammaire Tumeur mammaire
					Affibody	DyLight750		Tumeur mammaire
						QD800		
						AlexaFluor750		
						DY-680		
Marqueur cellulaire tumoral	Spécifique		IGF1R	Anticorps spécifique AVE-1642	QD705			
					AlexaFluor680			
Marqueur cellulaire tumoral	Spécifique		SSTR2	Ocreotate (analogue de la somatostatine)	ITCC			
					5-carboxy-fluorescein		Cellules du microenvironnement tumoral	
				GPCR	Gastrin peptide	AlexaFluor680		Cancer du sein, Cancer de la prostate
				Endothelin 1	Cy5.5		Cancer mammaire, fibrosarcome, cancer thyroïdique	

3.3.2.7 Applications biomédicales

Les applications précliniques chez le petit animal sont essentiellement de 2 types :

- Réaliser des études pharmacocinétiques *in vivo* de façon non invasive pour obtenir des informations concernant la biodistribution, le métabolisme et l'élimination de nouveaux composés marqués à cet effet par un fluorochrome,
- Etudier des phénomènes biologiques *in vivo* de façon non invasive pour explorer un contexte physiopathologique ou thérapeutique en utilisant les sondes fluorescentes existantes (en constante augmentation) pour le suivi de l'expression de biomarqueurs ou le suivi d'activités enzymatiques.

Les applications cliniques

Ces dernières années connaissent un intérêt grandissant pour l'utilisation de l'imagerie de fluorescence pour le guidage de la chirurgie.

Aujourd'hui, on dénombre une dizaine de systèmes commercialisés par différentes entreprises. Ces systèmes permettent en effet d'observer en temps réel un signal fluorescent directement superposé à une image morphographique. Parmi ces systèmes on peut citer les systèmes Solaris, Fluobeam800, LAb-Flare, Spectrum, SPY Elite, PDE, Iridum, Explorer Air respectivement commercialisés par les entreprises PerkinElmer, Fluoptics, Curadel, Quest, Novadaq, Hamamatsu, VisionSense et Surgvision. Ils se différencient selon la source d'illumination qui peut être à base de LEDs (Solaris, Spectrum, PDE et Explorer Air) ou d'un laser (Fluobeam, SPY Elite et Iridum). Une revue des systèmes disponibles a récemment été publiée par le groupe de Brian W Pogue [244].

Même si l'ICG reste le principal agent de contraste employé dans les études utilisant la fluorescence intra-opératoire [245], de nombreux essais sont menés afin de palier à la principale limite de ce traceur, à savoir son absence de spécificité tumorale. De récents essais cliniques sont en cours et mettent en œuvre l'utilisation:

- De BLZ100 à base d'ICG qui cible spécifiquement les canaux chlorures des cellules tumorales,
- De cetuximab-IRDye800CW ou de bevacizumab-IRDye800CW pour la résection pour la détection et la résection d'adénocarcinomes pancréatiques,
- De Girentuximab-IRDye800CW pour la détection de l'hypoxie tumorale dans des cas de carcinomes rénaux,
- D'OTL 38 et d'EC17 (sondes fluorescentes dirigées contre les récepteurs de l'acide folique) pour la détection de tumeurs ovariennes et pulmonaires,
- De Panitumumab-IRDYE800CW pour la détection de glioblastomes, de SGM101 dirigé contre les CEA de cancers digestifs,
- De l'EMI 137 qui cible les récepteurs tyrosine kinase dans les cancers colorectaux
- De sondes activables comme le LUM015 (ciblant l'activité des cathepsines) ou comme

l'AVB 620 (ciblant l'activité des protéases) pour la détection de cancers mammaires [245].

3.4 L'imagerie photoacoustique

3.4.1 Histoire et principes de base

L'effet photoacoustique a été découvert en 1880 par Alexander Graham Bell lors de l'invention du photophone, une nouvelle technique de communication où les sons étaient transmis au moyen de l'énergie lumineuse du soleil [246]. Lors de ces travaux, Bell a remarqué que des ondes sonores de natures variées étaient générées lorsque des ondes lumineuses étaient appliquées à différents matériaux.

Bowen en 1983, cent ans après la découverte de l'effet photoacoustique, qui a envisagé, pour la première fois, son application pour l'imagerie médicale avec des radiations ionisantes ou non-ionisantes [247]. Dans ces travaux, Bowen ne mentionne cependant que l'utilisation de micro-ondes comme source d'induction de cet effet en profondeur et pas la possibilité de l'utilisation de sources optiques. Dix ans plus tard l'imagerie en profondeur utilisant une source laser a été réalisée avec une résolution latérale ne descendant pas en dessous de 6 mm [4, 5]. Ce n'est qu'en 2003 que l'utilisation de l'imagerie photoacoustique *in vivo* a été rapportée Par Lihong V. Wang [248].

L'imagerie photoacoustique (PA) ou optoacoustique (OA) est une modalité mixte qui combine les atouts de **sensibilité de détection** de l'imagerie optique et la **résolution en profondeur** de l'imagerie ultrasonore. La preuve de concept de cette modalité d'imagerie a été réalisée chez le petit animal, mais de par ses caractéristiques uniques, elle s'inscrit parfaitement dans un processus de transfert vers une utilisation clinique.

Brièvement, l'acquisition d'images photoacoustique se décompose de la manière suivante :

- Une impulsion laser de quelques nanosecondes est envoyée dans le tissu à observer.
- Certaines molécules absorbent l'énergie lumineuse puis reviennent à leur état basal. Ce changement transitoire d'état d'énergie créé un échauffement local des molécules irradiées dont la dilatation provoque une vibration. Ce phénomène appelé phénomène « thermo-élastique » génère des ondes ultrasonores détectables par un transducteur ultrasonore qui peut composer une image digitale de la source du signal (Figure 23).

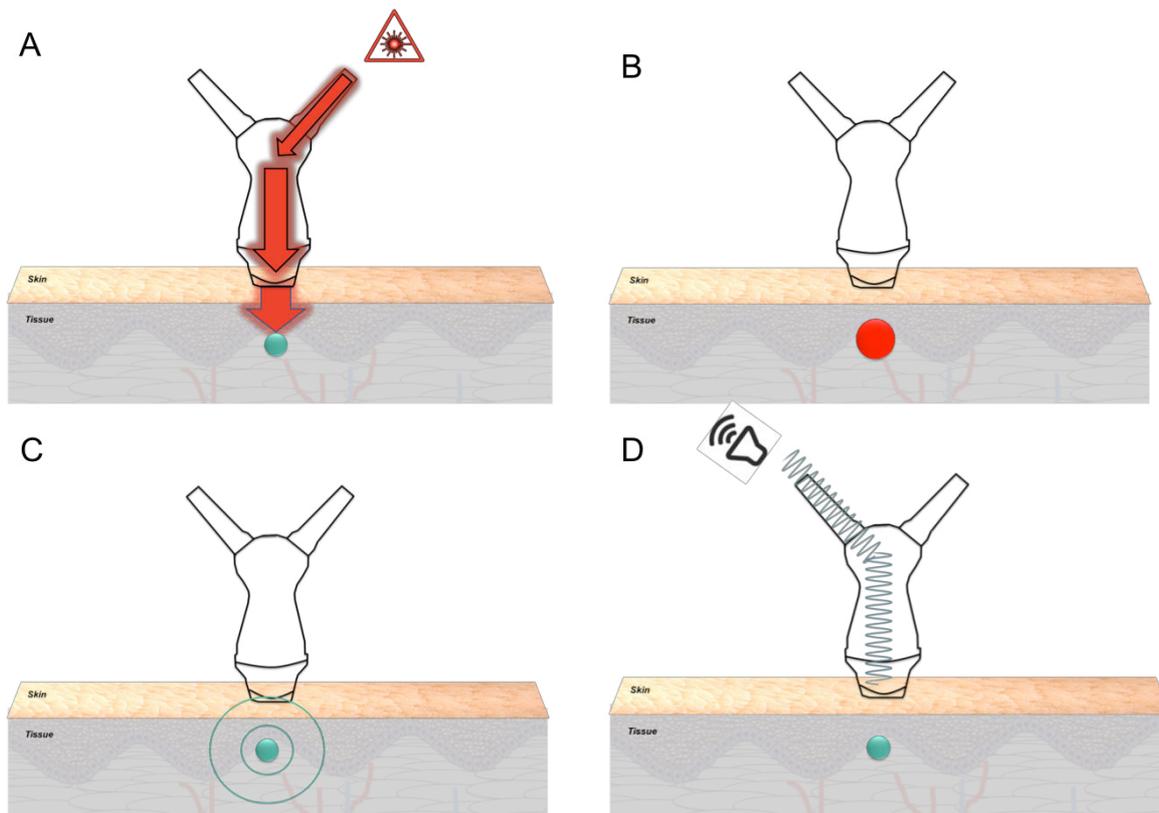


Figure 23 Principe général de l'imagerie photoacoustique biomédicale.

Le laser pulsé (nanoseconde) illumine les tissus d'intérêt (A). Les composés endogènes et/ou exogènes absorbent l'énergie lumineuse à des longueurs d'ondes spécifiques et créent un phénomène transitoire appelé « expansion thermo-élastique » (B). La répétition de ce phénomène génère des ondes ultrasonores (C) qui sont ensuite captées par un transducteur ultrasonore (D). (C)

Les sources d'illuminations lasers utilisées pour l'imagerie photoacoustique sont des lasers modulés en temps, c'est-à-dire capable d'émettre un rayonnement sur une courte période de façon répétitive. La durée de la pulsation est généralement de quelques nanosecondes et La cadence d'illumination est généralement entre 10 et 20 Hz. Les longueurs d'ondes utilisées, pour les applications *in vivo*, sont situées dans la zone proche infrarouge (Cf. § Atouts et limites sur l'imagerie de fluorescence).

Trois sociétés se sont positionnées précocement sur le marché des systèmes d'imagerie photoacoustique : Ithera, Endra Inc. et Visualsonics Inc (Figure 24).

Les systèmes inSight/inVison (Insight64, inVision128, inVision256-TF et inVision 512-echo) (**Ithera**) consistent en une acquisition tomographique de l'animal au moyen d'une couronne de transducteurs placés en cercle autour de celui-ci, qui est lui même placé dans une membrane de polyuréthane, le contact entre les détecteurs et l'animal se faisant par immersion dans l'eau. Cette technologie utilise un laser Neodymium-Doped Yttrium Aluminium Garnet (Nd:Yag) capable d'opérer entre 660 et 1300 nm avec une cadence de 9 ns par pulsation et une fréquence de 10 Hz. La lumière est acheminée par deux fibres optiques placées de part et

d'autres de l'animal. La fréquence des capteurs ultrasonores est de 5 MHz [249]. Afin de générer une image en trois dimensions, le portoir de l'animal est relié à un moteur 3D qui permet le déplacement de l'animal au travers de la partie illumination/collection du signal qui est fixe. Ithera propose depuis peu un système dédié plus spécifiquement à une utilisation clinique (MSOT Acuity). Ce système a été décrit pour le diagnostic de la sclérose multiple en plaques sur une dizaine de patients [250].

Le système Nexus 128+ (**Endra**) est un système présentant des similitudes avec le système précédent, avec une fréquence centrale pour les détecteurs ultrasonores de 5 MHz et un laser Nd :Yag qui opère de 680 à 950 nm avec une illumination de 7 ns et une cadence de répétition de 10 Hz. Dans ce système, le faisceau laser d'excitation ainsi que les détecteurs ultrasonores sont immergés dans l'eau. Les capteurs US sont disposés à 360° autour d'un « bol » en polyuréthane dans lequel l'animal est placé. Le contact entre le « bol » et l'animal se fait au moyen de quelques ml d'eau [251]. Endra Inc. propose également un système dédié à de futures utilisations cliniques (TAEUS, source : site web Endra Inc.).

Visualsonics propose deux systèmes d'imagerie photoacoustique, le Vevo®LAZR et sa version améliorée, le Vevo®LAZR-X. Le Vevo®LAZR se compose d'un laser Nd :Yag opérant de 680 à 970 nm avec une durée de pulsation de 5 ns et une cadence de répétition de 20 Hz. Le Vevo®LAZR-X utilise un laser présentant une deuxième fenêtre infrarouge et est donc capable d'opérer également de 1200 à 2000 nm. Dans ce cas, le transducteur US est composé de 256 éléments piezo-électrique linéaires. De part et d'autre de ce transducteur sont positionnés deux « bundles » de fibres optiques acheminant l'illumination laser. Dans la version historique, les fibres optiques étaient incorporées directement dans la coque du transducteur. Dans la version la plus récente, Vevo®LAZR-X, les fibres optiques sont libres et peuvent donc être positionnées sous différents angles autour du transducteur US. Afin de réaliser une acquisition 3D, l'animal est positionné sur le lit qui le maintient à température optimale mais qui permet également d'enregistrer et de contrôler les paramètres vitaux (fréquences cardiaques et respiratoire). Le transducteur est attaché à un moteur 3D qui permet de scanner l'animal sur une longueur maximum de 65 mm. Le contact entre le transducteur et l'animal se fait par un gel échographique. La fréquence ultrasonore utilisée pour les deux systèmes est variable, en effet, Visualsonics propose une gamme de transducteurs allant de 15 MHz à 55 MHz de fréquence centrale ce qui permet d'adapter la résolution (de 100 µm à 30 µm) et la profondeur de pénétration (de 15 à 30mm) selon l'application. On notera également une amélioration apportée au Vevo®LAZR-X pour lequel la largeur et la position des fibres lasers sont versatiles et peuvent donc être adaptées aux contraintes spécifiques de la zone à imager.

La possibilité de pouvoir choisir la fréquence US que l'on utilise pour l'imagerie photoacoustique *in vivo* est un atout important, la résolution, la profondeur d'acquisition et la sensibilité de détection du signal étant directement reliée à la fréquence employée.

Un autre atout du système Visualsonics par rapport à ses deux concurrents est la combinaison temps réel avec l'imagerie échographique, qui offre une dimension anatomique, voire

fonctionnelle (débit) particulièrement utile pour l'interprétation des données photoacoustiques.

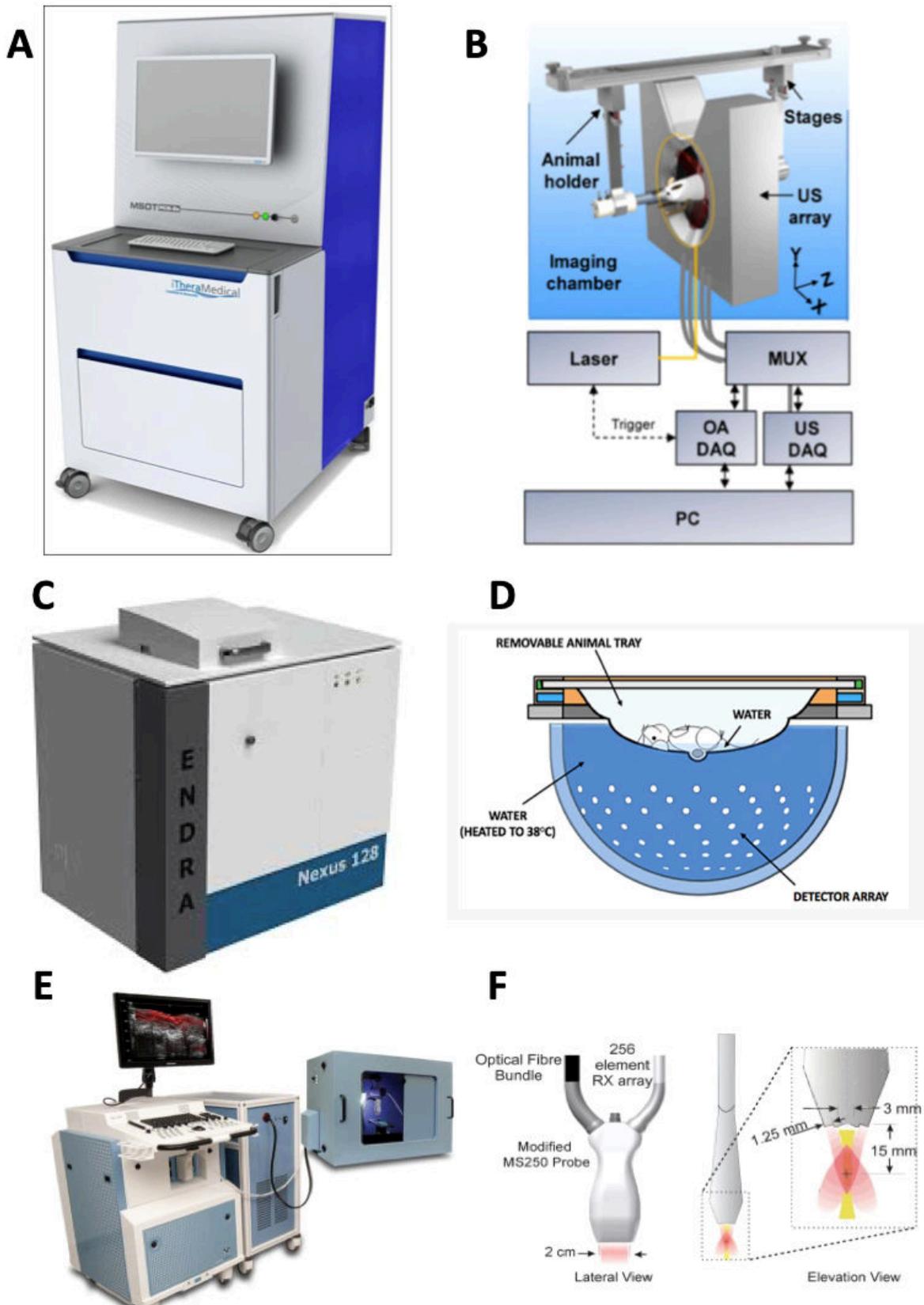


Figure 24 Photographies et représentations schématiques des configurations des systèmes d'imagerie photoacoustique dédiés au petit animal commercialisés par Ithera, le système MSOT (A) et (B), par Endra Inc., le système Nexus 128 (C) et (D) et du système

Vevo®LAZR (E) et (B). Pour le système Visualsonics, les deux fibres optiques sont placés de part et d'autre du transducteur et sont moulées à même la sonde. D'après [252].

3.4.2 Avancées Technologiques

De nombreux efforts de recherche et développement sont mis en œuvre afin de rendre les dispositifs d'imagerie photoacoustique plus versatiles et également utilisables en clinique.

C'est le cas pour les technologies laser pulsé de haute énergie/rapidité (illuminateur laser à diodes pulsées de Quantel-Laser, Inc.) mais également les transducteurs ultrasonores à bande ultra-large (225MHz de bande passante, Olympus Inc.) et à ultra haute fréquence (de 15 à 50 MHz pour des résolutions axiales respectives de 100 à 30 μm , Fujifilm Visualsonics Inc.) et encore les systèmes d'acquisition multi canaux à haute vitesse (128 canaux, DAQ Ultrasonix Inc.). Deux systèmes très innovants ont été décrits dernièrement. Il s'agit de systèmes d'imagerie photoacoustique capable de faire l'acquisition temps réel du corps entier d'un petit animal grâce à des laser et systèmes d'acquisitions ultra-rapides. Le premier est un système panoramique offrant une résolution axiale de 125 μm , une cadence d'images de 50 Hz en 2D et une profondeur d'acquisition de 48 mm. Ce système a notamment été décrit comme pouvant mettre en évidence des cellules tumorales circulantes dans le cerveau d'une souris [253]. Le second est un système pour lequel les auteurs ont fait l'acquisition dynamique intégrale d'un cœur battant grâce à une cadence de 100 Hz en 3D dans un volume de 1.5 cm^3 [254]. Un système plus compact et portatif basé sur l'utilisation de LEDs couplées à un transducteur ultrasonore de 10 MHz a récemment été présenté. Ce système, qui dispose de 2 longueurs d'ondes (690 et 850 nm) permet d'imager le sang à 2.2 cm de profondeur avec une résolution latérale de 570 μm et une résolution axiale de 260 μm [255].

3.4.3 Imagerie du contraste endogène

Un aspect intéressant de l'imagerie photoacoustique réside dans le fait que certains constituants biologiques présentent naturellement un effet photoacoustique assorti d'un spectre caractéristique et peuvent ainsi être détectés sans avoir recours à des agents de contraste exogènes [256]. La possibilité de balayer des longueurs d'ondes multiples permet de calculer la proportion relatives de molécules endogènes d'intérêt comme l'hémoglobine oxygénée, l'hémoglobine désoxygénée, la mélanine, les lipides, etc. [257-259].

Particulièrement, en détectant la proportion relative des hémoglobines oxygénée et désoxygénée, il est possible de déterminer la quantité totale en hémoglobine (HbT) et la saturation tissulaire en oxygène ($S_t\text{O}_2\%$) par l'équation $[(\text{oxyHb}/(\text{oxyHb} + \text{deoxyHb})) \times 100\%]$ [259]. Ces deux paramètres offrent, à eux seuls, des informations de très grande importance dans de nombreux contextes biologiques sur la vascularisation et l'oxygénation/l'hypoxie tissulaire.

Rich et al. ont par ailleurs démontré la pertinence de l'utilisation de l'imagerie photoacoustique pour le suivi des caractères hémodynamiques des tumeurs [260] et de l'évaluation de l'oxygénation tumorale pour prédire la réponse de cancers des VADS à la radiothérapie [261]. La pertinence de l'utilisation du contraste endogène a également été démontrée dans une étude visant à évaluer qualitativement l'imagerie photoacoustique endogène [249].

3.4.4 Imagerie du contraste exogène

Un autre volet intéressant de l'imagerie photoacoustique est sa capacité à fournir, en plus de ces informations fonctionnelles, des informations moléculaires par le biais de l'utilisation d'agents de contraste. Ces dernières années de nombreuses recherches ont été entreprises afin d'identifier des agents de contraste photoacoustiques compatibles avec une utilisation biomédicale.

La très récente revue du pionnier de l'imagerie photoacoustique, Lihong V Wang [262], présente les caractéristiques d'un agent de contraste idéal pour l'imagerie photoacoustique:

- Spécificité vis-à-vis d'un processus biologique d'intérêt
- Absorption maximale dans la fenêtre optique NIR pour une imagerie *in vivo* en profondeur
- Rendement quantique de fluorescence (Φ) nul ou proche de 0 (cette condition n'étant pas stricte)
- Absence de toxicité pour les cellules saines
- Faible propension au photo-blanchiment (photo-bleaching)

3.4.4.1 Agents de contraste organiques

Un des colorants historiquement utilisé pour l'imagerie photoacoustique est le vert d'indocyanine (ICG pour Indocyanine Green en anglais) qui présente l'originalité d'être à la fois fluorescent (avec un rendement quantique médiocre) (Cf. § fluorochromes) et photoacoustique.

Il a été utilisé en imagerie photoacoustique préclinique pour la détection de tumeurs cérébrales (glioblastome) [263], de nombreux modèles de tumeurs mammaires murines ou humaines [264-269], de cancer du col de l'utérus [270, 271], de cancers colorectaux [272, 273], hépatiques [274, 275], de la peau [276-282], pancréatique [283] implantés en sous-cutanés ou encore pour étudier la perfusion tumorale de carcinomes pulmonaires de Lewis (LLC) implantés en sous cutanée [284]. Plus anecdotiquement l'ICG a été utilisé dans le repérage des ganglions lymphatiques drainants chez des souris saines [285].

Par ailleurs, ces dernières années un large éventail de colorants organiques de petite taille absorbant dans la fenêtre proche infrarouge/infrarouge ont été développés pour une utilisation biomédicale, comme les colorants à base de porphyrine et de cyanine et les dérivés de

pérylène-diimide (PDI). Ces colorants présentent de bonnes biocompatibilité et biodégradabilité. Cependant, la plupart des colorants organiques souffrent d'une mauvaise solubilité dans l'eau, d'une mauvaise stabilité photo-thermique et d'une courte période de circulation sanguine. Pour résoudre ces problèmes, de nombreux nano-transporteurs (notamment des micelles, des liposomes et des protéines) ont été utilisés comme véhicules pour la distribution de ces colorants organiques [286-289]. Zhou et al. ont développé une phtalo-cyanine phosphorée (P-Pc) qui présente un spectre d'absorption avec un pic caractéristique à 1000 nm Cet agent de contraste a pu être visualisé à plus de 10 cm de profondeur dans un morceau de poulet, également à travers l'épaisseur d'un bras humain (entre 3.1 et 5 cm d'épaisseur) et il a montré sa capacité à mettre en évidence des tumeurs pancréatiques chez le petit animal [290]. Récemment, une stratégie intéressante a été publiée, il s'agit d'introduire le gène codant pour la mélanine qui absorbe très fortement dans proche infrarouge, dans des cellules qui ne produisent pas le pigment afin de les rendre visibles en imagerie photoacoustique [291]. Une troisième stratégie de très grand intérêt a été rapportée par Knox et al. Il s'agit d'un agent de contraste capable de mettre en évidence l'hypoxie tumorale. La molécule contient un composé N-oxyde capable de subir une bio-réduction en l'absence d'oxygène ce qui entraîne un déplacement du pic d'absorption optique de 670nm à 760nm. L'hypoxie est ainsi mise en évidence par le décalage du pic d'absorption [292].

3.4.4.2 Agents de contrastes inorganiques

La littérature décrit différents types de nanoparticules à base de carbone [293-295] mais également des nanoparticules d'argent et d'or sous des formes variées (sphères, étoiles, cubes, bâtonnets, feuilles) [296-306] ou encore des particules à base de chalcogénure de métal de transition [307-310]. L'utilisation de polymères semi-conducteurs [286, 311, 312] a également été rapportée. Ces agents de contraste inorganiques présentent d'excellentes caractéristiques pour l'imagerie de contraste en imagerie photoacoustique *in vivo* mais ne sont pas ou peu biodégradables ce qui peut entraîner à plus ou moins long terme une toxicité et limite leur utilisation potentielle chez l'Homme [313].

Une série de polymères conducteurs et semi-conducteurs avec des structures conjuguées, tels que le polypyrole, la polyaniline, la polydopamine, etc., ont également été développés comme agents de contraste photoacoustique [314-317]. Par rapport aux molécules organiques de petites tailles, les agents de contraste à base de polymères ont montré une bien meilleure stabilité photothermique. Au cours du processus de synthèse des polymères, de nombreuses fractions fonctionnelles comme des drogues (Doxorubicine, anticorps ciblés), des photosensibilisateurs (chlorine e6), des agents de contraste (^{64}Cu , Fe_3O_4 , le gadolinium, l'oxyde de tantale), etc., peuvent être intégrées pour réaliser de l'imagerie multimodale (en association avec d'autres modalités) et/ou conférer un potentiel thérapeutiques aux molécules délivrées [306, 317-320]. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré la biocompatibilité de ces nanomatériaux à base de polymères [321, 322] mais, leur biodégradabilité n'a toujours pas été étudiée en détail.

3.4.5 Applications biomédicales

Depuis le développement de l'imagerie photoacoustique, de nombreuses applications biomédicales ont été proposées [256] (Figure 25).

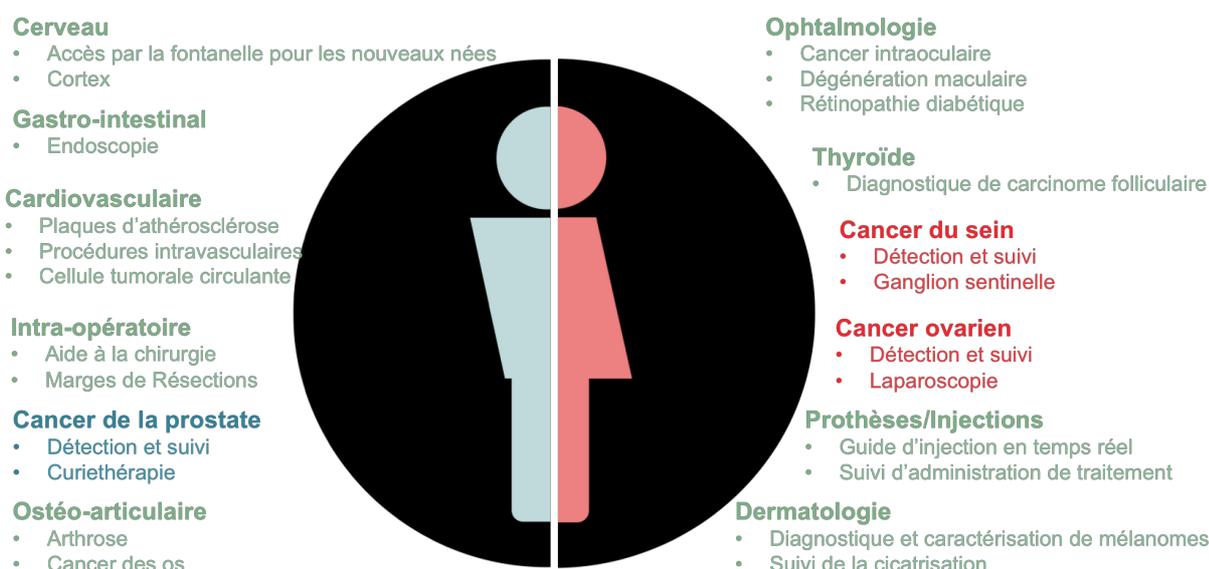


Figure 25 Panorama des applications potentielles de l'imagerie photoacoustique. Les applications spécifiques aux hommes sont listées en bleu, celles spécifiques aux femmes en rouge et les applications communes aux deux genres sont en verts. Plus d'applications sont détaillées dans le texte (Cf. § Imagerie photoacoustique).

Adapté de [256]

Des études ont été conduites sur la détection de cellules de mélanomes dans les ganglions lymphatiques sentinelles de patients atteints de mélanomes cutanés [323-325] et également chez des patientes atteintes de cancer du sein [326, 327]. En préambule d'essais cliniques à venir, des études de détection du contraste endogène en imagerie photoacoustique (hémoglobine (HbT et StO₂), lipides et eau) ont été réalisées ex vivo sur des pièces opératoires issues de patients ayant été opérés de cancers de la thyroïdes [328, 329], de la prostate [329-331], de l'ovaire [332-334] ou encore du col de l'utérus [335]. Un champ d'application clinique se concentre sur les cancers de la peau. Bien que les études sur le mélanome aient été publiées pour l'instant uniquement sur des modèles animaux [336-338] des essais cliniques sont en cours comme : *In vivo* real-time detection of circulating melanoma cells. (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01776905>). Favazza et al. [339] ont néanmoins étudié la microvascularisation et le contenu en mélanine de nevus mélanocytiques, une lésion bénigne de la peau qu'il est capital de différencier des mélanomes.

Une étude récente [340] a montré la capacité de l'imagerie photoacoustique à évaluer en temps réel la réponse à l'application d'un spray favorisant la ré-oxygénation des tissus, chez des patients diabétiques souffrant d'ulcères des membres inférieurs. Très récemment, une vaste étude a été publiée démontrant la pertinence de l'utilisation de l'imagerie photoacoustique par contraste endogène pour la détection et le suivi de la maladie de Crohn [341].

Parmi les premières applications cliniques mise en œuvre, un dispositif nommé « mammoscope » dédié à la détection du cancer du sein a été développé et proposé comme alternative à la mammographie par les rayons X [251, 342-347]. Ces études ont montré qu'il était possible de visualiser les tumeurs mammaires par imagerie photoacoustique avec un contraste plus élevé qu'en mammographie.

3.4.6 Atouts et limites

L'imagerie photoacoustique présente de nombreux atouts qui présagent de l'essor considérable que l'on peut attendre de cette nouvelle technologie. C'est une modalité d'imagerie moléculaire en **temps réel (résolution temporelle** de l'ordre de (du temps réel à plusieurs minutes) aisément combinée à l'imagerie échographique qui lui fournit une dimension anatomique. La **résolution spatiale** dépend des fréquences ultrasonores utilisées mais peut atteindre jusqu'à 30 μm . L'imagerie photoacoustique fournit des informations biologiques pertinentes sur la vascularisation et l'oxygénation/hypoxie tissulaire sans avoir recours à des agents de contraste exogènes qui pourraient poser des questions de toxicité. La **sensibilité** de détection dépend de la nature de l'absorbeur, mais elle est suffisante pour permettre la détection de variations physiologiques des taux d'hémoglobines oxygénée et désoxygénée [259]. La mélanine présente également un effet photoacoustique et sa détection a permis de repérer 625 cellules de mélanomes [348]. Concernant la détection d'agents de contraste exogènes, la sensibilité est de l'ordre de la picomole dans le cas de certains agents de contraste inorganiques. Cependant, de nombreux efforts de recherche restent à faire pour développer des agents de contraste pertinents pour l'imagerie photoacoustique. La **profondeur** de pénétration peut atteindre jusqu'à plusieurs cm ce qui est bien supérieur aux possibilités des techniques d'imagerie optique (fluorescence). Cela dit, cette profondeur reste limitée par la capacité de pénétration de la lumière d'excitation dans les tissus (Cf. § Imagerie optique). Il reste donc nécessaire de trouver des stratégies innovantes afin d'acheminer la lumière sur le site d'intérêt.

C'est une technique totalement sûre pour le sujet, les rayonnements utilisés étant non ionisants. Les systèmes d'imagerie photoacoustique sont relativement peu coûteux et ne nécessitent pas d'infrastructure particulière. Certains d'entre eux sont même portatifs.

Comme discuté dans le paragraphe précédent, l'imagerie photoacoustique est une modalité encore très récente et de nombreuses voies d'améliorations technologiques sont étudiées afin de développer le potentiel maximal de cette nouvelle modalité d'imagerie.

3.5 Conclusion sur les différentes modalités d'imagerie biomédicale

Les caractéristiques des différentes modalités d'imagerie présentées dans le chapitre précédent sont résumées dans le Tableau 4. Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en relief, l'intérêt de l'imagerie biomédicale à la fois pour la R&D préclinique et pour la pratique clinique. Nous avons présenté les développements technologiques spécifiquement dédiés aux modèles animaux pour l'étude et la compréhension des mécanismes physiopathologiques du cancer et pour l'évaluation préclinique de nouveaux agents diagnostiques, thérapeutiques ou théranostiques (diagnostique et thérapie combinée). Nous avons également présenté comment certains de ces développements technologiques visent plus particulièrement un transfert clinique pour des applications chez l'homme. Enfin, nous avons mis en avant l'intérêt d'avoir recours à une ou plusieurs technologies d'imagerie pour l'étude et la compréhension des mécanismes physiopathologiques du cancer.

En effet, comme abordée précédemment, il existe actuellement une tendance à la combinaison de plusieurs modalités d'imagerie, au sein ou non d'un même appareil, afin d'avoir accès à des informations biologiques complémentaires chez le même individu.

Tableau 4 Comparaison des différentes modalités d'imagerie biomédicale en oncologie

Modalité d'imagerie		Résolution temporelle	Résolution spatiale	Profondeur d'accès	Sensibilité (en molaire)	Multispectrale	Coût	Radiations	Utilisable en Clinique
Tomodensitométrie (CT)		Minutes	50-200 μm (préclinique), 0,5-1 mm (clinique)	sans limite	ND	Non	€€	Ionisantes	Oui
Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)		Minutes-heures	25 μm -100 μm (préclinique), 1 mm (clinique)	sans limite	10^{-3} à 10^{-5} M	Non	€€€	Non-ionisantes	Oui
Méthodes Nucléaires	Tomographie par Emission de Positrons (TEP)	secondes-minutes	1-2 mm (préclinique), 5-7 mm (clinique)	sans limite	10^{-11} à 10^{-12} M	Non	€€€	Ionisantes	Oui
	Tomographie par émission de Photons Simples (TEPS ou TEMP)	Minutes	1-2 mm (préclinique), 8-10 mm (clinique)	sans limite	10^{-10} à 10^{-11} M	Oui	€€	Ionisantes	Oui
Ultrasons		secondes-minutes	10 μm - 2mm	mm-cm	10^{-12} M (microbulles)	Non	€	Non-ionisantes	Oui
Optique	Bioluminescence	secondes-minutes	3-5 mm	2-3 cm	10^{-15} à 10^{-17} M	Oui	€	Non-ionisantes	Non
	Fluorescence	secondes-minutes	1-3 mm	2-3 cm	10^{-9} à 10^{-12} M	Oui	€	Non-ionisantes mais toxicité possible des fluorophores utilisés	Oui
Photoacoustique		secondes-minutes	10 μm -2 mm	6 mm-7 cm	10^{-9} à 10^{-12} M	Oui	€	Non-ionisantes mais toxicité possible des agents de contraste utilisés	Oui

II. Travail expérimental

Objectifs de la thèse

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents, la recherche et le développement de nouvelles stratégies pour lutter contre le cancer représentent un effort considérable. En effet, la compréhension des mécanismes qui régissent l'apparition et la promotion du cancer permettent, peu à peu, l'identification de nouvelles cibles pour le développement de nouvelles approches diagnostiques et/ou thérapeutiques. Pour la recherche en oncologie, les modèles animaux apparaissent comme un outil de premier choix pour mimer au plus près toutes les étapes du développement tumoral et métastatique intervenant dans la pathologie humaine.

Afin d'observer le plus finement possible tous les aspects de ce processus, les différentes modalités d'imagerie dédiées au petit animal représentent des avancées majeures dans la recherche en oncologie. Les différentes modalités d'imagerie permettent d'extraire des informations anatomiques, fonctionnelles et moléculaires. Plus particulièrement, l'imagerie optique présente des caractéristiques intéressantes en terme de sensibilité, d'innocuité et de coût pour la détection de phénomènes moléculaires. Pour cela, de nombreux agents de contraste spécifique ont été développés afin de cibler les récepteurs ou les enzymes dont les niveaux d'expression ou d'activité sont modulés au cours du développement tumoral. Par ailleurs, l'association des modalités d'imagerie moléculaire avec une modalité anatomique permet d'apprécier la distribution des agents de contraste dans un contexte anatomique complet. Aujourd'hui, la recherche et le développement pour l'intégration de systèmes d'imagerie multimodaux présentent un intérêt scientifique et économique important afin d'optimiser la qualité et la pertinence des informations extraites des modèles animaux utilisés en oncologie.

Plus récemment, l'imagerie photoacoustique s'est révélée être une modalité d'imagerie de grand intérêt puisqu'elle permet d'obtenir simultanément et de façon non invasive, des informations anatomiques, fonctionnelles et moléculaires. Cette modalité d'imagerie émergente présente également un fort potentiel pour de futurs transferts dans la pratique clinique. Cela étant, de nombreux efforts restent à fournir pour identifier et développer des agents de contraste compatibles avec l'utilisation de cette modalité d'imagerie.

Ce travail de thèse est découpé en deux parties.

La première partie vise à caractériser et valider le couplage d'une modalité d'imagerie moléculaire, la fluorescence en 3-D, avec une modalité d'imagerie anatomique, le microCT. Ce dispositif bimodal a dans un premier temps été évalué à un stade de prototype sur des modèles animaux de cancers pulmonaires. Dans un deuxième temps, l'intégration d'un module

de fluorescence 3-D dans un appareil multimodal commercialisé par la société Biospace Lab. sera discutée.

Cette première partie a également permis le développement d'outils d'analyses d'images en microCT qui ont donné lieu à diverses collaborations avec des laboratoires régionaux.

La deuxième partie de ce travail a porté sur l'évaluation d'un système d'imagerie photoacoustique en recherche préclinique pour des applications en oncologie. Dans ce deuxième volet nous nous sommes intéressés à l'imagerie photoacoustique. Celle-ci nous amène aux questions suivantes

- ✓ Quelle est la pertinence des informations fonctionnelles extraites de l'imagerie PA à partir de composantes endogènes physiologiques (hémoglobines) ?
- ✓ Comment utiliser ces informations pour la détection non invasive de tumeurs se développant dans des organes profonds ?
- ✓ Quelle est la pertinence de l'utilisation de traceurs exogènes en PA ? Quelles sont les informations complémentaires apportées par leur utilisation ?
- ✓ Quelles sont les pistes possibles afin d'améliorer la qualité et l'étendue des informations offertes par cette modalité ?
- ✓ Peut on utiliser cette modalité pour les besoins diagnostiques en santé humaine ? Quelles sont les informations que l'on en retire ?

i. Caractérisation et validation du couplage de l'imagerie de fluorescence en 3D et de l'imagerie microCT.

- 1 Combined Fluorescence diffuse optical tomography and microCT for the characterization of a set of relevant preclinical lung cancer models. {Article en préparation}**

Cette partie du travail expérimental a pour but l'évaluation d'un dispositif d'imagerie combinant la fluorescence 3-D et le microCT, utilisé en association avec un traceur fluorescent ciblant les tumeurs, pour l'exploration de trois modèles animaux de cancer du poumon offrant chacun un regard spécifique sur différentes étapes du développement tumoral et métastatique.

Title: Combined Fluorescence diffuse optical tomography and microCT for the characterization of a set of relevant preclinical lung cancer models

Authors: J. Lavaud¹⁻⁴, A. Fertin⁵, J. Vollaire¹⁻⁴, V. Jeannot²⁻⁴, M. Guidetti¹⁻⁴, J-L. Coll¹⁻⁴, V. Josserand^{1-4, ‡}

Author's affiliation:

¹ OPTIMAL, Small animal Imaging Platform, F-38000 Grenoble, France

² INSERM U1209, Institute for Advanced Biosciences, F-38000 Grenoble, France

³ CNRS UMR5309, Institute for Advanced Biosciences, F-38000 Grenoble, France

⁴ Univ. Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, F-38000 Grenoble, France

⁵ CNRS, UMR5525, TIMC-IMAG, Grenoble, France

‡ Corresponding Author:

Dr. Veronique Josserand, Institute for Advanced Biosciences INSERM-CNRS-UGA U1209-UMR5309, 38706 Grenoble, France. Phone: +33 (0)4.76.54.94.10, Fax : +33 (0)4.76.54.94.13, E-mail : veronique.josserand@univ-grenoble-alpes.fr

1.1 INTRODUCTION

Clinically relevant animal models that precisely stand for human pathology context represent powerful tools for both understanding biological mechanisms involved in cancer development and developing novel anti-cancer therapeutic strategies [91]. *In vivo* preclinical imaging in rodents offers interesting opportunities to explore physiopathological process of tumor development and to evaluate therapeutic strategies efficacy.

Near infrared (NIR) fluorescence imaging is an easy to use non-radiative molecular imaging modality providing highly sensitive detection of contrast agents' *in vivo* biodistribution and pharmacokinetics [177, 180]. In particular, fluorescent Diffuse Optical Tomography (fDOT) represents a major breakthrough in non-invasive fluorescence imaging in rodents since it provides 3D distribution of fluorescence signal and quantitative measurement of contrast agents' concentration within a living mouse [180, 202-204]. A number of fluorescent probes have been considered to target hallmarks of cancer [24, 136]. In particular, angiogenesis, firstly described by J. Folkman in 1971 [349] is the ability for tumors to recruit new blood vessels in order to get access in oxygen and nutrients and plays a critical role in tumor development and metastasis invasion [31] and represents, thus, an attractive phenomena to monitor tumor development *in vivo*.

Alpha_vBeta₃ integrin is a membrane protein that has been shown to play a role in extracellular matrix-cell and cell-cell interactions involved in angiogenesis and cancer cell migration [350]. The RGD tripeptide sequence was found to specifically bind $\alpha_v\beta_3$ integrin [351] and it has been shown that RGD cyclisation and multiplexing led to improved affinity and internalization [230, 352]. Our group previously developed a multivalent cyclic RGD based fluorescent probe called Angiostamp™700 [229] which has already been characterized in a number of cancer types in several animal species [204, 234-240, 353]. In all cases, Angiostamp™700 provided high tumor to background signal demonstrating high tumor specificity and its ability to improve the resection of deep tumors in head and neck mice model [237], fibrosarcomas in cat [239] or, more recently, to improve the resection of peritoneal carcinomas using electrochemotherapy [235]

In the present study, we aimed to investigate the use of Angiostamp™700 in three relevant animal models: primary lung adenocarcinoma orthotopic model, lung metastases model of mammary origin and lung metastases model from orthotopic mammary adenocarcinoma. Those three models aimed to mimic several steps of cancer development and metastatic spread and were characterized using 3-D fluorescence fDOT system. Then, microCT anatomical imaging of lung was added to fDOT in order to study the potential improvement given by the additional anatomical information that derives therefrom.

1.2 METHODS

1.2.1 *In vivo* fluorescence detectability by fDOT/microCT

Teflon capillaries (0.75 mm ID) were filed with 3 μL (7 mm long) of a mix of a radiopaque contrast agent Visipac[®] (GE healthcare) (50% of the total volume for each capillary) and a fluorescent contrast agent, AlexaFluor[®]700 (ThermoFischer) at different concentrations (50 μM , 25 μM , 10 μM , 5 μM , 2 μM , 1 μM and 0.5 μM). Capillaries were inserted into the mice lung by using a laryngoscope (Harvard Apparatus).

1.2.2 Cell culture of cancer cell lines

H358rvLuc2 (human lung adenocarcinoma), TS/ApcpGL3 (murine mammary adenocarcinoma) 4T1rvLuc2 (murine mammary adenocarcinoma) cell lines stably expressing luciferase were cultured in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum in humidified atmosphere with 5% CO_2 .

1.2.3 Primary lung cancer and lung metastasis models

All animal experiments were conducted in agreement with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication no. 86–23, revised 1985).

For all models, six weeks old female NMRI nude mice (Janvier, France) were used and implantation was performed under gaseous anesthesia (isoflurane/oxygen 3.5% for induction and 1.5% thereafter).

➤ **Primary lung adenocarcinoma orthotopic model**

H358rvLuc cells (10^6 cells in 50 μL of PBS) were inoculated directly into the lung *via* the airways using a laryngoscope (Harvard Apparatus) as described previously [354, 355].

➤ **Lung metastases model of mammary origin**

TS/Apc-pGL3 cells (10^6 cells in 100 μL of PBS) were injected intravenously *via* the caudal tail vein.

➤ **Lung metastases model from orthotopic mammary adenocarcinoma**

4T1rvLuc2 cells ($5 \cdot 10^5$ cells in 50 μL of PBS) were implanted into the fat pad of the lower right mammal. Sizing of primary tumor was performed using a caliper and when reaching about 500mm³, the primary tumor was surgically resected.

1.2.4 Bioluminescence imaging for tumor growth follow up

Primary tumor growth and metastases development were monitored by *in vivo* bioluminescence imaging (BLI) once a week.

Five minutes before imaging, vigil mice received an intraperitoneal injection of 150 µg/g of D-luciferin (Promega, France) and then were anesthetized (isoflurane 4% for induction and 1.5% thereafter) and placed in the IVIS Kinetic (PerkinElmer). This allowed localization and quantitation of luciferase-positive tumor cells and semi-quantitative data were obtained by drawing a region of interest (ROI) on the thorax. Results were expressed as photons/second (ph/s).

1.2.5 Tracer Administration

The most efficient route of administration of Angiostamp™700 (Fluoptics, France) was investigated on the primary lung adenocarcinoma model. At day 99 of tumor progression, the tracer was either injected intravenously *via* the tail vein (200µL; 50µM) or nebulized *via* the trachea (50 µL, 50 µM) using IA-1C Microspayer (Penn-Centur, Inc, PA, USA) connected to FMJ-250-high-pressure syringe (Penn-Centur, Inc).

For lung metastases model of mammary origin and lung metastatic model from orthotopic mammary adenocarcinoma models, the IV injection route was used.

1.2.6 2D Fluorescence & bimodal fDOT/microCT imaging

2D Fluorescence was performed using the Fluobeam700® system (Fluoptics, France). Image display and analysis were performed using Wasabi® software (Hamamatsu, Massy, France). Semi-quantitative data were obtained by drawing a region of interest (ROI) on the thorax (*in vivo*) and after mice sacrifice on the isolated lung (*ex vivo*).

The fDOT and microCT systems were two separate entities with whom the imaging sessions were conducted in line. Anesthetized mice were placed in a homemade animal holder compatible with both imaging systems and easily movable from one system to another without waking or moving the animal. The bimodal animal holder was mounted with fiducial landmarks detectable by both modalities in order to merge the two reconstructed volumes.

For fDOT acquisition, a 7x6 mm area was defined on the thorax and was scanned with 1 mm steps as previously described [202]. Image display and analysis were performed using the associated software. Quantitative data were obtained by drawing a volume of interest (VOI) on the acquired volume and results were expressed as relative light units (RLU).

MicroCT imaging was performed in line using the vivaCT40 (ScancoMedical, Switzerland) whose acquisitions parameters were 55 keV energy, 177 µA intensity, 300 ms integration time and 80 µm voxel isotropic resolution. After image reconstruction, contrast based segmentation was applied to discriminate bone and air. Pulmonary air volume was measured using Visilog® software (Noesis, France).

MicroCT and fDOT reconstructed volumes were finally merged by automatic recognition of the fiducial landmarks and pixels resizing using a homemade plugin developed in ImageJ software.

1.2.7 Ex vivo fluorescence imaging and histology

Mice received a final injection of luciferin and were euthanized by cervical dislocation under anesthesia. Lung were inflated with low melting agarose (LM) 1% and deposited on ice. BLI and 2D *ex vivo* fluorescence imaging were performed on the isolated lung.

Then, lungs were fixed in 4% formaldehyde, placed in a 40% sucrose bath and finally frozen using OCT Tissue-Tek™ (Sakura®, Torrance, U.S.A.). Lungs were cut in 7 μm thick slices using a cryostat and frozen slices were stained with hematoxylin and eosin and entirely scanned (mosaic) by Axio Scan Z1 (Zeiss, Germany) under 5x magnification.

1.2.8 Statistical analysis

All data were expressed as mean ± SD. Statistical analyses were made using GraphPad Prism version 6 software (GraphPad software, San Diego, California USA). Mann-Whitney tests were used in this study (*p-value<0,05; **p-value<0 ;01; ***p-value<0,001).

1.3 RESULTS

1.3.1 *In vivo* fluorescence detectability by fDOT/microCT

The fDOT system's ability to locate fluorescence signal in 3D and to provide quantitative measurement of fluorophore concentrations within a living mouse was evaluated. For this, capillaries containing a mixture of a radiopaque contrast agent and a fluorophore at various concentrations were inserted in the mouse lung for *in vivo* fDOT and microCT imaging. Both contrast agents were well detected by their respective imaging modality (figure 26-A and 26-B) and fluorescence signal was very well co-located with X-ray signal (Figure 26-C and 26-D). Moreover, fDOT fluorescence detection of various fluorophore concentrations was shown to be linear ($r^2 = 0.99$) between 0.5 and 50 μM with an associated sensitivity threshold of 500 nM corresponding to **0.3 pmol** of fluorophore in a 1 mm³ pixel (Figure 26-E).

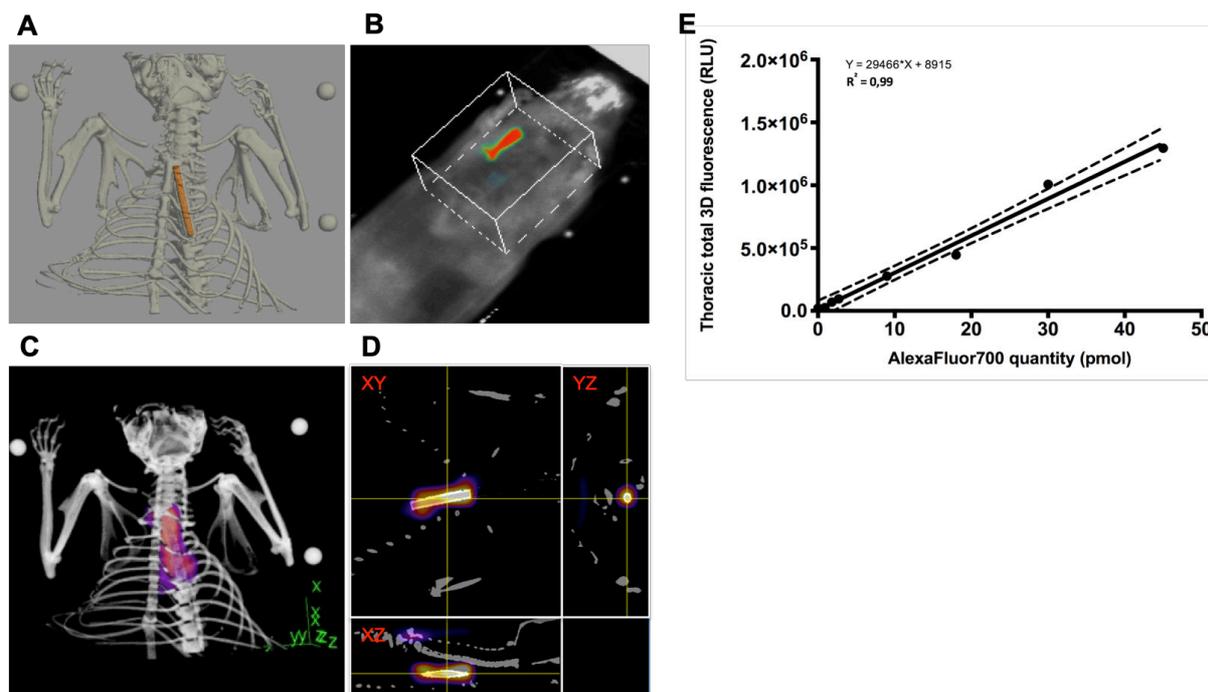


Figure 26 Evaluation of bimodal system characteristics.

The microCT (A) and fluorescence volumes obtained after fDOT acquisition (B) of Teflon capillary (7 mm in length, 0.75 mm ID for a 3 μ L total volume) containing 50% Visipac® and AlexaFluor®700 (10 μ M) introduced into the lung. Volumes are merged to obtain the bimodal 3D representation (C) and orthogonal views (XY, YZ and XZ axis) (D) of the capillary inserted into the lung. Fluorescence signals of various concentrations (n=3 samples/concentration) of AlexaFluor®700 measured by the fDOT system. The sensibility threshold (SThr) corresponds to 0.3 pmol in 1 mm³ (E).

For each animal model studied below, tumor-bearing animals were compared with healthy animals that have been similarly experimented.

1.3.2 Angiostamp™700 administration route for primary lung tumor imaging

In order to define the best administration route for Angiostamp™700 to perform lung tumor imaging as well as the optimal imaging time-point after injection, an orthotopic model of human lung adenocarcinoma was implemented. Based on BLI quantification, mice were distributed into two groups (n = 8 for each). Angiostamp®700 was administered either by intravenous injection (IV group) or by intrapulmonary nebulization (Nebul. group).

99 days after tumor cells implantation, both BLI (Figure 27-A & 28-A) and microCT (Figure 27-B & 28-B) clearly indicated the presence of a lung tumor. While BLI provided very few information concerning the tumor location and its geometry, microCT images presented well detectable air defects that were not visible in the healthy group, and thus reporting the presence of a tumor. However, after BLI signal quantification, a significant difference was observed between tumor-bearing and healthy groups (Figure 29-A) while there was no significant difference on the lung volumes estimated by microCT (Figure 29-B).

Using fDOT, 4 hours after intravenous injection of Angiostamp™700 a strong fluorescence signal was observed in lung tumor-bearing animals compared to healthy animals (T/H= 35.7) (Figure 27-C). When looking at 3D merged reconstructions (Figure 27-D), fluorescence signal at 4 h post-injection into the T group was very well co-located with the observed air defects. Adequacy between tumor location and fluorescence signal was confirmed by ex vivo lung observation by bioluminescence and 2D fluorescence (Figure 27-E and 27-F). Twenty four hours after intravenous injection, the tracer had been almost totally eliminated from the lung in both groups (T/H =1.2).

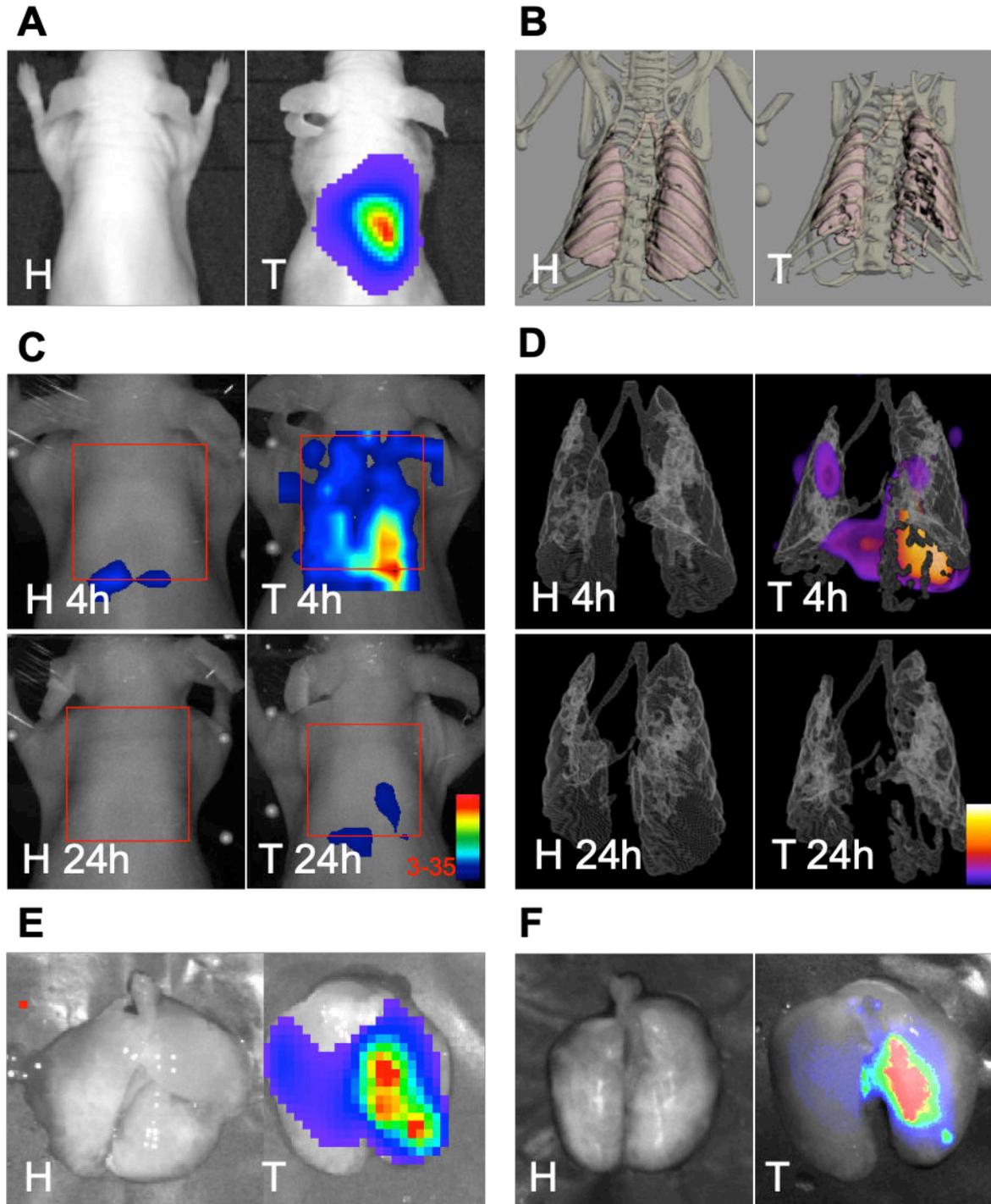


Figure 27 Multimodal study of primary lung adenocarcinoma orthotopic model: i.v. Injection.

A) BLI of Healthy and Tumor bearing animal 99 days after cell implantation

B) 3D air contrast-based segmentation of the lungs

C) Projections from 3D fluorescence imaging of the lung 4h and 24 after Angiostamp™700 injection

D) 3D bimodal fluorescence/microCT imaging of the lung 4h and 24 after Angiostamp™700 injection

E) *Ex vivo* BLI of the isolated lungs

F) *Ex vivo* 2D fluorescence of the isolated lungs 4 hours after Angiostamp™700 injection.

In comparison, 4 hours after nebulization, high fluorescence signals were observed in the mice thorax of both groups, signals being more intense in tumor bearing lungs (Figure 28-C). Twenty four after nebulization, the tracer had been eliminated from healthy lungs but retained in tumor-bearing lungs thus generating a T/H ratio of 8.6. When looking at 3D bimodal reconstructions (Figure 28-D) 4h after nebulization, fluorescence signal was scattered throughout the lungs and was not co-localized with the air defects observed using microCT. However, 24 hours after nebulization, fluorescence signal had decreased and was co-located with the air defects. Tumor specificity of fluorescence signal was confirmed by *ex vivo* lung observation by bioluminescence and 2D fluorescence (figure 28-E and F). These results demonstrated that using Angiostamp™700, lung tumor fluorescence imaging was achieved with higher tumor specificity after intravenous injection than nebulization. Accordingly, for next models exploration, imaging was performed 4 hours after Angiostamp™700 intravenous injection.

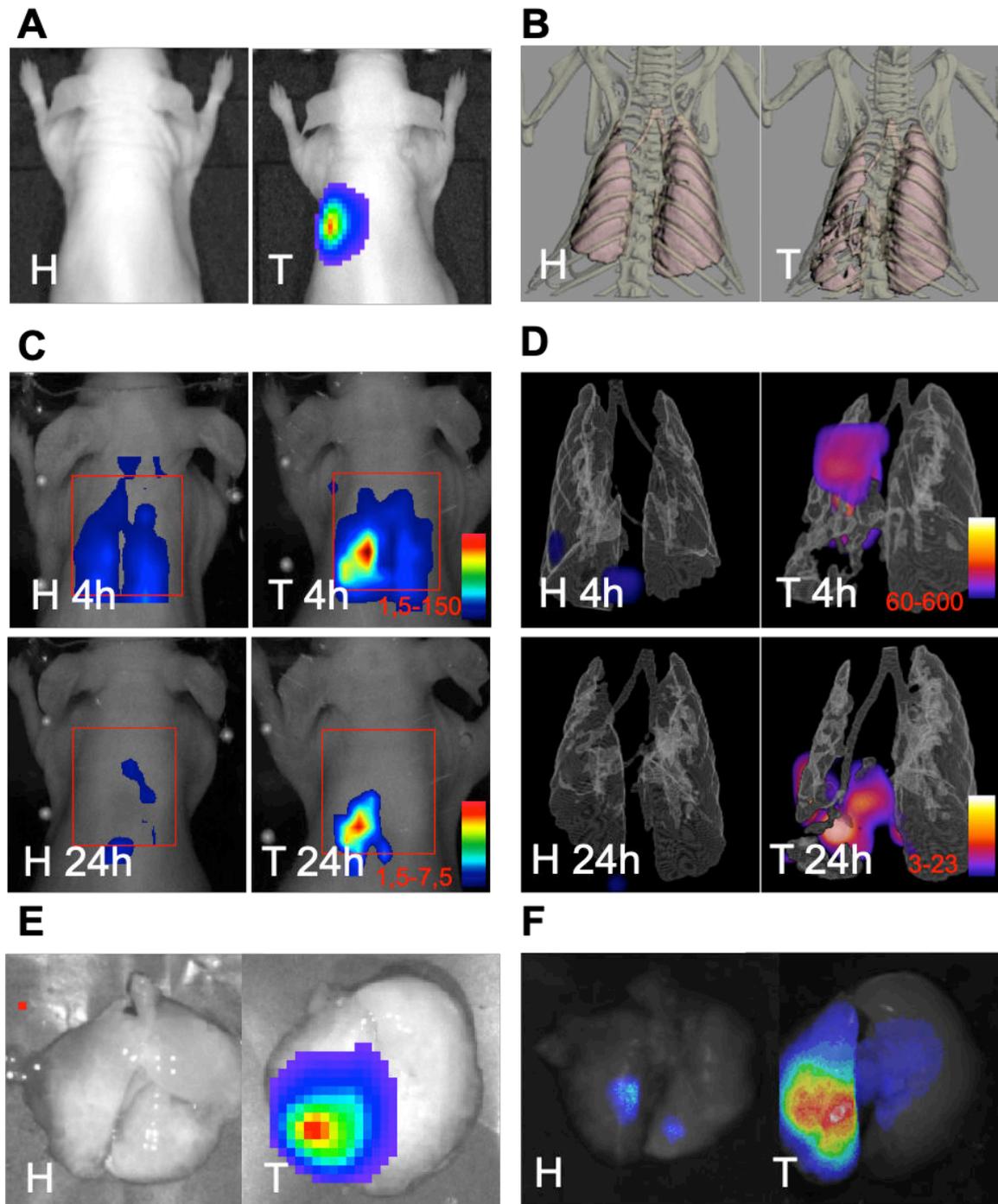


Figure 28 Multimodal study of primary lung adenocarcinoma orthotopic model: nebulization.

A) BLI of healthy and tumor-bearing animal 99 after cell implantation

B) 3D air contrast-based segmentation of the lungs (white arrow indicates tumor location)

C) Projections from 3D fluorescence imaging of the lung 4h and 24 after Angiostamp™700 nebulization

D) 3D bimodal fluorescence/microCT imaging of the lung 4h and 24 after Angiostamp™700 nebulization (white arrows indicate tumor location)

E) *Ex vivo* BLI of the isolated lungs

F) *Ex vivo* 2D fluorescence of the isolated lungs 24 hours after Angiostamp™700 nebulization.

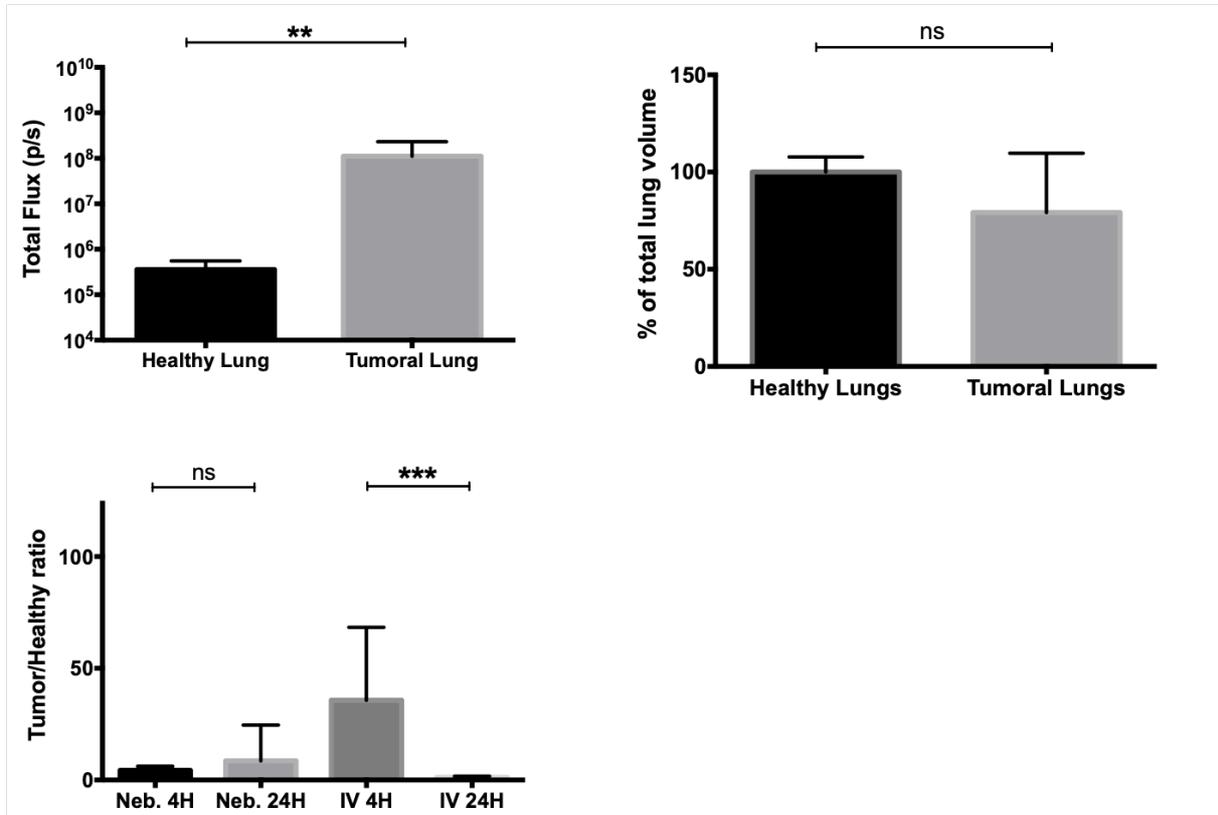


Figure 29 Quantitative analyses of primary lung adenocarcinoma orthotopic model

- Thoracic bioluminescence quantification for healthy and tumor-bearing mice.
- Lung volume measured from air contrast-based segmentation on healthy and tumor-bearing mice.
- Comparison between the two ways of Angiostamp™700 administration, for each administration route, 4 hours and 24 hours time point are considered.

n= 8; Mean±SD; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

Longitudinal follow up of lung metastases development

fDOT/microCT imaging with Angiostamp™700 was used for longitudinal follow up of deep and scattered tumor nodule development in a lung metastases model of mammary origin. This experimental animal model is dedicated to study specifically the metastasis stage when mammary tumor cells have already detached from the primary tumor and reached blood circulation before extravasation into the lung parenchyma.

Metastases development was followed over time by BLI (Figure 30-A), 10, 12 and 14 days after cells intravenous injection and a gradual increase of the signal was observed. BLI signal quantitative analyses showed significant differences between each step of metastatic development and healthy group (Figure 31-A). Signal was increased by 2.4 between D10 and

D12 and by 1.9 between D12 and D14.

Using Angiostamp™700, 3D fluorescence signal in the thorax (Figure 30-B) increased progressively with metastasis progression. While no differences were shown between non-injected and healthy injected group, significant differences appeared between each day of metastatic development (Figure 31-B) with a signal increase of 1.5 times between D10 and D12 and 1.3 times between D12 and D14.

MicroCT imaging (Figure 5-C) illustrated the presence of several disparate air defects as soon as D10 (-35% of initial lung volume) that appeared to be massive at D14 (-55% of initial lung volume) corresponding to a total loss of initial lung volume of 24% between D10 and D14 (Figure 31-C).

3D bimodal reconstructions (Figure 30-D) illustrated the consistence of fluorescence signal increase with air defects progression along time. *Ex vivo* lung observations by BLI (Figure 30-E) and 2D fluorescence (Figure 30-F) corroborated *in vivo* observations.

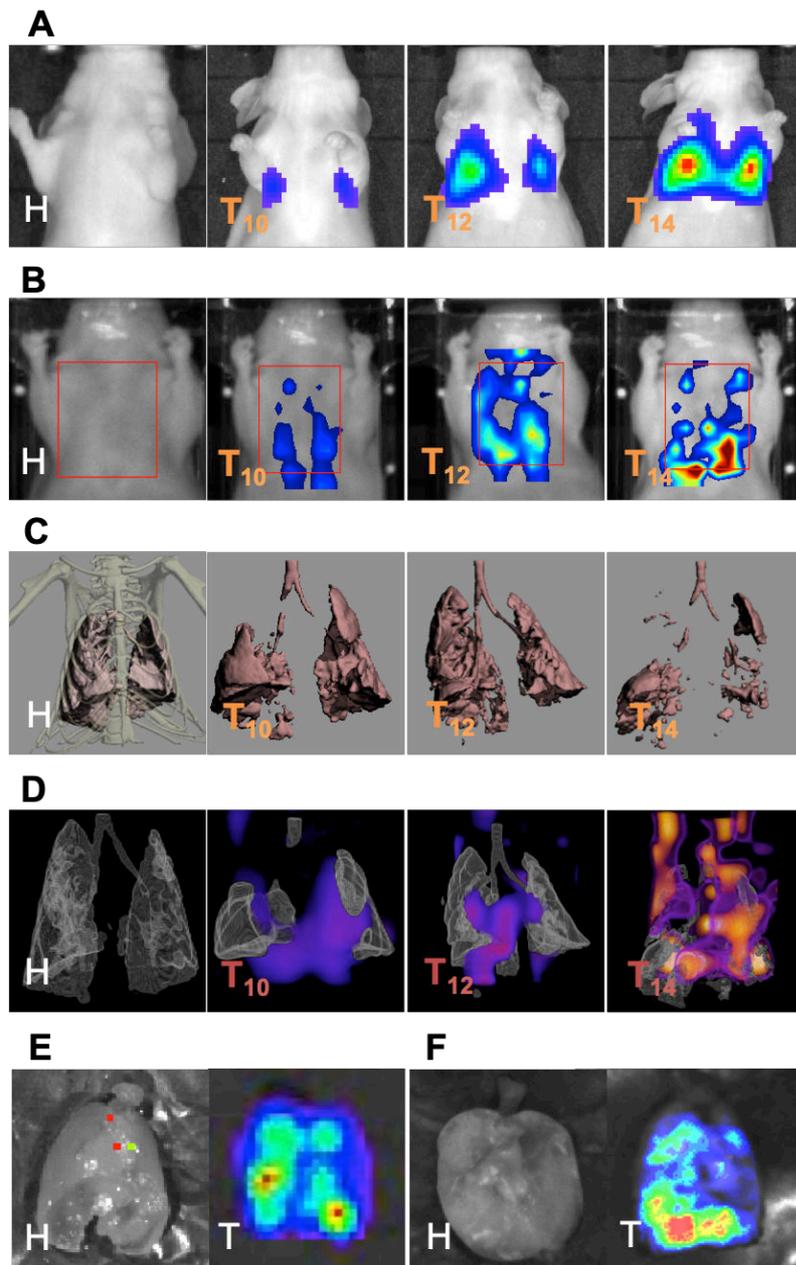


Figure 30 Multimodal study of lung metastases model of mammary origin.

- A) BLI of healthy and tumor-bearing animal 10, 12 and 14 days after cell implantation.
- B) Projections from 3D fluorescence imaging of the metastases development into the lung 10, 12 and 14 days after cell implantation and 4h after Angiostamp™700 injection.
- C) 3D air contrast-based segmentation of the metastases development into the lung 10, 12 and 14 days after cell implantation.
- D) 3D bimodal fluorescence/microCT imaging of the metastases development into the lung 10, 12 and 14 days after cell implantation and 4h after Angiostamp™700 injection.
- E) *Ex vivo* BLI of the isolated lungs 14 days after cell implantation
- F) *Ex vivo* 2D fluorescence of the isolated lungs 14 days after cell implantation and 4 hours after Angiostamp™700 injection.

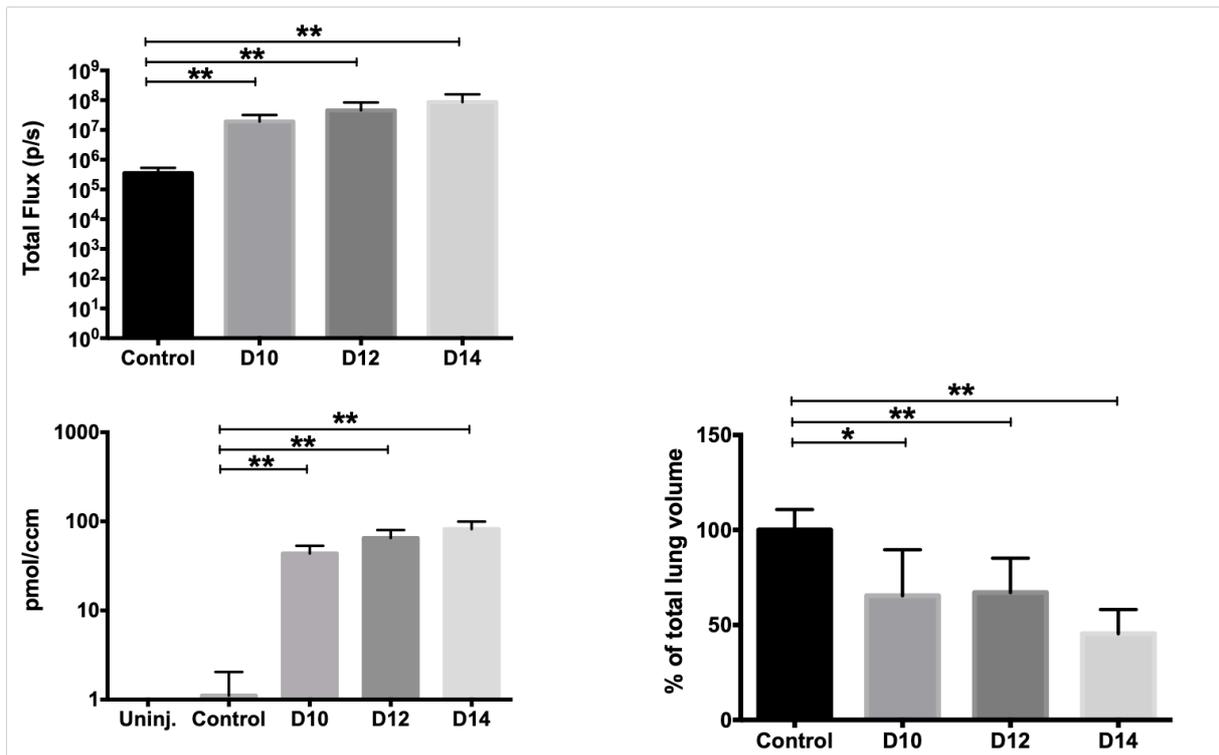


Figure 31 Quantitative analyses of lung metastases model of mammary origin.

- Thoracic bioluminescence quantification for healthy and tumor-bearing mice 10, 12 and 14 days after cell implantation.
- 3D fluorescence quantification of Angiostamp™ 700 signal accumulation into the lung 10, 12 and 14 days after cell implantation
- Lung volume measured from air contrast-based segmentation on healthy and tumor bearing mice 10, 12 and 14 days after cell implantation

n= 8; Mean±SD; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

1.3.3 3D fluorescence imaging of early lung metastases

An experimental animal model of lung metastases from orthotopic mammary adenocarcinoma, reproducing all stages of primary tumor growth and metastasis was developed. This model is as close as possible to the clinical situation where a primary breast cancer can progress to lymph node invasion and may lead to lung metastases despite primary tumor resection. In this experimental model, primary tumors became barely measurable 8 days after cells implantation and reached $246 \pm 47 \text{ mm}^3$ after 21 days just before being resected. Eight days after implantation, the primary tumor was easily detectable by BLI and after 14 days, axillary lymph node was shown to be already invaded (Figure 32-A). Lung metastases were detected as soon as D22 and were shown to progress afterward as illustrated by a BLI signal increase of 112 times at D29 (Figure 33-A). MicroCT imaging (Figure 32-C) did not highlight early lung metastases at D22 but it did at the D29 advanced stage where a significant 30% decrease in lung volume was observed with respect to the healthy group (Figure 33-C).

3D fluorescence imaging provided early detection of lung metastases at D22 (Figure 32-B) and metastases progression was illustrated by a 2.2 times fluorescence signal increase at D29 (Figure 33-B).

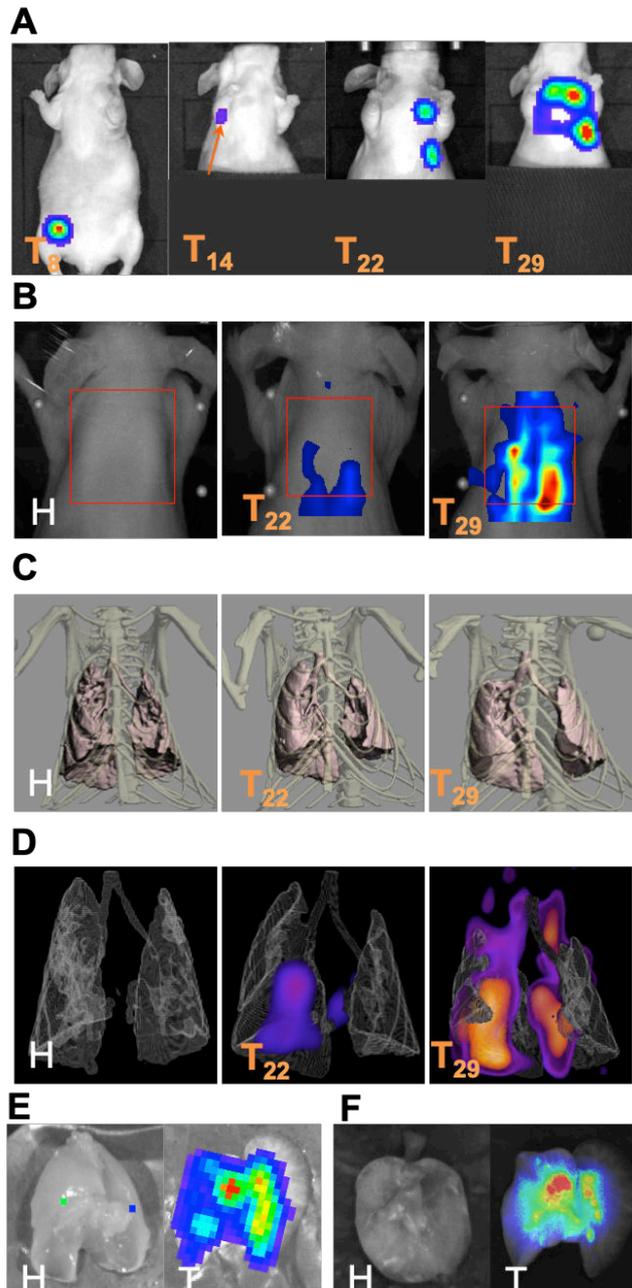


Figure 32 Multimodal study of lung metastases model from orthotopic mammary adenocarcinoma.

- A) BLI of primary tumor bearing animal 8 days after cell implantation and follow up of metastatic apparition 14, 22 and 29 days after cell implantation.
- B) Projections from 3D fluorescence imaging of the metastases development into the lung 22 and 29 days after cell implantation and 4h after Angiostamp™700 injection.
- C) 3D air contrast-based segmentation of the metastases development into the lung 22 and 29 days after cell implantation.
- D) 3D bimodal fluorescence/microCT imaging of the metastases development into the lung 22 and 29 days after cell implantation and 4h after Angiostamp™700 injection.
- E) *Ex vivo* BLI of the isolated lungs 29 days after cell implantation

F) *Ex vivo* 2D fluorescence of the isolated lungs 29 days after cell implantation and 4 hours after Angiostamp™700 injection.

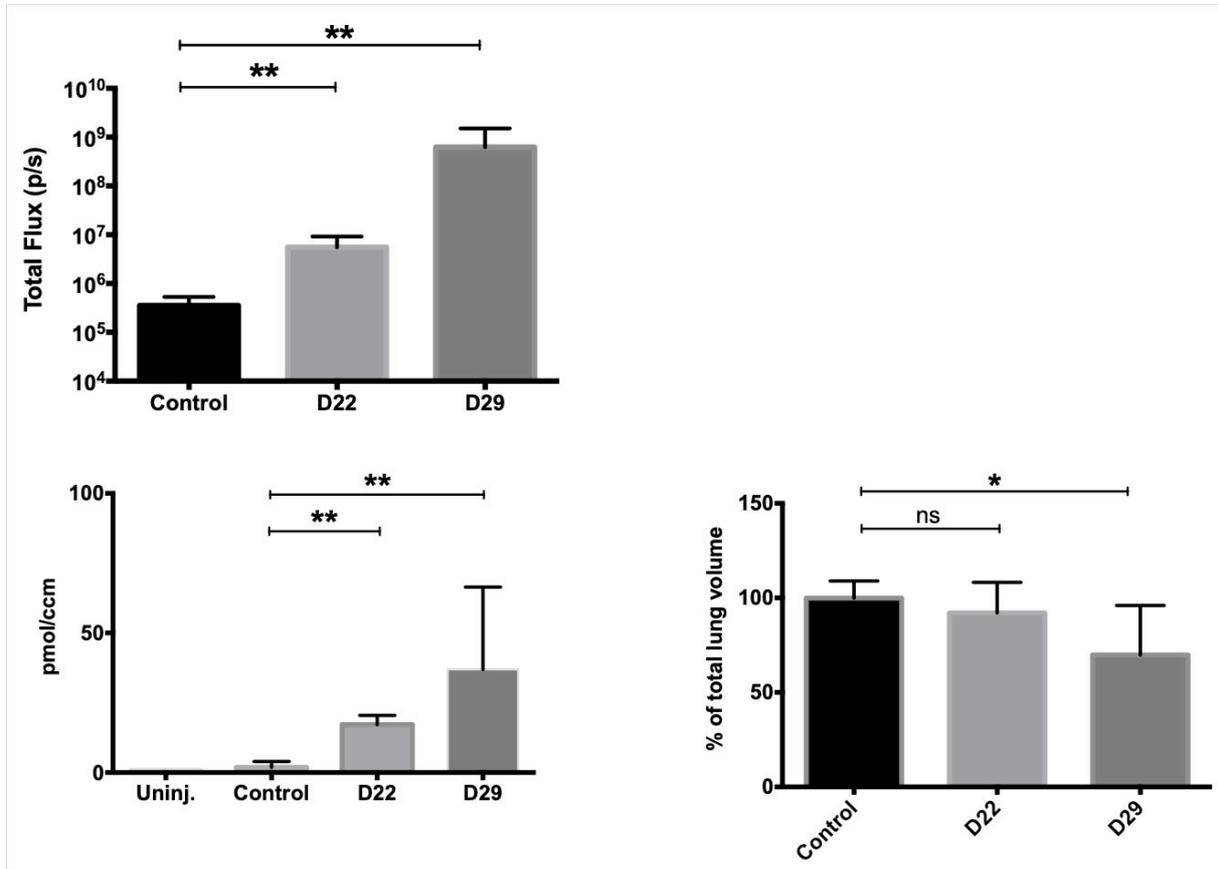


Figure 33 Quantitative analyses of lung metastases model from orthotopic mammary adenocarcinoma.

- A) Thoracic bioluminescence quantification for healthy and Tumor bearing mice 22 and 29 days after cell implantation.
- B) 3D fluorescence quantification of Angiostamp™700 signal accumulation into the lung 22 and 29 days after cell implantation
- C) Lung volume measured from air contrast-based segmentation on healthy and tumor bearing mice 22 and 29 days after cell implantation

n= 8; Mean±SD; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

1.4 Discussion

Three-dimensional detection of fluorescence from known concentrations of fluorophore inserted in the lung of living animals demonstrated an accurate location of fluorescence signal distribution and a very good quantification potential. In depth fluorescence signal detection was possible down to 500 nM and was linear in a range of concentrations that is fully compatible with concentrations that could be encountered in biological conditions.

In vivo BLI provides follow up of tumor development in a simple, rapid and sensible manner, a previous study showing the possibility to detect as little as 200 cells *in vivo* [236], however, bioluminescence do not provide any information about the geometry and spatial location of tumors and is significantly impacted by the tumor depth.

Angiostamp™700 has previously shown its ability to label tumors *in vivo* in many cancer models in mice but also in rats and cats [204, 234-240, 353, 356]. However the use of 2D fluorescence *in vivo* was previously shown to be totally inadequate for the detection of a fluorescent signal in depth. Indeed the thickness and the heterogeneous nature of tissues at the level of the thoracic cage (skin, muscle, bone, lung parenchyma, air) are obstacles for light to cross through. In the case of lung, the interactions of photons with tissues (absorption and diffusion) degrade the quality of the resulting image and the quantification of emitted signal then lose its meaning [242]. The fDOT approach aims to overcome these limits and produce a quantitative 3D image which reflects the spatial distribution of the fluorescent signal in a complex medium such as the thoracic cage [202].

Three animal models of lung tumors have been developed, each aimed mimicking one or more steps of tumor and / or metastatic development. Two routes of administration (intravenous and nebulization) and two times post administration of Angiostamp™700 were evaluated on mice bearing primary lung adenocarcinoma. Four hours after intravenous injection appeared to be the best way to administrate the tracer and to obtain the higher T/H ratio for lung cancer but other time points should also be considered between 4 and 24 hours.

MicroCT illustrated the loss of lung volume resulting from tumor development. Nevertheless, this approach was shown to be less sensitive than fDOT for the detection of lung tumors. 3D fluorescence images generated by the use of fDOT and Angiostamp™700 illustrated the distribution of pulmonary diffusive metastases (lung metastases model of mammary origin) as well as more circumscribed tumor and metastases (primary lung adenocarcinoma orthotopic model and lung metastases model from orthotopic mammary adenocarcinoma). Moreover, the longitudinal monitoring was performed for both metastatic models and quantitative analyses showed a correlation between tracer accumulation and metastases spread. The fusion of both, fDOT and MicroCT revealed, for each model its ability to get access to a complete, molecular and anatomical, set of quantitative information about tumors and metastases development.

1.5 Conclusion

This work demonstrated that the bimodal fDOT/microCT system in association with

Angiostamp™700 represents a powerful and non-invasive tool to visualize and monitor deep tumor and metastatic lesions development quantitatively within relevant animal models by providing molecular information in an anatomical context.

1.6 Bibliography

1. Ruggeri, B.A., F. Camp, and S. Miknyoczki, *Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery*. *Biochem Pharmacol*, 2014. **87**(1): p. 150-61.
2. Ntziachristos, V., C. Bremer, and R. Weissleder, *Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging*. *Eur Radiol*, 2003. **13**(1): p. 195-208.
3. Frangioni, J.V., *In vivo near-infrared fluorescence imaging*. *Curr Opin Chem Biol*, 2003. **7**(5): p. 626-34.
4. Koenig, A., et al., *Whole body small animal examination with a diffuse optical tomography instrument*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 2007. **571**(1,Ä2): p. 56-59.
5. Koenig, A., et al., *Fluorescence diffuse optical tomography for free-space and multifluorophore studies*. *J Biomed Opt*, 2010. **15**(1): p. 016016.
6. Koenig, A., et al., *In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography*. *J Biomed Opt*, 2008. **13**(1): p. 011008.
7. Smith, B.R. and S.S. Gambhir, *Nanomaterials for In Vivo Imaging*. *Chem Rev*, 2017. **117**(3): p. 901-986.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
9. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. *N Engl J Med*, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
10. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
11. Brooks, P.C., et al., *Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels*. *Cell*, 1994. **79**(7): p. 1157-64.
12. Aumailley, M., et al., *Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1*. *FEBS Lett*, 1991. **291**(1): p. 50-4.
13. Garanger, E., et al., *New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors*. *Mol Ther*, 2005. **12**(6): p. 1168-75.
14. Garanger, E., et al., *Multivalent RGD synthetic peptides as potent alphaVbeta3 integrin ligands*. *Org Biomol Chem*, 2006. **4**(10): p. 1958-65.
15. Boturyn, D., et al., *Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**(18): p. 5730-9.
16. Keramidas, M., et al., *Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model*. *Br J Surg*, 2010. **97**(5): p. 737-43.

17. Wenk, C.H., et al., *Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti- α v β 3 integrin molecular probe*. *Cancer Lett*, 2013. **334**(2): p. 188-95.
18. Atallah, I., et al., *Role of near-infrared fluorescence imaging in head and neck cancer surgery: from animal models to humans*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2014.
19. Atallah, I., et al., *Near-infrared fluorescence imaging-guided surgery improves recurrence-free survival rate in novel orthotopic animal model of head and neck squamous cell carcinoma*. *Head Neck*, 2016. **38 Suppl 1**: p. E246-55.
20. Dutour, A., et al., *Targeted imaging of α (v) β (3) expressing sarcoma tumor cells in vivo in pre-operative setting using near infrared: a potential tool to reduce incomplete surgical resection*. *Bone*, 2014. **62**: p. 71-8.
21. Yameogo, J.B., et al., *Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as potential Artemisinin nanocarriers. II: In vitro behavior toward the immune system and in vivo biodistribution assessment of unloaded nanoparticles*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014.
22. Keramidas, M., et al., *Noninvasive and Quantitative Assessment of In Vivo Fetomaternal Interface Angiogenesis Using RGD-Based Fluorescence*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 309082.
23. Josserand, V., et al., *Electrochemotherapy guided by intraoperative fluorescence imaging for the treatment of inoperable peritoneal micro-metastases*. *J Control Release*, 2016. **233**: p. 81-7.
24. Bellanger, A., et al., *The critical role of the ZNF217 oncogene in promoting breast cancer metastasis to the bone*. *J Pathol*, 2017.
25. Dufort, S., et al., *Nebulized gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization*. *Small*, 2015. **11**(2): p. 215-21.
26. Guilleminault, L., et al., *Fate of inhaled monoclonal antibodies after the deposition of aerosolized particles in the respiratory system*. *J Control Release*, 2014. **196**: p. 344-54.
27. Ntziachristos, V., *Fluorescence molecular imaging*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006. **8**: p. 1-33.

2 Projets collaboratifs

En parallèle de ce travail de développement d'un appareil bimodal fluorescence 3-D/MicroCT, j'ai eu l'occasion de participer à des projets collaboratifs avec différents laboratoires de la région Rhône-Alpes. Ces collaborations ont, d'une part, permis de mettre au point des protocoles d'acquisitions, d'analyses et de segmentations d'images microCT à haute résolution et, d'autre part, de poursuivre les études, et d'étendre le champ applicatif de l'instrument bimodal décrit dans ce manuscrit. Les travaux présentés ici ont été publiés dans des journaux internationaux à comité de lecture.

2.1 Projets de développement sur le versant d'imagerie bimodale fluorescence 3D/microCT.

2.1.1 Non-invasive and quantitative assessment of *in vivo* foetomaternal interface angiogenesis using RGD-based fluorescence.

Noninvasive and Quantitative Assessment of *In Vivo* Fetomaternal Interface Angiogenesis Using RGD-Based Fluorescence

M. Keramidas,^{1,2} J. Lavaud,^{1,2} F. Sergent,³ P. Hoffmann,^{2,4,5} S. Brouillet,^{2,4,5}
J.-J. Feige,^{2,3,4} J.-L. Coll,^{1,2} and N. Alfaidy^{1,4,5}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 823, Institut Albert Bonniot, Rond-point de la Chantourne, 38700 La Tronche, France

² Université Grenoble Alpes, 38041 Grenoble, France

³ Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Institut de Recherches en Sciences et Technologies pour le Vivant (iRTSV), Biologie du Cancer et de l'Infection, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

⁴ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 1036, Biologie du Cancer et de l'Infection, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

⁵ CHU de Grenoble, Hôpital Couple Enfant, Département de Génétique et Procréation, Centre d'Aide Médicale à la Procréation, BP 217, 38043 Grenoble, France

Correspondence should be addressed to N. Alfaidy; nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr

Received 3 May 2014; Accepted 27 May 2014; Published 10 July 2014

Academic Editor: Nathalie Bardin

Copyright © 2014 M. Keramidas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Angiogenesis is a key process for proper placental development and for the success of pregnancy. Although numerous *in vitro* methods have been developed for the assessment of this process, relatively few reliable *in vivo* methods are available to evaluate this activity throughout gestation. Here we report an *in vivo* technique that specifically measures placental neovascularization. The technique is based on the measurement of a fluorescent alpha v beta 3 ($\alpha_v\beta_3$) integrin-targeting molecule called Angiolone-Alexa-Fluor 700. The $\alpha_v\beta_3$ integrin is highly expressed by endothelial cells during the neovascularization and by trophoblast cells during their invasion of the maternal decidua. Angiolone was injected to gravid mice at 6.5 and 11.5 days post coitus (dpc). The fluorescence was analyzed one day later at 7.5 and 12.5 dpc, respectively. We demonstrated that (i) Angiolone targets $\alpha_v\beta_3$ protein in the placenta with a strong specificity, (ii) this technique is quantitative as the measurement was correlated to the increase of the placental size observed with increasing gestational age, and (iii) information on the outcome is possible, as abnormal placentation could be detected early on during gestation. In conclusion, we report the validation of a new noninvasive and quantitative method to assess the placental angiogenic activity, *in vivo*.

Dans cette étude, la capacité du système bimodal à mettre en évidence l'angiogenèse a été évaluée pour le suivi gestationnel de la souris en ciblant l'angiogenèse de l'interface fœto-placentaire. Cette étude a notamment permis de mettre en évidence la capacité de

l'Angiostamp™ associé à notre système d'imagerie bimodal à mettre en évidence les phénomènes angiogéniques intervenant dans un processus physiologique.

2.1.2 Targeting CD44 receptor-positive lung tumors using polysaccharide-based nanocarriers: influence of nanoparticle size and administration route.



BASIC SCIENCE

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
12 (2016) 921–932



Original Article

nanomedjournal.com

Targeting CD44 receptor-positive lung tumors using polysaccharide-based nanocarriers: Influence of nanoparticle size and administration route

Victor Jeannot, PharmD, PhD^{a,b,1}, Silvia Mazzaferro, PharmD, PhD^{c,d,1},
Jonathan Lavaud, MSc^{a,b,c}, Laetitia Vanwongerghem, BSc^{a,b}, Maxime Henry, BSc^{a,b,c},
Mélanie Arboléas, BSc^{a,b}, Julien Vollaire, PhD^{a,b,c}, Véronique Josserand, PhD^{a,b,c},
Jean-Luc Coll, PhD^{a,b}, Sébastien Lecommandoux, PhD^{c,d}, Christophe Schatz, PhD^{c,d,*},
Amandine Hurbin, PhD^{a,b,**,2}

^aINSERM U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

^bUniv. Grenoble Alpes, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

^cCNRS UMR5629, Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, Pessac, France

^dUniv. Bordeaux, Bordeaux-INP, Grenoble, France

^eOPTIMAL small animal imaging facility, Grenoble, France

Received 11 September 2015; accepted 18 November 2015

Abstract

New approaches that are more efficient and able to specifically reach lung tumors are needed. We developed new hyaluronan-based nanoparticles targeting CD44 receptors of two different sizes and compared their lung cancer cells targeting efficacy *in vitro* and *in vivo*. The nanoparticles' cellular uptake was dose-dependent, and specific to hyaluronan receptors, particularly CD44. The binding and internalization differed according to nanoparticle size. *In vivo* biodistribution studies in two orthotopic lung tumor models showed that intrapulmonary nebulized nanoparticles accumulated in lungs, but not in the tumor nodules. In contrast, despite a significant liver capture, intravenous injection led to a better accumulation of the nanoparticles in the lung tumors compared with the surrounding healthy lung tissues. We demonstrated that the hyaluronan-based nanoparticles size plays significant role in cellular uptake and biodistribution. Small nanoparticles showed active targeting of CD44-overexpressing tumors, suggesting that they could be used as drug-delivery system.

From the Clinical Editor: Combating cancers remains an important goal in clinical medicine. In this study, the authors investigated the ability of two hyaluronan-based nanoparticles targeting CD44 receptors to home in on lung cancer cells in an *in-vivo* orthotopic model. The preferential uptake of smaller sized nanoparticles via intravenous route has further enhanced the existing knowledge of future drug designs.
© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Dans cette étude, le système bimodal a permis d'évaluer la captation de nanoparticules dans le cas d'adénocarcinome pulmonaires et a permis de déterminer les caractéristiques physiques et la dose et la voie d'administration optimale de nanoparticules ciblant spécifiquement le cancer du poumon.

2.1.3 Electrochemotherapy guided by intraoperative fluorescence imaging for the treatment of inoperable peritoneal micro-metastases.

Accepted Manuscript

Electrochemotherapy guided by intraoperative fluorescence imaging for the treatment of inoperable peritoneal micro-metastases

V. Josserand, M. Kéramidas, J. Lavaud, C. Righini, J. Vollaire, E. Bellard, M.P. Rols, J. Teissié, J.L. Coll, M. Golzio

PII: S0168-3659(16)30255-3
DOI: doi: [10.1016/j.jconrel.2016.05.003](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.003)
Reference: COREL 8245

To appear in: *Journal of Controlled Release*

Received date: 8 February 2016
Revised date: 25 April 2016
Accepted date: 1 May 2016



Dans ce travail, le système bimodal a permis de suivre le développement de métastases péritonéales et d'évaluer le bénéfice de l'électro chimiothérapie guidée par fluorescence.

2.1.4 The critical role of the ZNF217 oncogene in promoting breast cancer metastasis to the bone.

Journal of Pathology

J Pathol 2017

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/path.4882

ORIGINAL PAPER

The critical role of the ZNF217 oncogene in promoting breast cancer metastasis to the bone

Aurélie Bellanger^{1,2†}, Caterina F Donini^{1,2,3†}, Julie A Vendrell^{1,2†}, Jonathan Lavaud^{4,5}, Irma Machuca-Gayet^{2,6}, Maëva Ruel^{1,2}, Julien Vollaire^{4,5}, Evelyne Grisard^{1,2}, Balázs Györfy^{7,8}, Ivan Bièche⁹, Olivier Peyruchaud^{2,6}, Jean-Luc Coll^{4,5}, Isabelle Treilleux¹⁰, Véronique Maguer-Satta¹, Véronique Josserand^{4,5} and Pascale A Cohen^{1,2*}

¹ Univ. Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

² Univ. Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

³ Unité Cancer et Environnement, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁴ INSERM U1209, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

⁵ Université Grenoble Alpes, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

⁶ INSERM, Unit 1033 (Faculté de Médecine Lyon Est), Lyon, France

⁷ MTA TTK Lendület Cancer Biomarker Research Group, Budapest, Hungary

⁸ Second Department of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest, Hungary

⁹ Unit of Pharmacogenetics, Department of Genetics, Institut Curie, Paris, France

¹⁰ Département de Biopathologie, Centre Léon Bérard, Lyon, France

*Correspondence to: PA Cohen, ISPBL, Faculté de Pharmacie de Lyon, 8 avenue Rockefeller, F69373 Lyon Cedex 08, France. E-mail: pascale.cohen@univ-lyon1.fr

†Equal contributions.

Abstract

Bone metastasis affects >70% of patients with advanced breast cancer. However, the molecular mechanisms underlying this process remain unclear. On the basis of analysis of clinical datasets, and *in vitro* and *in vivo* experiments, we report that the ZNF217 oncogene is a crucial mediator and indicator of bone metastasis. Patients with high ZNF217 mRNA expression levels in primary breast tumours had a higher risk of developing bone metastases. MDA-MB-231 breast cancer cells stably transfected with ZNF217 (MDA-MB-231-ZNF217) showed the dysregulated expression of a set of genes with bone-homing and metastasis characteristics, which overlapped with two previously described 'osteolytic bone metastasis' gene signatures, while also highlighting the bone morphogenetic protein (BMP) pathway. The latter was activated in MDA-MB-231-ZNF217 cells, and its silencing by inhibitors (Noggin and LDN-193189) was sufficient to rescue ZNF217-dependent cell migration, invasion or chemotaxis towards the bone environment. Finally, by using non-invasive multimodal *in vivo* imaging, we found that ZNF217 increases the metastatic growth rate in the bone and accelerates the development of severe osteolytic lesions. Altogether, the findings of this study highlight ZNF217 as an indicator of the emergence of breast cancer bone metastasis; future therapies targeting ZNF217 and/or the BMP signalling pathway may be beneficial by preventing the development of bone metastases.

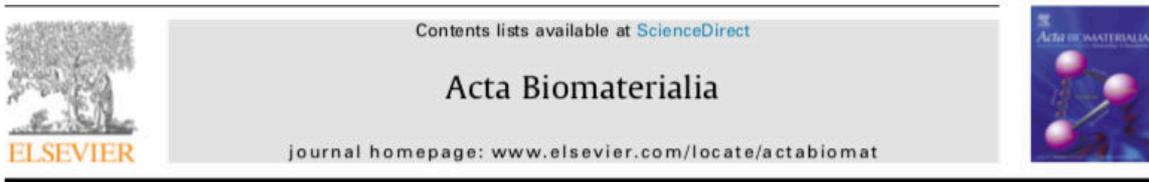
Copyright © 2017 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: ZNF217; oncogene; breast cancer; bone metastasis; BMP pathway

Dans cette dernière étude, le système bimodal a montré sa capacité à déterminer de façon précise et quantitative la formation de métastases osseuses dans un modèle de cancer du sein métastatique présentant une mutation du gène ZNF217 (Zinc Finger Protein 217), codant pour une protéine impliquée dans le développement de cancer et associé à un mauvais pronostic.

2.2 Projets de développement sur le versant microCT

2.2.1 Myoconductive and osteoconductive free-standing polysaccharide membranes



Myoconductive and osteoinductive free-standing polysaccharide membranes

Sofia G. Caridade^{a,b,c,1}, Claire Monge^{c,d,1}, Jorge Almodóvar^{c,d,2}, Raphael Guillot^{c,d}, Jonathan Lavaud^e, Véronique Josserand^e, Jean-Luc Coll^e, João F. Mano^{a,b,*}, Catherine Picart^{c,d,*}

^a3B's Research Group – Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, University of Minho, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Avepark – Parque de Ciência e Tecnologia, Zona Industrial da Gandra, 4805-017 Barco GMR, Guimarães, Portugal

^bICVS/3B's – PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal

^cCNRS UMR 5628, LMGP, 3 parvis Louis Néel, F-38016 Grenoble, France

^dUniversité de Grenoble Alpes, Grenoble Institute of Technology, 3 parvis Louis Néel, F-38016 Grenoble, France

^eInstitute Albert Bonniot, INSERM U823, ERL CNRS3148, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 August 2014

Received in revised form 26 December 2014

Accepted 30 December 2014

Available online xxxxx

Keywords:

Polysaccharides

Layer-by-layer

Biomaterials

Osteoinduction

Free-standing membranes

ABSTRACT

Free-standing (FS) membranes have increasing applications in the biomedical field as drug delivery systems for wound healing and tissue engineering. Here, we studied the potential of free-standing membranes made by the layer-by-layer assembly of chitosan and alginate to be used as a simple biomimetic system of the periosteum. The design of a periosteum-like membrane implies the elaboration of a thick membrane suitable for both muscle and bone formation. Our aim was to produce well-defined ~50 µm thick polysaccharide membranes that could be easily manipulated, were mechanically resistant, and would enable both myogenesis and osteogenesis *in vitro* and *in vivo*. The membranes were chemically crosslinked to improve their mechanical properties. Crosslinking chemistry was followed via Fourier transform infrared spectroscopy and the mechanical properties of the membranes were assessed using dynamic mechanical analysis. The loading and release of the potent osteoinductive growth factor bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) inside and outside of the FS membrane was followed by fluorescence spectroscopy in a physiological buffer over 1 month. The myogenic and osteogenic potentials of the membranes *in vitro* were assessed using BMP-2-responsive skeletal myoblasts. Finally, their osteoinductive properties *in vivo* were studied in a preliminary experiment using a mouse ectopic model. Our results showed that the more crosslinked FS membranes enabled a more efficient myoblast differentiation in myotubes. In addition, we showed that a tunable amount of BMP-2 can be loaded into and subsequently released from the membranes, depending on the crosslinking degree and the initial BMP-2 concentration in solution. Only the more crosslinked membranes were found to be osteoinductive *in vivo*. These polysaccharide-based membranes have strong potential as a periosteum-mimetic scaffold for bone tissue regeneration.

© 2015 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

En collaboration avec l'équipe du Dr. Catherine Picart, des membranes polysaccharidiques ayant la capacité à initier les processus d'ossification des tissus ont été développées par l'imprégnation d'un précurseur de l'ostéogénèse, la protéine BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2). La capacité de ces membranes à induire l'ostéogénèse a été testée *in vivo*. Pour ce travail, j'ai réalisé la mise au point du modèle animal utilisé et suivi au cours du temps, l'apparition de tissu osseux par imagerie microCT. Cette étude a mise en évidence la capacité des membranes polysaccharidiques imprégnées de BMP-2 à initier l'ostéogénèse.

2.2.2 Assessment of polyelectrolyte multilayer film coating loaded with BMP-2 on titanium and PEEK implants in the rabbit femoral condyle.

Accepted Manuscript

Full length article

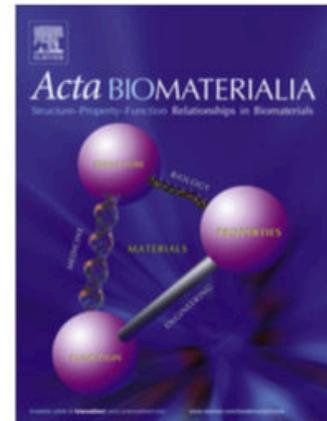
Assessment of a polyelectrolyte multilayer film coating loaded with BMP-2 on titanium and PEEK implants in the rabbit femoral condyle

R. Guillot, I. Pignot-Paintrand, J. Lavaud, A. Decambon, E. Bourgeois, V. Josserand, D. Logeart-Avramoglou, E. Viguier, C. Picart

PII: S1742-7061(16)30094-0
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.010>
Reference: ACTBIO 4147

To appear in: *Acta Biomaterialia*

Received Date: 30 October 2015
Revised Date: 29 February 2016
Accepted Date: 6 March 2016



Please cite this article as: Guillot, R., Pignot-Paintrand, I., Lavaud, J., Decambon, A., Bourgeois, E., Josserand, V., Logeart-Avramoglou, D., Viguier, E., Picart, C., Assessment of a polyelectrolyte multilayer film coating loaded with BMP-2 on titanium and PEEK implants in the rabbit femoral condyle, *Acta Biomaterialia* (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.010>

Dans la poursuite de notre collaboration avec l'équipe de Catherine Picard, des implants destinés à l'utilisation dentaire ont été recouverts du film imprégné de BMP-2. Pour cette étude, ces implants ont été implantés dans les condyles de lapins. Les condyles ont ensuite été chirurgicalement excisés et analysés par imagerie haute résolution en microCT afin d'apprécier et de quantifier le volume osseux construit autour et à l'intérieur des implants. Le travail réalisé ici a consisté dans la mise au point d'un protocole d'analyse des acquisitions microCT permettant de séparer de façon sensible et automatique, le tissu osseux de l'implant pour le quantifier. Cette étude a mis en évidence l'ostéogenèse induite par la BMP-2 pour ce type d'implants.

2.2.3 Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration.

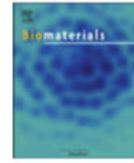
Biomaterials 104 (2016) 168–181



Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biomaterials



Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration



Michael Bouyer^{a, b, c}, Raphael Guillot^{a, b, 1}, Jonathan Lavaud^{d, e, 1}, Cedric Pletinx^{a, b, 2}, Cécile Olivier^{f, g, 2}, Véronique Curry^h, Jean Boutonnat^{h, i}, Jean-Luc Coll^{d, e}, Françoise Peyrin^{f, g}, Véronique Jossierand^{d, e}, Georges Bettega^{d, j, **}, Catherine Picart^{a, b, *}

^a CNRS, UMR 5628, LMGP, 3 parvis Louis Néel, F-38016, Grenoble, France

^b Université de Grenoble Alpes, LMGP, 3 parvis Louis Néel, F-38016, Grenoble, France

^c Service de chirurgie plastique et maxillo-faciale, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, France

^d INSERM U1209, Institut Albert Bonniot, F-38000, Grenoble, France

^e Université Grenoble Alpes, Institut Albert Bonniot, F-38000, Grenoble, France

^f Université de Lyon, CREATIS, CNRS UMR5220, Inserm U1044, INSA-Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, France

^g ESRF, The European Synchrotron, CS 40220, 38043, Grenoble, France

^h Unité médico-technique d'Histologie Cytologie expérimentale, Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, 38700, La Tronche, France

ⁱ Département d'Anatomie et Cytologie Pathologique, Institut de biologie et de pathologie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, France

^j Service de chirurgie maxillo-faciale, Centre Hospitalier Annecy Genevois, 1 avenue de l'hôpital, 74370, Epagny Metz-Tessy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2016

Received in revised form

17 May 2016

Accepted 1 June 2016

Available online 29 June 2016

Keywords:

Biomedical engineering

Orthopedic materials

Functional coatings

Tissue engineering

Bone morphogenetic proteins

ABSTRACT

The rapid and effective bone regeneration of large non-healing defects remains challenging. Bioactive proteins, such as bone morphogenetic protein (BMP)-2, are proved their osteoinductivity, but their clinical use is currently limited to collagen as biomaterial. Being able to deliver BMP-2 from any other biomaterial would broaden its clinical use. This work presents a novel means for repairing a critical size volumetric bone femoral defect in the rat by combining a osteoinductive surface coating (2D) to a polymeric scaffold (3D hollow tube) made of commercially-available PLGA. Using a polyelectrolyte film as BMP-2 carrier, we tune the amount of BMP-2 loaded in and released from the polyelectrolyte film coating over a large extent by controlling the film crosslinking level and initial concentration of BMP-2 in solution. Using microcomputed tomography and quantitative analysis of the regenerated bone growth kinetics, we show that the amount of newly formed bone and kinetics can be modulated: an effective and fast repair was obtained in 1–2 weeks in the best conditions, including complete defect bridging, formation of vascularized and mineralized bone tissue. Histological staining and high-resolution computed tomography revealed the presence of bone regeneration inside and around the tube with spatially distinct organization for trabecular-like and cortical bones. The amount of cortical bone and its thickness increased with the BMP-2 dose. In view of the recent developments in additive manufacturing techniques, this surface-coating technology may be applied in combination with various types of polymeric or metallic scaffolds to offer new perspectives of bone regeneration in personalized medicine.

© 2016 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Toujours dans la continuité du projet d'étude sur des biomatériaux capables d'induire l'ostéogénèse, cette dernière étude a été réalisée en partie au sein de notre laboratoire.

Dans ce cas, des plaques thermo-formables ont été imprégnées avec le film contenant BMP-2 et ont été appliquées dans des cas de fractures du fémur critiques chez le rat. Dans ce travail, j'ai pris en charge le suivi en imagerie et l'analyse *ex vivo* des fémurs par imagerie microCT. Cette étude a permis de déterminer les conditions en terme de dose et de propriétés physiques du film imprégné de BMP-2, nécessaires à la régénération osseuse dans le cas de fractures critiques du fémur.

3 Intégration du module de fluorescence 3-D dans un appareil d'imagerie préclinique multimodale, PhotonIMAGER™ OPTIMA de Biospace Lab.

La société Biospace Lab. commercialise une gamme d'instruments issus de technologies brevetées et dédiés à l'imagerie préclinique chez le petit animal. Biospace Lab. a récemment acquis les droits d'exploitation du brevet relatif au fDOT et souhaite commercialiser une version optimisée du fDOT intégrée dans leur propre système d'imagerie optique multimodale.

Dans la première partie de l'implémentation du module fDOT dans le système Optima, mon travail a consisté à prendre en main le module afin de trouver les paramètres adéquats pour obtenir un signal de fluorescence 3D pertinent, tant en terme d'intensité que de localisation spatiale.

Lors des premières acquisitions, le volume de fluorescence reconstruit n'était pas pertinent et ceci, après analyses approfondies des images brutes, résidait dans le fait que le signal collecté n'était pas suffisant pour générer une information 3D cohérente.

Après avoir modifié certains composants « hardware » et optimisé les paramètres d'acquisitions nous avons pu obtenir des images brutes de fluorescence contenant suffisamment de signal à condition d'acquérir chaque prise de vue avec de longs temps d'exposition. Ces observations nous ont amenés à mesurer la puissance effective du laser en sortie de fibre optique. Nous avons pu déterminer que la puissance laser était bien inférieure à celle requise dans le prototype, et notamment lors du balayage en mode « transmission » c'est-à-dire sans filtre devant la caméra.

Dans un premier temps, afin d'augmenter la puissance de l'illumination utilisée pour cette étape, la Densité Optique, qui se positionnait devant le laser lors de la « transmission » afin d'atténuer le signal et ne pas endommager la caméra, a été retirée. Une amélioration a été observée, mais cela s'est avéré insuffisant pour permettre une acquisition complète dans des conditions compatibles avec la biologie d'un animal vivant. Le module a alors été entièrement repensé par Biospace Lab. afin d'optimiser l'énergie d'illumination délivrée dans les tissus. Au stade actuel d'avancement du projet, les expérimentations réalisées ont permis de déterminer que les images acquises sont de bonne qualité, c'est-à-dire qu'elles contiennent un signal permettant de générer un bon rapport signal sur bruit à partir de temps d'exposition satisfaisants.

Par contre, il demeure que l'étape de reconstruction n'aboutit pas à un volume reconstruit reflétant correctement la configuration de l'objet imagé et cela constitue pour l'instant un obstacle pour envisager une étape de validation sur des modèles animaux.

ii. Imagerie photoacoustique

Les systèmes d'imagerie photoacoustique utilisés dans cette partie sont décrits en détails dans le paragraphe 3.4 de la revue bibliographique (§ Visualsonics).

1 Validation de l'imagerie photoacoustique par contraste endogène: from bench to bedside. {Article en préparation}

Cette première étude traite de l'évaluation des capacités de l'imagerie photoacoustique par contraste endogène et plus précisément sur l'évaluation de la répétabilité et de la reproductibilité des informations fonctionnelles extraites à partir du contraste endogène des hémoglobines oxygénée et désoxygénée. Cette étude a mis en évidence la très grande stabilité des mesures réalisées sur un absorbeur stable ainsi que la répétabilité et la reproductibilité des mesures du contenu en hémoglobine et de saturation en oxygène sur trois organes d'intérêt *in vivo* chez la souris ainsi que chez l'homme.

Title: Validation of endogenous contrast photoacoustic imaging: from bench to bedside.

Jonathan Lavaud¹, Maxime Henry¹, Jean Luc Coll¹, Matthieu Roustit²⁻³ and Véronique Josserand^{1‡}

Authors' affiliation:

1. Institute for Advanced Biosciences, Univ. of Grenoble Alpes, INSERM U1209 and CNRS UMR5309, 38000 Grenoble, France².
2. HP2, INSERM U1042, Univ. Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France
3. Centre d'investigations Cliniques, Grenoble University Hospital, Grenoble, France

‡ Corresponding Author:

Véronique Josserand PhD, Institute for Advanced Biosciences, INSERM-CNRS-UGA U1209-UMR5309, 38706 Grenoble, France. Phone: +33 (0)4.76.54.94.10, Fax: +33 (0)4.76.54.94.13
E-mail: veronique.josserand@univ-grenoble-alpes.fr

Abbreviations

PAI: Photoacoustic Imaging

PA: Photoacoustic

oxyHb: Oxygenated Hemoglobin

deoxyHb: Deoxygenated Hemoglobin

StO₂: Tissue Oxygen Saturation

O₂: Oxygen

HbT: Total Hemoglobin Content

TiO₂: Titanium dioxide powder

COV%: Coefficient of Variations (%)

BL: Baseline

Isch: Ischemia

Recov.: Recovery

BPM: Beats per minute

RR: Respiration Rate

BOLD MRI: Blood Oxygenation Level Dependent Magnetic Resonance Imaging

EPO: Erythropoietin

BMI: Body Mass Index

1.1 Introduction

Photoacoustic imaging (PAI) is a promising technology combining the most compelling features of optical imaging and ultrasound, providing both high optical contrast and high ultrasound resolution at depth in living organisms [248]. Some endogenous biological absorbers such as oxygenated (oxyHb) and deoxygenated hemoglobin (deoxyHb) can be detected using this technology. By detecting the relative amounts of oxy- and deoxy-hemoglobin, Hemoglobin content (HbT) and oxygen saturation (StO₂) can be calculated ($[\text{oxyHb}/(\text{oxyHb} + \text{deoxyHb})] \times 100\%$) [259]. These characteristics are of prime importance since they provide simultaneously physio-pathological and anatomical information. Photoacoustic imaging appears to be extremely useful in many preclinical and clinical applications such as detection of breast cancer imaging [251, 342-346], melanoma and sentinel lymph nodes [323-325], chronic leg ulcers in a context of diabetes [340] and more recently on patients presenting Crohn disease [341].

Nevertheless, if some studies cross-validated PAI-related StO₂ and HbT with measurements from other modalities [357], there is a lack of *in vitro*, *in vivo* and in human evaluation of reproducibility, repeatability and sensitivity concerning those parameters. So far, only one recent preclinical study focused on the importance of the evaluation of photoacoustic (PA) measurement accuracy on phantom as well as *in vivo* [249]. This study aimed to evaluate the precision of an iThera supplied PA system and no studies did the same with the other commercially available PA platforms.

Since PA systems have their own characteristics, it remains essential to evaluate each PA system technical quality. In this study, we aim to challenge a commercially available PAI system supplied by Fujifilm Visualsonics Inc. on tissue-mimicking phantom, healthy animals and in humans in order to highlight the accuracy of physiological values extracted from this imaging modality in both preclinical and clinical context.

1.2 Material & Methods

a. Photoacoustic systems

In this study, Vevo®LAZR and Vevo®LAZR-X (Fujifilm Visualsonics Inc, Toronto, Canada) photoacoustic imaging systems were used (Figure 34-A and B). Vevo®LAZR was used for preclinical study and the Vevo®LAZR X was used for a human study. Shortly, the system is based on an ultrasound transducer of 21 MHz on which 2 optical fibers are positioned on each side of a 256 elements ultrasound linear array. For the PA illumination, a Nd: YAG tunable laser (from 680 to 970 nm) provides a short light impulse (5 ns) at 20 Hz repetition rate. The laser shines the tissue leading to thermoelastic expansion and acoustic pressure waves detected thereafter by the ultrasound transducer. An internal calibration system corrects the energy of each laser pulse in order to homogenize the energy that could vary from one pulse to another. The sample is coupled with the transducer using ultrasonic gel

(Aquasonic® clear ultrasound gel; Parker Laboratories, Inc.; Fairfield, USA). The skin line is placed 11 mm far from the US elements in order to get the best light diffusion into the tissue.

In this study, the repeatability and the reproducibility of PAI were evaluated for two different protocols: a single wavelength on phantom (800 nm) and the oxyhemo protocol which measure HbT and StO₂% based on the proportion between oxy- and deoxy-hemoglobin detected by respective wavelengths (850 nm and 750 nm).

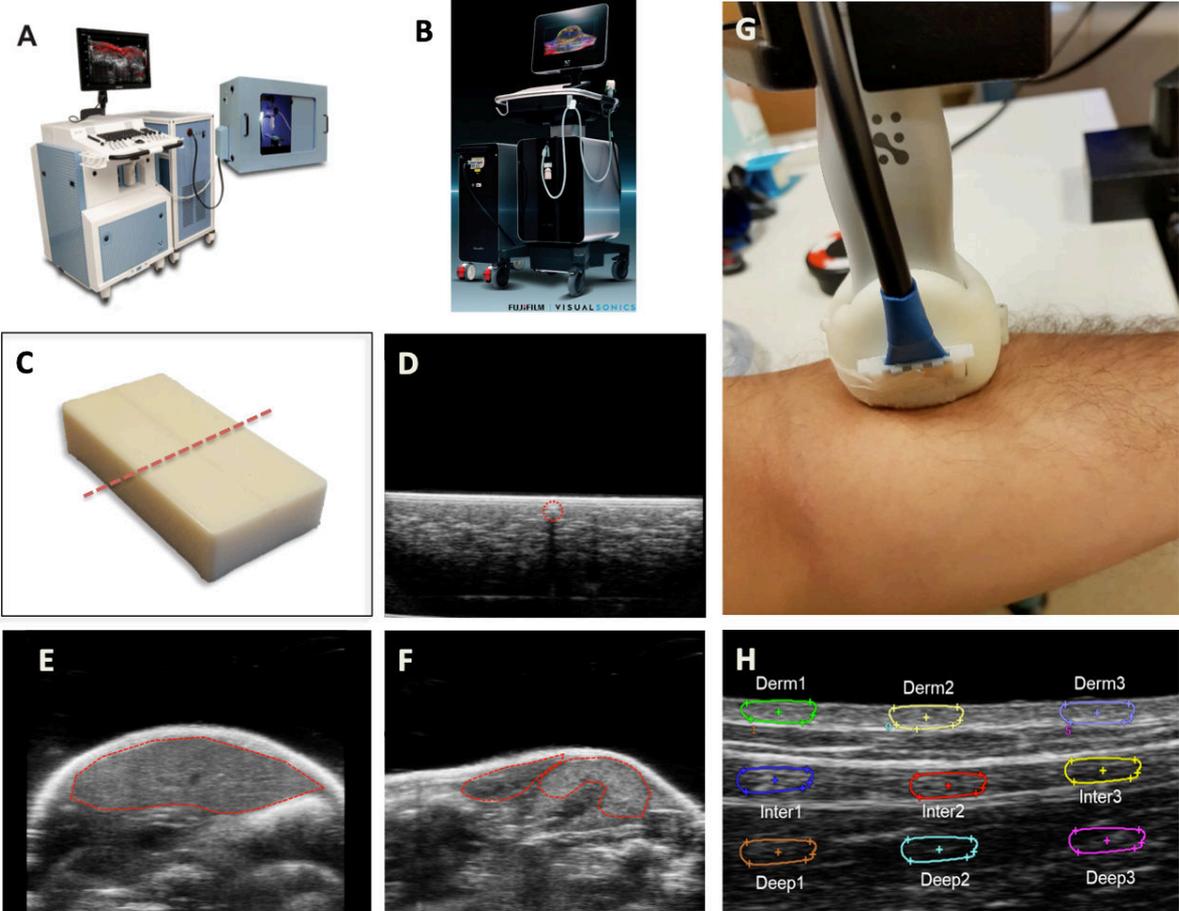


Figure 34 Description of the experimental setup

The two different used photoacoustic imaging system Vevo®LAZR (A) and Vevo®LAZR-X (B) for *in vitro* and *in vivo* evaluations of reproducibility and repeatability. *In vitro* evaluations are done on a tissue-mimicking phantom (C) on a 2D cross section (C, red region of interest (ROI) focusing on a stable absorber (D, red dotted line). *In vivo* experiments are made on the entire 3D volumes of the liver (E), on the spleen (F, left ROI) and the renal capsule (F, right ROI) for preclinical validation and on a muscle area of the left forearm (G) for human experiment. On human experiment 3 ROIs were drawn for each depth (H) Dermis, Intermediate and Deep.

b. PA measurement stability in phantoms

First, in order to determine the stability of measurements along time, an appropriate phantom (Figure 34-C) was designed. This phantom was made of polyurethane resin. A black string was included into the resin as a stable absorber into the phantom, 1 mm under the surface of the resin (Figure 34-D).

Titanium dioxide powder (TiO₂) was added to the phantom to obtain optical properties close to biological reality.

The previously described phantom was placed under the PA system and a 30min real-time acquisition was performed at 800 nm. The string area was measured to obtain the PA values among time. The experiment was repeated 3 times by moving and replacing the phantom in order to considerate the variability of PA values when we replace it several times under the transducer. For each acquisition, 7300 measurements points were collected.

The same imaging protocol was applied on the phantom 1.5 h, 3.5 h, 5.0 h, 6.5 h, 24 h, 48 h, 72 h, 1 week (168 h) and 2 weeks (336 h) thereafter in order to assess the repeatability of measurements on a stable PA absorber.

c. *In vivo* physiological parameter accuracy

Afterwards we moved to *in vivo* experiments to evaluate the stability of measurements in a complete biological context. The anesthesia procedure was performed carefully since the anesthesia could impact the blood parameters [358-360]. Animals were anesthetized using 4% isoflurane for induction during 2 minutes and then maintain under anesthesia using 1.5% anesthesia during image acquisitions. The 3 key physiological parameters were monitored using a rectal probe and the animal holder. The temperature was monitored using a rectal probe; the Heart Rate (HR) and the Respiration Rate (RR) were monitored using the animal holder.

Ethic protocol: none, in accordance with national guidelines regarding animal experimentation.

3 healthy NMRI nude mice were used. For each mice 3 references organ were scanned in 3D: kidney, spleen and liver (Figure 34-E and F). For each organ, an oxy-hemo protocol was applied at 0, 1.5h, 3.5h, 5.0h, 6.5h, 24h, 48h, 72h, 1week (168h) and 2weeks (336h).

The mice were removed between each time points in order to mimic real experimental conditions. To go further, in our approach to put this quality evaluation in real laboratory conditions, two different experimented users ran the scan:

- 1st user: 0, 3.5h, 6.5h, 48h and 1 week
- 2nd user: 1.5h, 5.0h, 24h, 72h and 2 weeks.

Organs were segmented based on B-mode images giving accurate anatomical information to draw VOIs. The 3D signal of HbT and StO₂ were extracted. All analyses and quantifications were performed using VevoLab[®] software (Fujifilm Visualsonics Inc, Toronto, Canada).

Within each time points and between each time point, COV% of reproducibility and repeatability were calculated using Bland Altman analysis [361];

the 1st day (from 0 to 6.5h) and each day after (from 0 to 336 h) were analyzed separately in order to observe the potential drift of the signal without any recalibration between 0 to 6.5 h.

d. In human physiological parameter accuracy

Finally, the biological information extracted from oxy-hemo protocol was assessed on human. On this purpose, 13 healthy volunteers (9 females, 4 males) were included in an ischemic challenge. An inflatable cuff was placed on the right arm, above systolic blood pressure, of the volunteers and the PA transducer was placed on a muscular region on the left forearm (Figure 34-G). The oxy-hemo protocol was started and the baseline was recorded during 1 min. (BL), the cuff was inflated and the ischemia (Isch) was recorded during 3 min., finally, the recovery (Recov.) was recorded during 4 min. after releasing the cuff. This procedure was repeated two times for each volunteer in order to assess the reproducibility of the measurements.

StO₂ was measured on 3 different depths named Deep (Deep, ≈ 5-6 mm), Intermediate (Inter, ≈ 2-3 mm) and Dermis (Derm, ≈ 0.5 mm) and 3 ROIs (3.4 mm²) were drawn for each depth (Figure 1-H). To evaluate the sensitivity of PA StO₂% measurements to different factors (Depth zone, subjects and ROIs placement), a general linear model was used for each period of the ischemic challenge (BL, Isch and Recov.). To evaluate the sensitivity of PA StO₂% measurements to the ischemic challenge, repeated ANOVA were used on 20 representative slides of each period (BL, Isch and Recov.).

Finally, within-subjects COVs% were calculated. Statistical analyses were done using XLSTAT software.

1.3 Results

a. PA measurement stability in phantoms

Looking at the signal collection during 30 min on a stable phantom (Figure 35-A), the mean COV% for temporal repeatability (Figure 35-B) was found to be 1.24%, without any crucial drift of PA signal observed during the 60 minutes real-time measurements.

The mean COV% for reproducibility were calculated to be 0.12% within the first day and 0.14% for the two week periods of measurements, indicating a very good stability of the PA measurements on phantom. The mean COV% for repeatability was calculated to be 0.96% within the first day and 0.71% for the two weeks after (Figure 35-C and D).

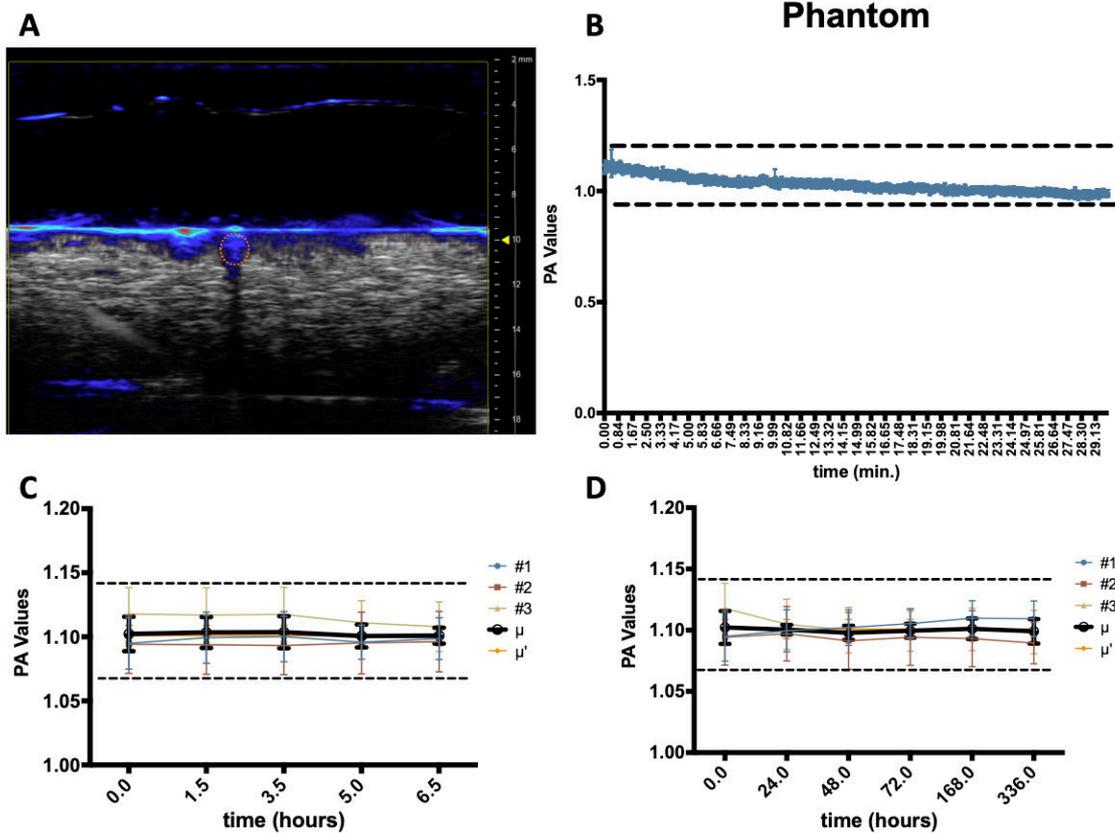


Figure 35 PA measurements of the stability on phantom

A PAI single wavelength acquisition (800nm) was ran on tissue mimicking phantom's absorber (A, ROI) during 30 min.

Measurements are displayed on the graph (B) and are used to calculate a mean Coefficient of Variation (COV%. μ represents the mean value of the 3 samples with its related standard error bare (reproducibility), μ' represents the mean value of all collected data with related standard error bares (repeatability), Min. and Max. values are shown as dotted lines representing the amplitude of measurements.

The 30 min real time acquisition gives a COV% equal to 1.24%.

Repeated measurements within the first day (0 to 6.5h) and within the weeks after (0 to 336h) give a COV% of repeatability equal to 0.96% and 0.71%, respectively

b. *In vivo* physiological parameter accuracy

The first attention was paid to physiological parameter measurements and stability in order to not introducing directly a bias directly due to the deepness of animal anesthesia. The temperature was monitored with a rectal probe and the RR and ECG were monitored thanks to the electrodes directly embedded onto the animal holder. The registered values were found to be $421.4 \pm 4.0\text{min}^{-1}$ (BPM) for HR, $55.3 \pm .7\text{min}^{-1}$ (RR) and $36.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ for temperature with related COV% of 1, 4.9 and 0.2 respectively.

Concerning the *in vivo* stability PA oxy-hemo measurements, three organs were considered as reference organs in this study. In liver (Figure 36-A and B), means COV% for HbT and

StO₂% reproducibility were calculated to be 7.86 and 7.91 within the first day. They were calculated to be 8.02 and 6.57 during the two weeks period measurements. The means COV% for HbT and StO₂% repeatability were calculated to be 17.27 and 7.43 within the first day. They were calculated to be 6.15% and 10.61 two weeks after (Figure 36-C and D). In spleen (Figure 37-A and B), means COV% for HbT and StO₂% reproducibility were calculated to be 11.79 and 5.09 within the first day. They were calculated to be 14.60 and 1.94 during the two-week periods of measurements. The means COV% for HbT and StO₂% repeatability were calculated to be 13.40 and 6.30 within the first day. They were calculated to be 12.37 and 7.12 two weeks after (Figure 37-C and D). In the renal Capsule (Figure 38-A and B): means COV% for HbT and StO₂% reproducibility were calculated to be 10.60 and 7.49 within the first day. They were calculated to be 13.95 and 8.47 during the two weeks period measurements. The means COV% for HbT and StO₂% repeatability were calculated to be 5.47 and 3.03 within the first day. They were calculated to be 9.28 and 4.87 two weeks after (Figure 38-C and D).

For all time points and all organs, the general means COV% for HbT and StO₂% reproducibility of measurements were calculated to be 9.55 ± 4.96 and 5.35 ± 3.23 . Concerning the general means COV% for HbT and StO₂% repeatability of measurements were calculated to be 10.66 ± 4.55 and 6.40 ± 2.38 . The mean COVs% values are detailed in Table 5.

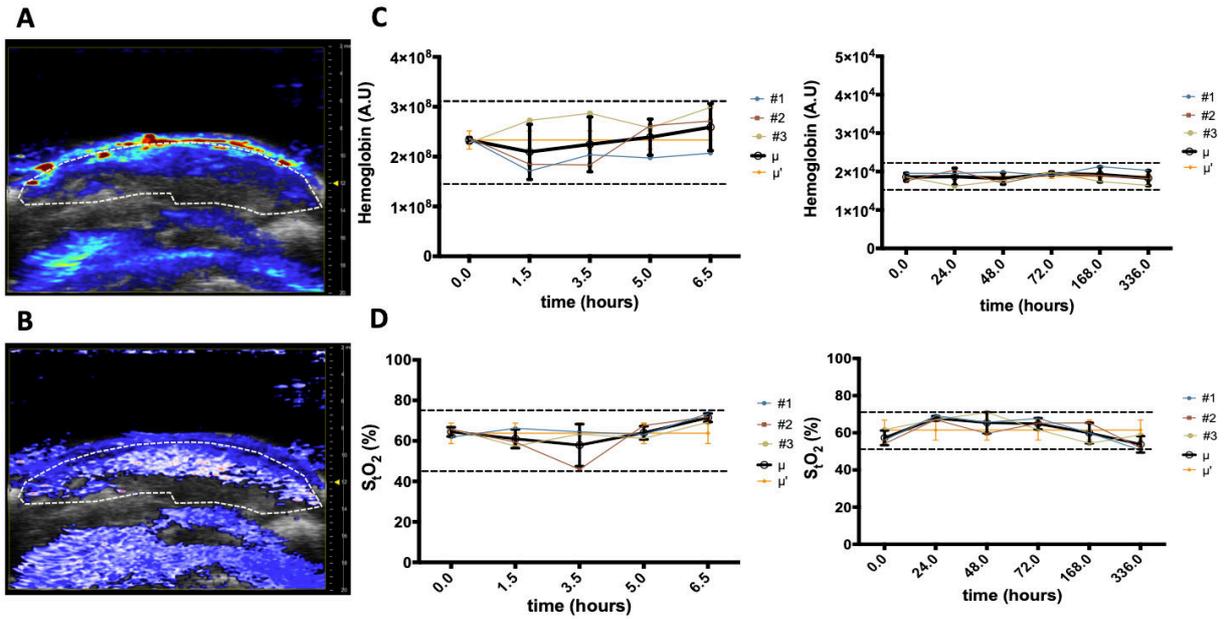


Figure 36 *In vivo* physiological parameter of accuracy in liver

Resulting images and values from oxy-hemo PAI protocol giving access to the total hemoglobin content (upper panel) and the tissular oxygen saturation (lower panel). The 3D measurements on the liver are displayed on the graphs. μ represents the mean value of the 3 animals with its related standard error bares (reproducibility), μ' represents the mean value of all collected data with related standard error bares (repeatability), Min. and Max. values are shown as dotted lines, representing the amplitude of measurements.

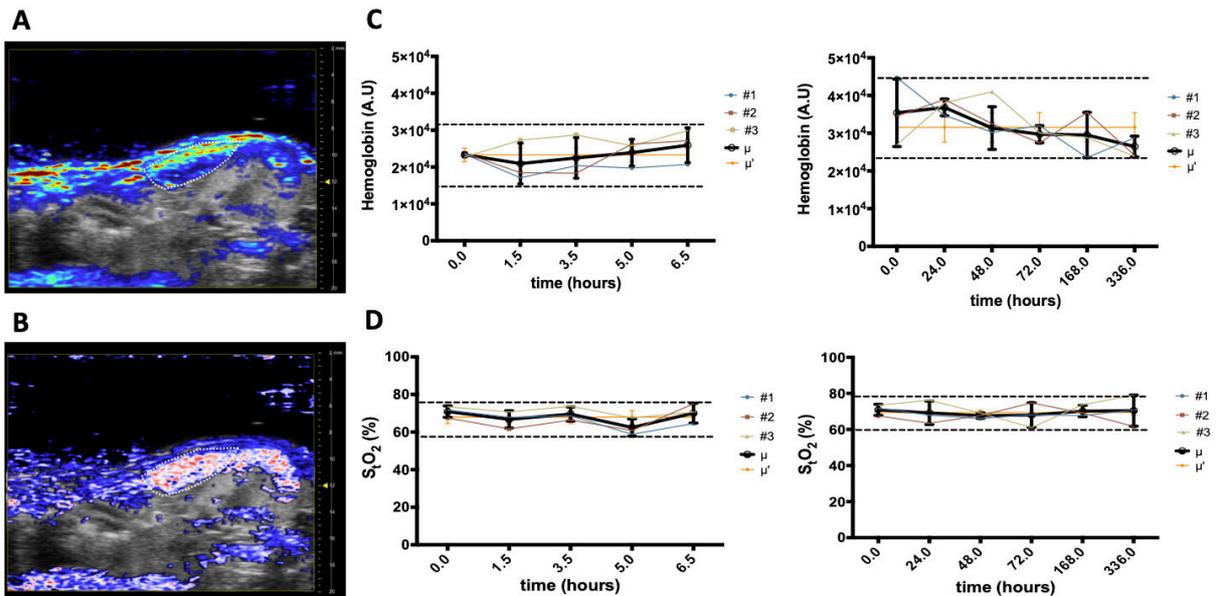


Figure 37 *In vivo* physiological parameter of accuracy in spleen

Resulting images and values from oxy-hemo PAI protocol giving access to the total hemoglobin content (upper panel) and the tissular oxygen saturation (lower panel). The 3D measurements on the spleen are displayed on the graphs. μ represents the mean

value of the 3 animals with its related standard error bares (reproducibility), μ' represents the mean value of all collected data with related standard error bares (repeatability), Min. and Max. values are shown as dotted lines, representing the amplitude of measurements.

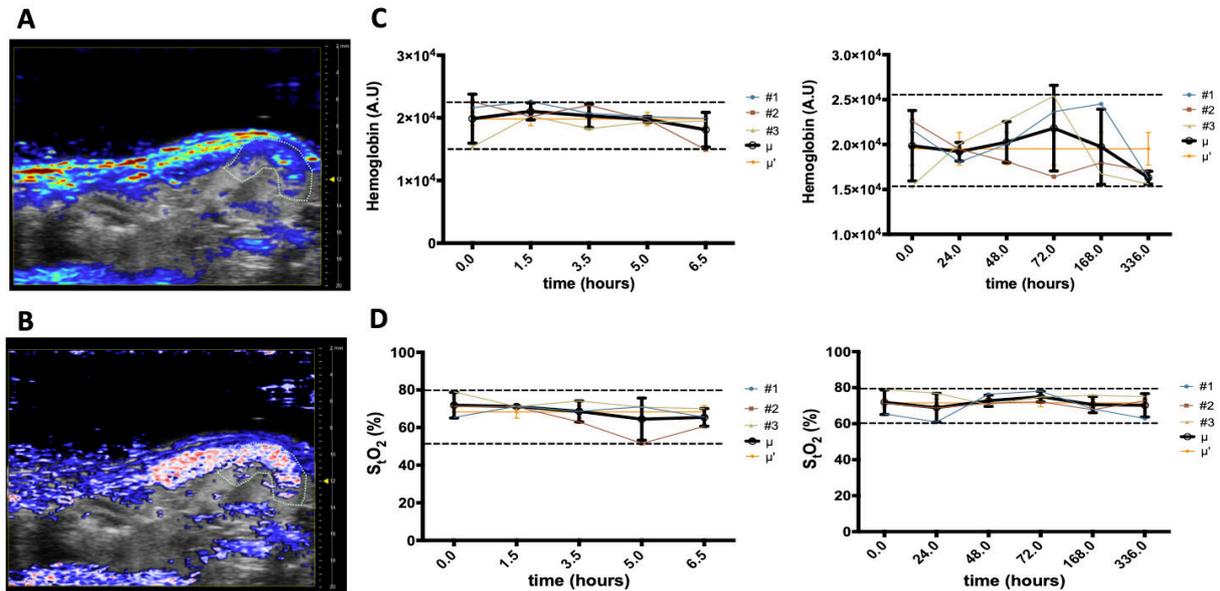


Figure 38 *In vivo* physiological parameter accuracy: renal capsule

Resulting images and values from oxy-hemo PAI protocol giving access to the total hemoglobin content (upper panel) and the tissular oxygen saturation (lower panel). The 3D measurements on the renal capsule are displayed on the graphs. μ represents the mean value of the 3 animals with its related standard error bares (reproducibility), μ' represents the mean value of all collected data with related standard error bares (repeatability), Min. and Max. values are shown as dotted lines, representing the amplitude of measurements.

Tableau 5 Summary table of meanCOV% by organ and the average COV% (in red) for (A) Repeatability and (B) Reproducibility of measurements.

Repeatability			
1st day			
COV %	HbT	StO2%	800nm
Phantom			0.12
Liver			7,86 7,91
Spleen			11,79 5,09
Renal Capsule			10,60 7,49
Mean			10.08 6.83
2 weeks			
COV %	HbT	StO2%	800nm
Phantom			0.14
Liver			8,02 6,57
Spleen			14,60 1,94
Renal Capsule			13,95 8,47
Mean			12.19 5.66

Repeatability			
1st day			
COV %	HbT	StO2%	800nm
Phantom			0.96
Liver			17,27 7,43
Spleen			13,40 6,30
Renal Capsule			5,47 3,03
Mean			12.05 5.59
2 weeks			
COV %	HbT	StO2%	800nm
Phantom			0.71
Liver			6,15 10,61
Spleen			12,37 7,12
Renal Capsule			9,28 4,87
Mean			9.27 7.53

c. In human physiological parameter accuracy

In order to validate the potential translation of photoacoustic into clinical practice, the physiological parameters extracted from photoacoustic endogenous contrast were assessed on 14 healthy volunteers on who were performed two ischemic challenges. The mean StO₂% values were observed for several depths. For deep regions (Figure 39-A) baseline, ischemia and recovery measurements for StO₂% were founded to be 40. For intermediate regions (Figure 39-B) baseline, ischemia and recovery measurements for StO₂% were founded to be 34, 32 and 40, respectively. For the dermis region (Figure 39-C) baseline, ischemia and recovery measurements for StO₂% were founded to be 34, 27 and 46, respectively.

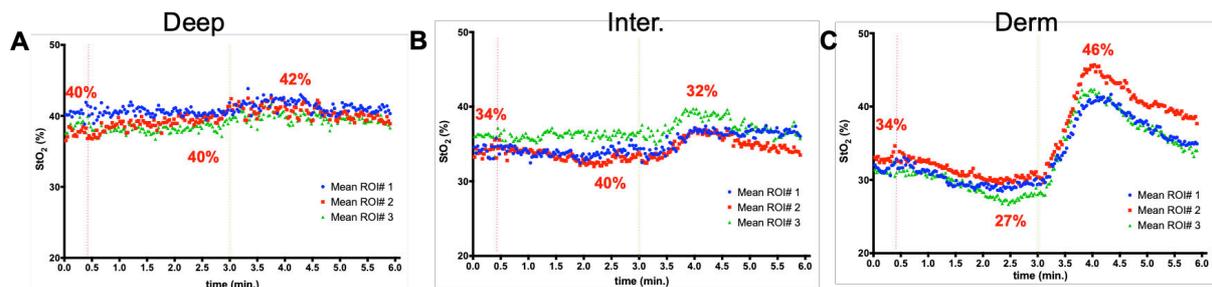


Figure 39 In human physiological parameters accuracy

Oxygen saturation kinetics during the ischemic challenge on 3 different depths, Deep (A), Intermediate (B), and Derm (C).

When considering statistical analysis in order to evaluate the sensitivity of photoacoustic StO₂% measurements to different factors, statistical differences were found (Figure 40). Regarding the BL, differences appeared between all zones (Derm, Inter, Deep) and between subjects but no differences were shown between the 3 different ROIs drawn for each zone.

Then, looking at the Ischemia, differences were showed between all zones (Derm, Inter, Deep) and between subjects but no differences appeared between the 3 different ROIs drawn for each zone. Concerning the recovery, differences appeared between subjects but no differences between zone and ROIs was revealed.

The photoacoustic oxygen saturation values were not sensitive to where ROIs are drawn for a given subject and a given depth. This analysis indicates that the two factors that influence the PAI StO₂% measurements are the subject and the deepness of the ROIs. It means that the 3 different ROIs drawn for each depth can be considered as identical.

For the following analysis, 20 representative images were chosen for each period of the ischemic challenge (BL, Isch and Recov.) (Figure 40-A). When looking at the sensitivity of photoacoustic detection (Figure 40-B), statistical differences where founded between all periods during the challenge (BL, Isch and Recov.) for the Derm And Inter depth (p-value < 0.001) but no differences where found for Deep region (p-value = 0.06).

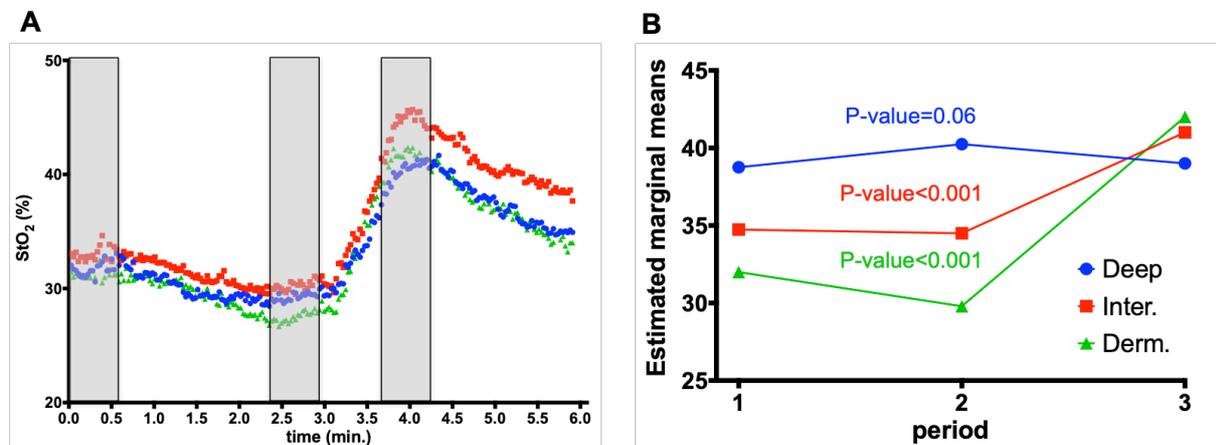


Figure 40 Physiological parameters accuracy in human

Description of the 20 slides chosen for each period (gray frames) of the ischemic challenge (A) and subset analysis graph representing the 3 periods of time of the ischemic challenge BL (1), Isch (2) and Recov. (3) for each depth on interest.

Effect of time (repeated measures ANOVA, Tukey post-hoc test).

When looking at the within-subjects COV% (Table 6), the mean values (lines “All”) indicates low COV% for all the ischemic challenges for Deep and Inter zones and higher COV% values for the Derm regions (up to 27.2% for the ischemic period). These results indicate that PAI is able to detect a change in oxygen saturation in a short period of time and that higher variations could be observed on superficial regions.

Tableau 6 Summary of whitin-subjects COV%

ROI	Zone	CV	BL	Isch	Peak
1	Deep	wsCV (%)	14.3	17.9	11.8
2	Deep	wsCV (%)	9.4	12.9	12.1
3	Deep	wsCV (%)	15.4	16.0	11.5
1	Interm	wsCV (%)	10.6	14.7	16.0
2	Interm	wsCV (%)	12.8	10.1	12.1
3	Interm	wsCV (%)	15.9	15.3	10.9
1	Derm	wsCV (%)	16.6	18.9	13.5
2	Derm	wsCV (%)	20.5	32.5	12.8
3	Derm	wsCV (%)	19.5	30.2	11.2
All	Deep	wsCV (%)	13.4	15.5	12.1
All	Interm	wsCV (%)	13.3	13.9	13.1
All	Derm	wsCV (%)	19.3	27.2	12.4

1.4 Discussion

The signal extracted from the measurements on our homemade phantom was observed to be extremely stable. Mean COVs% values were closely similar with the removal of the phantom between each measurement. An augmentation of the COV% during the first day of measurements was observed, which is possibly due to a slight drift of laser energy among time. However, the phantom employed in this study was not characterized using dedicated instruments and was based on a previous study in which the recipe was calibrated. Moreover, only one wavelength was investigated in this study assuming that the employed absorber did not absorb elsewhere on the available wavelength range. However, the laser's energies are calibrated for each pulse, the stability of measurements for all wavelengths thus be assumed.

In a general way, mean COV% of reproducibility and repeatability on measurements extracted from oxy-hemo protocol were observed to be about 10%, which indicates a strong stability and accuracy of information coming from PAI imaging. In other studies, COVs in the range of 10 and 15% were reported [249]. The low COV% of reproducibility seemed to be due to a strong repeatability of anesthesia depth for each animal. The COV% for the HbT measurements were 1.7 times higher than those for StO₂%. The observed variations were probably due to repeated gaseous anesthesia that lead to change in hemoglobin concentration up to 20% [358], suppress the erythropoietin (EPO) hypoxia response and cause vasodilatation [359, 360]. Indeed, the changes in HbT were observed to be higher in highly irrigated organs (spleen and liver). Nonetheless, even if the present study was done on a limited number of animals, the reproducibility and repeatability of the extracted biological information seemed to be extremely stable when the imaging protocol is finely calibrated (laser calibration, anesthesia and positioning of the animals, control of

physiological parameters). The repeatability and reproducibility of endogenous contrast photoacoustic imaging were cross-validated recently using BOLD MRI [357].

Moreover, the quality assessment of $S_T O_2\%$ measurements on healthy volunteers showed that the monitoring of oxygen saturation could be followed in real-time during an ischemic challenge. We noted a slow decrease of O_2 saturation during the ischemia and a pronounced post-occlusive hyperemia. The statistical analysis showed that photoacoustic imaging was not sensitive to choice of ROI position for a given subject at a given depth of observation in the tissue. Interestingly, the statistical analysis highlighted the ability of photoacoustic imaging to detect oxygen saturation changes. The variations were more predominantly observed into the dermis zone. This result could be due to way the ischemia was provoked which wasn't sufficient to observe any changes in O_2 saturation more in depth. The high COV% observed for Dermis region could be due to micro-movements of the volunteer skin during the challenge leading to over and under estimation of oxygen monitoring. The arterial pressure wasn't adapted for each subject characteristics (age, body mass index (BMI), arterial blood pressure...), which could be an outcome of this study. These results had to be confirmed in more standardized recording conditions, in others body areas (e.g. lower limb, hand) and in pathological conditions. However, they were promising for the use of photoacoustic in clinical use since they highlighted its strong ability to detect slight changes in O_2 saturation in human tissues.

In a more general way, this study emphasized the stability of photoacoustic-generated signal as well as the relevance of this modality to monitor dynamic physiological blood characteristics in real time and in a non-invasive way, and that, in small animals as well as in human tissues.

1.5 Bibliography

1. Wang, X., et al., *Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(7): p. 803-6.
2. Wang, X., et al., *Noninvasive imaging of hemoglobin concentration and oxygenation in the rat brain using high-resolution photoacoustic tomography*. J Biomed Opt, 2006. **11**(2): p. 024015.
3. Manohar, S., et al., *Initial results of in vivo non-invasive cancer imaging in the human breast using near-infrared photoacoustics*. Opt Express, 2007. **15**(19): p. 12277-85.
4. Kruger, R.A., et al., *Photoacoustic angiography of the breast*. Med Phys, 2010. **37**(11): p. 6096-100.
5. Ermilov, S.A., et al., *Laser optoacoustic imaging system for detection of breast cancer*. J Biomed Opt, 2009. **14**(2): p. 024007.
6. Heijblom, M., et al., *Visualizing breast cancer using the Twente photoacoustic mammoscope: what do we learn from twelve new patient measurements?* Opt Express, 2012. **20**(11): p. 11582-97.
7. Kitai, T. and M. Toi, [*Photoacoustic mammography for the diagnosis of breast cancer*]. Nihon Rinsho, 2012. **70 Suppl 7**: p. 326-30.
8. Heijblom, M., et al., *The state of the art in breast imaging using the Twente Photoacoustic Mammoscope: results from 31 measurements on malignancies*. Eur Radiol, 2016. **26**(11): p. 3874-3887.
9. Jose, J., et al., *Initial results of imaging melanoma metastasis in resected human lymph nodes using photoacoustic computed tomography*. J Biomed Opt, 2011. **16**(9): p. 096021.
10. Zhou, Y., et al., *Handheld photoacoustic microscopy to detect melanoma depth in vivo*. Opt Lett, 2014. **39**(16): p. 4731-4.
11. Langhout, G.C., et al., *Detection of melanoma metastases in resected human lymph nodes by noninvasive multispectral photoacoustic imaging*. Int J Biomed Imaging, 2014. **2014**: p. 163652.
12. Petri, M., et al., *Photoacoustic imaging of real-time oxygen changes in chronic leg ulcers after topical application of a haemoglobin spray: a pilot study*. J Wound Care, 2016. **25**(2): p. 87, 89-91.
13. Knieling, F., et al., *Multispectral Optoacoustic Tomography for Assessment of Crohn's Disease Activity*. N Engl J Med, 2017. **376**(13): p. 1292-1294.
14. Rich, L.J. and M. Seshadri, *Photoacoustic imaging of vascular hemodynamics: validation with blood oxygenation level-dependent MR imaging*. Radiology, 2015. **275**(1): p. 110-8.
15. Joseph, J., et al., *Evaluation of Precision in Optoacoustic Tomography for Preclinical Imaging in Living Subjects*. J Nucl Med, 2017. **58**(5): p. 807-814.

16. Gothelf, A., P. Hojman, and J. Gehl, *Change in Hemoglobin Levels due to Anesthesia in Mice: An Important Confounder in Studies on Hematopoietic Drugs*. Biol Proced Online, 2009. **11**: p. 325-30.
17. Kai, S., et al., *The volatile anesthetic isoflurane differentially suppresses the induction of erythropoietin synthesis elicited by acute anemia and systemic hypoxemia in mice in an hypoxia-inducible factor-2-dependent manner*. Eur J Pharmacol, 2014. **732**: p. 43-9.
18. Masamoto, K. and K. Tanishita, *Oxygen transport in brain tissue*. J Biomech Eng, 2009. **131**(7): p. 074002.
19. Giavarina, D., *Understanding Bland Altman analysis*. Biochem Med (Zagreb), 2015. **25**(2): p. 141-51.

2 Exploration of melanoma metastases in mice brains using endogenous contrast photoacoustic imaging {Article publié}

Cette étude visait à évaluer le potentiel de l'imagerie photoacoustique pour l'exploration fonctionnelle de métastases cérébrales de mélanome en se basant uniquement sur les propriétés intrinsèques des tissus (hémoglobine totale, saturation en oxygène et production de mélanine). L'imagerie photoacoustique a permis de détecter des cellules de mélanome de façon non-invasive dans le cerveau des souris et d'en extraire des informations relatives à l'hypoxie apparaissant lors du processus du développement tumoral. Cette étude a été publiée en Août 2017 dans *International Journal of Pharmaceutics*.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Exploration of melanoma metastases in mice brains using endogenous contrast photoacoustic imaging

Jonathan Lavaud^{a,b}, Maxime Henry^{a,b}, Jean Luc Coll^{a,b}, Veronique Josserand^{a,b,*}^a Institute for Advanced Biosciences, University of Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR5309, F-38000 Grenoble, France^b OPTIMAL, Small Animal Imaging Platform, F-38000 Grenoble, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Photoacoustic imaging
Melanoma brain metastases
Hypoxia
Angiogenesis

ABSTRACT

Photoacoustic imaging (PAI) provides real time non-invasive and contrast agent free monitoring of some endogenous compounds concentrations that provides improved insights into tissue vascularization and oxygenation which are particularly important during tumor progression.

This study assessed the input of PAI for examination of melanoma brain metastases in an orthotopic mouse model and further focused on spatial analyses within the tumor tissue.

Hemoglobin content appeared to be higher in tumors than in healthy brains. Spatial analyses further showed that angiogenesis was mainly at the tumor periphery. Concomitantly, while healthy brains were highly oxygenated, the tumors were hypoxic and subjected to a gradient of hypoxia from the periphery to the core.

In tumor-bearing brains, spectroscopic PAI clearly revealed the presence of melanin, generating a signal 3 times higher than the background signal in healthy brains. When inserted into tissue mimicking phantoms, the photoacoustic signal of B16F10 melanin-containing cells was linearly correlated to their concentration and the detection limit was 625 cells.

In vivo biological characterization of tumor models by non-invasive imaging of vasculature and tissue hypoxia represents an interesting opportunity for better understanding cancer progression; it is opening new research prospects to improve diagnostic, therapy, and early assessment of tumor treatment efficacy.

1. Introduction

Photoacoustic imaging (PAI) is an emerging technology combining the most compelling features of optical imaging and ultrasound, providing both high optical contrast and high ultrasound resolution at depth in living organisms (Wang et al., 2003a). It consists of illuminating tissues with a pulsed light, in the near-infrared wavelength range where light has its maximum depth of penetration in living tissues. This locally absorbed energy is dissipated into heat, producing a thermoelastic expansion, which generates an ultrasonic wave. This wave propagates through the tissues and can be collected by ultrasound detectors (transducers). Some endogenous compounds such as oxy- and deoxy-hemoglobin, melanin, lipids and collagen, exhibit a specific absorption spectrum together with a photoacoustic effect. By using multiple wavelengths of laser light (spectroscopic PAI) relative concentrations of these specific compounds can be determined (Luke et al., 2013; Wang et al., 2006). This imaging modality thus provides anatomically localized high inherent *in vivo* contrast in several tissue layers, allowing

for a precise and non-invasive mapping of several endogenous compounds.

In particular, by detecting the relative amounts of oxy- and deoxy-hemoglobin, oxygen saturation can be calculated ($[\text{oxyHb}/(\text{oxyHb} + \text{deoxyHb})] \times 100\%$) (Wang et al., 2006). It affords improved insights into levels of tissue oxygenation or hypoxia, which is of particular interest in oncology. This principle is applied in many studies postulating that tissues with low levels of oxygenation are more likely to be cancerous according to cancer's known metabolic changes (Warburg effect) and particularly hypoxia in later stages (Cairns et al., 2011; Kim and Dang, 2006).

With primary advantages including clinically relevant imaging depths (up to several centimeters) with submillimeter resolution (Wang and Hu, 2012), real-time monitoring, portability, and lack of ionizing radiations, PAI holds promise as a clinical modality for cancer detection (Valluru et al., 2016). Several applications pertaining to cancer imaging are currently being used in clinical trials for the exploration of microcirculation (via hemoglobin concentration) and tissue oxygen

Abbreviations: PAI, photoacoustic imaging; oxyHb, oxygenated hemoglobin; deoxyHb, deoxygenated hemoglobin; StO₂, tissue oxygen saturation; HbT, total hemoglobin content; EMT, epithelial-mesenchymal transition

* Corresponding author at: Institute for Advanced Biosciences, INSERM-CNRS-UGA U1209-UMR5309, 38706 Grenoble, France.

E-mail address: veronique.josserand@univ-grenoble-alpes.fr (V. Josserand).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.104>

Received 10 May 2017; Received in revised form 3 August 2017; Accepted 21 August 2017

Available online 25 August 2017

0378-5173/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

saturation in breast (Heijblom et al., 2016), prostate, and ovarian cancers (Valluru et al., 2016). Another attractive application of PAI is the detection and staging of skin cancer, given the potential advantages of this technology for non-invasive melanin endogenous contrast detection (Dawson et al., 1980). Melanoma (5% of skin cancers) is the most aggressive type of skin cancer, being associated with approximately 75% of skin cancer-related deaths (Karakousis and Czerniecki, 2011). PAI has, therefore, been utilized for the imaging of melanoma in subcutaneous mouse tumor models (Oh et al., 2006; Zhang et al., 2006; Zhou et al., 2014) and for the screening of circulating metastatic melanoma cells, based on cell melanin content detection (Galanzha et al., 2009). It has also successfully been applied to the detection of melanoma metastases in extracted sentinel lymph nodes from animals (McCormack et al., 2009) and human patients with cutaneous melanoma (Grootendorst et al., 2012; Langhout et al., 2014).

The main complication from melanoma is the development of brain metastases which impair brain function by dislodging or killing neurons, thereby inducing cerebral edema. This results in a decline in neurocognitive performance and in intracranial pressure leading to a major cause of death in patients with brain malignancies (Klump et al., 2016). The prognosis for such patients is thus very poor, with a median survival rate of 4 to 5 months (Davies et al., 2011). Thus, major improvements in brain metastases detection and subsequent therapeutic management remain critical.

In vivo biological characterization of melanoma brain metastases in experimental models represents a key step to developing new research strategies to improve diagnostic, therapy, and early assessment of treatment efficacy of these tumors in humans.

This study aimed to assess, for the first time, the input of spectroscopic PAI for non-invasive examination of melanoma brain metastases in an orthotopic mouse model and further focused on spatial analyses within the tumor tissue.

2. Material & methods

2.1. *In vitro* photoacoustic imaging

B16F10 cells (murine skin melanoma) were cultured in DMEM medium supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum in humidified atmosphere with 5% CO₂. At 60% confluency, cells were washed twice with 1 × PBS before being resuspended in trypsin. After centrifugation at 250g for 5 min, cells were suspended in cold 1 × PBS and living cells were counted on a Malassez cell after Trypan blue coloration. Cylindrical phantoms were prepared with agarose incorporating titan dioxide and Indian ink in order to mimic brain tissue absorbing ($\mu_a = 0.2 \text{ cm}^{-1}$) and scattering ($\mu_s' = 10 \text{ cm}^{-1}$) features. A 1 mm diameter tubing was placed at a 5 mm depth to create a tunnel where cells suspension could be placed. Various concentrations of B16F10 cells in DMEM (0; 6.25×10^3 ; 1.25×10^4 ; 2.5×10^4 ; 5.0×10^4 and 1.0×10^5 cells/ μL) were inserted into a phantom ($n = 3$ per condition) and were submitted to spectroscopic PAI (Vevo[®]LAZR, Fujifilm, Visualsonics Inc., Canada) from 680 to 970 nm with a 1 nm step. Spectral unmixing analyses were performed (Vevo[®]Lab software according to Luke et al. (2013)) and melanin quantification were made in a 0.1 mm^3 volume of interest corresponding to a slice of the phantom tunnel.

2.2. Brain metastasis animal model

All animal experiments procedures were approved by the animal ethics committee and received the authorization of the French Ministry of Higher Education and Research (reference #4937-2016041209236318 v6).

Female 6 weeks old, NMRI nude mice (Janvier, Le Genest-Isle, France) were implanted with B16F10 cells directly into the brain ($n = 6$). Anesthetized animals (isoflurane/air 4% for induction and

1.5% thereafter) were shaved and placed on a stereotaxic frame. A subcutaneous injection of 50 μL bupivacaine (5 mg/mL) was administered locally before the scalp was open to expose the skull. Skull sutures were revealed by gently removing all the membranes located on the external face of the skull. The point of injection was marked on the surface of the cranium (bregma 0, mediolateral 2 mm, dorso-ventral 3 mm) in order to drill a hole and insert the Hamilton syringe. After insertion of the Hamilton syringe into the striatum, the cells suspension (1.0×10^5 cells in 5 μL) was slowly pumped in (5 $\mu\text{L}/\text{min}$). The opening was then stoppered with Horsley wax and the skin sutured.

2.3. *In vivo* ultrasound and photoacoustic imaging

Ultrasound and PAI were performed with the Vevo[®]LAZR system (Fujifilm, Visualsonics Inc. Canada) using the LZ201 transducer (256 elements linear array; 15 MHz center frequency, [9–18 MHz bandwidth], 100 μm axial resolution; 220 μm lateral resolution; $30 \times 30 \text{ mm}^2$ image size) with the addition of a brain-dedicated illumination jacket concentrating the excitation light on a 10 mm-wide slice (Fig. S1). All imaging experiments were conducted under gaseous anesthesia (isoflurane/air 4% for induction and 1.5% thereafter).

3D B-mode, Color Doppler, oxy-hemo (750 and 850 nm) and spectroscopic (680; 710; 728; 894; 924 nm) scans were performed on the entire mice heads. For data analysis, tumor volumes were obtained by manually drawing Volumes of Interest (VOIs) on 3D B-mode images. Total hemoglobin content (HbT) and oxygen saturation rate (StO₂) were calculated from oxy-hemo data (Vevo[®]Lab software according to Wang et al. (2006)). Melanin, oxy- and deoxy-hemoglobin content were estimated by spectral unmixing analyses of spectroscopic data (Vevo[®]Lab software according to Luke et al. (2013)).

In addition, HbT and StO₂ were calculated in several sub-volumes of interest along the longitudinal axis of the tumors (Fig. 4A) from the tumors periphery (slices #1 and #5) to the tumors core (slice #3), with 2 intermediate positions (slices #2 and #4).

2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad software, San Diego, California USA) and Mann & Withney or One-Way ANOVA tests were applied (*p-value < 0.05; **p-value < 0.01; ***p-value < 0.001; ****p-value < 0.0001).

2.5. *Ex vivo* brain imaging and histology

Anesthetized mice were euthanized through a 30 μL intracardiac injection of Doletal (Vetoquinol, France) and were perfused by 4% formaldehyde for tissue fixation. Harvested brains were then placed in a water bowl for *ex vivo* spectroscopic PAI (680; 710; 728; 894; 924 nm), melanin content being estimated by spectral unmixing analyses (Vevo[®]Lab software). Finally, brains were frozen in OCT Tissue-Tek[™] (Sakura[®], Torrance, U.S.A.) and cut in 7 μm thick slices using a cryostat. Slices were stained with hematoxylin and eosin and entirely scanned (mosaic) by Axioimageur M2 Microscope (Zeiss) under $5 \times$ magnification.

3. Results

3.1. Melanoma cells photoacoustic signal in phantoms

B16F10 Melanoma cells displayed a specific photoacoustic spectrum that can be clearly separated from those of oxy- and deoxyhemoglobin (Fig. 1A). When inserted 5 mm deep into a phantom with brain tissue absorbing and scattering features, B16F10 cells were clearly detectable, and after spectral unmixing analyses, the photoacoustic signal was shown to be linearly correlated to the cell concentration ($R^2 = 0.97$). The detection limit in these experimental conditions was found to be

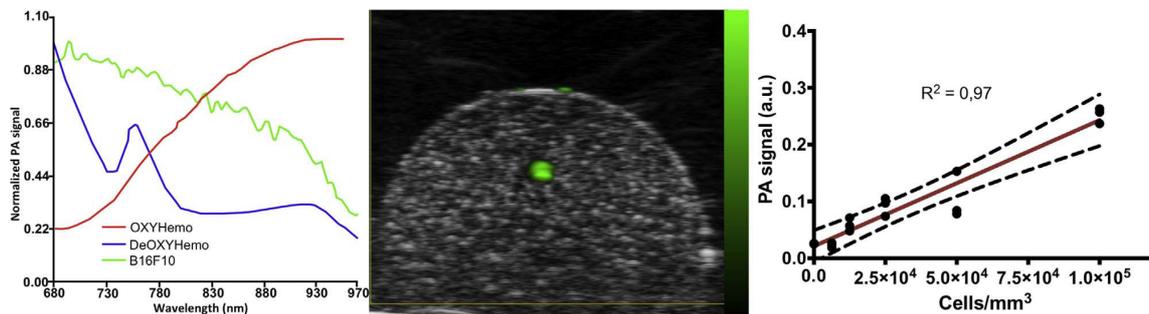


Fig. 1. Melanoma cells photoacoustic signal in phantoms. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.) A) Photoacoustic spectra of B16F10 cells (light blue), Oxyhemoglobin (green) and deoxyhemoglobin (dark blue). B) Bmode and overlaid photoacoustic images of B16F10 cells (10^5 cells/ mm^3) inserted into a tissue mimicking phantom after spectral unmixing analyses from spectroscopic acquisitions (680–970 nm). C) Photoacoustic signal of various B16F10 melanoma cell concentrations inserted into a tissue mimicking phantom after spectral unmixing analyses from spectroscopic acquisitions (680–970 nm).

6.25×10^3 cells/ mm^3 that corresponds to 625 cells in the analyzed volume of interest (Fig. 1C).

3.2. In vivo ultrasound and photoacoustic imaging

Seven days after tumor cells implantation, non-invasive 3D ultrasound and spectroscopic PAI were performed *in vivo* on the mice heads. From 3D Bmode images the mean tumor volume was found to be $23.93 \pm 6.65 \text{ mm}^3$ (Fig. 3A) which represented about 7% of the mean total brain volume ($348 \pm 12 \text{ mm}^3$ data not shown).

3D color Doppler in healthy brains provided a clear visualization of brain vessels (middle cerebral arteries, posterior communicating arteries, carotid arteries, internal carotid arteries and jugular veins) (Figs. 2 B and S2). In contrast, 3D color Doppler in tumor-bearing brains showed a strong disorganization of brain vasculature (Fig. 2B).

Melanin, oxy and deoxy-hemoglobin spectra could be extracted from spectral unmixing analyses to provide 3D melanin and hemoglobin contents as well as StO_2 . Interestingly, HbT and StO_2 measurements in healthy brains (Fig. 3C and D) were very reproducible (means \pm standard deviations from $n = 6$ mice: $\text{HbT} = 3.01 \times 10^8 \pm 5.04 \times 10^6$ and $\text{StO}_2 = 75.0 \pm 8.3\%$, that correspond to 4 and 11% of variation coefficients respectively for this control condition) which represents a valuable aspect of photoacoustic

technology.

In tumor volumes HbT appeared to be 0.70 to 6.31 times higher than in the same volume from healthy brains (Figs. 2 C and 3 C) indicating angiogenesis within the tumors. Concomitantly, while healthy brains tissues were highly oxygenated ($\text{StO}_2 = 75.0 \pm 8.3\%$) (Figs. 2 D and 3 D) with hemoglobin being mainly oxygenated (Fig. 2E), the tumors were hypoxic ($\text{StO}_2 = 45.6 \pm 3.6\%$) with a mean StO_2 39% lower than in healthy brains (Fig. 3D; *p-value < 0.05).

In tumor-bearing brains, spectroscopic PAI clearly revealed the presence of melanin, generating a photoacoustic signal 3 times higher than the background signal in healthy brains (Figs. 2 E and 3 D).

After euthanasia, brains were harvested and placed in a water bowl for *ex vivo* spectroscopic PAI. *Ex vivo* imaging in water, having removed skin, skull and interfaces, corroborated the results of non-invasive *in vivo* imaging illustrating the distribution of melanin in the tumors (Fig. 4).

3.3. Regional tumor analyses of the photoacoustic signal

For further analyses, tumor volumes were divided along the longitudinal axis into several sub-volumes (Fig. 5A), from the tumors periphery (slices #1 and #5) to the tumors core (slice #3), with 2 intermediate positions (slices #2 and #4).

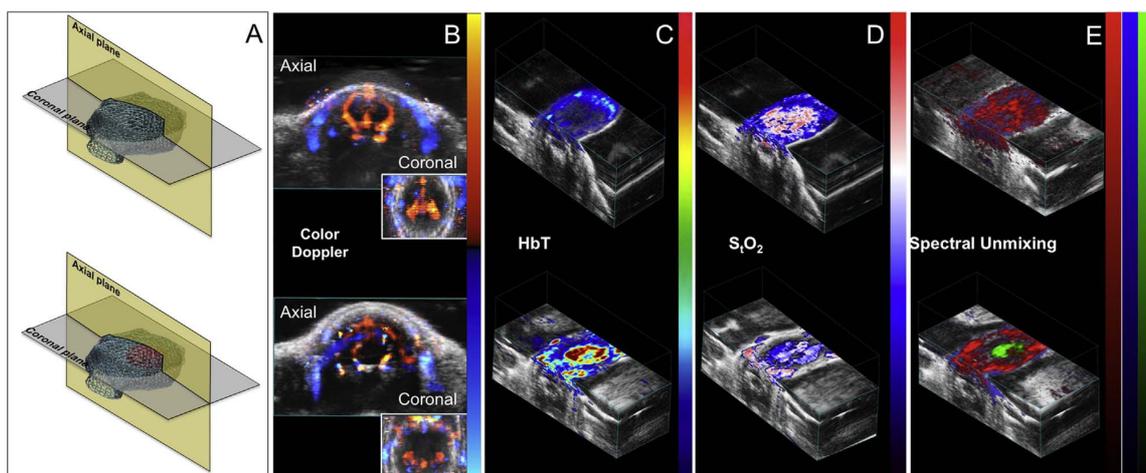


Fig. 2. Non-invasive *in vivo* ultrasound and photoacoustic imaging of healthy (upper panel) and melanoma tumor bearing (lower panel) brains. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

A) Schematic figure of healthy (blue grid) and tumor (red grid) bearing brains. B) Axial and coronal projections of 3D Color Doppler imaging. C) 3D HbT and D) 3D Average StO_2 evaluated from the Oxy-Hemo protocol using 750 and 850 nm wavelengths. E) Melanin (green), oxy- (red) and deoxy- (blue) hemoglobin 3D distribution estimated by spectral unmixing analyses from spectroscopic acquisitions (680; 710; 728; 894; 924 nm).

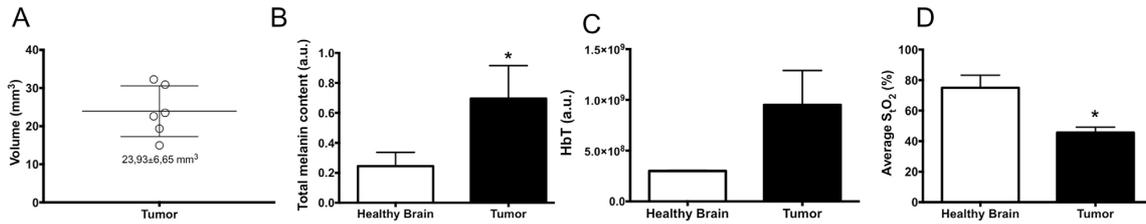


Fig. 3. Quantifications from non-invasive *in vivo* ultrasound and photoacoustic imaging of healthy and melanoma tumor bearing brains. A) Tumor volumes obtained by drawing manually Volumes of Interest (VOIs) on 3D B-mode images. B) HbT, C) Average StO₂ measured from the images acquired by the Oxy-Hemo protocol using 750 and 850 nm wavelengths. D) Total melanin content measured by spectral unmixing analyses from spectroscopic acquisitions (680; 710; 728; 894; 924 nm). All quantifications were made in the tumors volume and in the same volume from healthy brains. Data represented are mean ± SEM; Mann & Withneys statistical evaluation: *p-value < 0.05.

While a non-significant increase of HbT was observed in the tumors when considered in their entirety, when analyzing sub-volumes, HbT was found to be significantly increased in the tumors periphery (by 81% compared to the healthy brain), going gradually back to the healthy level when moving toward the core (Fig. 5B; **p-value < 0,01).

In parallel, global hypoxia was observed within the entire tumors, but this was increasingly evident in samples from the periphery to the core, StO₂ being decreased by 43%, 54% and 62%, respectively, compared to healthy brains.

4. Discussion

The usefulness of non-invasive *in vivo* PAI was first demonstrated in mouse and rat brains in the early years of the 21th century (Wang et al., 2003a,b). These precursor studies demonstrated the practicability of transdermal and transcranial PAI with the skin and skull intact for the

high-resolution anatomical exploration of brain blood vessels and others detailed brain structures. This highlighted the unique potential of PAI for the assessments of functional cerebral hemodynamic changes, total hemoglobin content, and tissue oxygen saturation (Wang et al., 2006). PAI then proved to be suitable for the examination of intracranial tumor xenografts and consecutive angiogenesis and hypoxia (Attia et al., 2016; Burton et al., 2013; Lungu et al., 2007). It was further shown that brain tumors could be identified on the basis of their distorted vascular architecture and modified tissue oxygen saturation, thus illustrating the critical and well-documented role of hypoxia in driving tumor angiogenesis and invasion. Indeed, these phenomena have several implications of prime importance for understanding cancer and therapeutic strategies, as recently reviewed by Muz et al. (Muz et al., 2015). Pathological hypoxia affects both cancer cells and the tumor microenvironment, and plays a critical role in cancer progression and dissemination. Hypoxia regulates tumor neovascularization,

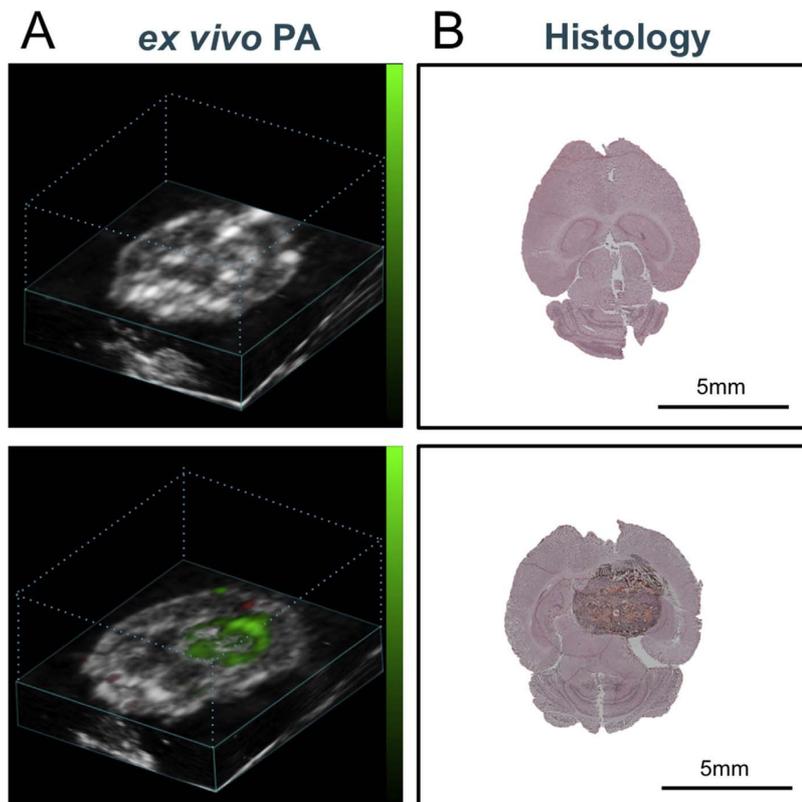


Fig. 4. *Ex vivo* imaging of healthy (upper panel) and melanoma tumor bearing (lower panel) brains. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.) A) Melanin (green) 3D distribution *ex vivo* in brains estimated by spectral unmixing analyses from spectroscopic acquisitions (680; 710; 728; 894; 924 nm). B) Histology of brain slices after HE staining.

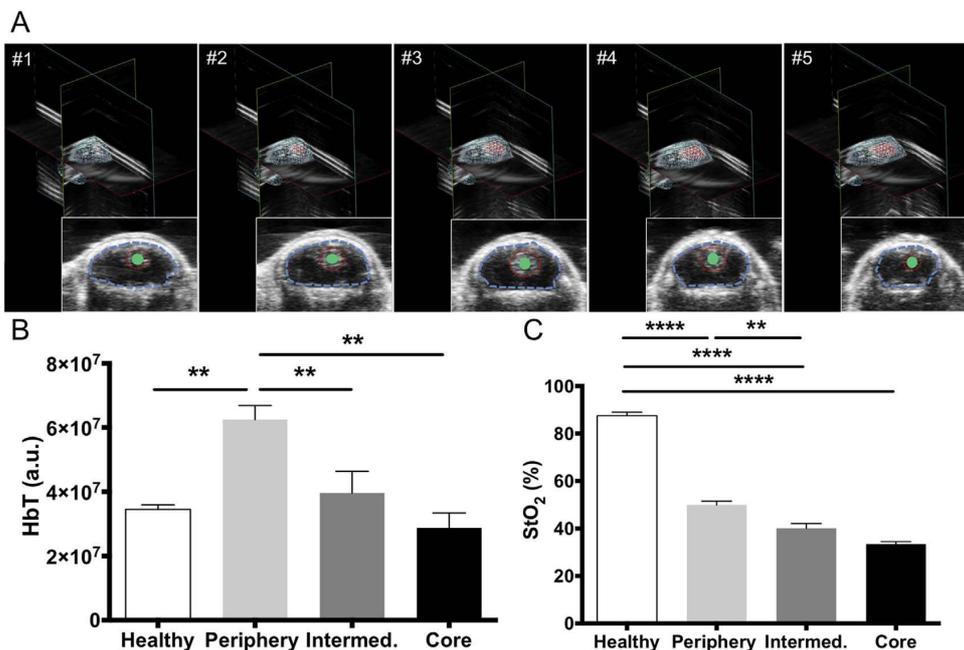


Fig. 5. Regional tumor analyses of the photoacoustic signal. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.) A) The tumor volumes (red grid) were divided into several sub-volumes (gray disk) along the longitudinal axis from the tumors periphery (#1 and #5) to the tumors core (#3) with 2 intermediate positions (#2 and #4). B) HbT and C) StO₂ in the tumor sub-volumes and in the same volume from healthy brains. Data represented are mean ± SEM; One-way ANOVA statistical analysis. p-value: * < 0.05; ** < 0.01; **** < 0.0001.

metabolism, cell survival, and cell death. In addition, hypoxia contributes to epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like cancer cell migration and to cancer stem-cell-like properties, including resistance to treatment, one of the chief challenges in the medical field (Muz et al., 2015).

Monitoring of tissue hypoxia thus represents a unique opportunity for better understanding its role in cancer progression; it is also expected to open new prospects in developing novel hypoxia-targeting therapies and early assessments of treatment efficacy.

In this regard, Rich et al. recently demonstrated that tumor hypoxia monitoring by PAI could be used effectively to predict early tumor response to radiotherapy or chemo-radiotherapy in subcutaneous patient-derived xenograft (PDX) models of head and neck cancer as soon as 24 h after treatment (Rich and Seshadri, 2016). They also established a strong positive correlation between tumor StO₂ measurement by PAI and blood oxygenation level-dependent (BOLD) signal measured by MR imaging (Rich and Seshadri, 2015).

The present study reports for the first time the input of endogenous contrast PAI for non-invasive examination of tumor vascularization and hypoxia in melanoma brain metastases. Using spectroscopic PAI, hemoglobin concentration and tissue oxygen saturation were monitored in tumor compared to healthy brain tissue through intact skin and skull in living animals. As might be expected, these parameters demonstrated tumor angiogenesis as well as tumor hypoxia. The novelty was brought by further spatial analyses within the tumor tissue achieved through the high spatial resolution offered by PAI (100 μm axial resolution; 220 μm lateral resolution). This revealed an increased vasculature at the periphery of the tumor and a concomitant gradient of hypoxia from the periphery to the core. These observations are in full agreement with current knowledge on tumorigenesis (Muz et al., 2015) that has been established mainly from the anatomopathological characterization of biopsies or surgical specimens, but it represents a major step forward to achieve such 3D spatial analyses directly *in vivo* by non-invasive imaging.

Beyond vascularization and hypoxia evaluation, the present study also explored melanin content as a specific marker of the presence of melanoma cells in the brain. Detecting the endogenous contrast of melanin in melanoma brain tumor was first undertaken by Staley et al. (2010) but the authors used a unique 764 nm excitation wavelength which restricts the specificity and quantitative potential of the detection. In the present study, by using non-invasive spectroscopic PAI, melanoma brain tumor cells were detected through intact skin and skull in living animals. *In vitro* calibration studies on brain tissue mimicking phantoms showed that the photoacoustic signal was correlated to cell concentration, and that as few as 625 melanoma cells could be detected in a 5 mm deep volume of interest of 0.1 mm³. Similar results in melanin detection were recently obtained in the same mouse model with a newly developed handheld Multispectral optoacoustic (MSOT) system aimed to clinical translation (Neuschmelting et al., 2016).

5. Conclusion

Endogenous contrast PAI was used for the non-invasive examination of melanoma brain metastases in an orthotopic mouse model. Tumor angiogenesis and hypoxia as well as melanin content were characterized; the submillimeter resolution of this technology afforded a unique level of precision for the spatial exploration of tumor heterogeneity. Therefore, contrast agents-free, non-invasive and high resolution imaging of vasculature and tissue hypoxia is deemed to represent a valuable opportunity for a better understanding of the physiopathology of cancer, and is expected to open fresh prospects in the development of novel cancer therapies.

Acknowledgments

Imaging systems were acquired thanks to France Life Imaging (French program “Investissement d’Avenir” grant; “Infrastructure d’avenir en Biologie Sante”, ANR-11-INBS-44 0006).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.104>.

References

- Attia, A.B., Ho, C.J., Chandrasekharan, P., Balasundaram, G., Tay, H.C., Burton, N.C., et al., 2016. Multispectral optoacoustic and MRI coregistration for molecular imaging of orthotopic model of human glioblastoma. *J. Biophoton.* 9 (7), 671–679.
- Burton, N.C., Patel, M., Morscher, S., Driessen, W.H., Claussen, J., Beziere, N., et al., 2013. Multispectral opto-acoustic tomography (MSOT) of the brain and glioblastoma characterization. *Neuroimage* 65, 522–528.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W., 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11 (2), 85–95.
- Davies, M.A., Liu, P., McIntyre, S., Kim, K.B., Papadopoulos, N., Hwu, W.J., et al., 2011. Prognostic factors for survival in melanoma patients with brain metastases. *Cancer* 117 (8), 1687–1696.
- Dawson, J.B., Barker, D.J., Ellis, D.J., Grassam, E., Cotterill, J.A., Fisher, G.W., et al., 1980. A theoretical and experimental study of light absorption and scattering by in vivo skin. *Phys. Med. Biol.* 25 (4), 695–709.
- Galanzha, E.I., Shashkov, E.V., Spring, P.M., Suen, J.Y., Zharov, V.P., 2009. In vivo, noninvasive, label-free detection and eradication of circulating metastatic melanoma cells using two-color photoacoustic flow cytometry with a diode laser. *Cancer Res.* 69 (20), 7926–7934.
- Grootendorst, D.J., Jose, J., Wouters, M.W., van Boven, H., Van der Hage, J., Van Leeuwen, T.G., et al., 2012. First experiences of photoacoustic imaging for detection of melanoma metastases in resected human lymph nodes. *Lasers Surg. Med.* 44 (7), 541–549.
- Heijblom, M., Piras, D., van den Engh, F.M., van der Schaaf, M., Klaase, J.M., Steenberg, W., et al., 2016. The state of the art in breast imaging using the Twente Photoacoustic Mammoscope: results from 31 measurements on malignancies. *Eur. Radiol.* 26 (11), 3874–3887.
- Karakousis, G.C., Czerniecki, B.J., 2011. Diagnosis of melanoma. *PET Clin.* 6 (1), 1–8.
- Kim, J.W., Dang, C.V., 2006. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res.* 66 (18), 8927–8930.
- Klumpp, L., Sezgin, E.C., Eckert, F., Huber, S.M., 2016. Ion channels in brain metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (9).
- Langhout, G.C., Grootendorst, D.J., Nieweg, O.E., Wouters, M.W., van der Hage, J.A., Jose, J., et al., 2014. Detection of melanoma metastases in resected human lymph nodes by noninvasive multispectral photoacoustic imaging. *Int. J. Biomed. Imaging* 2014, 163652.
- Luke, G.P., Nam, S.Y., Emelianov, S.Y., 2013. Optical wavelength selection for improved spectroscopic photoacoustic imaging. *Photoacoustics* 1 (2), 36–42.
- Lungu, G.F., Li, M.L., Xie, X., Wang, L.V., Stoica, G., 2007. In vivo imaging and characterization of hypoxia-induced neovascularization and tumor invasion. *Int. J. Oncol.* 30 (1), 45–54.
- McCormack, D., Al-Shaer, M., Goldschmidt, B.S., Dale, P.S., Henry, C., Papageorgio, C., et al., 2009. Photoacoustic detection of melanoma micrometastasis in sentinel lymph nodes. *J. Biomech. Eng.* 131 (7), 074519.
- Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., Azab, A.K., 2015. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl.)* 3, 83–92.
- Neuschmelting, V., Burton, N.C., Lockau, H., Urich, A., Harmsen, S., Ntziachristos, V., et al., 2016. Performance of a multispectral optoacoustic tomography (MSOT) system equipped with 2D vs. 3D handheld probes for potential clinical translation. *Photoacoustics* 4 (1), 1–10.
- Oh, J.T., Li, M.L., Zhang, H.F., Maslov, K., Stoica, G., Wang, L.V., 2006. Three-dimensional imaging of skin melanoma in vivo by dual-wavelength photoacoustic microscopy. *J. Biomed. Opt.* 11 (3), 34032.
- Rich, L.J., Seshadri, M., 2015. Photoacoustic imaging of vascular hemodynamics: validation with blood oxygenation level-dependent MR imaging. *Radiology* 275 (1), 110–118.
- Rich, L.J., Seshadri, M., 2016. Photoacoustic monitoring of tumor and normal tissue response to radiation. *Sci. Rep.* 6, 21237.
- Staley, J., Grogan, P., Samadi, A.K., Cui, H., Cohen, M.S., Yang, X., 2010. Growth of melanoma brain tumors monitored by photoacoustic microscopy. *J. Biomed. Opt.* 15 (4), 040510.
- Valluru, K.S., Wilson, K.E., Willmann, J.K., 2016. Photoacoustic imaging in oncology: translational preclinical and early clinical experience. *Radiology* 280 (2), 332–349.
- Wang, L.V., Hu, S., 2012. Photoacoustic tomography: in vivo imaging from organelles to organs. *Science* 335 (6075), 1458–1462.
- Wang, X., Pang, Y., Ku, G., Xie, X., Stoica, G., Wang, L.V., 2003a. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat. Biotechnol.* 21 (7), 803–806.
- Wang, X., Pang, Y., Ku, G., Stoica, G., Wang, L.V., 2003b. Three-dimensional laser-induced photoacoustic tomography of mouse brain with the skin and skull intact. *Opt. Lett.* 28 (19), 1739–1741.
- Wang, X., Xie, X., Ku, G., Wang, L.V., Stoica, G., 2006. Noninvasive imaging of hemoglobin concentration and oxygenation in the rat brain using high-resolution photoacoustic tomography. *J. Biomed. Opt.* 11 (2), 024015.
- Zhang, H.F., Maslov, K., Stoica, G., Wang, L.V., 2006. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* 24 (7), 848–851.
- Zhou, Y., Xing, W., Maslov, K.I., Cornelius, L.A., Wang, L.V., 2014. Handheld photoacoustic microscopy to detect melanoma depth in vivo. *Opt. Lett.* 39 (16), 4731–4734.

3 Exploration of vascular dysplasia by photoacoustic imaging: an example on multiple Blue Rubber Bleb Nevus {Article soumis}

Dans cette étude, l'imagerie photoacoustique a été utilisée chez un patient humain souffrant d'une pathologie vasculaire rare nommée Blue Rubber Bleb Nevus (BRBN). Des lésions caractéristiques de ce patient ont été explorées en se basant sur le contraste endogène de l'hémoglobine observable en photoacoustique qui permet d'extraire des informations sur leur contenu en hémoglobine et leur saturation en oxygène comparées à des régions saines correspondantes. Cette étude a été soumise pour publication dans *Circulation : Cardiovascular Imaging* en Octobre 2018.

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential,
intended for journal review purposes only, and not to be further
disclosed.

URL: <https://circimaging-submit.aha-journals.org>

Title: Exploration of vascular dysplasia by photoacoustic imaging:
an example on multiple
Blue Rubber Bleb Nevus.

Manuscript number: CIRCCVIM/2018/008500

Author(s): Veronique Josserand, Institute for Advanced Biosciences,
Univ. of Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR5309

Jonathan Lavaud, Institute for Advanced Biosciences, Univ. of
Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR5309

Jean-Luc Coll, Institute for Advanced Biosciences, Univ. of Grenoble
Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR5309

Jean-Luc Cracowski, HP2, INSERM U1042, Univ. Grenoble Alpes; Centre
d'Investigations Cliniques, Grenoble University Hospital

Sophie Blaise, Grenoble University Hospital

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

Title: Exploration of vascular dysplasia by photoacoustic imaging: an example on multiple Blue Rubber Bleb Nevus.

Authors: J. Lavaud¹, JL. Coll¹, JL. Cracowski^{2,3}, S. Blaise^{4*} and V. Josserand^{1**}

Author's affiliation:

1. Institute for Advanced Biosciences, Univ. of Grenoble Alpes, INSERM U1209 and CNRS UMR5309, 38000 Grenoble, France
2. HP2, INSERM U1042, Univ. Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France
3. Centre d'Investigations Cliniques, Grenoble University Hospital, Grenoble, France
4. Department of Vascular Medicine, Grenoble University Hospital, F-38000 Grenoble, France

***Co-last authors**

‡ Corresponding Authors:

Veronique Josserand

Institute for Advanced Biosciences, Univ. of Grenoble Alpes, INSERM U1209 and CNRS UMR5309, 38000 Grenoble, France

Email: veronique.josserand@univ-grenoble-alpes.fr

Phone: +33(0) 476549410

Disclaimer: This manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

Blue rubber bleb nevus syndrome (BRBN, Bean syndrome) is a rare vascular malformation characterized by multiple cutaneous and mucous venous defects disseminated throughout the whole body. An infringement of mucous membranes is possible with potential complications as anemia or hemorrhage [1]. Photoacoustic imaging (PAI) is an emerging technology combining the most compelling features of optical imaging and ultrasound, providing both high optical contrast and high ultrasound resolution at depth in living organisms [2]. PAI offers great potential for non-invasive exploration of tissue, leveraging differences in the optical absorption of underlying tissue components. In particular, oxy- and deoxy-hemoglobin are endogenous absorbers that exhibit specific photoacoustic signal. By using several wavelengths of laser light, relative concentrations of these specific compounds can be determined thus providing non-invasive mapping of total hemoglobin content (HbT) and tissue oxygen saturation (StO₂) through several tissue layers at submillimeter resolution [3, 4]. To the best of our knowledge, this is the first time that PAI is used for the exploration of vascular malformation (VM), with specific interest in the evaluation of lesions with abnormal vessels and hyper vascularization. This case study reports the use of this new imaging modality, non-ionizing and contrast agent free, for the monitoring of hemoglobin content and tissue oxygenation mapping of several BRBN lesions.

Methods

A 36-years-old patient presenting a BRBN with multiple lesions of the arms, lower limbs and trunk. Doppler ultrasound confirmed the multiple extra truncal low flow vascular lesions. The patient had no sign of gastrointestinal tract bleeding and the laboratory tests were normal. Ultrasounds (B-mode) and PAI were performed using the Vevo®LAZR-X system (Fujifilm Visualsonics Inc., Toronto, Canada) with 21MHz transducer coupled with a 24mm wide optical fiber. Three dysplastic sites, on the left lower limb (Fig. 1 A), the left heel (Fig. 1 F) and the right forearm (Fig. 1 I), as well as control zones (dermal tissue), were scanned. The zones of interest were first spotted using anatomical B-mode. The Oxy-hemo multispectral PAI mode (wavelengths: 750 nm and 850 nm) was used for the evaluation of HbT and StO₂. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad software, San Diego, California USA). Two-ways ANOVA tests were used (ns: non-significant; *p-value<0,05; **p-value<0 ;01; ***p-value<0,001).

Results

The VM zone on the lower limb (Fig. 1 A, B, C) displayed a very strong photoacoustic signal (Fig. 1 C) in terms of hemoglobin content and tissue oxygen saturation, showing blood accumulation in the lesion area. PAI derived quantitative values (Fig. 1 D and E, left part) demonstrated significantly higher both HbT and StO₂ compared to the contralateral zone on the other foot (x2.1 for HbT and x1.6 for StO₂). In the same way, the VM on the left heel (Fig. 1 F, G, H) exhibited a clear but heterogeneous PA signal (Fig. 1 H) illustrating blood accumulation but restricted to a partial zone of the lesion. Quantitative analyses (Fig. 1 D and E, right) demonstrated higher HbT and StO₂ compared to the contralateral zone on the other foot (x1.8 for HbT and x1.5 for StO₂). PAI results thus illustrated blood accumulation in these two sites that appeared to be highly oxygenated.

On the right forearm, VM was located at the junction of a normal vein (Fig. 1 I). Therefore two zones of VM were examined, one close to the normal vein and another remote from the vein. The VM zone close to the normal vein (Fig. 1 J) showed a contrasted PA signal (Fig. 1 K) related to rather high HbT and StO₂ compared to a control dermal tissue zone (x1.4 for HbT and x1.2 for StO₂) (Fig. 1 L and M, left). On the contrary, the VM zone remote from the vein (Fig. 1 N and O) displayed higher HbT (Fig. 1 L, right) but lower StO₂ (Fig. 1 M, right) compared to a control dermal tissue zone (x1.4 for HbT and x0.8 for StO₂). This precisely illustrates the blood stasis in the VM leading to congestion and low oxygenation remotely from the normal vein.

Discussion

PAI allowed visualizing areas of VM and non-invasive monitoring of HbT and StO₂. PAI derived values were in accordance with the status of vascular lesions. Differences in photoacoustic signal were observed when dysplastic areas were compared to cutaneous contralateral regions. As expected, higher hemoglobin levels and higher but variable oxygen saturations were observed in dysplastic areas when compared to healthy tissue areas.

As far as we know, it is the first time that PAI was used to explore VM. Interestingly, PAI could highlight small lesions with low flow where Doppler ultrasound failed, such as in the case of extra-truncular lesions poorly connected to « normal » vascular network. This suggests that in some cases PAI could be more sensitive than Doppler ultrasound offering

better delineation of VM areas with also further advantage in the BRNB post treatment exploration and follow-up (after surgery or sclerotherapy) to detect early recurrence.

BRBN diagnosis is currently based mainly on the clinical examination but differential diagnosis may be difficult in particular regarding other vascular anomalies such as glomuvenous or even cutaneous tumors [5]. This suggests that PAI could offer significant benefits for vascular malformation or cutaneous tumor diagnosis [5].

Conflict of interest:

S.Blaise : none

J.Lavaud : none

V. Josserand: none

J.L. Coll : none

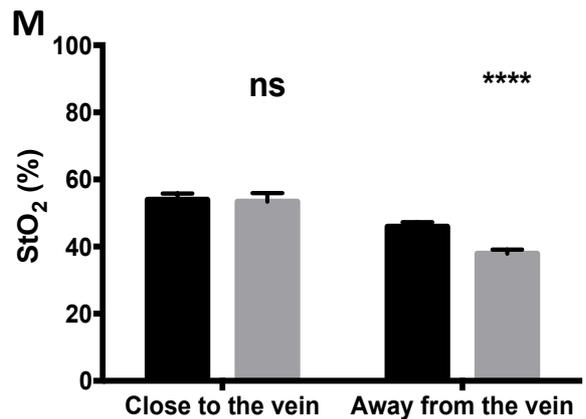
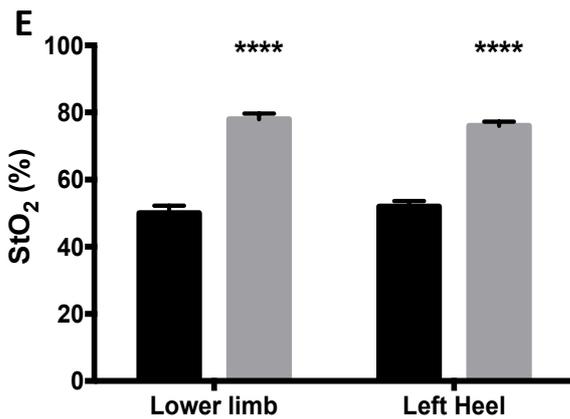
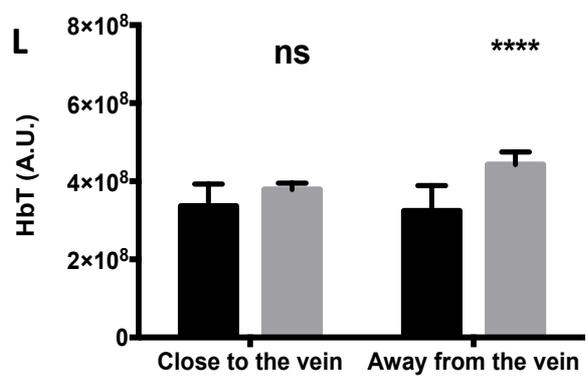
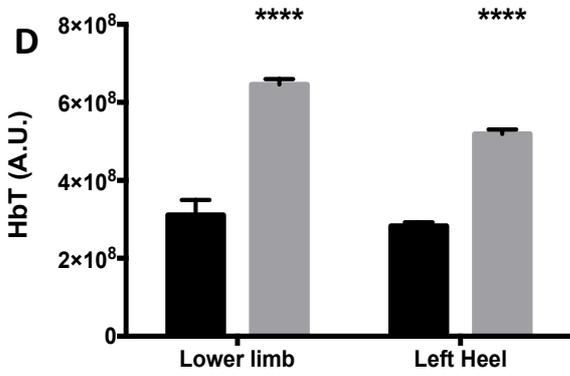
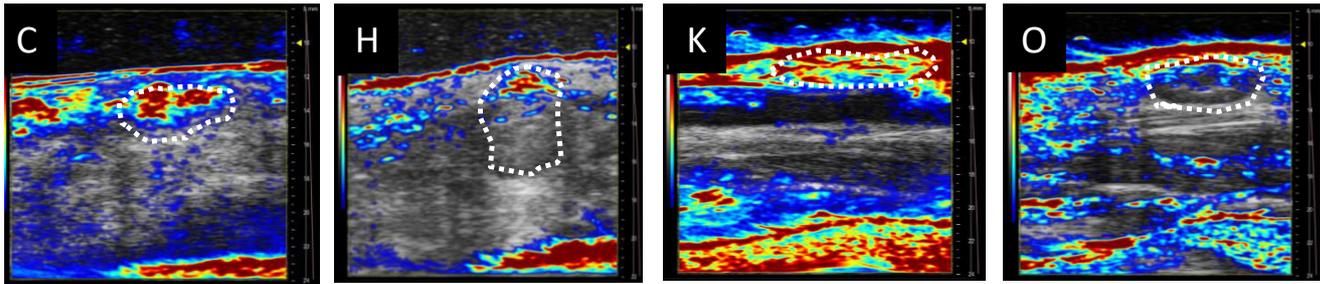
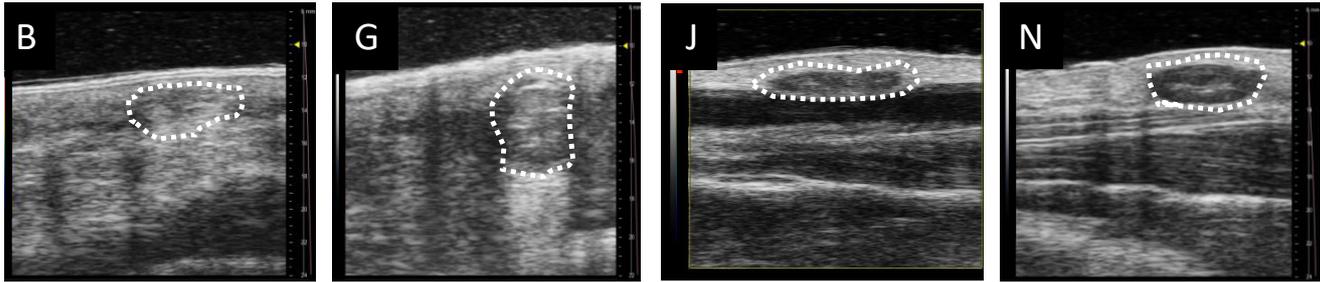
J.L. Cracowski : none

Acknowledgements

We thank Visualsonics (J Jose, P Davault, P Trochet) that lent the vevoLAZR system and France Life Imaging (French program “Investissement d'Avenir” grant; “Infrastructure d'avenir en Biologie Sante”, ANR-11-INBS-44 0006) that made possible such collaboration and translational program.

REFERENCES:

1. Ballieux, F., L.M. Boon, and M. Vikkula, *Blue bleb rubber nevus syndrome*. *Handb Clin Neurol*, 2015. **132**: p. 223-30.
2. Wang, X., et al., *Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain*. *Nat Biotechnol*, 2003. **21**(7): p. 803-6.
3. Luke, G.P., S.Y. Nam, and S.Y. Emelianov, *Optical wavelength selection for improved spectroscopic photoacoustic imaging*. *Photoacoustics*, 2013. **1**(2): p. 36-42.
4. Wang, X., et al., *Noninvasive imaging of hemoglobin concentration and oxygenation in the rat brain using high-resolution photoacoustic tomography*. *J Biomed Opt*, 2006. **11**(2): p. 024015.
5. Li, Z., et al., *The surgery for blue rubber bleb nevus syndrome*. *Ann Med Surg (Lond)*, 2016. **5**: p. 93-6.



Control tissue
 Dysplasia

4 Amélioration des caractéristiques de l'imagerie PA par une approche d'acquisition multi-angles.

Comme mentionné précédemment, l'imagerie photoacoustique est une modalité d'imagerie fonctionnelle et moléculaire qui présente un rapport profondeur/résolution important. Cette modalité permet notamment d'imager le contenu en hémoglobine, ce qui est d'un très grand intérêt pour la visualisation du réseau vasculaire normal ou pathologique [362, 363] mais également pour différencier les hémoglobines oxygénée et désoxygénée et d'en déduire des informations sur le niveau d'oxygénation des tissus [364, 365].

Les transducteurs ultrasonores employés en imagerie PA sont la plupart du temps organisés selon une géométrie linéaire. Ces transducteurs permettent d'imager les tissus en profondeur et sur une grande zone d'intérêt avec une impulsion laser unique. Malheureusement, la plupart de ces transducteurs ultrasonores linéaires sont sensibles à l'angle d'acquisition (Cf. § US) et détectent préférentiellement les signaux de structures qui sont orientées perpendiculairement à l'axe du transducteur.

En raison de la nature sinueuse du réseau vasculaire, cette sensibilité angulaire provoque une certaine difficulté à apprécier toute l'étendue du système vasculaire et nécessite un positionnement précis afin d'obtenir le meilleur angle de vision et détecter la plus grande quantité de signal. Plusieurs approches technologiques ont été explorées pour surmonter cette limitation, y compris l'utilisation comme détecteurs de transducteurs à réseau en anneau et en utilisant une approche tomographique pour reconstruire les images.

Dans notre projet, pour palier à ces limites, nous avons postulé qu'une acquisition semi-tomographique, c'est-à-dire sous des angles multiples, pourrait

- i) réduire le bruit de fond des images,
- ii) réduire et/ou éliminer la présence d'artefacts sur l'image,
- iii) améliorer le rapport signal/bruit et ainsi augmenter la sensibilité de détection mais aussi améliorer la véracité anatomique des structures observées.

Pour cela nous avons évalué la pertinence d'un module prototype « Rotational Compound Imaging » (RCI) développé par Fujifilm Visualsonics Inc.

Le module est décrit dans la Figure 41.

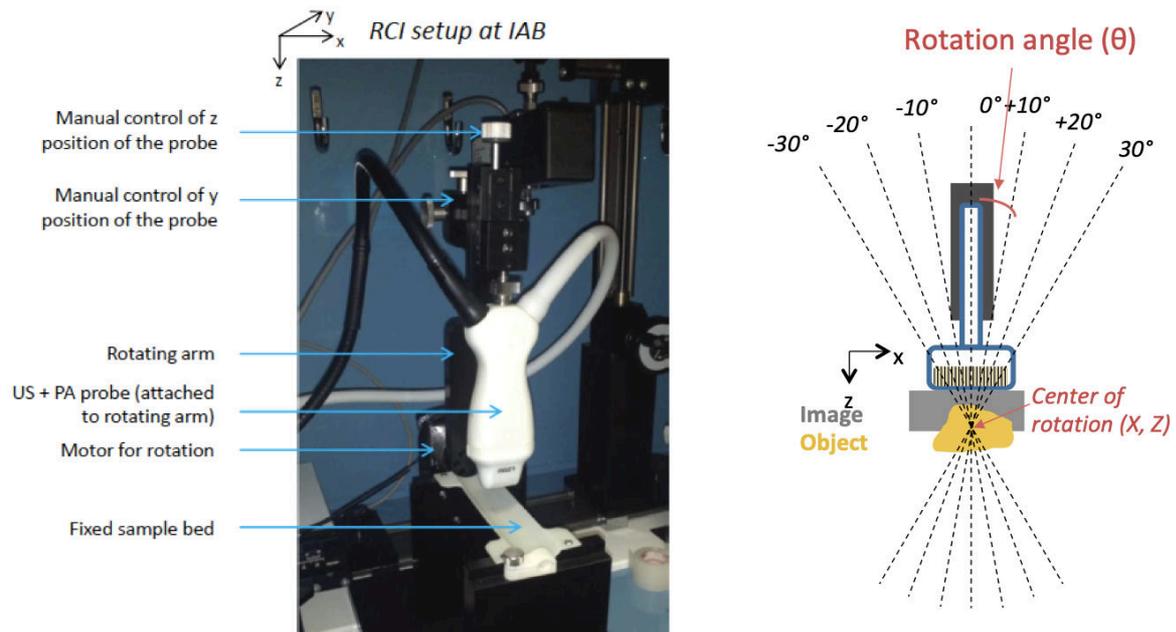


Figure 41 Description du module Rotational Compound Imaging (RCI). L'objet à observer est placé sous le transducteur (US+PA) qui est attaché à un bras motorisé. Le système, piloté par l'ordinateur, donne la possibilité de faire l'acquisition d'une image sous différents angles avec un pas de 1° minimum et sur une amplitude totale de 60°.

Les objectifs du travail avaient pour but de :

- Trouver une approche algorithmique adaptée afin de compiler et quantifier les signaux provenant des différents angles d'acquisition et des deux canaux d'acquisition de signal (US et PA).
- Tester la validité de cette approche sur un modèle de fantôme mimant les propriétés optiques d'un petit animal,
- Tester la validité de cette approche dans différents contextes biologiques *in vivo* chez la souris
- Comparer les résultats obtenus par cette approche multi-angles avec une acquisition réalisée sous un angle unique à une ou plusieurs longueurs d'onde et avec une autre modalité d'imagerie (Fluorescence en 2D).

Lorsqu'une approche semi-tomographique est considérée, l'une des problématiques fondamentales est de pouvoir compiler (moyenne, médiane, addition) les images réalisées sous tous les angles d'acquisitions. Pour cela, il est nécessaire d'identifier de manière précise les coordonnées du centre de rotation, c'est-à-dire le point autour duquel se déplace le transducteur. En effet, le transducteur lorsqu'il est placé sur un objet à imager, se trouve à

une distance précise de celui ci et cette distance « Transducteur-objet » a une influence directe sur la position du centre de rotation dans l'image.

Lorsque c'est un tissu biologique qui est considéré, les points de repères potentiellement exploitables pour compiler les images sont susceptibles de ne pas être visibles sous tous les angles d'acquisition. Dans la présente approche, la démarche utilisée pour l'identification de ces coordonnées est dite de calibration externe, c'est-à-dire qu'elle a recours à un objet présentant des repères physiques visibles à tous les angles d'acquisitions (en B-mode et/ou en PA) et dont les coordonnées seront dans un premier temps identifiées et sauvegardées puis secondairement réinjectées dans les acquisitions ultérieures réalisées dans un système biologique dans les mêmes conditions et la même configuration géométrique que celles de la calibration.

4.1 Matériel et méthodes

4.1.1 Fantôme

Les fantômes sont réalisés avec de l'agarose 1% mélangé avec de l'intralipide™ 5% (Sigma Aldrich) qui lui confère des propriétés optiques similaires à celle d'un animal.

Les fantômes sont moulés dans un demi-cylindre. (Cf. § Exploration of melanoma metastases in mice brains using endogenous contrast photoacoustic imaging).

- Calibration des paramètres de rotation : 3 inclusions (fils de sutures) visibles en B-mode sont placées à différentes positions dans le fantôme.
- Evaluation de la sensibilité des mesures : un tunnel central unique est réalisé au centre du fantôme (3 mm sous la surface du fantôme) afin d'insérer l'agent de contraste.

4.1.2 Calibration des paramètres de rotation de l'image

Un fantôme présentant 3 inclusions visibles en B-Mode est placé à une distance donnée du transducteur et une acquisition d'un angle total de 60° autour du fantôme est réalisée. Le programme automatisé développé sous ImageJ identifie les inclusions sur chaque image (à chaque angle) puis les coordonnées x, y et z du centre de rotation de l'image. Une souris est ensuite placée à la même distance du transducteur que le fantôme et une acquisition d'un angle total de 60° est réalisée autour de la souris au niveau d'un organe d'intérêt (Figure 42). Le logiciel se base sur les coordonnées du centre de rotation extraites de la précédente

acquisition pour recomposer une image US+PA unique à partir des 60 images acquises (Figure 43).

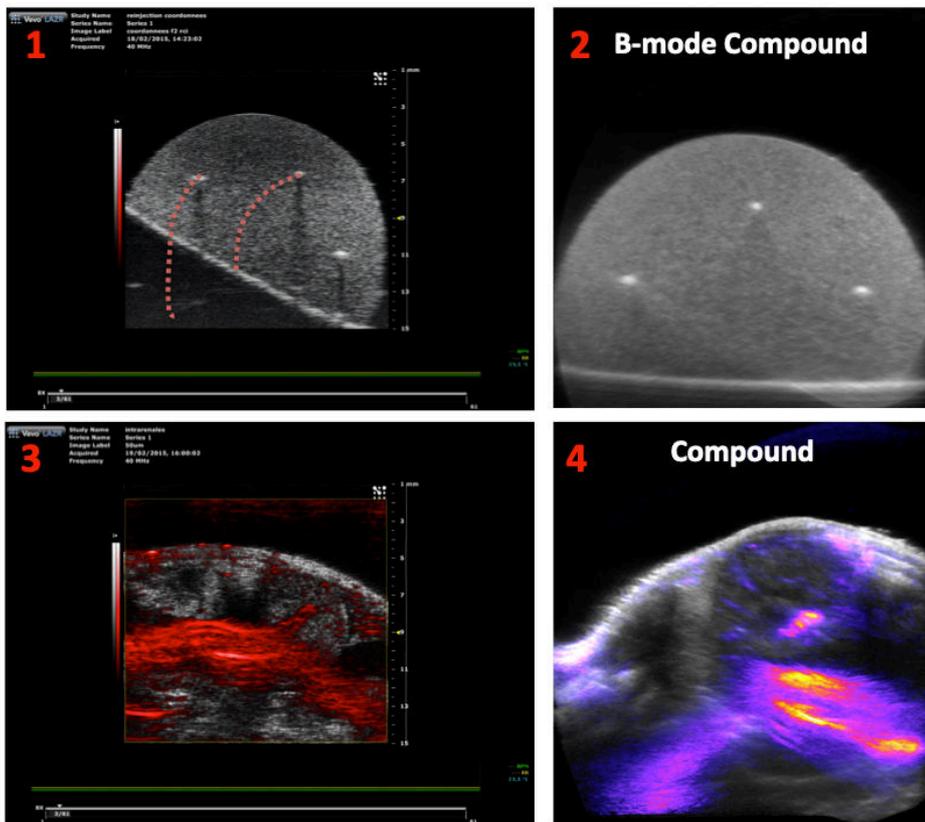


Figure 42 Description d'une séquence d'acquisition avec le module RCI.

Un fantôme présentant 3 inclusions visibles en B-Mode est placé à une distance donnée du transducteur et une acquisition d'un angle total de 60° autour du fantôme est réalisée (1). Le logiciel identifie les inclusions sur chaque image (chaque angle) et identifie les coordonnées x,y et z du centre de rotation de l'image (2). Une souris est ensuite placée à la même distance du transducteur que le fantôme et une acquisition d'un angle total de 60° est réalisée autour de la souris sur un organe d'intérêt (3). Le logiciel se base sur les coordonnées du centre de rotation extraites de la précédente acquisition pour recomposer une image US+PA unique à partir des 60 images (4).

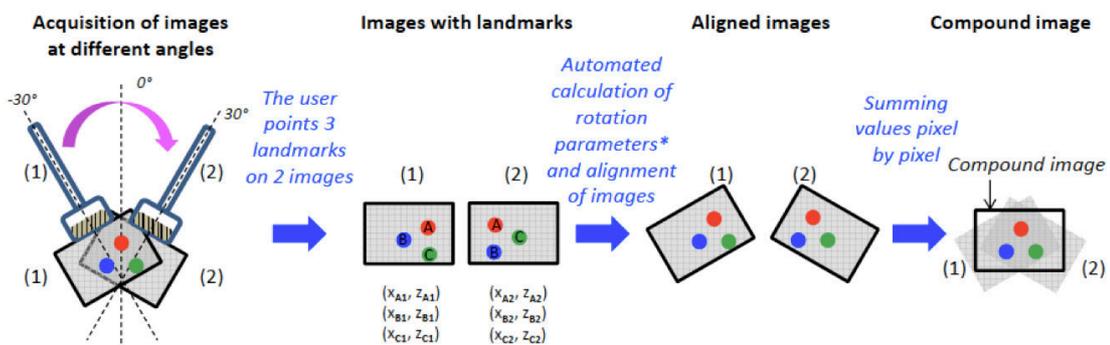


Figure 43 Description de la procédure utilisée pour l'identification du centre de rotation de l'image par la méthode des repères externes.

4.1.3 Agent de contraste photoacoustique et fluorescent

L'ICG (Infracyanine™, Serb, France) est ici utilisé pour les tests en fantômes et *in vivo*.

L'ICG est dilué dans du PBS afin d'obtenir une gamme de concentration (75 µM, 50 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2 µM, 1 µM, 0.5 µM, 0.2 µM, 0.1 µM et 0 µM) avant d'être inséré dans le fantôme ou chez les souris. Cet agent de contraste a la particularité d'être visible à la fois en PA et en fluorescence 2D. (Cf. § Fluorescence and Multispectral Photoacoustic Imaging for the monitoring of Liver Metastases development).

4.1.4 Evaluation des caractéristiques du module RCI *in vivo*

Des inclusions d'ICG à différentes concentrations sont insérées dans un rein ou dans le cerveau de souris NMRI nude (Janvier, France). Afin d'empêcher la fuite de l'ICG dans les tissus, l'agent de contraste est préalablement mélangé avec du Matrigel® (Corning), un polymère se solidifiant à 37°C.

4.1.4.1 Imagerie ultrasonore et photoacoustique

L'imagerie photoacoustique est réalisée avec le système d'imagerie Vevo®LAZR (Fujifilm Visualsonics Inc. Toronto, ON, Canada). Le module RCI est piloté par le système *via* l'interface VevoLAB®. Le transducteur LZ550 (gamme de fréquence de 32 à 55 MHz, 36µm de résolution axiale, 72 µm de résolution latérale) est utilisé. Trois types d'acquisitions sont réalisés :

- Une acquisition sous un angle unique à 800 nm
- Une acquisition RCI de 60° d'amplitude avec un pas de 1° à 800 nm
- Une acquisition sous un angle unique multispectrale de 680 nm à 970 nm avec un pas de 5 nm.

4.1.4.2 Imagerie de fluorescence 2D

Une acquisition corps entier est réalisée en imagerie de fluorescence 2D (Fluobeam800®, Fluoptics, France; laser excitation: 780 nm; Emission: 820 nm long pass filter).

4.1.5 Analyses d'images

L'identification des coordonnées du centre de rotation de l'image ainsi que la compilation des images « RCI » et la quantification des signaux en PA ont été réalisés avec le logiciel Image J.

L'identification du centre de rotation est réalisée de façon semi-automatique.

Sur la pile de 60 images réalisée sur le fantôme de calibration, c'est l'utilisateur qui désigne et numérote sur la première image de rotation, les 3 repères physiques (numérotés 1, 2 et 3) dans le fantôme puis les trois mêmes repères dans le même ordre sur la dernière image. Le logiciel scanne et identifie les repères dans les images qui se situent entre ces deux images (reconnaissance automatique de formes). Le logiciel analyse la trajectoire empruntée par chaque repère dans la pile d'image et en déduit le centre de rotation de l'acquisition par la résolution d'un problème inverse. Les images sont ensuite compilées (Figure 43). Les coordonnées du centre de rotation pour une distance « transducteur-objet » donnée sont enregistrées et ensuite réinjectées dans une nouvelle pile d'acquisitions.

4.2 Résultats

4.2.1 Evaluation des caractéristiques du module RCI sur un modèle de fantôme

Lorsque l'image unique est comparée (Figure 44-A) avec une acquisition réalisée sous différents angles (Figure 44-C), les artefacts sont en grande partie éliminés dans l'image multi-angles et le bruit de fond semble réduit. Cette observation se vérifie quantitativement puisque pour l'image unique la limite de détection est de 20 μM d'ICG avec un rapport s/b de 1.05 (Figure 44-B) lorsque cette limite est de 10 μM avec un rapport s/b de 1.10 pour l'acquisition multi-angles (Figure 44-D). Le bruit est donc réduit d'environ 20 %. La linéarité de détection est bonne dans les deux cas ($R^2 = 0.99$).

Lorsque l'on compare les résultats obtenus en PA avec ceux obtenus en imagerie de fluorescence 2D (Figure 44-E), la linéarité de détection est également excellente ($R^2 = 0.99$) mais la limite de sensibilité en fluorescence est bien supérieure à celle observée en PA ; en effet, quand on se place à la limite de détection du mode multi-angles photoacoustique (10 μM), le rapport s/b en fluorescence 2D est encore de 883 (Figure 44-F).

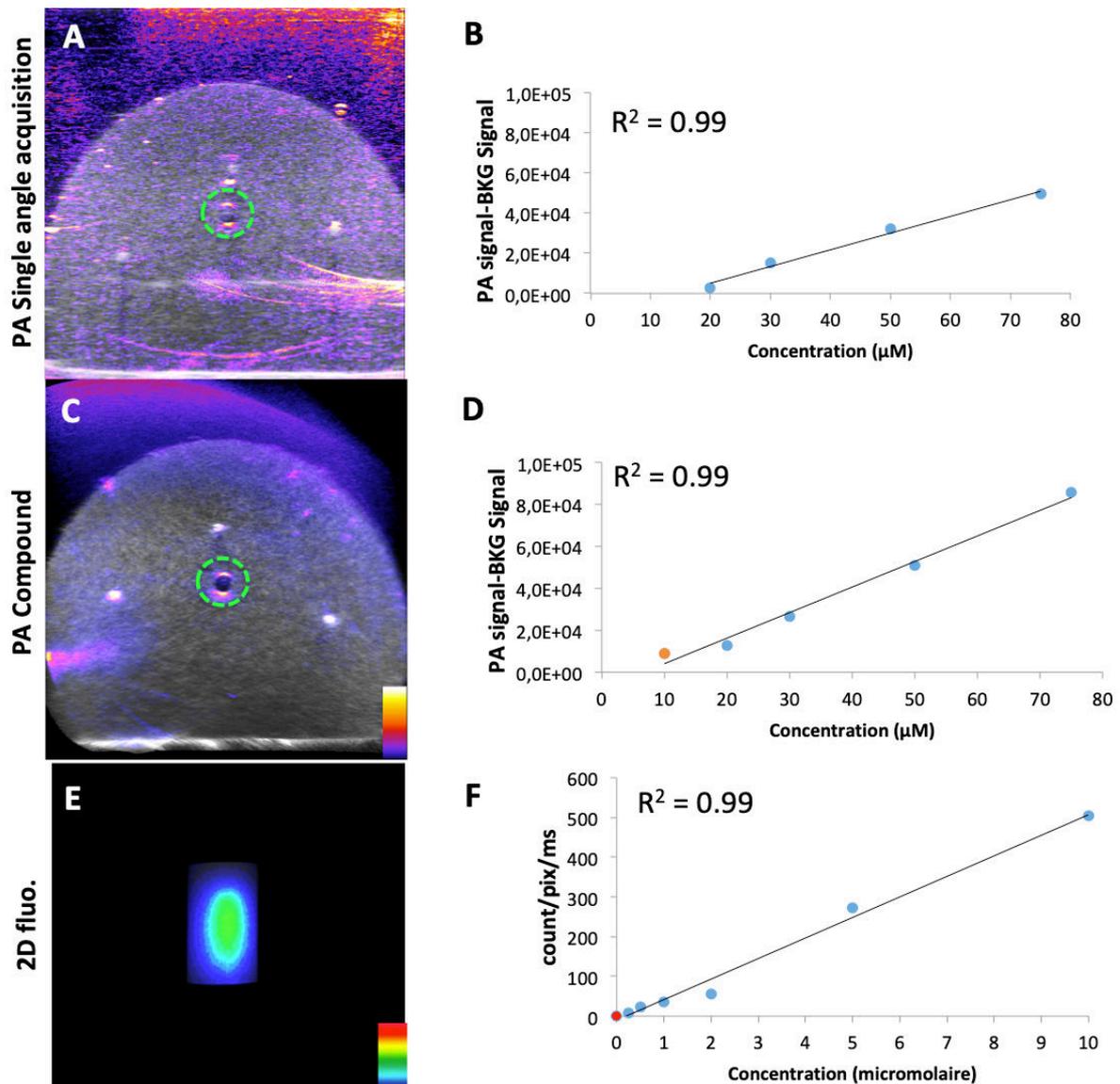


Figure 44 Images et quantification des acquisitions réalisées en PA sous angle unique (A) et (B), avec une rotation de 60° (C) et (D) et en fluorescence 2D (E) et (F) réalisées sur fantômes contenant une gamme de concentrations d'une solution d'ICG.

4.2.2 Evaluation des caractéristiques du module RCI *in vivo* dans différents organes d'intérêt.

4.2.2.1 Reins

Lorsque l'on observe les résultats obtenus avec l'implantation d'inserts d'ICG dans les reins des animaux, la qualité de l'image réalisée sous un angle unique (Figure 45-A et 45-B) est bien meilleure en B-mode et en PA que pour les images réalisées avec le module d'acquisitions multi-angles (Figure 45-D et 45-E).

Malgré cela, la linéarité de détection du signal est améliorée avec l'acquisition multi-angles ($R^2 = 0.89$ contre $R^2=0.91$ pour l'acquisition angle unique) et la sensibilité de détection est légèrement augmentée (rapport s/b de 1.13 à 10 μM sous un angle unique contre 1.28 à la même concentration en angles multiples) (Figure 45-C et 45-F).

L'approche multispectrale présente la même limite de sensibilité d'environ 10 μM (Figure 45-G).

Lorsque l'on compare les résultats obtenus en PA avec les résultats obtenus en imagerie de fluorescence 2D (Figure 46-A), la linéarité de détection est légèrement moins bonne qu'en PAI ($R^2 = 0.86$) mais la limite de sensibilité en fluorescence est elle, bien supérieure à celle observée en PA ; en effet, quand on se place à la limite de détection du mode multi-angle PA (10 μM), le rapport s/b en fluorescence 2D est encore de 331 (Figure 46-B).

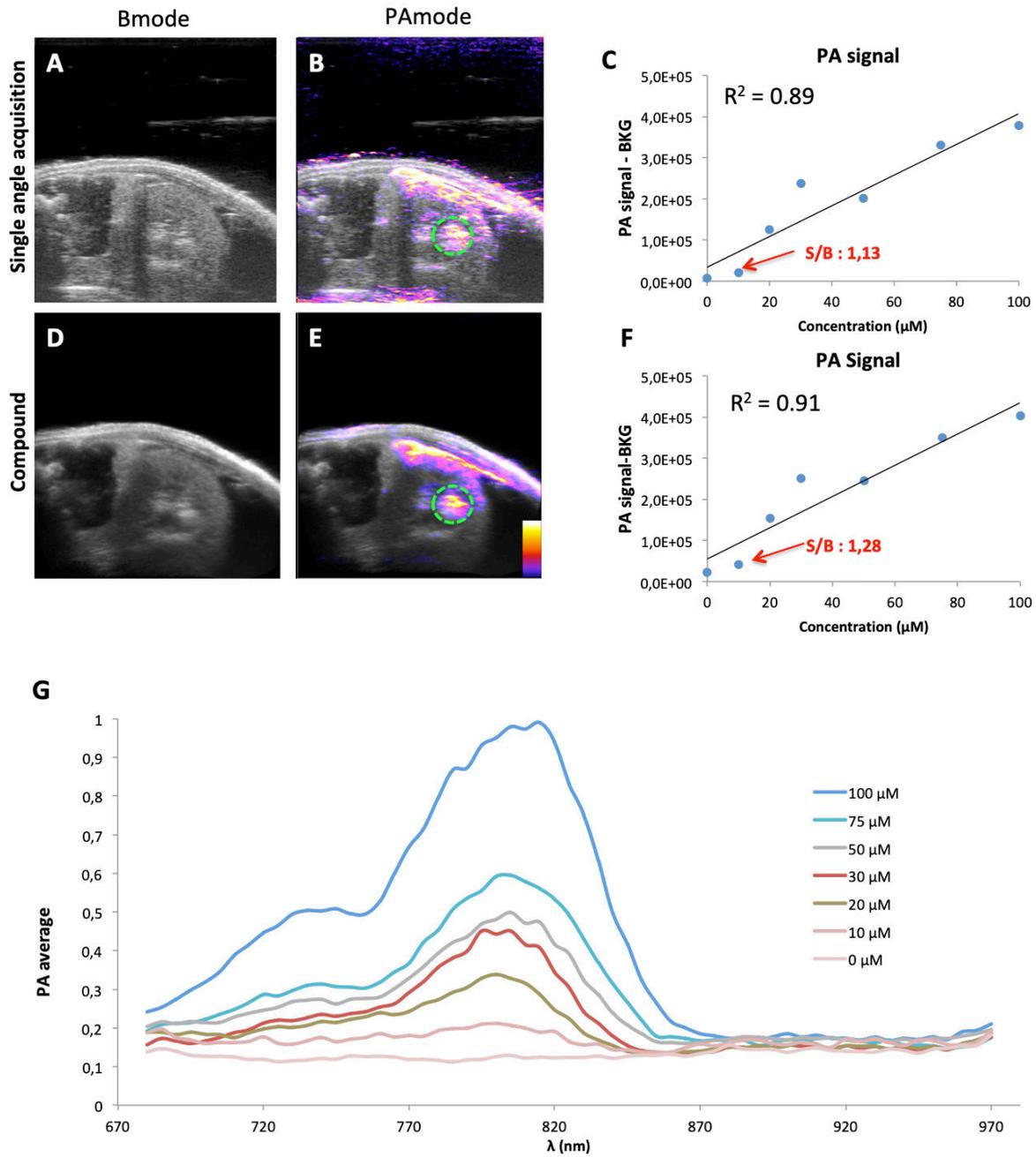


Figure 45 Images et quantification des acquisitions réalisées en US et PA sous angle unique (A), (B) et (C), avec une rotation de 60° (C), (D) et (E) et en mode spectral de 680 nm à 970 nm (F) sur les reins d'animaux dans lesquels ont été implantés des inserts solides d'une gamme de concentrations d'ICG.

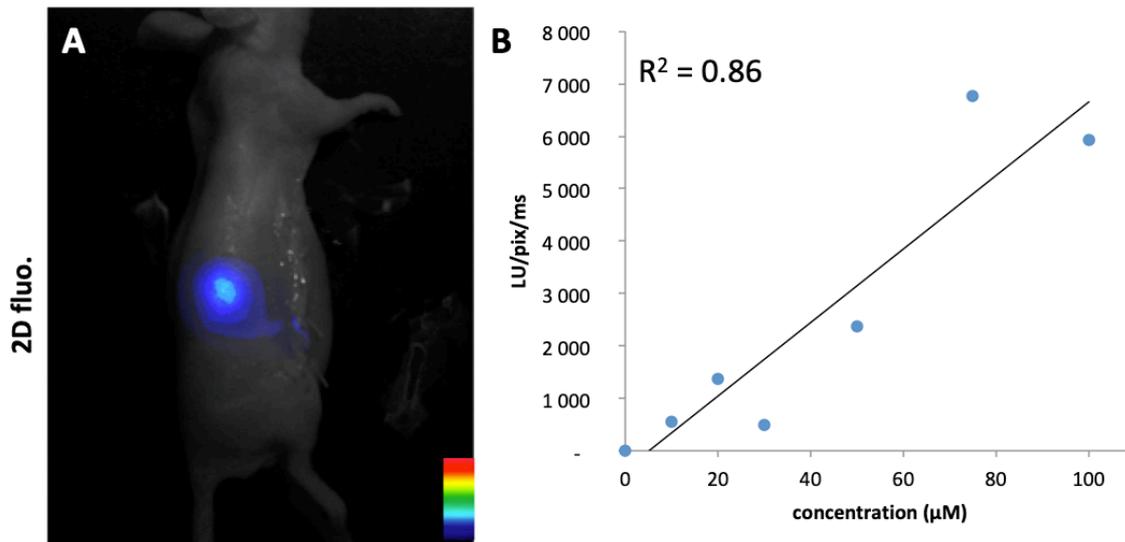


Figure 46 Image corps entier (A) et quantifications (B) des acquisitions réalisées en fluorescence 2D sur les reins d'animaux dans lesquels ont été implantés des inserts solides d'une gamme de concentrations d'ICG.

4.2.3 Cerveau

Le second organe profond pour lequel l'approche multi-angle a été évaluée est le cerveau (Figure 47). Dans ce cas, les inserts d'ICG sont plus difficilement repérables en B-mode, de plus ils sont implantés à des profondeurs différentes du cerveau ce qui représente une difficulté supplémentaire dans l'analyse des résultats.

Néanmoins, les résultats quantitatifs (Figure 47-C et 47-F) montrent une bonne linéarité de détection du signal dans les deux modes d'acquisitions ($R^2 = 0.93$ pour un angle unique et $R^2 = 0.94$ pour des acquisitions multi-angles). La sensibilité de détection du signal est légèrement augmentée avec un rapport s/b de 1.14 pour 30 µM avec l'acquisition sous un angle unique et un rapport s/b de 1.23 pour 30 µM avec les acquisitions multi-angles.

L'approche spectrale présente la même limite de sensibilité d'environ 30µM (Figure 47-G). En fluorescence 2D, du fait de l'implantation des inserts d'ICG à différentes profondeurs dans le cerveau, la linéarité de détection du signal n'est pas respectée ($R^2 = 0.42$), et il n'est pas possible de définir un seuil de sensibilité (Figure 48).

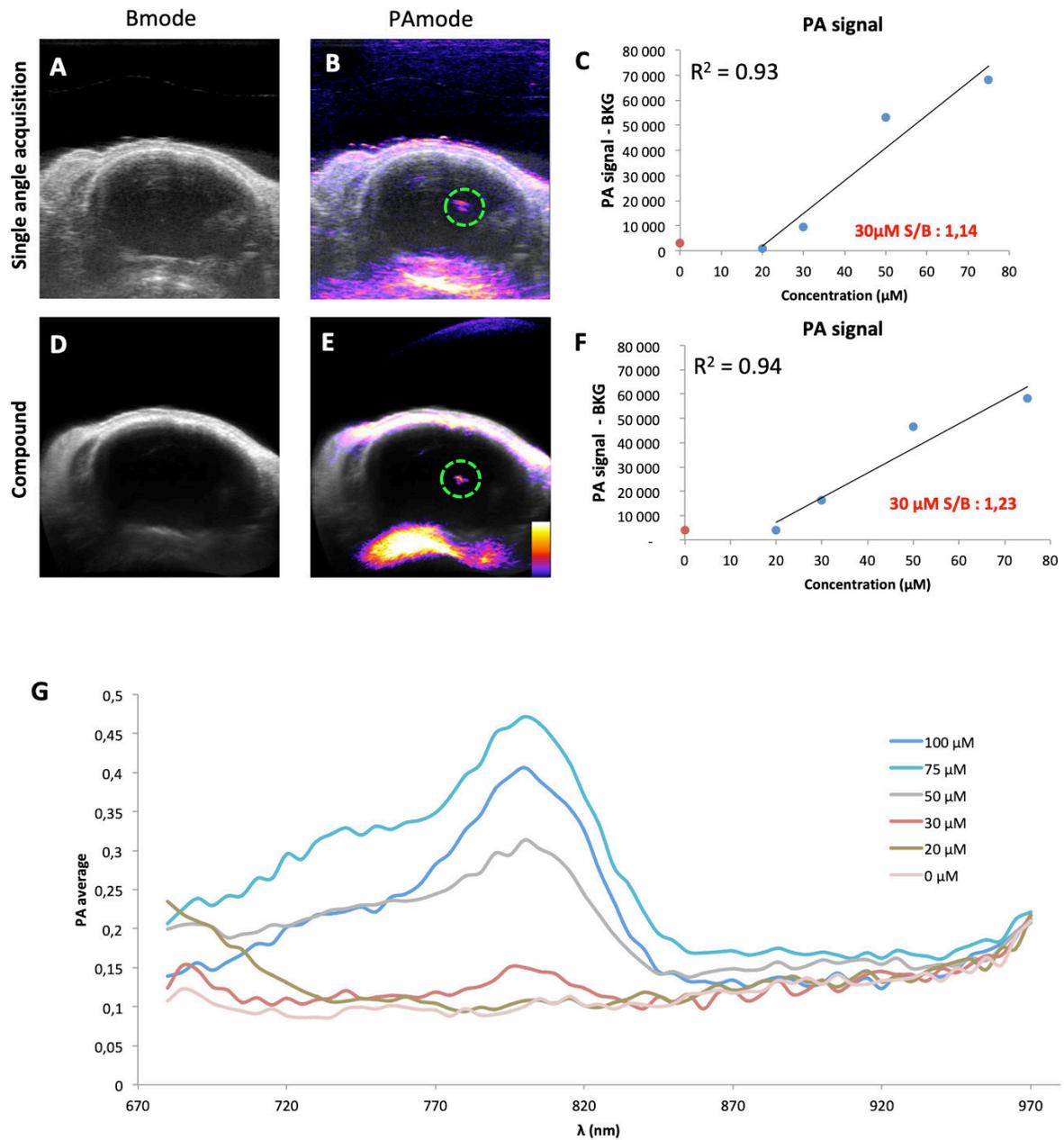


Figure 47 Images et quantification des acquisitions réalisées en US et PA sous angle unique (A), (B) et (C), avec une rotation de 60° (C), (D) et (E) et en mode spectrale de 680 nm à 970 nm (F) sur les cerveaux d'animaux dans lesquels ont été implantés des inserts solides d'une gamme de concentrations d'ICG.

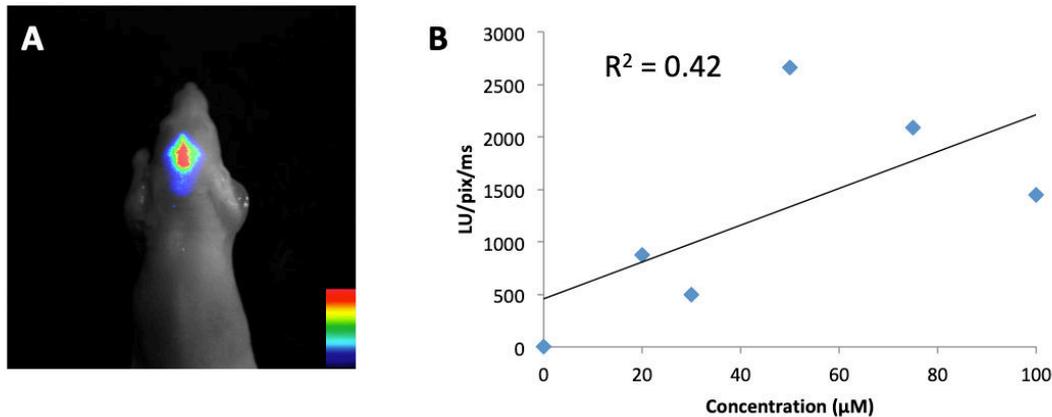


Figure 48 Image corps entier (A) et quantifications (B) des acquisitions réalisées en fluorescence 2D sur les cerveaux d'animaux dans lesquels ont été implantés des inserts solides d'une gamme d'ICG.

4.3 Discussion

Dans les fantômes, les ombres et les artefacts observables sur les images US et PA pour une acquisition angle unique sont diminués de l'image lorsque l'approche multi-angle est considérée. On observe également une réduction du bruit d'environ 20 % et une limite de sensibilité améliorée d'un facteur 2.

Dans le cas d'inserts d'agent de contraste (ICG) visibles en fluorescence et en PA, insérés dans des organes profonds (reins et cerveau) à différentes concentrations, la qualité des images obtenues en acquisition multi-angles est réduite et un « flou » apparaît sur l'image. La limite de sensibilité est légèrement augmentée dans le cas de l'approche multi-angle.

De façon générale et tant que l'on considère cet agent de contraste la sensibilité de détection de la fluorescence 2D est bien supérieure à celle de la PA. En revanche, la fluorescence 2D montre des limites majeures lorsque les sources de signal sont à différentes profondeurs comme c'est le cas de l'expérimentation menée dans le cerveau de souris (Cf. § fluorescence et interactions avec les tissus biologiques). De plus, la résolution spatiale de cette technique d'imagerie est bien inférieure à celle de la photoacoustique. L'approche semi-tomographique avec l'utilisation du module RCI couplé au système d'imagerie photoacoustique est fonctionnelle et permet l'acquisition d'une image bimodale (US et PA) à différents angles. Le programme automatisé développé sous le logiciel ImageJ permet l'identification automatisée de marqueurs externes inclus dans un fantôme et permet d'extraire les coordonnées du centre de rotation de l'image pour une distance transducteur-objet donnée. De plus, ce programme automatisé permet de compiler les images acquises sous différents angles en une image composite unique.

La quantification des signaux obtenus à partir des images compilées des fantômes dans lesquels de l'ICG à plusieurs concentrations a été inséré montre une détection linéaire du

signal et une limite de détection de 10 μM . Cette limite de détection est inférieure à celle observée pour une image acquise sous un angle unique et à une analyse spectrale de l'inclusion d'ICG. Cette limite est néanmoins supérieure à celle observable en fluorescence 2D. L'approche semi-tomographique permet de soustraire les ombres et les artefacts de l'acquisition avec une réduction du bruit de fond de environ 20 %. L'acquisition d'images *in vivo* ne permet pas d'observer d'amélioration significative de la limite de détection avec le module RCI lorsqu'elle est comparée à celle d'une acquisition sous un angle unique et à celle d'une approche multi-spectrale. Dans le cas du rein, la limite de sensibilité en fluorescence 2D reste bien supérieure à celle de la PA mais la linéarité de la détection commence à se détériorer dans cet organe. Dans le cas du cerveau, les inclusions sont placées à des profondeurs différentes ce qui a pour conséquence la perte complète de linéarité de détection du signal dans cette modalité. Cet exemple illustre ici la complémentarité des modalités d'imagerie en photoacoustique et en fluorescence. En effet la résolution spatiale de l'imagerie photoacoustique permet de collecter des signaux moléculaires en profondeur en limitant l'impact des problèmes d'interaction de la lumière avec les tissus biologiques (Cf. § Imagerie photoacoustique).

De façon générale, le module RCI et les outils d'analyses associés, dans leurs configurations actuelles, ne permettent pas un gain notable en termes de sensibilité de détection du signal d'ICG. De plus, l'utilisation de ce système requiert l'utilisation d'une grande quantité de gel échographique afin de ne pas perdre le contact entre le transducteur et le sujet d'étude lors de la rotation. La résolution des images anatomiques obtenues en B-mode *in vivo* se trouve être dégradée lorsque le module RCI est utilisé, en effet, l'image compilée est floue et ne permet pas de distinguer convenablement les limites des organes observés.

Une amélioration pourrait être apportée par une approche analytique des images par une méthode de Lucas–Kanade consistant à stabiliser l'image et ainsi diminuer l'effet de « flou » observé dans la recombinaison des images à partir d'une acquisition multi-angles.

Si les résultats obtenus dans ce travail n'ont pas prouvé le réel intérêt de cette approche pour une utilisation généralisée, elle pourrait néanmoins se révéler intéressante pour faire l'acquisition de structures anatomiques d'intérêt se situant dans le voisinage proche de structures parasitant très fortement les ultrasons tels que les os ou l'air contenu dans les poumons.

5 Evaluation de la pertinence de l'utilisation d'un module d'acquisition « corps entier » en imagerie photoacoustique : biodistribution *in vivo* du vert d'indocyanine.

Le travail présenté ici est le résultat d'un stage de 4 mois réalisé au sein de l'équipe R&D de Fujifilm Visualsonics Inc. à Toronto de Juillet à Octobre 2017.

5.1 Introduction

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes d'introduction, les modalités d'imagerie moléculaire nucléaires et optiques permettaient de visualiser, avec l'aide d'agents de contraste spécifiques, des processus biologiques (activité enzymatique, expression de protéines, etc.) impliqués dans le développement tumoral de façon non invasive et sur la totalité du corps de l'animal. En associant ces modalités moléculaires avec une modalité d'imagerie anatomique telle que l'IRM ou le CT, il est possible d'obtenir une information moléculaire dans un contexte anatomique complet.

Nous avons également pu voir que l'imagerie photoacoustique était une modalité hybride en plein essor se caractérisant par une grande résolution spatiale donnée par l'emploi des techniques ultrasonores et par une grande sensibilité due à l'utilisation de signaux optiques. En effet, par l'imagerie US, il est possible d'obtenir une image anatomique de haute résolution qui permet d'apprécier la structure des différents organes avec précision et, de façon, simultanée, par l'imagerie PA, une image fonctionnelle avec le contraste endogène et une image moléculaire avec le contraste exogène de grande sensibilité.

Le système d'imagerie PA dédié au petit animal, le Vevo®LAZR permet d'obtenir ce type d'informations en temps réel sur une coupe anatomique de plusieurs micromètres de résolution ou pour un organe complet par l'utilisation d'un moteur 3D mais ne permet pas, à l'heure actuelle, de réaliser l'image 3D d'un animal corps entier.

Le système Vevo®LAZR (figure 49-A) présente deux contraintes pour obtenir ce type d'image :

- Les fibres optiques qui apportent l'illumination laser dans les tissus sont directement moulées dans le corps du transducteur et se situent du même côté. Cette caractéristique a pour conséquence de n'apporter aucune souplesse au manipulateur pour moduler l'apport de l'illumination dans les tissus, ce qui peut s'avérer utile pour les organes difficiles d'accès, et limite la pénétration de la lumière au premier centimètre de tissu.
- Le transducteur est de géométrie « plane » c'est-à-dire qu'il est composé d'éléments piézoélectriques (256) alignés sur le même axe. Cette caractéristique a pour conséquence l'acquisition d'une seule « tranche » de l'animal à la fois. (Figure 49-B). Cette limite est palliée par l'utilisation d'un moteur 3D qui permet une acquisition sur une longueur maximale de 41 mm, ce qui s'avère être insuffisant pour réaliser l'acquisition corps entier d'un petit animal.

Afin de palier à ces limites, le nouveau système d'imagerie PA le plus récemment commercialisé par Visualsonics., le Vevo®LAZR X (figure 49-C), présente le transducteur US et les fibres optiques comme deux entités distinctes. Il est donc possible de moduler la fréquence de la sonde utilisée ainsi que la largeur et le positionnement des fibres optiques selon le type d'application envisagée (figure 49-D).

Un module « corps-entier » (WB) a été développé par l'équipe R&D Visualsonics à Toronto et ce travail a cherché à évaluer ce dispositif prototype pour l'acquisition d'images US et PA 3D corps entier et étudier la biodistribution d'agents de contraste *in vivo* afin de faire la preuve de concept que cet outil pourrait être pertinent et puissant pour l'évaluation de composés pharmaceutiques dans le cadre de la recherche préclinique.

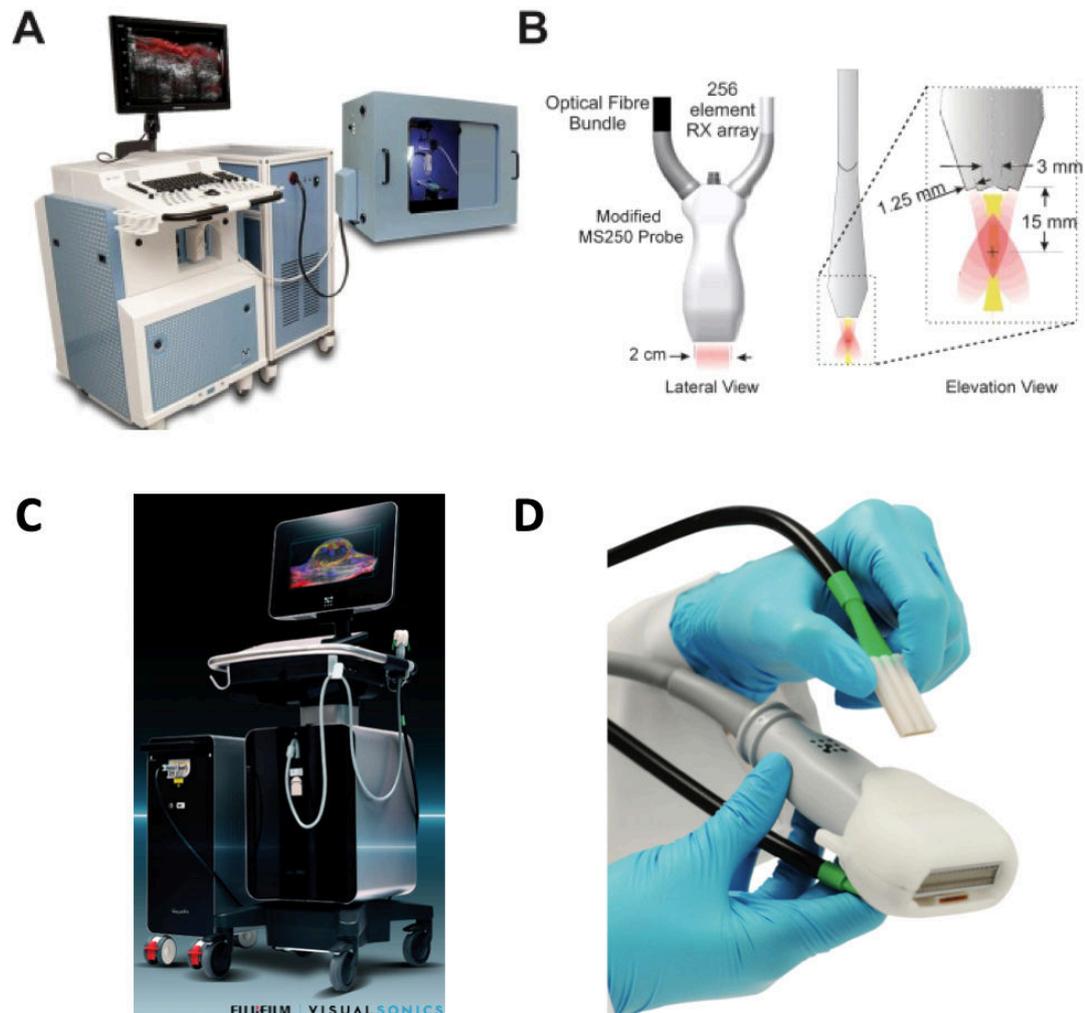


Figure 49 Les deux systèmes d'imagerie photoacoustique commercialisés par Fujifilm Visualsonics Inc. et les caractéristiques de leurs sondes respectives.

Photographie du système Vevo@LAZR (A) et caractéristique des transducteurs utilisés (B) Les deux fibres optiques sont placées de part et d'autre du transducteur et sont moulées à même la sonde. D'après [252].

Photographie du système Vevo@LAZR X (C) qui permet de placer dans différentes positions des fibres optiques de différentes tailles (D) ©Fujifilm Visualsonics Inc.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Description du module WB développé par Fujifilm Visualsonics Inc.

L'imagerie photoacoustique WB est réalisée avec le système d'imagerie Vevo®LAZR X (Fujifilm Visualsonics Inc. Toronto, ON, Canada). Le module WB est piloté *via* l'interface VevoLAB®. Le transducteur MX201 (9 à 18 MHz, 15 MHz de fréquence centrale, 75 µm de résolution axiale, 150 µm de résolution latérale) est utilisé en association avec une paire de fibres optiques linéaires de 24 mm.

Le module d'imagerie WB est décrit dans la Figure 50. Il se compose d'un bras modifié (1) capable d'accueillir le transducteur (2) sur lequel est fixé un adaptateur permettant de placer une première fibre optique (3). Une deuxième fibre optique est fixée par le bras de support (4) en dessous d'un lit en verre (3 mm d'épaisseur) sur lequel est placé l'animal (5) et qui est relié à un moteur 3D d'une amplitude totale de 65 mm (6). Dans le dispositif d'imagerie présenté ici, le contact entre l'animal et le transducteur se fait au moyen de gel échographique. Afin de réduire la quantité de gel utilisé pour réaliser une acquisition corps entier, un bloc de gel échographique (Aquaflex®, Parker, USA) est découpé afin d'être placé sur l'animal pour l'acquisition WB (figure 51-A et B).

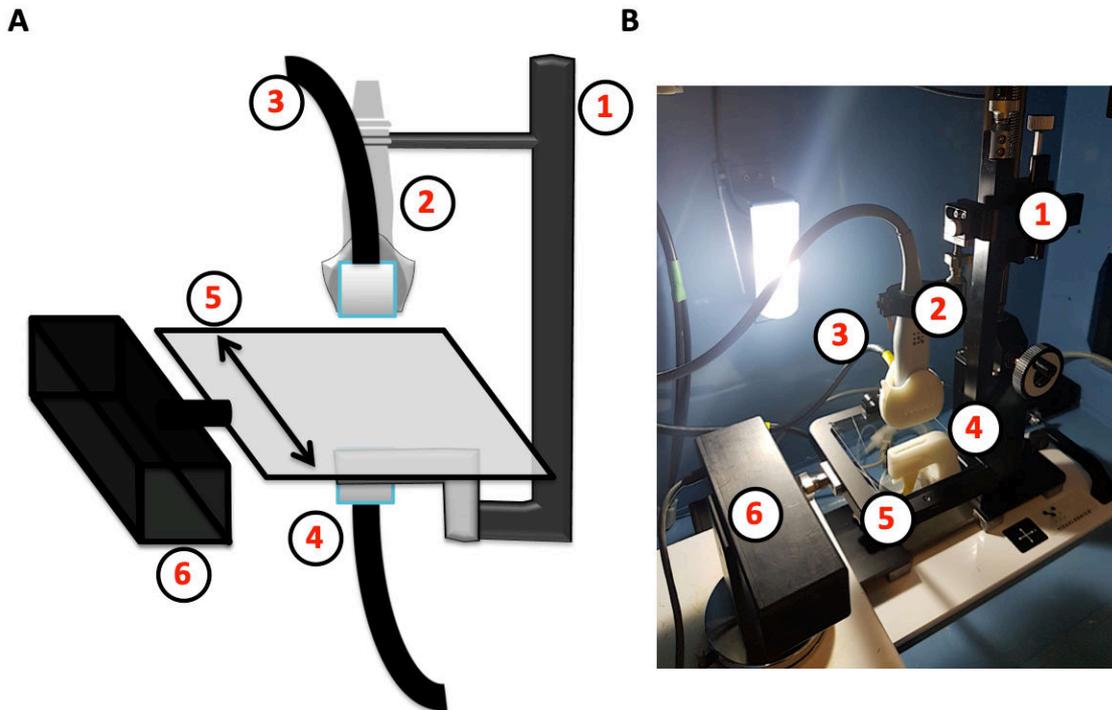


Figure 50 Description schématique du module corps entier (A) et photo du système prototype (B). Il se compose d'un bras modifié (1) capable d'accueillir le transducteur (2) sur lequel est fixé un adaptateur permettant d'accueillir une première fibre optique (3). La deuxième fibre optique est fixée par le bras de support (4) en dessous du lit en verre (3 mm d'épaisseur) sur lequel est placé l'animal (5) et qui est relié à un moteur 3D d'une amplitude totale de 65mm (6).

5.2.2 Evaluation et calibration de l'homogénéité d'illumination du module WB dans un fantôme.

Des fantômes hémicylindriques sont réalisés avec de l'agarose 1% mélangé avec de l'intralipide™ 5 % (Sigma Aldrich) afin de mimer les propriétés optiques de l'animal en terme d'absorption de la lumière ($\mu_a = 0.3 \text{ cm}^{-1}$).

5 capillaires en polyuréthane de 0,75 mm de diamètre interne (ID) contenant la solution de bleu de méthylène (solution à 1 % (poids/volume en solution aqueuse, VWR) sont ensuite placés à différentes hauteurs du fantôme (environ 3.4 mm de distance entre chaque capillaires) (Figure 51-C). La configuration classique (les deux fibres optiques en épillumination) est ensuite comparée à une configuration WB (une fibre optique en épillumination, la deuxième en trans-illumination) en réalisant une acquisition 2D, à 680 nm (pic d'absorbance du bleu de méthylène) soit sur un volume de 90 nanolitres environ pour chaque capillaire.

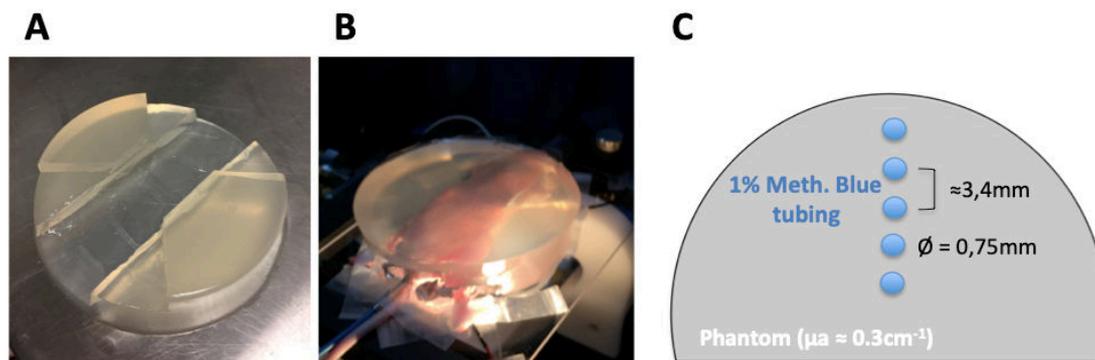


Figure 51 Photographie du bloc de gel échographique (A) qui sert à être positionné sur l'animal lors d'un balayage corps entier (D) afin d'éviter l'utilisation de grandes quantités de gel. Description schématique du fantôme utilisé pour caractériser le module et aligner l'axe des fibres optiques (C)

5.2.3 Evaluation du module WB pour réaliser la biodistribution et l'étude d'élimination du vert d'indocyanine (ICG) sur souris saines.

L'ICG (Cardiogreen, Sigma-Aldrich) est ici utilisé pour la partie *in vivo*. L'ICG est dilué dans du chlorure de sodium (NaCl) 0.9 % afin d'obtenir une concentration de 5mg/mL. 200 μ L de solution sont ensuite injectés *via* la veine caudale chez des souris Balb/c.

L'animal est placé sur le support et une acquisition en 3D est réalisée sur une longueur totale de 65 mm avec un pas de 375 μ m (motorisation 3D), de l'appendice xiphoïde de la cage thoracique jusqu'à la base de la queue, en utilisant un protocole d'acquisition multi-spectrale comprenant les longueurs d'ondes 750 nm (Hb), 805 nm (ICG) et 850 nm (HbO₂) ; L'imagerie est réalisée avant injection puis 30 min, 1h, 24h et 48h après injection.

5.2.4 Analyses d'images

L'analyse du fantôme de calibration est réalisée sur une coupe axiale en traçant une ROI de 1 mm² au niveau de chaque capillaire et le signal total à 680 nm est quantifié. Les signaux sont quantifiés pour chaque capillaire et dans chaque configuration de fibres optiques et sont ensuite comparés.

Pour réaliser l'analyse de biodistribution *in vivo* de l'ICG, les organes des deux principales voies d'élimination (e.g. urinaire (reins et vessie) et hépatobiliaire (foie, vésicule biliaire, estomac, intestins) sont segmentés manuellement en se basant sur l'image US anatomique des séquences d'acquisition. Puis une analyse en « spectral unmixing » des 3 composantes (Hb, HbO₂ et ICG) est réalisée au niveau de chaque organe et les moyennes sur toute les acquisitions sont calculées pour le contenu en hémoglobine (HbT) et la saturation en

oxygène (StO₂). Les signaux provenant de la composante « ICG » permettent de tracer le profil de distribution et d'élimination du traceur.

5.3 Résultats

5.3.1 Evaluation du module WB et de l'homogénéité d'illumination dans un fantôme mimant les propriétés optiques de l'animal.

Le fantôme de calibration est placé dans le dispositif WB et une acquisition à 680 nm est réalisée en plaçant les fibres optiques dans la configuration « classique » (les deux en épi-illumination) et en configuration WB (une en épi-illumination et la deuxième en trans-illumination).

L'image obtenue en configuration classique (Figure 52-A) montre que plus le capillaire est placé en profondeur dans le fantôme, plus le signal diminue. Au contraire dans la configuration WB (figure 52-B) le signal semble être de même intensité pour chaque capillaire. Ces observations sont confirmées par l'analyse quantitative (Figure 52-C) des signaux. Pour chaque tube, on observe une augmentation de l'intensité de signal de 1.2 fois (tube 2), 2.4 fois (Tube 3), 2.9 fois (tube 4) et 6.2 fois (Tube 5) dans la configuration WB par rapport à la configuration classique. Dans la configuration WB, la perte moyenne du signal optimal (représentée par le tube 1) est de seulement 40 % pour les tubes les plus profonds alors qu'elle est de plus de 71 % dans la configuration classique.

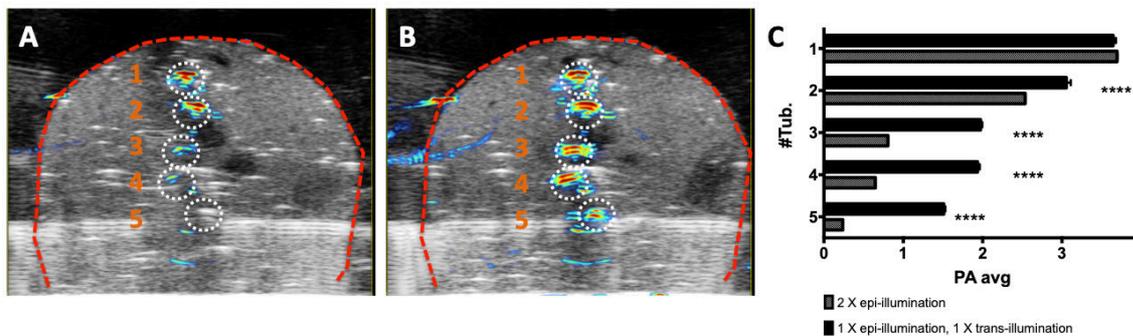


Figure 52 Acquisition US et PA (680nm) d'un fantôme contenant 5 tubes remplis avec une solution de bleu de méthylène 1 % placés à différentes profondeurs. Comparaison d'une image réalisée avec les deux fibres optiques placées en épi-illumination (A) ou avec une fibre optique placée en épi-illumination et une autre en trans-illumination (B). Les quantifications réalisées pour chaque tube sur le fantôme dans les deux modes d'illumination (lignes pointillées blanches) sont représentées dans le graphique (C).

5.3.2 Evaluation du module WB pour réaliser la biodistribution et l'étude d'élimination du vert d'indocyanine (ICG) sur souris saines.

Alors que dans la configuration classique, le signal obtenu à 800 nm se limite au premier tiers de l'abdomen de l'animal (Figure 53-B), dans la configuration WB le signal est réparti de façon plus homogène et plus en profondeur (Figure 53-A).

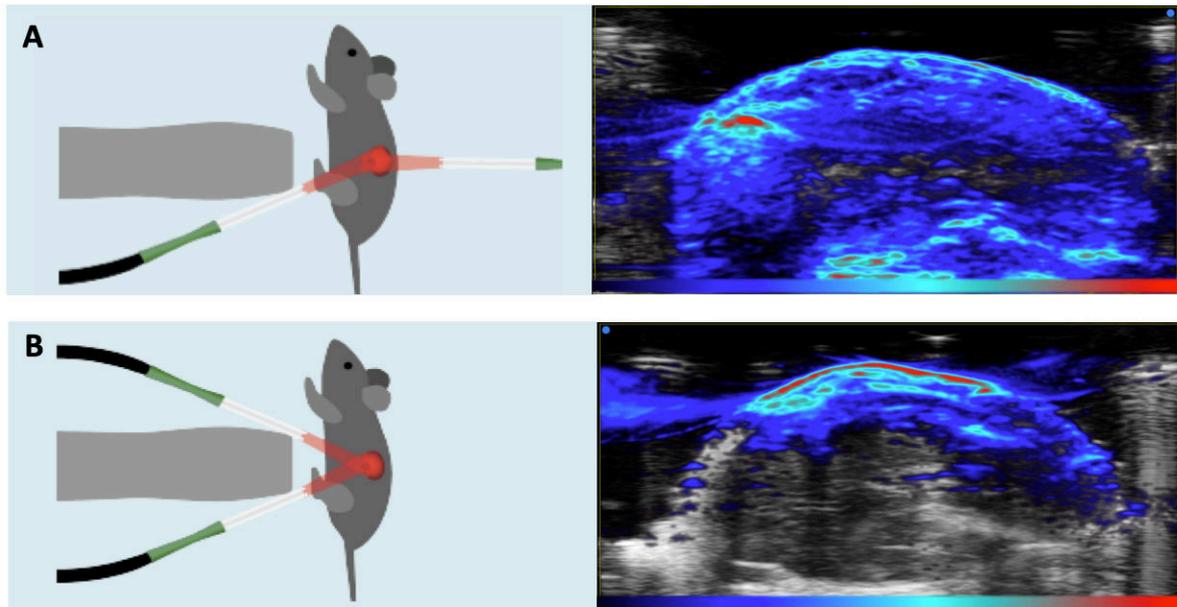


Figure 53 Schéma de description et acquisitions d'une zone abdominale du petit animal à l'aide d'un système d'illumination en imagerie photoacoustique à 800 nm avec une configuration "WB", c'est-à-dire avec une fibre optique disposée en épi-illumination et une autre en trans-illumination (A) en comparaison avec une configuration "classique", c'est-à-dire avec les deux fibres optiques disposées en épi-illumination (B).

Avant injection d'ICG (Figure 54-A (a)) l'analyse par spectral unmixing attribue les signaux prédominants aux deux types d'hémoglobine et n'attribue pas ou peu de signal à l'ICG. Trente minutes après injection d'ICG (Figure 54-A (b)), un fort signal spécifique de l'ICG est détecté dans la vésicule biliaire (Gb) et le foie (L). 60 minutes après injection (Figure 54-A (c)) le signal dans la vésicule biliaire est fort, celui du foie est considérablement diminué et un signal provenant de l'intestin (Int.) apparaît. 24 heures (Figure 54-A (c)). 48 heures (Figure 63-A (d)) après injection, les signaux de la vésicule biliaire et du foie ont disparus alors que ceux provenant des intestins restent prononcés.

La quantification dans chaque organe du signal provenant de l'ICG illustre les pharmacocinétiques de l'ICG (Figure 54-C) et montre l'accumulation d'ICG dans la vésicule biliaire et le foie entre le moment de l'injection et 60 minutes après. L'élimination du traceur *via* le tractus gastro-intestinal est observée 24 heures et 48 heures après injection.

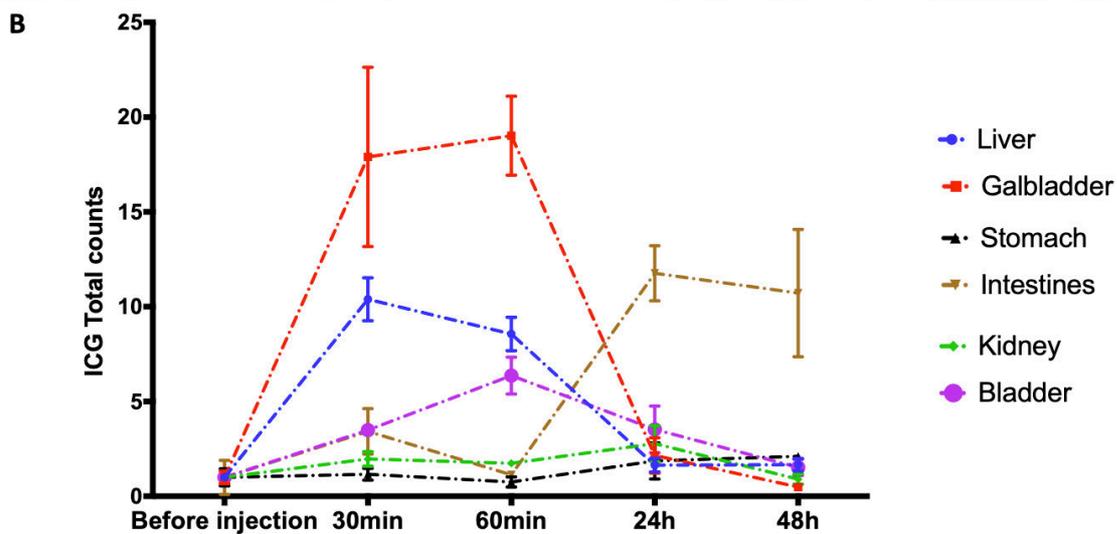
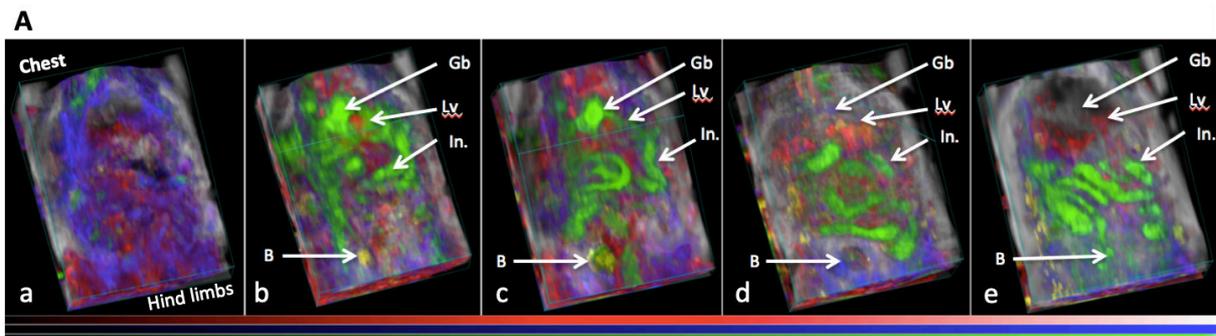


Figure 54 Représentations 3-D des acquisitions US et PA multi-spectrales (A) montrant le signal d'ICG (vert), d'hémoglobine oxygénée (rouge) et non-oxygénée (bleu) sur les différents organes d'intérêt avant (a), 30 minutes (b), 1 heure (c), 24 heures (d) et 48 heures (e) après injection d'ICG. Les différents organes sont segmentés en utilisant le mode B (US) et les quantifications relatives au signal de l'ICG en photoacoustique sont extraites pour chaque organe d'intérêt afin de tracer la cinétique de captation et d'élimination de l'ICG (B).

Gb: Vésicule biliaire

Lv: Foie

In.: Intestins

B: Vessie.

5.4 Discussion

Le système d'imagerie Vevo®LAZR X est un outil performant qui permet l'acquisition d'images multimodales (US et PA) avec une grande résolution, une grande sensibilité et une grande flexibilité de configuration. De plus, ce système PA se compose d'un laser qui couvre la deuxième fenêtre infrarouge (NIR-II) de 1200 à 2000 nm. Cette fenêtre d'acquisition n'a pas été étudiée ici.

La distribution de la lumière selon une configuration « WB », c'est-à-dire avec une fibre optique en épi-illumination et une en trans-illumination, a montré que la lumière

d'excitation était distribuée de manière plus homogène et plus en profondeur d'abord dans des fantômes puis *in vivo* chez la souris. La quantification des signaux sur fantôme a montré une augmentation du signal à 680 nm jusqu'à 6.2 fois pour le tube le plus profond dans la configuration WB par rapport à la configuration classique. Dans la configuration WB, la perte moyenne du signal optimal est de seulement 40 % pour les tubes les plus profonds alors qu'elle est de plus de 71 % dans la configuration classique. Le module WB permet de réaliser une imagerie 3D d'une souris sur une zone allant de l'appendice xiphoïde jusqu'à la base de la queue. L'acquisition simultanée d'images anatomiques, fonctionnelles et moléculaires a été rendue possible au sein du même animal grâce au module WB. Les signaux spécifiques de plusieurs composés d'intérêt, endogènes et exogènes, dans différents organes ont pu être quantifiés par l'utilisation de plusieurs longueurs d'ondes et en segmentant chaque organe en se basant sur la référence anatomique donnée par le B-mode. Il a donc été possible d'observer la biodistribution et de déterminer le profil pharmacocinétique d'un composé injecté à l'animal.

Dans cette étude, seules trois longueurs d'ondes ont été utilisées (750 nm, 805 nm et 850 nm) et des longueurs d'ondes supplémentaires seraient nécessaires afin de réaliser un « spectral unmixing » plus précis. Cependant, l'ajout de longueurs d'ondes allongerait le temps nécessaire à la réalisation d'un balayage corps entier (2 à 3 minutes supplémentaires par longueur d'onde ajoutée). Cette dégradation de la vitesse d'acquisition serait en effet délétère puisque l'objectif visé est de réaliser le profil de distribution d'un composé de façon ponctuelle.

Le module semble être un outil prometteur dans le domaine de la recherche pharmacologique pour étudier directement *in vivo* de façon non invasive et en temps réel le comportement d'une molécule candidate thérapeutique et /ou diagnostique chez la souris. Néanmoins, cette étude a été réalisée sur un très petit nombre d'animaux (n= 3) dans des conditions de laboratoire peu optimales pour l'expérimentation animale. En effet, elle a été réalisée à Toronto au sein de l'entreprise Fujifilm Visualsonics Inc. et les différentes réglementations gouvernementales canadiennes en matière d'utilisation d'animaux dans les laboratoire de R&D technologique ne permet pas un accès facile à l'expérimentation animale et encore plus complexe pour des modèles animaux xénogreffés.

Si les profils pharmacocinétiques obtenus pour l'ICG sont conformes à ce qui est décrit dans la littérature pour ce composé, il serait intéressant de répéter cette expérimentation en association avec un suivi par imagerie de fluorescence.

Au niveau du logiciel d'analyses d'images de nombreuses améliorations sont à envisager pour faciliter l'obtention d'informations biologiques pertinentes. En effet, dans la configuration actuelle, les fibres optiques sont alignées manuellement et la quantification des signaux se fait en post-traitement (l'image est acquise, les ROIs sont tracées et le signal est quantifié). L'opérateur doit donc faire une acquisition, exporter les images, réaliser la quantification des signaux, déplacer le bras de maintien des fibres optiques et recommencer l'opération jusqu'à obtenir un signal optimal. Cette étape est fastidieuse et ne permet pas d'obtenir de façon certaine le signal PA le plus intense possible. Cette étape de calibration

des fibres optiques doit être réalisée de manière plus rigoureuse et pourrait être évitée par le positionnement définitif des fibres optiques dans un angle d'alignement optimal.

Le lit en verre qui accueille les animaux n'est pas chauffé ce qui limite le temps d'imagerie possible pour un animal anesthésié dont la température va chuter rapidement ce qui risque d'influencer ses paramètres physiologiques.

Le lit pourrait être équipé de capteurs permettant l'enregistrement des paramètres physiologiques (e.g. électrocardiogramme (ECG) et fréquence respiratoire (FR)), ce qui serait un atout en terme d'information biologique concernant l'animal et qui pourrait permettre ultérieurement de synchroniser les acquisitions avec le rythme respiratoire ou le rythme cardiaque selon le besoin.

Pour l'analyse des images, les organes doivent être segmentés manuellement en 3D, cette étape, fastidieuse pourrait être facilitée par des approches algorithmiques de segmentation automatisée se basant sur la reconnaissance de texture.

Pour conclure, le module WB permet de distribuer la lumière d'illumination laser plus en profondeur et de façon homogène dans les tissus et permet de réaliser la biodistribution et le profil d'élimination d'un agent de contraste, l'ICG, de manière non invasive.

Pour l'avenir, une modification du lit est prévue afin d'intégrer un système de chauffage et des électrodes d'enregistrements des paramètres vitaux adaptés au petit animal. Le nouveau lit sera également conçu pour pouvoir être adapté à d'autres instruments d'imagerie moléculaire (fluorescence 3D) et anatomique (CT, IRM) pour valider et compléter les informations obtenues en imagerie PA.

Ce nouveau module fera l'objet d'une nouvelle évaluation plus complète pour une utilisation en pharmacologie expérimentale sur le petit animal.

iii. Fluorescence and Multispectral Photoacoustic Imaging for the monitoring of Liver Metastases development {Article en préparation}

Cette étude combine l'utilisation de l'imagerie de fluorescence en 3D (fDOT) et de l'imagerie photoacoustique en exploitant le potentiel double de fluorescence et de photoacoustique de 2 agents de contraste, l'ICG et l'Angiostamp™800 ayant auparavant démontrés leur capacité à marquer des tumeurs, le premier par accumulation passive et le second par ciblage spécifique d'un biomarqueur du cancer. Les résultats ont mis en évidence les avantages respectifs et la complémentarité de ces 2 modalités d'imagerie pour le suivi non invasif du développement de métastases hépatiques de cancer colorectal.

Title: Fluorescence and Multispectral Photoacoustic Imaging for the monitoring of Liver Metastases development

Authors: J. Lavaud^{1, 2}, M. Henry^{1, 2}, P. Gayet³, J. Vollaire^{1, 2}, J-L. Coll^{1, 2} and V. Josserand^{1, 2 ‡}

Authors' affiliation:

¹ OPTIMAL, Small animal Imaging Platform, F-38000 Grenoble, France

² INSERM U1209, CNRS UMR5309, Univ. Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, F-38000 Grenoble, France

³ Fluoptics, Grenoble, France

‡ Corresponding Authors:

Dr. Veronique Josserand, Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209 CNRS UMR5309, Univ. Grenoble Alpes, site santé, allée des Alpes, 38706 Grenoble, France. Phone: +33 (0)4.76.54.94.10, Fax : +33 (0)4.76.54.94.13, E-mail : veronique.josserand@univ-grenoble-alpes.fr

1 Introduction

***In vivo* molecular imaging in preclinical animal models** is a **tool of choice** for fundamental research and understanding of pathophysiological mechanisms involved in cancer development and metastasis. Molecular imaging has also become a key player in **drug development research**, especially for evaluating new anticancer therapeutic strategies *in vivo* aimed at improving cancer therapy and circumventing resistance mechanisms to conventional radio- or chemo-therapies.

This requires to **set up relevant animal models** faithfully reproducing the biological pattern of the human pathology and to precisely characterize their specific tumor development to be able to apprehend the impact of new therapeutic attempts.

At the beginning of the 2000's ***in vivo* fluorescence** imaging stood out in preclinical imaging field thanks to significant technological advances in detection techniques, better understanding of the interactions of light with biological tissues and the development of biocompatible near infrared fluorophores that could be conjugated to targeting molecules and [177]. Further technological advancements using laser light sources and highly sensitive camera combined with mathematical modeling of light propagation in tissues have made possible the application of **tomographic principles** for the 3D reconstruction of fluorescence distribution within a mouse body and the measurement of fluorophores concentrations *in vivo* in volumes of interest [180, 202-204].

These last two decades have also seen the development of **numerous tracers** aimed at generating tumor contrast, based on either non-specific accumulation due to enhanced permeability and retention (EPR) effect [366] or recognition of cancer specific biomarkers [24] that are overexpressed on cancer cells or involved in cancer progression such as angiogenesis, hypoxia or apoptosis.

Indocyanin green (ICG) is an FDA approved contrast agent known for a very long time as a tracer of hepatic function but ICG recently encountered a new scope of application for intraoperative fluorescence-guided surgery of cancer [367]. This non-targeting contrast agent is indeed passively accumulating in tumors by EPR effect and it has been shown to facilitate tumor detection in several cancer types[216-227].

Angiostamp™ is a tumor targeting contrast agent that has already been well described for tumor labelling *via* specific targeting of $\alpha v\beta 3$ integrin, which is overexpressed on endothelial cells during angiogenesis and on some cancer cells [230]. Angiostamp™ has been shown to provide a high signal in tumor tissue with low nonspecific background, generating a very good tumor contrast in various animal models including peritoneal carcinomatosis [233, 235, 236, 368] head and neck squamous cell carcinoma [237] and bone metastasis [238] in mice, osteosarcoma in rats [234] and fibrosarcoma in domestic cats [239]. This tumor-targeting agent thus holds significant promise for future clinical translation.

Photoacoustic imaging (PAI) is an emerging technology combining the most compelling features of optical imaging and ultrasound, providing both high optical contrast and high ultrasound resolution at depth in living organisms [248]. PAI offers great potential for non-

invasive exploration of biological tissues, leveraging differences in the optical absorption of underlying tissue components such as hemoglobin, lipids, melanin, collagen and water. In particular, oxy- and deoxy-hemoglobin are endogenous absorbers that exhibit specific photoacoustic signals whose detection reports blood vasculature cartography and tissue oxygen saturation (StO₂) [259]. PAI can also identify exogenous molecules and thus is inherently capable of molecular imaging [262]. By using several wavelengths of laser light, relative concentrations of these specific compounds can be determined thus providing non-invasive mapping of contrast agents' *in vivo* distribution [258]. Combined in real time with high resolution ultrasound anatomical imaging, this new non-ionizing imaging modality offers significant opportunities for combined anatomical, functional and molecular imaging through several tissue layers at submillimeter resolution [369].

Although numerous inorganic **contrast agents** have been identified, there are still very few biocompatible photoacoustic contrast agents for *in vivo* imaging.

In the present study, we used an **animal model of liver metastasis** from human colon cancer [370] and we evaluated both the non-specific contrast agent **ICG** and the $\alpha\beta 3$ targeting contrast agent **Angiostamp™800** for the non-invasive monitoring of tumor progression by fluorescence and multispectral photoacoustic imaging.

2 Material & Methods

2.1 Mouse model of liver metastases from colorectal cancer

All animal experiments procedures were approved by the animal ethics committee and received the authorization of the French Ministry of Higher Education and Research (ref: APAFIS#4937-2016041209236318 v7).

HT29rvluc2 cell line (human colorectal adenocarcinoma) stably expressing firefly luciferase were cultured in McCoy medium supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum in humidified atmosphere with 5% CO₂.

Twenty-four Female 6 weeks old NMRI nude mice (Janvier, Le Genest-Isle, France) were anesthetized (isoflurane/air 4% for induction and 1.5% thereafter) before an incision was made on the left flank and the spleen was pushed out of the abdomen. Then HT29rvluc2 cells (3x10⁶ cells in 20 μ L 50/50 1X-PBS and Matrigel® (Corning®, USA)) were implanted into the spleen. After few seconds, when Matrigel® became solid, the spleen was replaced in the peritoneal cavity and the peritoneum and skin were sutured. Two weeks later, the primary tumor bearing spleen was surgically removed following the same surgical approach.

2.2 *In vivo* bioluminescence imaging

Primary tumor growth and metastases development were weekly monitored by *in vivo* bioluminescence imaging (BLI) for 6 weeks after tumor cells implantation. Five minutes before imaging, vigil mice received an intraperitoneal injection of 150 μ g/g of D-luciferin (Promega, France) and were then anesthetized (isoflurane 4% for induction and 1.5%

thereafter) and placed in the IVIS Kinetic imaging system (PerkinElmer), first on the left side and then in supine position. Semi-quantitative data were obtained from bioluminescence images by drawing regions of interest on the liver area. Based on the bioluminescence signal from the liver, mice were distributed into two groups: Early stage (n=12): BLI signal $< 7,7 \times 10^6$ photons/second (ph/s) and advanced stage (n=12): BLI signal $> 2,4 \times 10^7$ ph/s.

2.3 Contrast agent preparation

ICG (Intracyanine, SERB, France) and Angiostamp™800 (Fluoptics, France) were diluted in PBS to reach 200 and 50 μM respectively. Contrast agents were injected intravenously *via* the tail vein (200 μL). For microCT contrast enhancement in the liver, Exitron®Nano6000 (Myltenyi Biotec, Germany) was injected intravenously (100 μL ; 640 mg iodine/kg) the day before imaging.

2.4 Contrast agent fluorescence and photoacoustic detectability

Dilution ranges of each contrast agent were prepared in PBS. Then 10 μL drops of each contrast agent concentration (n = 3) as well as 10 μL drops of PBS were placed on a piece of parafilm and fluorescence imaging was performed using the Fluobeam®800 (Fluoptics, France) (laser excitation: 780 nm; Emission: 820 nm long pass filter). Fluorescence signal was quantified using wasabi® software (Hamamatsu photonics) and expressed as Relative Light Units per pixel/millisecond (RLU/pix/ms).

Multispectral PAI was performed with the Vevo®LAZR (Fujifilm, Visualsonics INC. Canada) to characterize ICG and Angiostamp™800 photoacoustic spectra. Samples of various contrast agents' concentrations (n = 3) were placed into a 1 mm³ silicon cassette and were submitted to spectroscopic PAI from 680 to 970 nm with 1 nm step. Quantifications were made using the manufacturer's software (Vevo®Lab. 3.1.1) and expressed as PA values in arbitrary units (A.U.).

For both imaging methods, the signal to noise ratio (SNR) was calculated for each concentration (contrast agent versus PBS) and the sensibility threshold (SThr) was defined by the concentration for which the SNR was 1.3 for fluorescence and 1.2 for photoacoustic.

2.5 ICG blood pharmacokinetics

ICG blood pharmacokinetic was acquired by real-time non-invasive PAI using the Vevo®LAZR (Fujifilm, Visualsonics INC. Canada). Anesthetized mice (isoflurane/air: 2%) were placed on a heated plate and the LZ250 transducer (256 elements linear array; 21MHz center frequency, {13-24 MHz bandwidth}, 75 μm axial resolution; 150 μm lateral resolution; 25x25 mm² image size) was positioned on the longitudinal axis of the carotid artery. The probe positioning was validated using the Color Doppler mode. A catheter was placed into the tail vein and the PA acquisition (800 nm) was started. After 2 minutes of background acquisition, ICG was intravenously injected (200 μL ; 200 μM) and its elimination from the blood was monitored

for 30 minutes after injection. This was performed on 3 healthy and 12 liver metastases bearing mice.

Nine other mice (3 healthy and 6 liver metastases bearing mice) were injected intravenously (ICG: 200 μ L; 200 μ M) and blood samples were collected at various time points (1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 minutes and 1 hour) by making a small incision at the end of the tail.

Plasma was isolated by centrifugation (7200g for 8 minutes) and was then imaged by 2D fluorescence using the Fluobeam[®]800 (Fluoptics, France). For both monitoring methods, ICG blood half-life was calculated (non-linear regression) using Graphpad Prism version 6 (Graphpad, USA).

2.6 Non-invasive photoacoustic imaging of the liver

Three dimensional ultrasound and PAI were performed on the liver area using the Vevo[®]LAZR (Fujifilm, Visualsonics INC. Canada). By using the “oxy-hemo” mode (750 and 850 nm), total hemoglobin content (HbT) and tissue oxygen saturation rate (StO₂%) were calculated (Vevo[®]Lab software according to Wang et al. [259]). Then, 1, 24 and 48 hours after ICG injection and 24 hours after Angiostamp[™]800, whole-body 2D fluorescence imaging (Fluobeam[®]800, Fluoptics, France) was performed before 3D PAI (at 800 nm) was carried out on the whole liver and 2D multispectral PAI (from 680 to 970 nm, 5 nm step) was implemented on a metastases bearing slice. Spectral unmixing analyses were performed by Vevo[®]Lab software according to [258].

2.7 Combined 3D fluorescence and microCT imaging

One hour after ICG injection and 24 hours after Angiostamp[™]800 injection, anesthetized mice (isoflurane/air: 2%) were placed in a homemade mobile animal holder for bimodal microCT/3D fluorescence imaging. Three dimensional fluorescence imaging was performed on the liver using the previously described fDOT system [203]. MicroCT imaging was performed in line using the vivaCT40 (ScancoMedical, Switzerland) whose acquisitions parameters were 55 keV energy, 177 μ A intensity, 300 ms integration time and 80 μ m voxel isotropic resolution. MicroCT and 3D fluorescence reconstructed volumes were merged using ImageJ software. Total fluorescence signal in the volume of interest (liver) was quantified and expressed as relative light units (RLU).

2.8 Ex vivo fluorescence imaging and histology

One hour after ICG injection and 24 hours after Angiostamp[™]800 injection, mice were euthanized through a cervical dislocation and livers were isolated. *Ex vivo* 2D fluorescence imaging was performed using the Fluobeam[™]800 (Fluoptics, France) before livers were frozen in OCT Tissue-Tek[™] (Sakura[®], Torrance, U.S.A.) and cut in 7 μ m thick slices using a cryostat. Slices were then stained with hematoxylin and eosin and entirely scanned (mosaic) by Axio Scan Z1 (Zeiss, Germany) under 5x magnification.

2.9 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad software, San Diego, California USA). Either one-way ANOVA or two-ways ANOVA tests were used (*p-value<0,05; **p-value<0 ;01; ***p-value<0,001). In order to facilitate statistical analyses of liver kinetics, Pair-Wise Matrix (PSM) were used [200] where each box represents the comparison of two groups. Significant differences between pairs of groups are shown in green and non-significant differences in red.

3 Results

3.1 Mouse model of liver metastases from colon cancer

In vivo bioluminescence imaging (BLI) was used to check the quality of tumor cells implantation (Figure 55-A, D0) as well as primary tumor growth until the day of spleen surgical resection (Figure 55-A, D14). Then, BLI was used to monitor abdominal metastases development at various stages (Figure 55-B) and this allowed rational mice distribution into 2 groups corresponding to early and advanced stages (Figure 55-C).

Liver metastases were also detectable by *in vivo* microCT imaging using earth metal-based nanoparticles for liver contrast enhancement (figure 56-A). Contrast-based segmentation illustrated that liver function was altered at the advanced stage (figure 56-B) and whole liver volume was shown to be increased by 50% compared to healthy group (figure 56-C).

Contrast agent-free 3D photoacoustic imaging was used to measure total hemoglobin content (HbT) and tissue oxygen saturation (StO₂) in the liver (Figure 57). HbT was shown to be precociously increased in metastases bearing livers (Figure 57-A) indicating tumor angiogenesis occurrence while StO₂ was shown to decrease gradually with metastases development (Figure 57-B) illustrating tumor related induction of hypoxia.

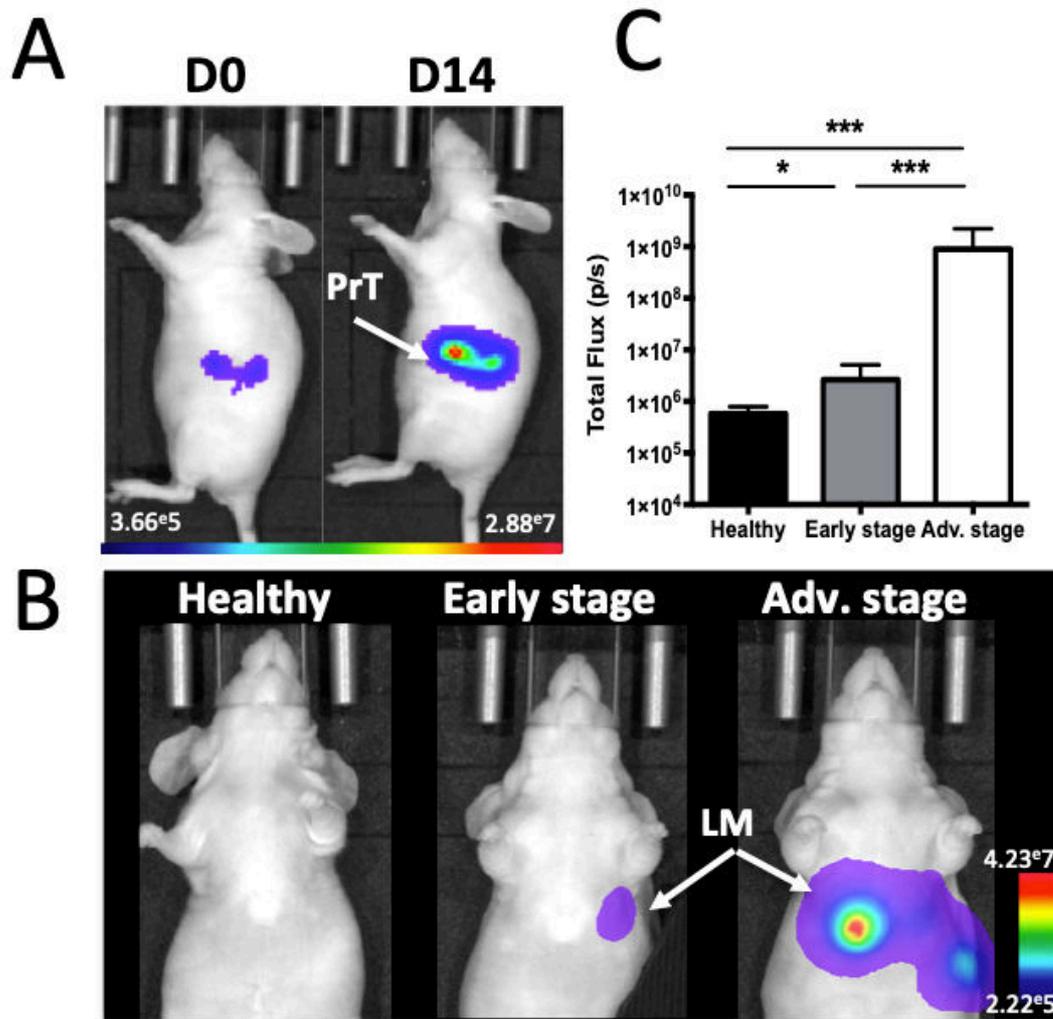


Figure 55 Mouse model of liver metastases from colon cancer monitored by *in vivo* bioluminescence imaging

A) Just after colon cancer cells implantation into the spleen (J0) and just before spleen resection at D14 (PrT: primary tumor); B) at various stages of liver metastases (LM) development. C) Abdominal bioluminescence quantification for mice assignment to early or advanced stage of liver metastases development.

Statistical analysis: 1-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test: *p-value<0.05; ** p-value < 0.01; ***p-value<0.001; **** p-value < 0.0001.

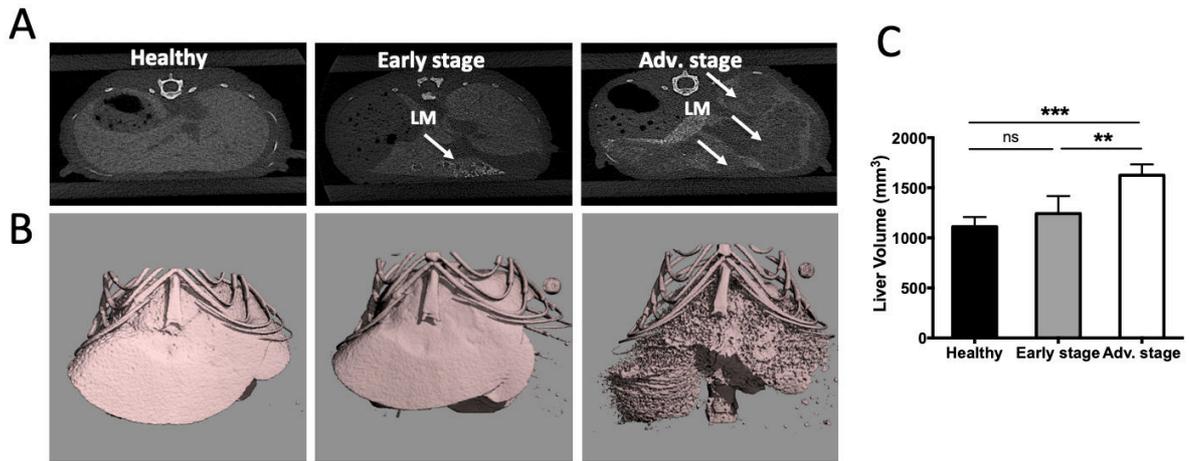


Figure 56 *In vivo* microCT imaging of liver function after intravenous injection of iodine based nanoparticles (Exitron® Nano6000).

A) Coronal section through the liver; B) 3D iodine contrast-based segmentation of the liver; and C) Liver volume measured from iodine contrast-based segmentation. Statistical analysis: 1-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test: *p-value<0.05; ** p-value < 0.01; ***p-value<0.001; **** p-value < 0.0001.

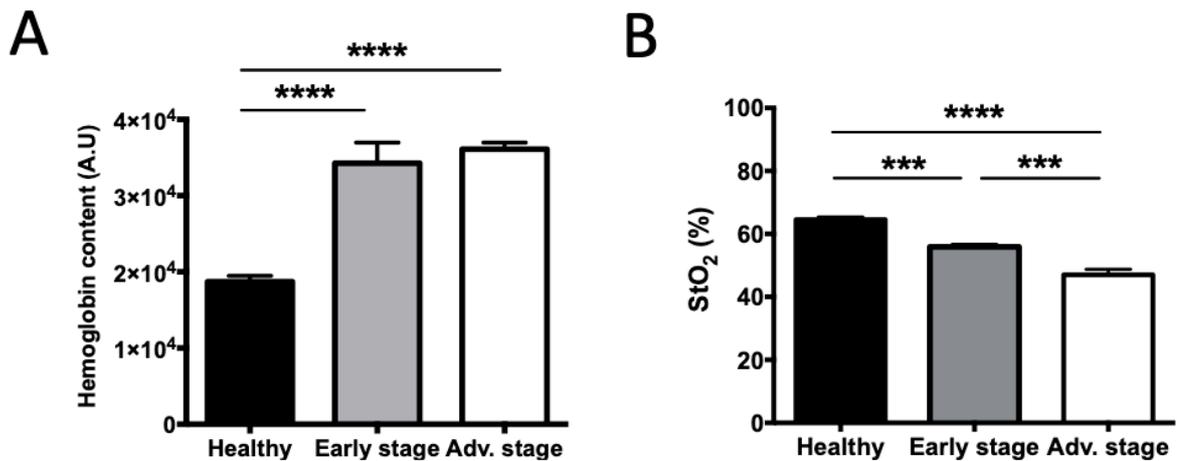


Figure 57 contrast agent-free 3D photoacoustic measurements in the liver

A) Total hemoglobin content and B) Average StO₂ evaluated from the Oxy-Hemo protocol using 750 and 850 nm wavelengths. Statistical analysis: 1-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test: *p-value<0.05; ** p-value < 0.01; ***p-value<0.001; **** p-value < 0.0001.

3.2 Contrast agent fluorescence and photoacoustic detectability

ICG and Angiostamp™800 displayed specific absorption and fluorescence spectra (Figure 58-A) in the near infra-red region fully compatible with their detection by the Fluobeam™800 (Figure 58-B, C) which provided linear detections between 10 and 0.003 μM ($r^2 = 0.99$) and very low sensibility thresholds (Sthr: **24 and 3 nM** respectively). Their photoacoustic profiles were very similar to their absorption spectra (Figure 58-D) and their detections in sample

cassettes were linear between 50 and 0.2 μM ($r^2 = 0.98$) providing photoacoustic sensibility thresholds at **0.20 and 0.50 μM** respectively (Figure 58-E, F). Samples photoacoustic measurement was highly repeatable since the mean coefficient of variation (mCOV%) calculated from all measurements of the 2 contrast agents was only $2.98 \pm 2.22\%$.

Interestingly, these contrast agents displayed photoacoustic spectra that were clearly distinguishable from those of oxy- and deoxy-hemoglobin (Figure 58-D) that imply multispectral unmixing possibilities.

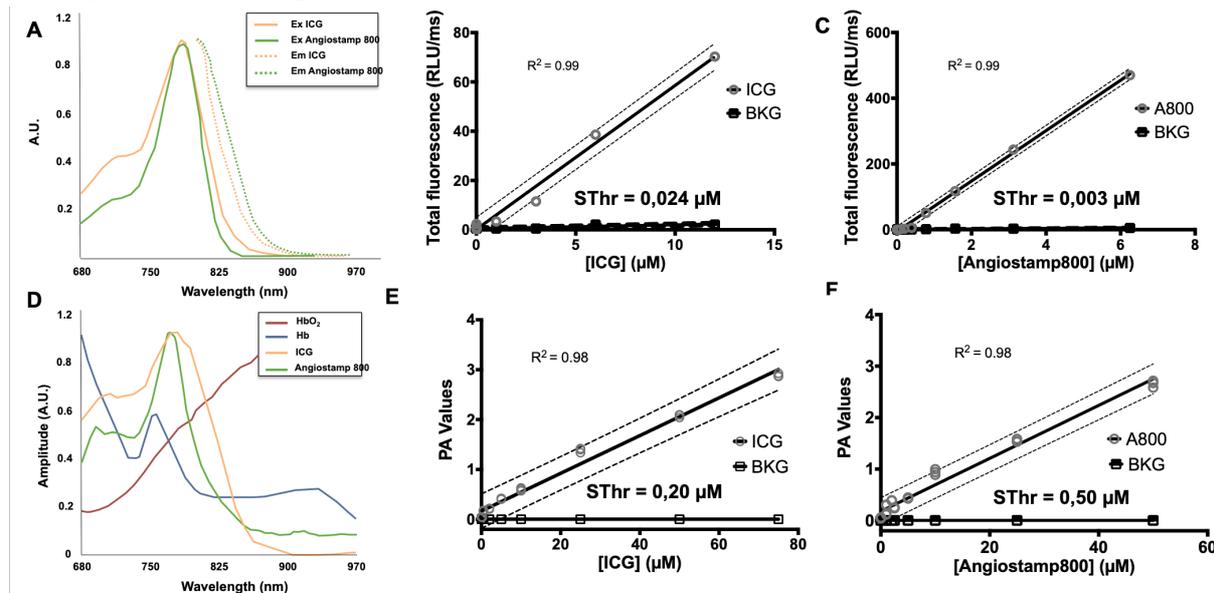


Figure 58 Detectability of Indo-Cyanine Green (ICG) and Angiostamp™ 800 (A800) by fluorescence and photoacoustic imaging

A) Absorption and fluorescence spectra of ICG (light blue) and Angiostamp™ 800 (Dark blue).

B) Fluorescence signal of various concentrations (n=3 samples/concentration) of ICG and C) Angiostamp™ 800 measured by the Fluobeam®800 (Excitation 780 nm; Emission > 830 nm). The sensibility threshold (SThr) corresponds to the concentration, which provides a signal to noise ratio (contrast agent versus PBS) of 1.3.

D) Photoacoustic spectra of ICG (light blue), Angiostamp™ 800 (Dark blue), Oxyhemoglobin (Dark Green) and Deoxyhemoglobin (Light Green).

E) Photoacoustic signal of various concentrations (n=3 samples/concentration) of ICG and F) Angiostamp™ 800 measured by spectral unmixing analyses from spectroscopic acquisition (680-970 nm). The sensibility threshold (SThr) corresponds to the concentration, which provides a signal to noise ratio (contrast agent versus PBS) of 1.2.

3.3 ICG blood pharmacokinetics

ICG blood pharmacokinetic was evaluated in mice at various stages of liver metastases development by both non-invasive PAI on the carotid artery (Figure 59-A) and fluorescence imaging on plasma samples collected at various time points (Figure 59-B). Blood half-lives were calculated from both imaging modalities and were found to be 2.25 ± 0.18 min for

fluorescence and 1.27 ± 0.99 min for PAI (Figure 59-C). A marked increase in the circulation time was observed for the mice at advanced stage compared to mice at early stage (x1.46 to 2.86) and healthy mice (x1.6 to 4.04) regardless of the imaging modality. Indeed, although a slightly higher variability was observed from non-invasive photoacoustic measurements, there was no significant difference with the data obtained from fluorescence detection on collected samples.

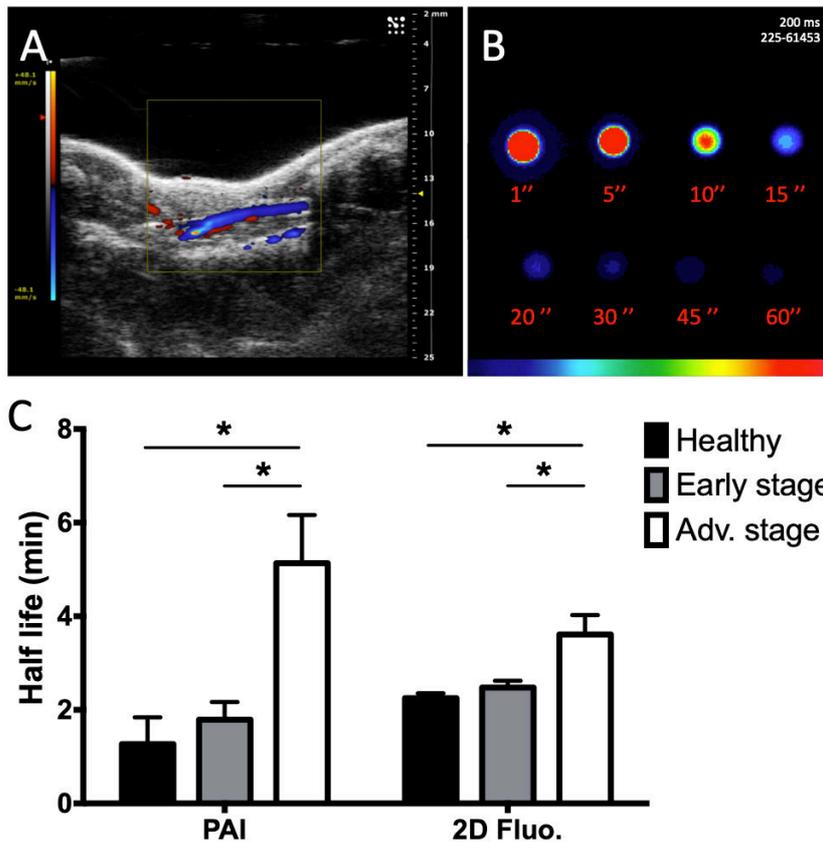


Figure 59 Evaluation of ICG Blood pharmacokinetic by real-time non-invasive photoacoustic imaging and *ex vivo* fluorescence imaging of plasma samples.

A) Color Doppler imaging of the carotid artery (longitudinal section) for optimizing probe positioning prior to photoacoustic monitoring. B) *Ex vivo* fluorescence imaging of plasma samples collected at different time points after intravenous injection of ICG. C) ICG blood half life calculated from real time *in vivo* photoacoustic monitoring (800nm) of the carotid artery and from *ex vivo* fluorescence measurements of blood samples taken from mice at various stages of liver metastases development. Statistical analysis: 2-way ANOVA, Sidak post-hoc test: *p-value<0.05; ** p-value < 0.01; ***p-value<0.001; **** p-value < 0.0001.

3.4 ICG liver kinetics

Following intravenous injection of ICG, healthy mice displayed a strong signal in the liver decreasing to background noise 48 hours after injection (Figure 60). Liver metastases bearing mice followed the same elimination profile but their early liver uptake was significantly impaired as demonstrated by both non-invasive whole-body 2D fluorescence and 3D photoacoustic imaging (Figure 60-A and B). More precisely, when looking at ICG

fluorescence or photoacoustic signal in the liver 1 hour after injection, the more advanced was the metastases development the lower was the liver signal (Figure 60-C and D).

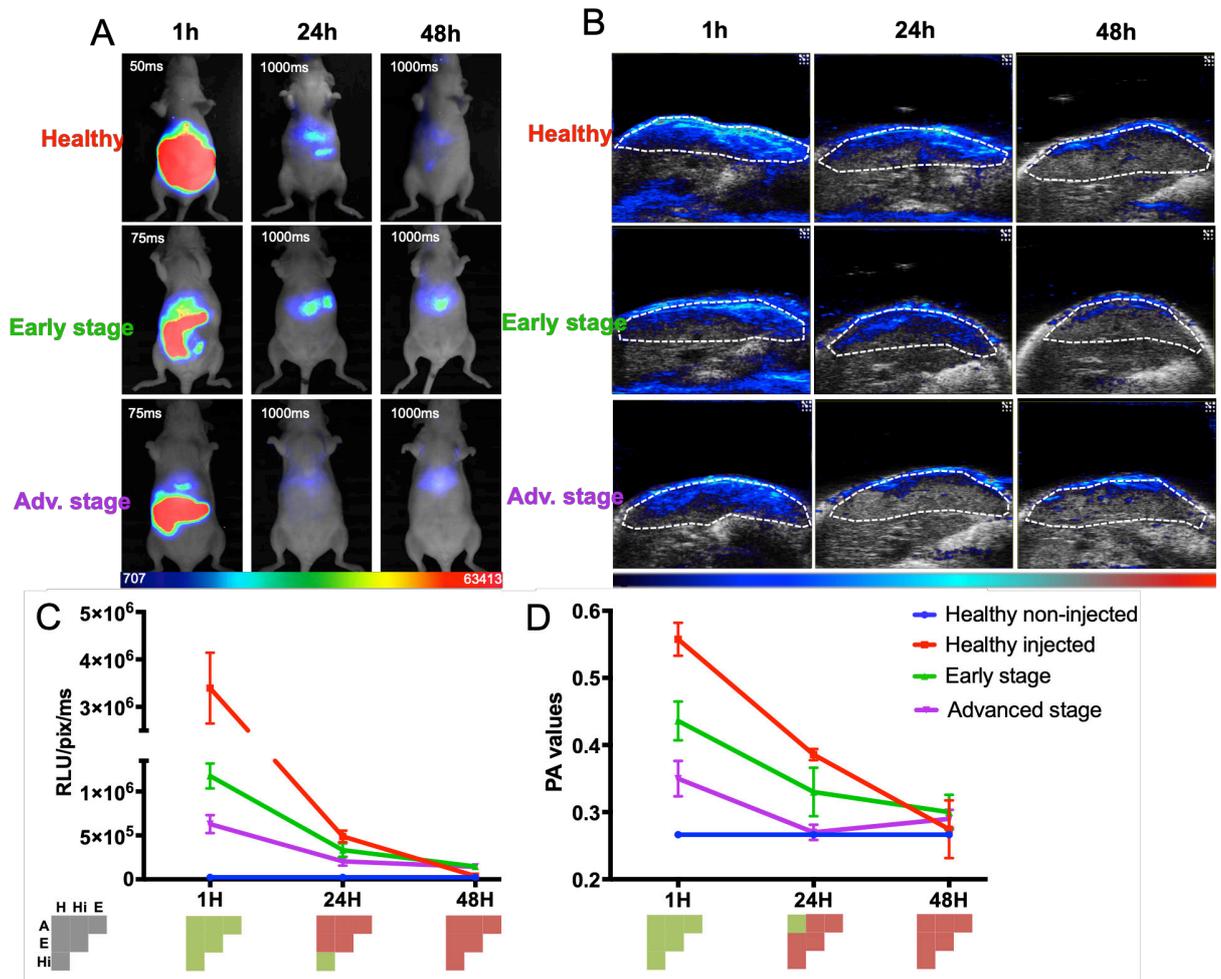


Figure 60 *In vivo* distribution kinetic of ICG at various stages of liver metastases development by fluorescence and photoacoustic imaging.

A) 2D whole body fluorescence imaging,

B) Liver sections from 3D ultrasound and photoacoustic (800 nm) imaging.

C) Kinetics of fluorescence and D) photoacoustic signals from the liver. Statistical analysis: 1-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test.

3.5 Non-invasive 3D multimodal imaging for liver metastases exploration: Angiostamp™800 vs. ICG

ICG and Angiostamp™800 were injected intravenously at their respective optimal timing for 3D fluorescence and photoacoustic imaging (1 and 24 hours before imaging respectively) (Figure 61).

Using Angiostamp™800, liver metastases bearing mice displayed liver signals that were clearly detectable by both 3D fluorescence and photoacoustic imaging (Figure 61-A and C). From fluorescence measurements, mice at advanced stage presented significantly higher signal ($3.67 \times 10^7 \pm 3.78 \times 10^7$ RLU) than mice at early stage ($2.56 \times 10^6 \pm 1.31 \times 10^6$ RLU) while

healthy mice showed only very weak signal ($1.26 \times 10^5 \pm 9.38 \times 10^4$ RLU) (Figure 61-D). These observations were confirmed by *ex vivo* fluorescence imaging on the isolated livers (figure 62 B). *In vivo* 3D photoacoustic measurements provided similar patterns (Figure 61-E); the more advanced the metastases development was, the higher the signal was (x1.88 for early stage and x3.76 for advanced stage compared to healthy mice), thus allowing precise discrimination between all stages (Figure 61-D).

Conversely, using ICG, liver from healthy mice displayed high fluorescence (Figures 61 A, B & 62 A) and photoacoustic signals (Figure 61-C) and these signals were significantly decreased ($p < 0.0001$) in liver metastases bearing mice (-80.7 to -88.1% for fluorescence (Figure 61-I) and -47.3 to -49.3% for photoacoustic (Figure 61-J) compared to healthy mice). However, for both imaging modalities there was no significant difference of liver signal between early and advanced stages (Figure 61-I and J).

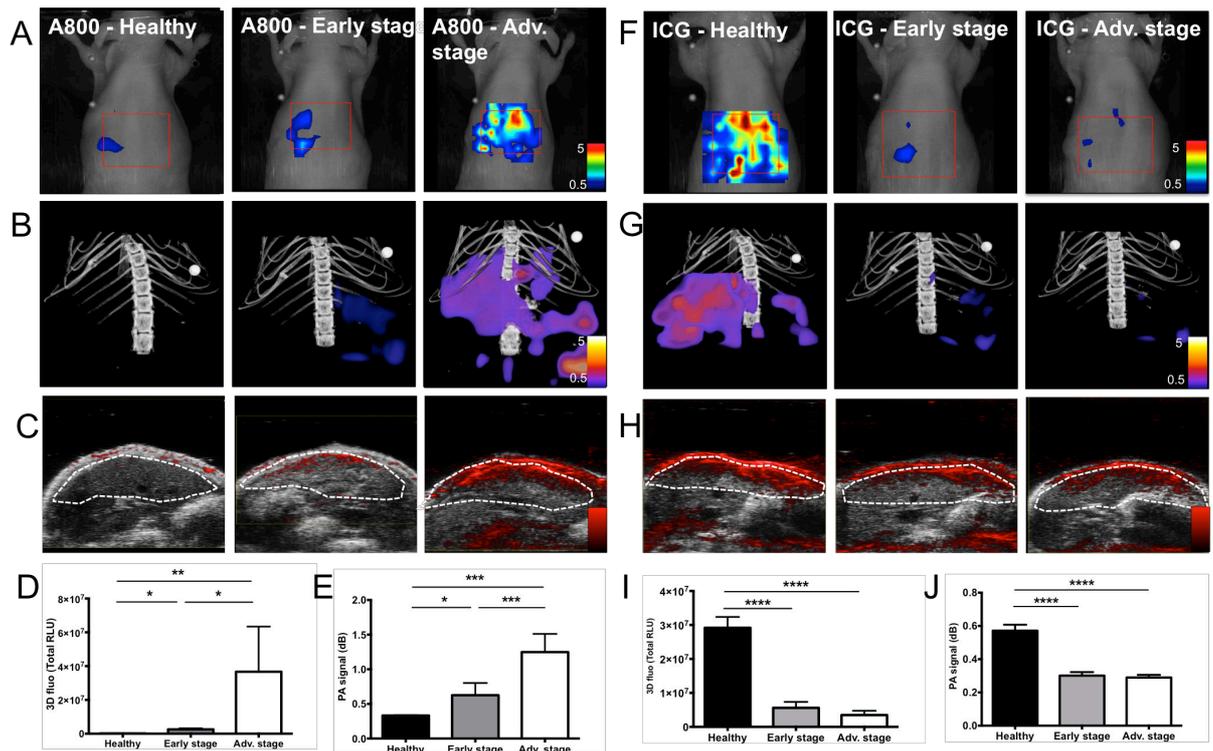


Figure 61 *in vivo* 3D fluorescence and photoacoustic imaging of various stages of liver metastases development with Angiostamp™ 800 and ICG.

ICG and Angiostamp™ 800 were injected intravenously respectively 1 hour and 24 hours before imaging.

- A) Projections from 3D fluorescence imaging of the liver with Angiostamp™ 800,
- B) 3D bimodal fluorescence/microCT imaging of the liver with Angiostamp™ 800,
- C) Liver sections from 3D ultrasound and photoacoustic (800 nm) imaging with Angiostamp™ 800,
- D) Fluorescence and E) Photoacoustic signals measured from the liver with Angiostamp™ 800,
- F) Projections from 3D fluorescence imaging of the liver with ICG,
- G) 3D bimodal fluorescence/microCT imaging of the liver with ICG,
- H) Liver sections from 3D ultrasound and photoacoustic (800 nm) imaging with ICG,
- I) Fluorescence and J) Photoacoustic signals measured from the liver with ICG.

Statistical analysis: 1-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test: *p-value<0.05; ** p-value < 0.01; ***p-value<0.001; **** p-value < 0.0001.

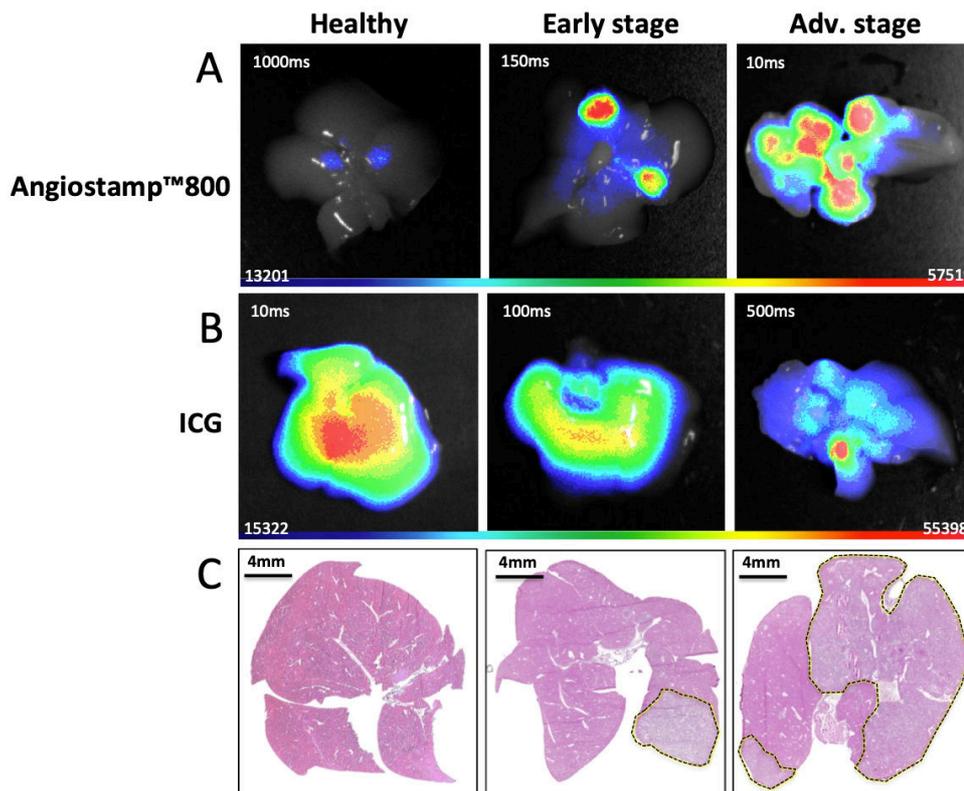


Figure 62 *Ex vivo* 2D fluorescence of the isolated liver at various stages of liver metastases development.

A) Twenty-four hours after Angiostamp™800 intravenous injection or B) One hour after ICG intravenous injection. C) HE staining of liver slices (liver metastases delineated by dotted lines)

3.6 *In vivo* multispectral photoacoustic imaging

Multispectral photoacoustic acquisitions were performed on liver metastases bearing mice after injection of ICG or Angiostamp™800 (Figure 63). Having previously defined the specific photoacoustic spectra of contrast agents (figure 58-D), spectral unmixing analysis could be implemented and this provided simultaneous monitoring and visualization of hemoglobin content, tissue oxygen saturation and contrast agent concentration within the liver (Figure 49). Using Angiostamp™800, a contrast agent specific photoacoustic signal as well as increased hemoglobin content were observed at a metastasis location (Figure 63-A). In a different way, ICG provided low but ring-shaped specific photoacoustic signal together with high hemoglobin content at a metastasis site (Figure 63-B).

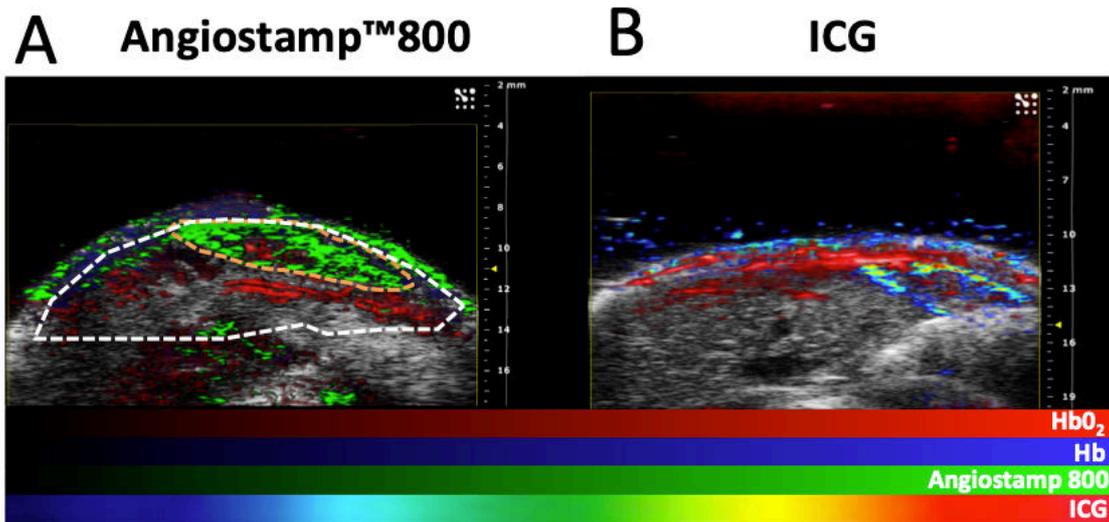


Figure 63 *in vivo* multispectral photoacoustic imaging of oxy- and deoxyhemoglobin and tracer distribution

Liver sections from 3D ultrasound and multispectral photoacoustic imaging with Angiostamp™800 (A) or ICG (B) injected respectively 24 hours or 1 hour before imaging (red: oxyhemoglobin, blue: deoxyhemoglobin, green: Angiostamp™800 or ICG).

4 Discussion

In this study we used an animal model of liver metastasis from human colon cancer [371] whose development was precisely characterized by *in vivo* multimodal imaging using bioluminescence, microCT, fluorescence and multispectral PAI. The use of several imaging modalities offered combined and cross-validated information. MicroCT with nanoparticles liver contrast enhancement illustrated that mice at pathological advanced stage displayed altered liver function and increased whole liver volume compared to healthy group. However, the specificity of this approach was quite low since mice at early stage were not significantly different from healthy mice. Additionally this required the injection of earth metal-based nanoparticles whose potential toxicity precludes repeated injections for longitudinal follow up [372].

Conversely, contrast agent-free PAI was used to detect the respective amounts of oxy- and deoxy-hemoglobin and HbT was shown to be precociously increased in metastases bearing livers, indicating tumor angiogenesis occurrence, while StO₂ was shown to decrease gradually with metastases development illustrating tumor related induction of hypoxia.

Then, liver metastases exploration by molecular imaging has been considered and ICG and Angiostamp™800 contrast agents were characterized for their use in fluorescence and PAI.

These two contrast agents displayed specific absorption and fluorescence spectra in the near infra-red region where autofluorescence, light absorption and scattering through tissue is moderated [179]. Following light excitation, their fluorescence quantum yield being moderate (12-14%), part of the absorbed energy is converted into heat and generates a photoacoustic effect. All in one, both fluorescence and photoacoustic detections of these two contrast agents were shown to be linear in wide concentration ranges leading to high sensibility thresholds (few nanomolar by fluorescence and few hundred nanomolar by PAI).

These contrast agents' dual behavior opens up interesting prospects for associating two molecular imaging modalities and thus adding their respective advantages. Fluorescence is highly sensitive but resolution and signal quantification are impacted by tissue depth, while PAI offers slightly lower sensitivity (as far as concerned these two contrast agents) but very high resolution (down to 40 μm axial resolution at 32-55 MHz) and real time combination with anatomical information from ultrasound. Moreover, multispectral PAI by monitoring simultaneously endogenous and exogenous contrast agents' signals offers molecular information from specific tracers integrated in functional context about angiogenesis and tissue hypoxia.

ICG is an FDA approved contrast agent known for a very long time as a tracer of hepatic function. In this study we demonstrated for the first time that PAI could be used to monitor non-invasively and in real time its blood pharmacokinetic and consequently its elimination half-life. This was performed in parallel with fluorescence imaging on plasma samples collected at various time points and blood half-lives calculated from both imaging modalities in healthy mice were found to be 1.27 ± 0.99 min for PAI and 2.25 ± 0.18 min for fluorescence. Those results are in accordance with literature [373] where ICG blood half-life is described to be about 2-4 min for healthy rodents.

Our results also illustrated that ICG blood half-life measurement was an indirect marker of liver metastasis development, a marked increase in the circulation time being observed for the mice at advanced stage compared to mice at early stage and healthy mice. By evaluating the kinetic of ICG elimination by the liver, this approach is reflecting the physiopathological status of the liver but it is not specific of cancer development. Anyway, similarly to contrast agent-based microCT evaluation, this approach was not able to discriminate mice at early stage from healthy mice.

Recently, ICG encountered a new scope of application for intraoperative fluorescence-guided surgery of hepatic metastases from colorectal cancer [222, 224, 374]. Along this line, we evaluated ICG potential for non-invasive exploration of liver metastases by fluorescence and photoacoustic imaging.

Whole-body fluorescence reflectance imaging was used to characterize ICG biodistribution kinetics and the time point 1-hour post injection was selected in accordance with photoacoustic monitoring for the best discrimination of metastases development stages. However when using 2D fluorescence imaging, distinguishing liver signal from guts signal was an issue and only 3D fluorescence imaging combined to microCT allowed precise delineation of liver volume and thus rigorous liver signal quantification.

Using ICG, both 3D fluorescence and photoacoustic imaging allowed discrimination of liver metastases bearing mice and healthy mice, but there was no significant difference between early and advanced stages regardless of the imaging modality. Interestingly, spectral unmixing analysis of ICG photoacoustic signal in the liver evidenced a “rim-type” signal delineating a metastasis place as previously described for ICG in the context of fluorescence-guided surgery of liver metastases from colorectal carcinoma [222].

Angiostamp™ is a tumor targeting contrast agent that has already been well described for tumor labeling *via* specific targeting of $\alpha v\beta 3$ integrin, which is overexpressed on endothelial cells during angiogenesis and on some cancer cells [230]. Angiostamp™ has been shown to provide a high signal in tumor tissue with low nonspecific background, generating a very good tumor contrast in various animal models including peritoneal carcinomatosis [233, 235, 236, 368] head and neck squamous cell carcinoma [237] in mice, osteosarcoma in rats [234] and fibrosarcoma in domestic cats [239].

Here we described for the first time its use for fluorescence and photoacoustic imaging of liver metastases from colon cancer origin in mice. Using Angiostamp™800, liver metastases were clearly detectable by both 3D fluorescence and photoacoustic imaging. For both imaging modalities, the more advanced the metastases development was, the higher the signal was, thus allowing precise discrimination between all stages and healthy mice. This result highlighted the significant improvement achieved by using a tumor-specific marker such as Angiostamp™800 with respect to passive accumulation in the tumor by enhanced permeability and retention (EPR) effect of ICG.

This study reported the use of two contrast agents for fluorescence and PAI in a preclinical model of liver metastases from colon cancer. This is the first time that these two molecular imaging modalities were closely associated and this provided better understanding of their

respective strengths and complementarities. We presented new imaging methodologies for non-invasive cancer development monitoring and staging which represent powerful tools for the development and preclinical evaluation of new therapeutic strategies against cancer.

5 Bibliography

1. Frangioni, J.V., *In vivo near-infrared fluorescence imaging*. *Curr Opin Chem Biol*, 2003. **7**(5): p. 626-34.
2. Ntziachristos, V., C. Bremer, and R. Weissleder, *Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging*. *Eur Radiol*, 2003. **13**(1): p. 195-208.
3. Koenig, A., et al., *Whole body small animal examination with a diffuse optical tomography instrument*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 2007. **571**(1,Ä2): p. 56-59.
4. Koenig, A., et al., *Fluorescence diffuse optical tomography for free-space and multifluorophore studies*. *J Biomed Opt*, 2010. **15**(1): p. 016016.
5. Koenig, A., et al., *In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography*. *J Biomed Opt*, 2008. **13**(1): p. 011008.
6. Yu, M. and J. Zheng, *Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles*. *ACS Nano*, 2015. **9**(7): p. 6655-74.
7. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
8. Jolesz, F., *Intraoperative Imaging and Image-Guided Therapy*. 2014: Springer-Verlag New York. XVII, 893.
9. Tummers, Q.R., et al., *The Value of Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging Based on Enhanced Permeability and Retention of Indocyanine Green: Feasibility and False-Positives in Ovarian Cancer*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0129766.
10. Holt, D., et al., *Intraoperative near-infrared imaging can distinguish cancer from normal tissue but not inflammation*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e103342.
11. Kosaka, N., et al., *Near infrared fluorescence-guided real-time endoscopic detection of peritoneal ovarian cancer nodules using intravenously injected indocyanine green*. *Int J Cancer*, 2011. **129**(7): p. 1671-7.
12. Yamamoto, S., et al., *Intraoperative detection of sentinel lymph nodes in breast cancer patients using ultrasonography-guided direct indocyanine green dye-marking by real-time virtual sonography constructed with three-dimensional computed tomography-lymphography*. *Breast*, 2013. **22**(5): p. 933-7.
13. Madajewski, B., et al., *Intraoperative near-infrared imaging of surgical wounds after tumor resections can detect residual disease*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(20): p. 5741-51.
14. Martirosyan, N.L., et al., *Use of in vivo near-infrared laser confocal endomicroscopy with indocyanine green to detect the boundary of infiltrative tumor*. *J Neurosurg*, 2011. **115**(6): p. 1131-8.

15. Gotoh, K., et al., *A novel image-guided surgery of hepatocellular carcinoma by indocyanine green fluorescence imaging navigation*. J Surg Oncol, 2009. **100**(1): p. 75-9.
16. Ishizawa, T., et al., *Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging*. Cancer, 2009. **115**(11): p. 2491-504.
17. Barabino, G., et al., *Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging using indocyanine green in colorectal carcinomatosis surgery: Proof of concept*. Eur J Surg Oncol, 2016. **42**(12): p. 1931-1937.
18. Barabino, G., et al., *Improving Surgical Resection of Metastatic Liver Tumors With Near-Infrared Optical-Guided Fluorescence Imaging*. Surg Innov, 2016. **23**(4): p. 354-9.
19. Yokoyama, J., et al., *Impact of indocyanine green fluorescent image-guided surgery for parapharyngeal space tumours*. J Craniomaxillofac Surg, 2014. **42**(6): p. 835-8.
20. Okusanya, O.T., et al., *Small portable interchangeable imager of fluorescence for fluorescence guided surgery and research*. Technol Cancer Res Treat, 2015. **14**(2): p. 213-20.
21. Garanger, E., et al., *New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors*. Mol Ther, 2005. **12**(6): p. 1168-75.
22. Jin, Z.H., et al., *Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)4*. Mol Imaging, 2006. **5**(3): p. 188-97.
23. Jossierand, V., et al., *Electrochemotherapy guided by intraoperative fluorescence imaging for the treatment of inoperable peritoneal micro-metastases*. J Control Release, 2016. **233**: p. 81-7.
24. Keramidas, M., et al., *Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model*. Br J Surg, 2010. **97**(5): p. 737-43.
25. Mery, E., et al., *Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal dissemination of ovarian carcinomas. A preclinical study*. Gynecol Oncol, 2011. **122**(1): p. 155-62.
26. Atallah, I., et al., *Near-infrared fluorescence imaging-guided surgery improves recurrence-free survival rate in novel orthotopic animal model of head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2016. **38 Suppl 1**: p. E246-55.
27. Bellanger, A., et al., *The critical role of the ZNF217 oncogene in promoting breast cancer metastasis to the bone*. J Pathol, 2017.
28. Dutour, A., et al., *Targeted imaging of alpha(v)beta(3) expressing sarcoma tumor cells in vivo in pre-operative setting using near infrared: a potential tool to reduce incomplete surgical resection*. Bone, 2014. **62**: p. 71-8.
29. Wenk, C.H., et al., *Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti-alpha(v)beta(3) integrin molecular probe*. Cancer Lett, 2013. **334**(2): p. 188-95.
30. Wang, X., et al., *Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(7): p. 803-6.

31. Wang, X., et al., *Noninvasive imaging of hemoglobin concentration and oxygenation in the rat brain using high-resolution photoacoustic tomography*. J Biomed Opt, 2006. **11**(2): p. 024015.
32. Yao, J. and L.V. Wang, *Recent progress in photoacoustic molecular imaging*. Curr Opin Chem Biol, 2018. **45**: p. 104-112.
33. Luke, G.P., S.Y. Nam, and S.Y. Emelianov, *Optical wavelength selection for improved spectroscopic photoacoustic imaging*. Photoacoustics, 2013. **1**(2): p. 36-42.
34. Wang, S., et al., *Recent Advances in Photoacoustic Imaging for Deep-Tissue Biomedical Applications*. Theranostics, 2016. **6**(13): p. 2394-2413.
35. Kruskal, J.B., et al., *Hepatic colorectal cancer metastases: imaging initial steps of formation in mice*. Radiology, 2007. **243**(3): p. 703-11.
36. Al Rawashdeh, W., et al., *Noninvasive Assessment of Elimination and Retention using CT-FMT and Kinetic Whole-body Modeling*. Theranostics, 2017. **7**(6): p. 1499-1510.
37. Kruskal, J.B., et al., *Hepatic colon cancer metastases in mice: dynamic in vivo correlation with hypoechoic rims visible at US*. Radiology, 2000. **215**(3): p. 852-7.
38. Mannheim, J.G., et al., *Comparison of small animal CT contrast agents*. Contrast Media Mol Imaging, 2016. **11**(4): p. 272-84.
39. Hong, G., A. L. Antaris and H. Dai, *Near-infrared fluorophores for biomedical imaging*. Nature Biomedical Engineering, 2017. **1**: **0010**.
40. Desmettre, T., J.M. Devoisselle, and S. Mordon, *Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography*. Surv Ophthalmol, 2000. **45**(1): p. 15-27.
41. Miyata, A., et al., *Photoacoustic tomography of human hepatic malignancies using intraoperative indocyanine green fluorescence imaging*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112667.

Conclusion

L'imagerie *in vivo* de modèles animaux dédiés à la recherche en oncologie représente un outil puissant pour extraire des informations biologiques utiles d'une part à la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui régissent le développement des tumeurs et d'autre part à la mise au point de stratégies diagnostiques et thérapeutiques innovantes.

Bien que chaque modalité d'imagerie possède des caractéristiques qui lui soient propres en termes de sensibilité et de résolutions spatiale et temporelle, l'association de plusieurs modalités permet d'extraire un panel complet d'informations moléculaires, fonctionnelles et anatomiques.

Dans la première partie de ce travail, la combinaison de l'imagerie de fluorescence 3-D avec l'imagerie microCT a été mise en œuvre et s'est montrée particulièrement pertinente pour la caractérisation de différents modèles animaux de cancers pulmonaires mimant chacun spécifiquement une ou plusieurs étapes du processus cancéreux, du développement tumoral primaire à l'invasion métastatique. Ce système d'imagerie 3-D bimodale associé à l'utilisation du traceur fluorescent Angiostamp™, a permis le suivi non invasif au cours du temps de modifications du niveau d'expression d'un biomarqueur d'intérêt, l'intégrine $\alpha\beta3$, dont la régulation joue un rôle important dans la progression du cancer [61]. Ces informations moléculaires ont pu être localisées avec précision en 3-D grâce à la dimension anatomique apportée par l'imagerie microCT. Cette précision géométrique fut tout particulièrement décisive pour la mise en évidence du tropisme préférentiellement osseux de métastases issues d'un cancer du sein associé à la mutation *ZNF* [238] ainsi que lors du suivi d'anomalies du développement placentaire chez la souris gestante [240]. Bien que d'autres systèmes bimodaux soient commercialisés, le système décrit ici est pour l'instant à l'état de prototype et son intégration dans le système PhotonImager®Optima représente un défi. Cependant, l'addition de ce module de fluorescence 3-D aux possibilités déjà existantes de bioluminescence, fluorescence multi-spectrale et radiographie, permettrait d'obtenir un système d'imagerie multimodale offrant un panel d'informations multiples du plus grand intérêt pour la recherche préclinique.

L'imagerie photoacoustique dont la première application *in vivo* a été publiée en 2003 [248] pour l'exploration non-invasive de la vascularisation cérébrale chez le rat est depuis lors en plein essor. Cependant, cette technique d'imagerie, encore émergente, fait l'objet de nombreux développements technologiques et de nombreuses études sont encore nécessaires pour développer de nouvelles applications biologiques et médicales et démontrer la pertinence de son utilisation tant pour la recherche préclinique que pour la pratique clinique.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons évalué le potentiel de l'imagerie photoacoustique pour l'imagerie non invasive de la vascularisation et de l'oxygénation tissulaire dans différents contextes physiopathologiques chez la souris ainsi que chez l'homme. Après avoir démontré ses excellentes reproductibilité et répétabilité, cette

imagerie basée sur le contraste endogène de l'hémoglobine a été mise en œuvre dans un modèle de métastase cérébrale de mélanome chez la souris et a permis la mise en évidence d'un gradient d'hypoxie de la périphérie vers le centre de la tumeur en relation avec la situation principalement superficielle du réseau vasculaire tumoral [348]. Ces informations sont d'une très grande importance, puisqu'elles permettent de prédire, de manière précoce et non-invasive, la capacité d'une tumeur à résister aux chimio- et radio-thérapies conventionnelles, ce qui représente un écueil thérapeutique majeur [50, 51].

Dans la continuité de ce travail, démontrant son très fort potentiel translationnel, l'imagerie photoacoustique par contraste endogène a été utilisée pour l'exploration de lésions vasculaires chez un patient souffrant du syndrome de Bean. Il a été démontré dans cette étude que l'imagerie photoacoustique pouvait représenter un outil intéressant comme alternative au Doppler couleur puisqu'elle s'est montrée capable de mettre en évidence des flux de sang lents. Cette modalité s'est avérée un outil pertinent d'aide au diagnostic qui pourrait permettre de différencier avec précision, différents types de pathologies dermatologiques ayant des caractéristiques cliniques similaires. L'utilisation de l'imagerie photoacoustique par contraste endogène, en évitant le recours à des agents de contraste dont il est incontournable, long et coûteux de prouver l'innocuité avant d'envisager leur utilisation chez l'homme, présente ainsi une certaine facilité pour le transfert clinique et par suite ouvre à court terme de nouvelles perspectives diagnostiques chez l'homme.

Dans la suite de ce travail, des agents de contraste photoacoustiques ont été utilisés pour l'exploration d'un modèle de métastases hépatiques d'origine colorectale et le bénéfice apporté par l'utilisation d'un marqueur assurant un ciblage tumoral spécifique (Angiostamp™) a été démontré en comparaison d'un agent de contraste s'accumulant passivement dans la tumeur (ICG). Ce travail a mis en évidence le gain significatif d'information qui peut être apportée par le recours à des agents de contraste exogènes en complément de l'exploration par contraste endogène. Cela a par conséquent souligné la nécessité de développer de nouvelles sondes moléculaires qui ciblent les mécanismes d'action d'une pathologie, mais répondent également à des contraintes de biocompatibilité et d'innocuité afin d'envisager des stratégies diagnostiques efficaces, sûres et ciblées contre le cancer.

Nos travaux réalisés dans les modèles animaux de cancer pulmonaire primaire ou métastatique et dans le modèle de métastases hépatiques d'origine colorectale ont souligné la capacité de l'Angiostamp™ à cibler spécifiquement les tumeurs sur-exprimant l'intégrine $\alpha\beta3$. Lorsqu'il a été comparé avec un traceur de référence, l'ICG, l'Angiostamp™ a montré le bénéfice lié à sa spécificité et son fort potentiel de transfert vers une utilisation chez l'Homme. En effet, le développement de sondes spécifiques, permettrait non seulement d'augmenter la précision et la précocité avec laquelle un cancer peut être diagnostiqué, mais également augmenter la précision du geste chirurgical lors de la résection des nodules tumoraux.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons proposé deux développements technologiques permettant d'améliorer les capacités applicatives de l'imagerie

photoacoustique. Le premier, un module d'acquisition multi-angles visait à améliorer la qualité des images obtenues par ultrasons et par photoacoustique en contournant certaines causes de génération d'artefacts par une approche d'acquisition multi-angle. Cette approche ne s'est au final pas révélée très prometteuse, mais d'autres pistes sont à développer dans cette voie d'approche tomographique.

Le deuxième module visait à augmenter la taille du volume acquis en imagerie photoacoustique 3-D et à améliorer la distribution de la lumière dans le sujet d'étude. Ce module a permis de réaliser une imagerie corps-entier d'un animal tout en conservant des temps d'acquisition compatibles avec les contraintes de la réalité biologique. Il a ainsi été utilisé pour évaluer la biodistribution et les cinétiques d'élimination d'un agent de contraste de référence. Cette étude a montré des résultats très prometteurs mais a été réalisée sur un nombre restreint d'animaux. Elle ouvre des perspectives intéressantes pour les applications pharmaceutiques puisque ce module pourrait permettre de réaliser des études pharmacocinétiques et de biodistribution, de façon non-invasive, rapide, peu coûteuse, avec une haute résolution et une grande sensibilité.

De façon générale, ce travail a montré l'intérêt de l'imagerie multimodale pour réaliser des études précliniques en oncologie. Les différentes modalités d'imagerie, lorsqu'elles sont associées à des modèles animaux pertinents, se révèlent être des outils puissants pour la compréhension des mécanismes qui régissent le cancer. Ces systèmes d'imagerie sont perfectibles et de nombreuses pistes technologiques sont envisageables. Par exemple, l'apparition de nouvelles sources laser, l'augmentation des cadences de tirs laser, l'augmentation de la sensibilité des détecteurs, la rapidité des déplacements moteurs, etc., sont autant de pistes à exploiter pour augmenter la vitesse, accroître la sensibilité et la résolution, et faire baisser le coût des instruments d'imagerie afin de les proposer à la communauté scientifique.

Liste des figures

Figure 1 Estimation de l'incidence et de la mortalité en fonction des différentes localisations cancéreuses pour les hommes et les femmes dans le monde en 2012. Source IARC 2018.....	13
Figure 2 Les caractéristiques biologiques des cellules cancéreuses, d'après Hanahan et Wielberg 2011 [18]	16
Figure 3 Les mécanismes d'initiation de la carcinogénèse.....	19
Figure 4 Les étapes principales de la mise en place de l'angiogénèse tumorale ©medicalartwork.co.uk. D'après, Folkman 2007 [32].....	21
Figure 5 Schéma de la diffusion de l'oxygène au travers du tissu tumoral. ©medicalartwork.co.uk	23
Figure 6 Schéma général d'une intégrine (A) et des différentes combinaisons de sous unités α et β (B). D'après http://www.amdbook.org et [61].....	27
Figure 7 Illustration des différentes modalités d'imagerie en fonction du type d'informations biologiques collectées (© OPTIMAL)	35
Figure 8 La première radiographie de la main de l'épouse de Wilhelm Röntgen en 1895. Source : NIH National Library.....	36
Figure 9 Schémas de l'effet Compton (gauche) et de l'effet photoélectrique (droite).....	37
Figure 10 Mortalité lié au cancer du sein (IARC-WHO).....	39
Figure 11 Echelle Hounsfield pour l'analyse et la segmentation des images rayons X.....	40
Figure 12 Schéma d'un tomodensitomètre (CT) de 4 ^{ème} génération et exemple de reconstruction d'image microCT en 3D d'une souris transgénique mutée pour le gène <i>Kras</i> ayant développé des adénocarcinome pulmonaire (©OPTIMAL).....	41
Figure 13 L'élément piézoélectrique émet des ultrasons lorsqu'un courant électrique lui est appliqué et produit de l'électricité lorsqu'il reçoit des ultrasons.....	43
Figure 14 Exemple d'illustrations de différentes applications de l'imagerie par ultrasons	45
Figure 15 Description de la technique de bioluminescence dans le système <i>Photinus pyralis</i>	48
Figure 16 Diagramme de Jablonski (a) qui illustre la transition énergétique observable dans l'imagerie de fluorescence. Spectre d'excitation et d'émission de la molécule d'AlexaFluor488.....	52
Figure 17 Spectres d'absorption des composants endogènes des tissus biologiques dans les longueurs d'ondes visibles (200nm-700nm), dans la fenêtre proche infrarouge-I (NIR-I de 700 à 950nm) et dans la deuxième fenêtre proche infrarouge (NIR-II de 1000 à 1400 nm) ...	53
Figure 18 Illustration de l'augmentation du nombre de photons traversant le petit animal dans la fenêtre proche infrarouge.	54
Figure 19 Auto-fluorescence des organes de la souris dans différentes configurations de jeu de filtres.....	55
Figure 20 Système d'imagerie de fluorescence par réflectance (2D).....	57
Figure 21 Système d'imagerie de fluorescence par transmission (3D).....	58
Figure 22 Les différents types de sondes utilisées en imagerie de fluorescence.....	62
Figure 23 Principe général de l'imagerie photoacoustique biomédicale.	70
Figure 24 Photographies et représentations schématiques des configurations des systèmes d'imagerie photoacoustique dédiés au petit animal commercialisés par Ithera, le système MSOT (A) et (B), par Endra Inc., le système Nexus 128 (C) et (D) et du système Vevo@LAZR (E) et (B). Pour le système Visualsonics, les deux fibres optiques sont placés de part et d'autre du transducteur et sont moulées à même la sonde. D'après [249].....	72
Figure 25 Panorama des applications potentielles de l'imagerie photoacoustique. Les applications spécifiques aux hommes sont listées en bleu, celles spécifiques aux femmes en rouge et les applications communes aux deux genres sont en verts. Plus d'applications sont détaillées dans le texte (Cf. § Imagerie photoacoustique).	76
Figure 26 Evaluation of bimodal system characteristics.....	88
Figure 27 Multimodal study of primary lung adenocarcinoma orthotopic model: i.v. Injection.....	90
Figure 28 Multimodal study of primary lung adenocarcinoma orthotopic model: nebulization.....	92
Figure 29 Quantitative analyses of primary lung adenocarcinoma orthotopic model	93
Figure 30 Multimodal study of lung metastases model of mammary origin.	95
Figure 31 Quantitative analyses of lung metastases model of mammary origin.	96

Figure 32 Multimodal study of lung metastases model from orthotopic mammary adenocarcinoma.....	98
Figure 33 Quantitative analyses of lung metastases model from orthotopic mammary adenocarcinoma.....	99
Figure 34 Description of the experimental setup	115
Figure 35 PA measurements of the stability on phantom	118
Figure 36 <i>In vivo</i> physiological parameter of accuracy in liver.....	120
Figure 37 <i>In vivo</i> physiological parameter of accuracy in spleen.....	120
Figure 38 <i>In vivo</i> physiological parameter accuracy: renal capsule.....	121
Figure 39 In human physiological parameters accuracy.....	122
Figure 40 Physiological parameters accuracy in human.....	123
Figure 41 Description du module Rotational Compound Imaging (RCI). L'objet à observer est placé sous le transducteur (US+PA) qui est attaché à un bras motorisé. Le système, piloté par l'ordinateur, donne la possibilité de faire l'acquisition d'une image sous différents angles avec un pas de 1° minimum et sur une amplitude totale de 60°.....	145
Figure 42 Description d'une séquence d'acquisition avec le module RCI.....	147
Figure 43 Description de la procédure utilisée pour l'identification du centre de rotation de l'image par la méthode des repères externes.....	147
Figure 44 Images et quantification des acquisitions réalisées en PA sous angle unique (A) et (B), avec une rotation de 60° (C) et (D) et en fluorescence 2D (E) et (F) réalisées sur fantômes contenant une gamme de concentrations d'une solution d'ICG.....	150
Figure 45 Images et quantification des acquisitions réalisées en US et PA sous angle unique (A), (B) et (C), avec une rotation de 60° (C), (D) et (E) et en mode spectrale de 680 nm à 970 nm (F) sur les reins d'animaux dans lesquels ont été implantés des inserts solides d'une gamme de concentrations d'ICG.....	152
Figure 46 Image corps entier (A) et quantifications (B) des acquisitions réalisées en fluorescence 2D sur les reins d'animaux dans lesquels ont été implantés des inserts solides d'une gamme de concentrations d'ICG.....	153
Figure 47 Images et quantification des acquisitions réalisées en US et PA sous angle unique (A), (B) et (C), avec une rotation de 60° (C), (D) et (E) et en mode spectrale de 680 nm à 970 nm (F) sur les cerveaux d'animaux dans lesquels ont été implantés des inserts solides d'une gamme de concentrations d'ICG.....	154
Figure 48 Image corps entier (A) et quantifications (B) des acquisitions réalisées en fluorescence 2D sur les cerveaux d'animaux dans lesquels ont été implantés des inserts solides d'une gamme d'ICG.....	155
Figure 49 Les deux systèmes d'imagerie photoacoustique commercialisés par Fujifilm Visualsonics Inc. et les caractéristiques de leurs sondes respectives.....	158
Figure 50 Description schématique du module corps entier (A) et photo du système prototype (B). Il se compose d'un bras modifié (1) capable d'accueillir le transducteur (2) sur lequel est fixé un adaptateur permettant d'accueillir une première fibre optique (3). La deuxième fibre optique est fixée par le bras de support (4) en dessous du lit en verre (3 mm d'épaisseur) sur lequel est placé l'animal (5) et qui est relié à un moteur 3D d'une amplitude totale de 65mm (6).....	160
Figure 51 Photographie du bloc de gel échographique (A) qui sert à être positionné sur l'animal lors d'un balayage corps entier (D) afin d'éviter l'utilisation de grandes quantités de gel. Description schématique du fantôme utilisé pour caractériser le module et aligner l'axe des fibres optiques (C).....	161
Figure 52 Acquisition US et PA (680nm) d'un fantôme contenant 5 tubes remplis avec une solution de bleu de méthylène 1 % placés à différentes profondeurs. Comparaison d'une image réalisée avec les deux fibres optiques placées en épi-illumination (A) ou avec une fibre optique placée en épi-illumination et une autre en trans-illumination (B). Les quantifications réalisées pour chaque tube sur le fantôme dans les deux modes d'illumination (lignes pointillées blanches) sont représentées dans le graphique (C).....	162
Figure 53 Schéma de description et acquisitions d'une zone abdominale du petit animal à l'aide d'un système d'illumination en imagerie photoacoustique à 800 nm avec une configuration "WB", c'est-à-dire avec une fibre optique disposée en épi-illumination et une autre en trans-illumination (A) en comparaison avec une configuration "classique", c'est-à-dire avec les deux fibres optiques disposées en épi-illumination (B).....	163

Figure 54 Représentations 3-D des acquisitions US et PA multi-spectrales (A) montrant le signal d'ICG (vert), d'hémoglobine oxygénée (rouge) et non-oxygénée (bleu) sur les différents organes d'intérêt avant (a), 30 minutes (b), 1 heure (c), 24 heures (d) et 48 heures (e) après injection d'ICG. Les différents organes sont segmentés en utilisant le mode B (US) et les quantifications relatives au signal de l'ICG en photoacoustique sont extraites pour chaque organe d'intérêt afin de tracer la cinétique de captation et d'élimination de l'ICG (B).....	164
Figure 55 Mouse model of liver metastases from colon cancer monitored by <i>in vivo</i> bioluminescence imaging	175
Figure 56 <i>In vivo</i> microCT imaging of liver function after intravenous injection of iodine based nanoparticles (Exitron® Nano6000)	176
Figure 57 contrast agent-free 3D photoacoustic measurements in the liver	176
Figure 58 Detectability of Indo-Cyanine Green (ICG) and Angiostamp™800 (A800) by fluorescence and photoacoustic imaging.....	177
Figure 59 Evaluation of ICG Blood pharmacokinetic by real-time non-invasive photoacoustic imaging and <i>ex vivo</i> fluorescence imaging of plasma samples.....	178
Figure 60 <i>In vivo</i> distribution kinetic of ICG at various stages of liver metastases development by fluorescence and photoacoustic imaging	179
Figure 61 <i>in vivo</i> 3D fluorescence and photoacoustic imaging of various stages of liver metastases development with Angiostamp™800 and ICG.	181
Figure 62 <i>Ex vivo</i> 2D fluorescence of the isolated liver at various stages of liver metastases development.....	182
Figure 63 <i>in vivo</i> multispectral photoacoustic imaging of oxy- and deoxyhemoglobin and tracer distribution.....	183

Liste des tableaux

Tableau 1 Proto-ocogènes et gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la carcinogénèse	17
Tableau 2 Les différents types de modèles animaux utilisés en oncologie. D'après [85]	33
Tableau 3 Les différents types de sondes spécifiques et activables utilisées en imagerie de fluorescence.....	65
Tableau 4 Comparaison des différentes modalités d'imagerie biomédicale en oncologie.....	79
Tableau 5 Summary table of meanCOV% by organ and the average COV% (in red) for (A) Repeatability and (B) Reproducibility of measurements.	121
Tableau 6 Summary of within-subjects COV%.....	124

Bibliographie

1. Lyons, S.K., *Imaging Mouse Models of Cancer*. Cancer J, 2015. **21**(3): p. 152-64.
2. Politi, K. and W. Pao, *How genetically engineered mouse tumor models provide insights into human cancers*. J Clin Oncol, 2011. **29**(16): p. 2273-81.
3. Singh, M., C.L. Murriel, and L. Johnson, *Genetically engineered mouse models: closing the gap between preclinical data and trial outcomes*. Cancer Res, 2012. **72**(11): p. 2695-700.
4. Kruger, R.A., *Photoacoustic ultrasound*. Med Phys, 1994. **21**(1): p. 127-31.
5. Kruger, R.A. and P. Liu, *Photoacoustic ultrasound: pulse production and detection of 0.5% Liposyn*. Med Phys, 1994. **21**(7): p. 1179-84.
6. Zackrisson, S., S.M. van de Ven, and S.S. Gambhir, *Light in and sound out: emerging translational strategies for photoacoustic imaging*. Cancer Res, 2014. **74**(4): p. 979-1004.
7. Morgan, G., et al., *National cancer institute conference on treating tobacco dependence at cancer centers*. J Oncol Pract, 2011. **7**(3): p. 178-82.

8. Sasco, A.J., M.B. Secretan, and K. Straif, *Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence*. Lung Cancer, 2004. **45 Suppl 2**: p. S3-9.
9. Cogliano, V.J., et al., *Preventable exposures associated with human cancers*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(24): p. 1827-39.
10. Gandini, S., et al., *Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis*. Int J Cancer, 2008. **122**(1): p. 155-64.
11. Le Faou, A.L., et al., [*Characteristics of smokers seeking smoking cessation services: the CDT programme*]. Rev Mal Respir, 2005. **22**(5 Pt 1): p. 739-50.
12. Hecht, S.S., F. Kassié, and D.K. Hatsukami, *Chemoprevention of lung carcinogenesis in addicted smokers and ex-smokers*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(7): p. 476-88.
13. Corrao, G., et al., *A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases*. Prev Med, 2004. **38**(5): p. 613-9.
14. Boffetta, P. and M. Hashibe, *Alcohol and cancer*. Lancet Oncol, 2006. **7**(2): p. 149-56.
15. Parkin, D.M., L. Boyd, and L.C. Walker, *16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010*. Br J Cancer, 2011. **105 Suppl 2**: p. S77-81.
16. INCa, *Nutrition et prévention primaire des cancers : actualisation des données, collection État des lieux et des connaissances, INCa, juin 2015*. 2015.
17. *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1994. **61**: p. 1-241.
18. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.
19. Hamra, G.B., et al., *Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis*. Environ Health Perspect, 2014. **122**(9): p. 906-11.
20. Lissowska, J., et al., *Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses*. Cancer Causes Control, 2010. **21**(7): p. 1091-104.
21. Petrucelli, N., M.B. Daly, and T. Pal, *BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer*, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
22. Weinberg, R.A., *How cancer arises*. Sci Am, 1996. **275**(3): p. 62-70.
23. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
24. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
25. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell, 1997. **88**(5): p. 593-602.
26. Evan, G. and T. Littlewood, *A matter of life and cell death*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1317-22.
27. Sharpless, N.E. and R.A. DePinho, *The INK4A/ARF locus and its two gene products*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(1): p. 22-30.
28. Dyson, N., *The regulation of E2F by pRB-family proteins*. Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2245-62.
29. Paul, S. and E. Regulier, [*Molecular basis of oncogenesis*]. Ann Biol Clin (Paris), 2001. **59**(4): p. 393-402.

30. Folkman, J., *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(1): p. 4-6.
31. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
32. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 73-91.
33. Kerbel, R. and J. Folkman, *Clinical translation of angiogenesis inhibitors.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(10): p. 727-39.
34. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 677-84.
35. Folkman, J., *Angiogenesis inhibitors generated by tumors.* Mol Med, 1995. **1**(2): p. 120-2.
36. Feige, J.J. and S. Bailly, *[Molecular bases of angiogenesis].* Bull Acad Natl Med, 2000. **184**(3): p. 537-44; discussion 544-5.
37. Folkman, J., *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis.* Semin Oncol, 2002. **29**(6 Suppl 16): p. 15-8.
38. Folkman, J., *Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(4): p. 273-86.
39. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1989. **161**(2): p. 851-8.
40. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
41. Liu, Z.J., et al., *VEGF-A and alphaVbeta3 integrin synergistically rescue angiogenesis via N-Ras and PI3-K signaling in human microvascular endothelial cells.* FASEB J, 2003. **17**(13): p. 1931-3.
42. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., *Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 211-7.
43. Asahara, T., et al., *Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo.* Circulation, 1995. **92**(9 Suppl): p. II365-71.
44. Vaupel, P., D.K. Kelleher, and M. Hockel, *Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy.* Semin Oncol, 2001. **28**(2 Suppl 8): p. 29-35.
45. Hall, E.J., *Radiobiology for the Radiologist.* 2012. **7**.
46. Isa, A.Y., et al., *Hypoxia in head and neck cancer.* Br J Radiol, 2006. **79**(946): p. 791-8.
47. Simon, J.M., *[Hypoxia and angiogenesis].* Bull Cancer, 2007. **94 Spec No**: p. S160-5.
48. Lancaster, J.A., et al., *Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix.* Cancer Res, 2001. **61**(17): p. 6394-9.
49. Wykoff, C.C., et al., *Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases.* Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 7075-83.
50. Kunkel, M., et al., *Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma.* Cancer, 2003. **97**(4): p. 1015-24.

51. Hoskin, P.J., et al., *GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON*. Br J Cancer, 2003. **89**(7): p. 1290-7.
52. Stupack, D.G. and D.A. Cheresh, *A Bit-role for integrins in apoptosis*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(5): p. 388-9.
53. Van Lint, P. and C. Libert, *Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(6): p. 1375-81.
54. John, A. and G. Tuszynski, *The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis*. Pathol Oncol Res, 2001. **7**(1): p. 14-23.
55. Lelongt, B. and P. Ronco, *Role of matrix metalloproteinases in kidney development and glomerulopathy: lessons from transgenic mice*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17 Suppl 9**: p. 28-31.
56. Brooks, P.C., *Cell adhesion molecules in angiogenesis*. Cancer Metastasis Rev, 1996. **15**(2): p. 187-94.
57. George, E.L., et al., *Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin*. Development, 1993. **119**(4): p. 1079-91.
58. Yang, X.D., et al., *Inhibition of insulinitis and prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by blocking L-selectin and very late antigen 4 adhesion receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10494-8.
59. Dejana, E., *Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis*. J Clin Invest, 1996. **98**(9): p. 1949-53.
60. Brooks, P.C., R.A. Clark, and D.A. Cheresh, *Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis*. Science, 1994. **264**(5158): p. 569-71.
61. Kumar, C.C., *Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis*. Curr Drug Targets, 2003. **4**(2): p. 123-31.
62. Jin, H. and J. Varner, *Integrins: roles in cancer development and as treatment targets*. Br J Cancer, 2004. **90**(3): p. 561-5.
63. Rovinsky, Y.A., *Cellular and molecular mechanisms of tumor invasion*. Biochemistry (Mosc), 1998. **63**(9): p. 1029-43.
64. Gao, B., T.M. Saba, and M.F. Tsan, *Role of alpha(v)beta(3)-integrin in TNF-alpha-induced endothelial cell migration*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(4): p. C1196-205.
65. Lauffenburger, D.A., *Cell motility. Making connections count*. Nature, 1996. **383**(6599): p. 390-1.
66. Takada, Y., X. Ye, and S. Simon, *The integrins*. Genome Biol, 2007. **8**(5): p. 215.
67. Tolomelli, A., et al., *Can Integrin Agonists Have Cards to Play against Cancer? A Literature Survey of Small Molecules Integrin Activators*. Cancers (Basel), 2017. **9**(7).
68. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
69. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *alphaV integrins in angiogenesis and cancer*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006478.
70. Byron, A., et al., *Anti-integrin monoclonal antibodies*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 22): p. 4009-11.
71. Schnell, O., et al., *Imaging of integrin alpha(v)beta(3) expression in patients with malignant glioma by [18F] Galacto-RGD positron emission tomography*. Neuro Oncol, 2009. **11**(6): p. 861-70.

72. Montgomery, A.M., R.A. Reisfeld, and D.A. Cheresh, *Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8856-60.
73. Brooks, P.C., et al., *Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3*. Cell, 1996. **85**(5): p. 683-93.
74. Petitclerc, E., et al., *Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival*. Cancer Res, 1999. **59**(11): p. 2724-30.
75. Chattopadhyay, N. and A. Chatterjee, *Studies on the expression of alpha(v)beta3 integrin receptors in non-malignant and malignant human cervical tumor tissues*. J Exp Clin Cancer Res, 2001. **20**(2): p. 269-75.
76. Eliceiri, B.P., *Integrin and growth factor receptor crosstalk*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1104-10.
77. Soldi, R., et al., *Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2*. EMBO J, 1999. **18**(4): p. 882-92.
78. Byzova, T.V., et al., *A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins*. Mol Cell, 2000. **6**(4): p. 851-60.
79. Pierschbacher, M.D. and E. Ruoslahti, *Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule*. Nature, 1984. **309**(5963): p. 30-3.
80. Xiong, J.P., et al., *Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3*. Science, 2001. **294**(5541): p. 339-45.
81. Buerkle, M.A., et al., *Inhibition of the alpha-nu integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo*. Br J Cancer, 2002. **86**(5): p. 788-95.
82. Haier, J., et al., *Inhibition of tumor progression and neoangiogenesis using cyclic RGD-peptides in a chemically induced colon carcinoma in rats*. Clin Exp Metastasis, 2002. **19**(8): p. 665-72.
83. Ogawa, M., et al., *Direct electrophilic radiofluorination of a cyclic RGD peptide for in vivo alpha(v)beta3 integrin related tumor imaging*. Nucl Med Biol, 2003. **30**(1): p. 1-9.
84. Paul, S.M., et al., *How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 203-14.
85. Jorge Mestre-Ferrandiz, J.S., Adrian Towse, *The R&D cost of a new medicine*. 2012.
86. Van Dyke, T. and T. Jacks, *Cancer modeling in the modern era: progress and challenges*. Cell, 2002. **108**(2): p. 135-44.
87. Bibby, M.C., *Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages*. Eur J Cancer, 2004. **40**(6): p. 852-7.
88. Singh, M. and L. Johnson, *Using genetically engineered mouse models of cancer to aid drug development: an industry perspective*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5312-28.
89. Teicher, B.A., *Tumor models for efficacy determination*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(10): p. 2435-43.
90. Sausville, E.A., *Respecting cancer drug transportability: a basis for successful lead selection*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(16): p. 1098-9.
91. Ruggeri, B.A., F. Camp, and S. Miknyoczki, *Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery*. Biochem Pharmacol, 2014. **87**(1): p. 150-61.

92. Becher, O.J. and E.C. Holland, *Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies*. *Cancer Res*, 2006. **66**(7): p. 3355-8, discussion 3358-9.
93. Olive, K.P. and D.A. Tuveson, *The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(18): p. 5277-87.
94. Kucherlapati, M., et al., *Tumor progression in Apc(1638N) mice with Exo1 and Fen1 deficiencies*. *Oncogene*, 2007. **26**(43): p. 6297-306.
95. Engelman, J.A., et al., *Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers*. *Nat Med*, 2008. **14**(12): p. 1351-6.
96. Johnson, J.I., et al., *Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials*. *Br J Cancer*, 2001. **84**(10): p. 1424-31.
97. Voskoglou-Nomikos, T., J.L. Pater, and L. Seymour, *Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(11): p. 4227-39.
98. Abate-Shen, C., *A new generation of mouse models of cancer for translational research*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(18): p. 5274-6.
99. Gillet, J.P., et al., *Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(46): p. 18708-13.
100. Gillet, J.P., S. Varma, and M.M. Gottesman, *The clinical relevance of cancer cell lines*. *J Natl Cancer Inst*, 2013. **105**(7): p. 452-8.
101. Shoemaker, R.H., *The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(10): p. 813-23.
102. Barretina, J., et al., *The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity*. *Nature*, 2012. **483**(7391): p. 603-7.
103. Holmberg, J.C., et al., *An in vitro model for the study of human implantation*. *Am J Reprod Immunol*, 2012. **67**(2): p. 169-78.
104. Haber, D.A. and J. Settleman, *Cancer: drivers and passengers*. *Nature*, 2007. **446**(7132): p. 145-6.
105. McMillin, D.W., J.M. Negri, and C.S. Mitsiades, *The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities*. *Nat Rev Drug Discov*, 2013. **12**(3): p. 217-28.
106. Gao, D., et al., *Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition*. *Cancer Res*, 2012. **72**(6): p. 1384-94.
107. Smith, P.A., et al., *An orthotopic model of metastatic nasopharyngeal carcinoma and its application in elucidating a therapeutic target that inhibits metastasis*. *Genes Cancer*, 2011. **2**(11): p. 1023-33.
108. Chan, E., et al., *Mouse orthotopic models for bladder cancer research*. *BJU Int*, 2009. **104**(9): p. 1286-91.
109. Sano, D. and J.N. Myers, *Xenograft models of head and neck cancers*. *Head Neck Oncol*, 2009. **1**: p. 32.
110. Loi, M., et al., *The use of the orthotopic model to validate antivasular therapies for cancer*. *Int J Dev Biol*, 2011. **55**(4-5): p. 547-55.
111. Rubio-Viqueira, B., et al., *An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(15): p. 4652-61.

112. Dong, X., et al., *Patient-derived first generation xenografts of non-small cell lung cancers: promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(5): p. 1442-51.
113. DeRose, Y.S., et al., *Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1514-20.
114. Hidalgo, M., et al., *Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research*. Cancer Discov, 2014. **4**(9): p. 998-1013.
115. Flechsig, P., et al., *Loss of matrix metalloproteinase-13 attenuates murine radiation-induced pulmonary fibrosis*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010. **77**(2): p. 582-90.
116. Freimuth, J., et al., *Application of magnetic resonance imaging in transgenic and chemical mouse models of hepatocellular carcinoma*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 94.
117. Zhong, W., et al., *In vivo high-resolution fluorescence microendoscopy for ovarian cancer detection and treatment monitoring*. Br J Cancer, 2009. **101**(12): p. 2015-22.
118. Hoyt, K., et al., *Determination of breast cancer response to bevacizumab therapy using contrast-enhanced ultrasound and artificial neural networks*. J Ultrasound Med, 2010. **29**(4): p. 577-85.
119. Tannenbaum, J. 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, 2015. **54**(2): p. 120-32.
120. Attix, F.H., *INTRODUCTION TO RADIOLOGICAL PHYSICS AND RADIATION DOSIMETRY*. 2004: Wiley-CH.
121. Mahesh, M., *The Essential Physics of Medical Imaging, Third Edition*. Med Phys, 2013. **40**(7).
122. Links, J.L.P.J.M., *Medical Imaging Signals and Systems*. 2006: Pearson Prentice Hall.
123. Whaites, E., *Essentials of Dental Radiography and Radiology*. 2002: Churchill Livingstone.
124. Hsieh, J., *Computed tomography : principles, design, artifacts and recent advances*. 2015: Bellingham, WA : SPIE.
125. Garvey, C.J. and R. Hanlon, *Computed tomography in clinical practice*. BMJ, 2002. **324**(7345): p. 1077-80.
126. Paulus, M.J., et al., *High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research*. Neoplasia, 2000. **2**(1-2): p. 62-70.
127. Hyafil, F., et al., *Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 636-41.
128. Li, J., et al., *A novel functional CT contrast agent for molecular imaging of cancer*. Phys Med Biol, 2010. **55**(15): p. 4389-97.
129. Popovtzer, R., et al., *Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer*. Nano Lett, 2008. **8**(12): p. 4593-6.
130. Reuveni, T., et al., *Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer: an in vivo study*. Int J Nanomedicine, 2011. **6**: p. 2859-64.
131. Kim, D., Y.Y. Jeong, and S. Jon, *A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer*. ACS Nano, 2010. **4**(7): p. 3689-96.
132. Massoud, T.F. and S.S. Gambhir, *Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light*. Genes Dev, 2003. **17**(5): p. 545-80.
133. Newman, P.G. and G.S. Rozycki, *The history of ultrasound*. Surg Clin North Am, 1998. **78**(2): p. 179-95.

134. Pochon, S., et al., *BR55: a lipopeptide-based VEGFR2-targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of angiogenesis*. Invest Radiol, 2010. **45**(2): p. 89-95.
135. Wang, S., J.A. Hossack, and A.L. Klibanov, *Targeting of microbubbles: contrast agents for ultrasound molecular imaging*. J Drug Target, 2018. **26**(5-6): p. 420-434.
136. Smith, B.R. and S.S. Gambhir, *Nanomaterials for In Vivo Imaging*. Chem Rev, 2017. **117**(3): p. 901-986.
137. Shimomura, O., *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods* World Scientific ed. 2012.
138. Brovko, L.Y., N.A. Romanova, and N.N. Ugarova, *Bioluminescent Assay of Bacterial Intracellular AMP, ADP, and ATP with the Use of a Coimmobilized Three-Enzyme Reagent (Adenylate Kinase, Pyruvate Kinase, and Firefly Luciferase)*. Analytical Biochemistry, 1994. **220**(2): p. 410-414.
139. Amaral, D.T., et al., *A new orange emitting luciferase from the Southern-Amazon Pyrophorus angustus (Coleoptera: Elateridae) click-beetle: structure and bioluminescence color relationship, evolutionary and ecological considerations*. Photochem Photobiol Sci, 2016. **15**(9): p. 1148-1154.
140. Shimomura, O., et al., *Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp Oplophorus gracilorostris*. Biochemistry, 1978. **17**(6): p. 994-8.
141. Hall, M.P., et al., *Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate*. ACS Chem Biol, 2012. **7**(11): p. 1848-57.
142. Andreotti, P.E., et al., *Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma*. Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5276-82.
143. Zhang, J. and H. Li, *Heterogeneity of tumor chemosensitivity in ovarian epithelial cancer revealed using the adenosine triphosphate-tumor chemosensitivity assay*. Oncol Lett, 2015. **9**(5): p. 2374-2380.
144. Zhang, Y., et al., *[ATP-tumor chemosensitivity assay directed chemotherapy in patients with cervical cancer]*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2013. **38**(12): p. 1223-7.
145. Fehm, T., et al., *Antitumor activity of zoledronic acid in primary breast cancer cells determined by the ATP tumor chemosensitivity assay*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 308.
146. Honig, A., et al., *Microtubule-associated protein tau correlates with estrogen receptor status but not with in vitro paclitaxel sensitivity in primary breast cancer*. Eur J Gynaecol Oncol, 2014. **35**(5): p. 503-7.
147. Neuber, K., *Treosulfan in the treatment of metastatic melanoma: from chemosensitivity testing to clinical trials*. Recent Results Cancer Res, 2003. **161**: p. 159-79.
148. Doerler, M., et al., *Does chemosensitivity-assay-directed therapy have an influence on the prognosis of patients with malignant melanoma stage IV? A retrospective study of 14 patients with malignant melanoma stage IV*. Eur J Med Res, 2007. **12**(10): p. 497-502.
149. Gong, L., et al., *3-Bromopyruvic acid, a hexokinase II inhibitor, is an effective antitumor agent on the hepatoma cells : in vitro and in vivo findings*. Anticancer Agents Med Chem, 2014. **14**(5): p. 771-6.
150. Hochgrafe, K. and E.M. Mandelkow, *Making the brain glow: in vivo bioluminescence imaging to study neurodegeneration*. Mol Neurobiol, 2013. **47**(3): p. 868-82.

151. Papon, N., et al., *Illuminating fungal infections with bioluminescence*. PLoS Pathog, 2014. **10**(7): p. e1004179.
152. Krappmann, S., *Lightning up the worm: How to probe fungal virulence in an alternative mini-host by bioluminescence*. Virulence, 2015. **6**(8): p. 727-9.
153. Siciliano, G. and P. Alano, *Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent Plasmodium in fundamental and applied research*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 391.
154. Coleman, S.M. and A. McGregor, *A bright future for bioluminescent imaging in viral research*. Future Virol, 2015. **10**(2): p. 169-183.
155. Aswendt, M., J. Adamczak, and A. Tennstaedt, *A review of novel optical imaging strategies of the stroke pathology and stem cell therapy in stroke*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 226.
156. Roura, S., C. Galvez-Monton, and A. Bayes-Genis, *Bioluminescence imaging: a shining future for cardiac regeneration*. J Cell Mol Med, 2013. **17**(6): p. 693-703.
157. de Almeida, P.E., J.R. van Rappard, and J.C. Wu, *In vivo bioluminescence for tracking cell fate and function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(3): p. H663-71.
158. Hossain, M.A., T. Chowdhury, and A. Bagul, *Imaging modalities for the in vivo surveillance of mesenchymal stromal cells*. J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(11): p. 1217-24.
159. Katsumata, T., et al., *Bioluminescence imaging of beta cells and intrahepatic insulin gene activity under normal and pathological conditions*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60411.
160. Virostko, J., et al., *Bioluminescence imaging reveals dynamics of beta cell loss in the non-obese diabetic (NOD) mouse model*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e57784.
161. Chan, K.M., S.P. Raikwar, and N. Zavazava, *Strategies for differentiating embryonic stem cells (ESC) into insulin-producing cells and development of non-invasive imaging techniques using bioluminescence*. Immunol Res, 2007. **39**(1-3): p. 261-70.
162. Yin, H., et al., *Enhancing pancreatic Beta-cell regeneration in vivo with pioglitazone and alogliptin*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65777.
163. Klerk, C.P., et al., *Validity of bioluminescence measurements for noninvasive in vivo imaging of tumor load in small animals*. Biotechniques, 2007. **43**(1 Suppl): p. 7-13, 30.
164. Luwor, R.B., S.S. Stylli, and A.H. Kaye, *Using bioluminescence imaging in glioma research*. J Clin Neurosci, 2015. **22**(5): p. 779-84.
165. Wang, Y., et al., *Noninvasive imaging of tumor burden and molecular pathways in mouse models of cancer*. Cold Spring Harb Protoc, 2015. **2015**(2): p. 135-44.
166. Gammon, S.T., et al., *Preclinical anatomical, molecular, and functional imaging of the lung with multiple modalities*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **306**(10): p. L897-914.
167. O'Farrell, A.C., et al., *Non-invasive molecular imaging for preclinical cancer therapeutic development*. Br J Pharmacol, 2013. **169**(4): p. 719-35.
168. Germain-Genevois, C., O. Garandeau, and F. Couillaud, *Detection of Brain Tumors and Systemic Metastases Using NanoLuc and Fluc for Dual Reporter Imaging*. Mol Imaging Biol, 2016. **18**(1): p. 62-9.
169. Lupu, M., et al., *²³Na MRI longitudinal follow-up of PDT in a xenograft model of human retinoblastoma*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2009. **6**(3-4): p. 214-20.
170. Wu, X., et al., *Noninvasive evaluation of antiangiogenic effect in a mouse tumor model by DCE-MRI with Gd-DTPA cystamine copolymers*. Mol Pharm, 2010. **7**(1): p. 41-8.

171. Ryan, P.L., et al., *Photonic monitoring in real time of vascular endothelial growth factor receptor 2 gene expression under relaxin-induced conditions in a novel murine wound model*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1041**: p. 398-414.
172. Angst, E., et al., *Bioluminescence imaging of angiogenesis in a murine orthotopic pancreatic cancer model*. *Mol Imaging Biol*, 2010. **12**(6): p. 570-5.
173. Hawes, J.J. and K.M. Reilly, *Bioluminescent approaches for measuring tumor growth in a mouse model of neurofibromatosis*. *Toxicol Pathol*, 2010. **38**(1): p. 123-30.
174. Craft, N., et al., *Bioluminescent imaging of melanoma in live mice*. *J Invest Dermatol*, 2005. **125**(1): p. 159-165.
175. Black, P.C., et al., *Validating bladder cancer xenograft bioluminescence with magnetic resonance imaging: the significance of hypoxia and necrosis*. *BJU Int*, 2010. **106**(11): p. 1799-804.
176. Sun, L., et al., *Folic acid-functionalized up-conversion nanoparticles: toxicity studies in vivo and in vitro and targeted imaging applications*. *Nanoscale*, 2014. **6**(15): p. 8878-83.
177. Frangioni, J.V., *In vivo near-infrared fluorescence imaging*. *Curr Opin Chem Biol*, 2003. **7**(5): p. 626-34.
178. Klohs, J., A. Wunder, and K. Licha, *Near-infrared fluorescent probes for imaging vascular pathophysiology*. *Basic Res Cardiol*, 2008. **103**(2): p. 144-51.
179. Hong, G., A. L. Antaris and H. Dai, *Near-infrared fluorophores for biomedical imaging*. *Nature Biomedical Engineering*, 2017. **1**: **0010**.
180. Ntziachristos, V., C. Bremer, and R. Weissleder, *Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging*. *Eur Radiol*, 2003. **13**(1): p. 195-208.
181. Bohmer, M. and J. Enderlein, *Fluorescence spectroscopy of single molecules under ambient conditions: methodology and technology*. *Chemphyschem*, 2003. **4**(8): p. 793-808.
182. Antaris, A.L., et al., *A small-molecule dye for NIR-II imaging*. *Nat Mater*, 2016. **15**(2): p. 235-42.
183. Hong, G., et al., *Multifunctional in vivo vascular imaging using near-infrared II fluorescence*. *Nat Med*, 2012. **18**(12): p. 1841-6.
184. Robinson, J.T., et al., *In vivo fluorescence imaging in the second near-infrared window with long circulating carbon nanotubes capable of ultrahigh tumor uptake*. *J Am Chem Soc*, 2012. **134**(25): p. 10664-9.
185. Antaris, A.L., et al., *A high quantum yield molecule-protein complex fluorophore for near-infrared II imaging*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15269.
186. Diao, S., et al., *Fluorescence Imaging In Vivo at Wavelengths beyond 1500 nm*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015. **54**(49): p. 14758-62.
187. Sun, Y., et al., *Novel bright-emission small-molecule NIR-II fluorophores for in vivo tumor imaging and image-guided surgery*. *Chem Sci*, 2017. **8**(5): p. 3489-3493.
188. Bhattacharyya, S., et al., *Synthesis and biological evaluation of panitumumab-IRDye800 conjugate as a fluorescence imaging probe for EGFR-expressing cancers*. *MedChemComm*, 2014. **5**(9): p. 1337-1346.
189. Cheong, W.F., S.A. Prahl, and A.J. Welch, *A Review Of the Optical Properties of Biological Tissues*. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 1990. **26**(12).

190. Darne, C., Y. Lu, and E.M. Sevick-Muraca, *Small animal fluorescence and bioluminescence tomography: a review of approaches, algorithms and technology update*. Phys Med Biol, 2014. **59**(1): p. R1-64.
191. Graves, E.E., et al., *A submillimeter resolution fluorescence molecular imaging system for small animal imaging*. Med Phys, 2003. **30**(5): p. 901-11.
192. Patwardhan, S., et al., *Time-dependent whole-body fluorescence tomography of probe bio-distributions in mice*. Opt Express, 2005. **13**(7): p. 2564-77.
193. Bourayou, R., et al., *Fluorescence tomography technique optimized for noninvasive imaging of the mouse brain*. J Biomed Opt, 2008. **13**(4): p. 041311.
194. Deliolanis, N., et al., *Free-space fluorescence molecular tomography utilizing 360 degrees geometry projections*. Opt Lett, 2007. **32**(4): p. 382-4.
195. Garofalakis, A., et al., *Three-dimensional in vivo imaging of green fluorescent protein-expressing T cells in mice with noncontact fluorescence molecular tomography*. Mol Imaging, 2007. **6**(2): p. 96-107.
196. Guo, X., et al., *A combined fluorescence and microcomputed tomography system for small animal imaging*. IEEE Trans Biomed Eng, 2010. **57**(12): p. 2876-83.
197. Ntziachristos, V., B. Chance, and A. Yodh, *Differential diffuse optical tomography*. Opt Express, 1999. **5**(10): p. 230-42.
198. Ale, A., et al., *FMT-XCT: in vivo animal studies with hybrid fluorescence molecular tomography-X-ray computed tomography*. Nat Methods, 2012. **9**(6): p. 615-20.
199. Nahrendorf, M., et al., *Hybrid in vivo FMT-CT imaging of protease activity in atherosclerosis with customized nanosensors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(10): p. 1444-51.
200. Al Rawashdeh, W., et al., *Noninvasive Assessment of Elimination and Retention using CT-FMT and Kinetic Whole-body Modeling*. Theranostics, 2017. **7**(6): p. 1499-1510.
201. Koenig, A., et al. *Fluorescence diffuse optical tomographic (fDOT) system for small animal studies*. in *Engineering in Medicine and Biology Society, 2007. EMBS 2007. 29th Annual International Conference of the IEEE*. 2007.
202. Koenig, A., et al., *In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography*. J Biomed Opt, 2008. **13**(1): p. 011008.
203. Koenig, A., et al., *Whole body small animal examination with a diffuse optical tomography instrument*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 2007. **571**(1,Ä2): p. 56-59.
204. Koenig, A., et al., *Fluorescence diffuse optical tomography for free-space and multifluorophore studies*. J Biomed Opt, 2010. **15**(1): p. 016016.
205. Herve, L., et al., *Noncontact fluorescence diffuse optical tomography of heterogeneous media*. Appl Opt, 2007. **46**(22): p. 4896-906.
206. Garofalakis, A., et al., *In vivo validation of free-space fluorescence tomography using nuclear imaging*. Opt Lett, 2010. **35**(18): p. 3024-6.
207. Stuker, F., et al., *Hybrid small animal imaging system combining magnetic resonance imaging with fluorescence tomography using single photon avalanche diode detectors*. IEEE Trans Med Imaging, 2011. **30**(6): p. 1265-73.
208. Da Silva, A., et al., *Optical calibration protocol for an x-ray and optical multimodality tomography system dedicated to small-animal examination*. Appl Opt, 2009. **48**(10): p. D151-62.

209. Schulz, R.B., et al., *Hybrid system for simultaneous fluorescence and x-ray computed tomography*. IEEE Trans Med Imaging, 2010. **29**(2): p. 465-73.
210. Yang, X., et al., *Combined system of fluorescence diffuse optical tomography and microcomputed tomography for small animal imaging*. Rev Sci Instrum, 2010. **81**(5): p. 054304.
211. Leblond, F., et al., *Toward whole-body optical imaging of rats using single-photon counting fluorescence tomography*. Opt Lett, 2011. **36**(19): p. 3723-5.
212. Solomon, M., et al., *Multimodal fluorescence-mediated tomography and SPECT/CT for small-animal imaging*. J Nucl Med, 2013. **54**(4): p. 639-46.
213. Weissleder, R. and M.J. Pittet, *Imaging in the era of molecular oncology*. Nature, 2008. **452**(7187): p. 580-9.
214. Fox, I.J., et al., *A tricarboyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation*. Proc Staff Meet Mayo Clin, 1957. **32**(18): p. 478-84.
215. Caesar, J., et al., *The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function*. Clin Sci, 1961. **21**: p. 43-57.
216. Holt, D., et al., *Intraoperative near-infrared imaging can distinguish cancer from normal tissue but not inflammation*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103342.
217. Kosaka, N., et al., *Near infrared fluorescence-guided real-time endoscopic detection of peritoneal ovarian cancer nodules using intravenously injected indocyanine green*. Int J Cancer, 2011. **129**(7): p. 1671-7.
218. Yamamoto, S., et al., *Intraoperative detection of sentinel lymph nodes in breast cancer patients using ultrasonography-guided direct indocyanine green dye-marking by real-time virtual sonography constructed with three-dimensional computed tomography-lymphography*. Breast, 2013. **22**(5): p. 933-7.
219. Madajewski, B., et al., *Intraoperative near-infrared imaging of surgical wounds after tumor resections can detect residual disease*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(20): p. 5741-51.
220. Martirosyan, N.L., et al., *Use of in vivo near-infrared laser confocal endomicroscopy with indocyanine green to detect the boundary of infiltrative tumor*. J Neurosurg, 2011. **115**(6): p. 1131-8.
221. Gotoh, K., et al., *A novel image-guided surgery of hepatocellular carcinoma by indocyanine green fluorescence imaging navigation*. J Surg Oncol, 2009. **100**(1): p. 75-9.
222. Ishizawa, T., et al., *Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging*. Cancer, 2009. **115**(11): p. 2491-504.
223. Barabino, G., et al., *Improving Surgical Resection of Metastatic Liver Tumors With Near-Infrared Optical-Guided Fluorescence Imaging*. Surg Innov, 2016. **23**(4): p. 354-9.
224. Barabino, G., et al., *Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging using indocyanine green in colorectal carcinomatosis surgery: Proof of concept*. Eur J Surg Oncol, 2016. **42**(12): p. 1931-1937.
225. Tummers, Q.R., et al., *The Value of Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging Based on Enhanced Permeability and Retention of Indocyanine Green: Feasibility and False-Positives in Ovarian Cancer*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129766.
226. Yokoyama, J., et al., *Impact of indocyanine green fluorescent image-guided surgery for parapharyngeal space tumours*. J Craniomaxillofac Surg, 2014. **42**(6): p. 835-8.

227. Okusanya, O.T., et al., *Small portable interchangeable imager of fluorescence for fluorescence guided surgery and research*. Technol Cancer Res Treat, 2015. **14**(2): p. 213-20.
228. Kalchenko, V., et al., *Use of lipophilic near-infrared dye in whole-body optical imaging of hematopoietic cell homing*. J Biomed Opt, 2006. **11**(5): p. 050507.
229. Boturyn, D., et al., *Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(18): p. 5730-9.
230. Garanger, E., et al., *New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors*. Mol Ther, 2005. **12**(6): p. 1168-75.
231. Jin, Z.H., et al., *In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors*. Mol Cancer, 2007. **6**: p. 41.
232. Jin, Z.H., et al., *In vivo noninvasive optical imaging of receptor-mediated RGD internalization using self-quenched Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)(4)*. Mol Imaging, 2007. **6**(1): p. 43-55.
233. Jin, Z.H., et al., *Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)(4)*. Mol Imaging, 2006. **5**(3): p. 188-97.
234. Dutour, A., et al., *Targeted imaging of alpha(v)beta(3) expressing sarcoma tumor cells in vivo in pre-operative setting using near infrared: a potential tool to reduce incomplete surgical resection*. Bone, 2014. **62**: p. 71-8.
235. Josserand, V., et al., *Electrochemotherapy guided by intraoperative fluorescence imaging for the treatment of inoperable peritoneal micro-metastases*. J Control Release, 2016. **233**: p. 81-7.
236. Keramidas, M., et al., *Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model*. Br J Surg, 2010. **97**(5): p. 737-43.
237. Atallah, I., et al., *Near-infrared fluorescence imaging-guided surgery improves recurrence-free survival rate in novel orthotopic animal model of head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2016. **38 Suppl 1**: p. E246-55.
238. Bellanger, A., et al., *The critical role of the ZNF217 oncogene in promoting breast cancer metastasis to the bone*. J Pathol, 2017.
239. Wenk, C.H., et al., *Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti-alpha(v)beta(3) integrin molecular probe*. Cancer Lett, 2013. **334**(2): p. 188-95.
240. Keramidas, M., et al., *Noninvasive and Quantitative Assessment of In Vivo Fetomaternal Interface Angiogenesis Using RGD-Based Fluorescence*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 309082.
241. Funovics, M., R. Weissleder, and C.H. Tung, *Protease sensors for bioimaging*. Anal Bioanal Chem, 2003. **377**(6): p. 956-63.
242. Ntziachristos, V., *Fluorescence molecular imaging*. Annu Rev Biomed Eng, 2006. **8**: p. 1-33.
243. Rao, J., A. Dragulescu-Andrasi, and H. Yao, *Fluorescence imaging in vivo: recent advances*. Curr Opin Biotechnol, 2007. **18**(1): p. 17-25.
244. AV, D.S., et al., *Review of fluorescence guided surgery systems: identification of key performance capabilities beyond indocyanine green imaging*. J Biomed Opt, 2016. **21**(8): p. 80901.
245. Nagaya, T., et al., *Fluorescence-Guided Surgery*. Front Oncol, 2017. **7**: p. 314.
246. Bell, A.G., *The Photophone*. Science, 1880. **1**(11): p. 130-4.

247. Bowen, T., *Radiation-Induced Thermoacoustic Imaging* U.o.A. Foundation, Editor. 1983: USA.
248. Wang, X., et al., *Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(7): p. 803-6.
249. Joseph, J., et al., *Evaluation of Precision in Optoacoustic Tomography for Preclinical Imaging in Living Subjects*. J Nucl Med, 2017. **58**(5): p. 807-814.
250. Becker, A., et al., *Multispectral optoacoustic tomography of the human breast: characterisation of healthy tissue and malignant lesions using a hybrid ultrasound-optoacoustic approach*. Eur Radiol, 2018. **28**(2): p. 602-609.
251. Kruger, R.A., et al., *Photoacoustic angiography of the breast*. Med Phys, 2010. **37**(11): p. 6096-100.
252. Bohndiek, S.E., et al., *Development and application of stable phantoms for the evaluation of photoacoustic imaging instruments*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e75533.
253. Li, L., et al., *Single-impulse Panoramic Photoacoustic Computed Tomography of Small-animal Whole-body Dynamics at High Spatiotemporal Resolution*. Nat Biomed Eng, 2017. **1**(5).
254. Fehm, T.F., et al., *Volumetric optoacoustic imaging feedback during endovenous laser therapy - an ex vivo investigation*. J Biophotonics, 2016. **9**(9): p. 934-41.
255. Hariri, A., et al., *The characterization of an economic and portable LED-based photoacoustic imaging system to facilitate molecular imaging*. Photoacoustics, 2018. **9**: p. 10-20.
256. Zackrisson, S., S. van de Ven, and S.S. Gambhir, *Light in and sound out: emerging translational strategies for photoacoustic imaging*. Cancer Res, 2014. **74**(4): p. 979-1004.
257. Cox, B., et al., *Quantitative spectroscopic photoacoustic imaging: a review*. J Biomed Opt, 2012. **17**(6): p. 061202.
258. Luke, G.P., S.Y. Nam, and S.Y. Emelianov, *Optical wavelength selection for improved spectroscopic photoacoustic imaging*. Photoacoustics, 2013. **1**(2): p. 36-42.
259. Wang, X., et al., *Noninvasive imaging of hemoglobin concentration and oxygenation in the rat brain using high-resolution photoacoustic tomography*. J Biomed Opt, 2006. **11**(2): p. 024015.
260. Rich, L.J. and M. Seshadri, *Photoacoustic monitoring of tumor and normal tissue response to radiation*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 21237.
261. Rich, L.J., et al., *Photoacoustic Imaging as an Early Biomarker of Radio Therapeutic Efficacy in Head and Neck Cancer*. Theranostics, 2018. **8**(8): p. 2064-2078.
262. Yao, J. and L.V. Wang, *Recent progress in photoacoustic molecular imaging*. Curr Opin Chem Biol, 2018. **45**: p. 104-112.
263. Burton, N.C., et al., *Multispectral opto-acoustic tomography (MSOT) of the brain and glioblastoma characterization*. Neuroimage, 2013. **65**: p. 522-8.
264. Wang, H., et al., *In vivo photoacoustic molecular imaging of breast carcinoma with folate receptor-targeted indocyanine green nanoprobe*. Nanoscale, 2014. **6**(23): p. 14270-9.
265. Beziere, N., et al., *Dynamic imaging of PEGylated indocyanine green (ICG) liposomes within the tumor microenvironment using multi-spectral optoacoustic tomography (MSOT)*. Biomaterials, 2015. **37**: p. 415-24.
266. Kannadorai, R.K., S.K. Udumala, and Y.W. Sidney, *Noninvasive in vivo multispectral optoacoustic imaging of apoptosis in triple negative breast cancer using indocyanine*

- green conjugated phosphatidylserine monoclonal antibody*. J Biomed Opt, 2016. **21**(12): p. 126002.
267. Gao, C., et al., *Near-infrared dye-loaded magnetic nanoparticles as photoacoustic contrast agent for enhanced tumor imaging*. Cancer Biol Med, 2016. **13**(3): p. 349-359.
268. Liu, F., et al., *Folate-receptor-targeted laser-activable poly(lactide-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with paclitaxel/indocyanine green for photoacoustic/ultrasound imaging and chemo/photothermal therapy*. Int J Nanomedicine, 2018. **13**: p. 5139-5158.
269. Li, Y., et al., *Chemotherapeutic drug-photothermal agent co-self-assembling nanoparticles for near-infrared fluorescence and photoacoustic dual-modal imaging-guided chemo-photothermal synergistic therapy*. J Control Release, 2017. **258**: p. 95-107.
270. Temma, T., et al., *Preclinical evaluation of a novel cyanine dye for tumor imaging with in vivo photoacoustic imaging*. J Biomed Opt, 2014. **19**(9): p. 090501.
271. Chen, J., et al., *Indocyanine Green Loaded Reduced Graphene Oxide for In Vivo Photoacoustic/Fluorescence Dual-Modality Tumor Imaging*. Nanoscale Res Lett, 2016. **11**(1): p. 85.
272. Beziere, N. and V. Ntziachristos, *Optoacoustic imaging of naphthalocyanine: potential for contrast enhancement and therapy monitoring*. J Nucl Med, 2015. **56**(2): p. 323-8.
273. Sano, K., et al., *Indocyanine Green-Labeled Polysarcosine for in Vivo Photoacoustic Tumor Imaging*. Bioconjug Chem, 2017. **28**(4): p. 1024-1030.
274. Shi, Z., et al., *Self-Assembled Metal-Organic Nanoparticles for Multimodal Imaging-Guided Photothermal Therapy of Hepatocellular Carcinoma*. J Biomed Nanotechnol, 2018. **14**(11): p. 1934-1943.
275. Guan, T., et al., *From Detection to Resection: Photoacoustic Tomography and Surgery Guidance with Indocyanine Green Loaded Gold Nanorod@liposome Core-Shell Nanoparticles in Liver Cancer*. Bioconjug Chem, 2017. **28**(4): p. 1221-1228.
276. Capozza, M., et al., *Photoacoustic imaging of integrin-overexpressing tumors using a novel ICG-based contrast agent in mice*. Photoacoustics, 2018. **11**: p. 36-45.
277. Sano, K., et al., *In vivo photoacoustic imaging of cancer using indocyanine green-labeled monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **464**(3): p. 820-5.
278. Uthaman, S., et al., *Tumor homing indocyanine green encapsulated micelles for near infrared and photoacoustic imaging of tumors*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2016. **104**(4): p. 825-34.
279. Wang, G., et al., *Nanotubes-Embedded Indocyanine Green-Hyaluronic Acid Nanoparticles for Photoacoustic-Imaging-Guided Phototherapy*. ACS Appl Mater Interfaces, 2016. **8**(8): p. 5608-17.
280. Zhang, C., et al., *Photoacoustic and Fluorescence Imaging of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Living Subjects Using a Probe Targeting Integrin α v β 6*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 42442.
281. Gao, S., et al., *Oxygen-generating hybrid nanoparticles to enhance fluorescent/photoacoustic/ultrasound imaging guided tumor photodynamic therapy*. Biomaterials, 2017. **112**: p. 324-335.
282. Beztsinna, N., et al., *Photoacoustic imaging of tumor targeting with riboflavin-functionalized theranostic nanocarriers*. Int J Nanomedicine, 2017. **12**: p. 3813-3825.

283. Kimbrough, C.W., et al., *Orthotopic pancreatic tumors detected by optoacoustic tomography using Syndecan-1*. J Surg Res, 2015. **193**(1): p. 246-54.
284. Okumura, K., et al., *Photoacoustic imaging of tumour vascular permeability with indocyanine green in a mouse model*. Eur Radiol Exp, 2018. **2**(1): p. 5.
285. Nagaoka, R., et al., *Visualization of murine lymph vessels using photoacoustic imaging with contrast agents*. Photoacoustics, 2018. **9**: p. 39-48.
286. Lovell, J.F., et al., *Porphysome nanovesicles generated by porphyrin bilayers for use as multimodal biophotonic contrast agents*. Nat Mater, 2011. **10**(4): p. 324-32.
287. Rong, P., et al., *Fluorescence Dye Loaded Nano-graphene for Multimodal Imaging Guided Photothermal Therapy*. RSC Adv, 2016. **6**(3): p. 1894-1901.
288. Chen, Q., et al., *A Self-Assembled Albumin-Based Nanoprobe for In Vivo Ratiometric Photoacoustic pH Imaging*. Adv Mater, 2015. **27**(43): p. 6820-7.
289. Huang, P., et al., *Dye-loaded ferritin nanocages for multimodal imaging and photothermal therapy*. Adv Mater, 2014. **26**(37): p. 6401-8.
290. Zhou, Y., et al., *A Phosphorus Phthalocyanine Formulation with Intense Absorbance at 1000 nm for Deep Optical Imaging*. Theranostics, 2016. **6**(5): p. 688-97.
291. Amit P. Jathoul, J.L., Olumide Ogunlade, Bradley Treeby, Ben Cox, Edward Zhang,, A.R.P. Peter Johnson, Brian Philip, Teresa Marafioti, Mark F. Lythgoe,, and M.A.P. R. Barbara Pedley, Paul Beard, *Deep in vivo photoacoustic imaging of mammalian tissues using a tyrosinase-based genetic reporter*. Nature Photonics, 2015. **22**(Nphoton.2015.22).
292. Knox, H.J., et al., *A bio-reducible N-oxide-based probe for photoacoustic imaging of hypoxia*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1794.
293. Zhang, T., et al., *Targeted nanodiamonds as phenotype-specific photoacoustic contrast agents for breast cancer*. Nanomedicine (Lond), 2015. **10**(4): p. 573-87.
294. Sheng, Z., et al., *Protein-assisted fabrication of nano-reduced graphene oxide for combined in vivo photoacoustic imaging and photothermal therapy*. Biomaterials, 2013. **34**(21): p. 5236-43.
295. Ge, J., et al., *Red-Emissive Carbon Dots for Fluorescent, Photoacoustic, and Thermal Theranostics in Living Mice*. Adv Mater, 2015. **27**(28): p. 4169-77.
296. Homan, K.A., et al., *Silver nanoplate contrast agents for in vivo molecular photoacoustic imaging*. ACS Nano, 2012. **6**(1): p. 641-50.
297. Ray, A., et al., *Lifetime-based photoacoustic oxygen sensing in vivo*. J Biomed Opt, 2012. **17**(5): p. 057004.
298. Nie, L., et al., *In vivo volumetric photoacoustic molecular angiography and therapeutic monitoring with targeted plasmonic nanostars*. Small, 2014. **10**(8): p. 1585-93, 1441.
299. Chen, M., et al., *Core-shell Pd@Au nanoplates as theranostic agents for in-vivo photoacoustic imaging, CT imaging, and photothermal therapy*. Adv Mater, 2014. **26**(48): p. 8210-6.
300. Chen, W.H., et al., *Multifunctional theranostic nanoplatform for cancer combined therapy based on gold nanorods*. Adv Healthc Mater, 2015. **4**(15): p. 2247-59.
301. Li, W., et al., *Semimetal nanomaterials of antimony as highly efficient agent for photoacoustic imaging and photothermal therapy*. Biomaterials, 2015. **45**: p. 18-26.
302. Zhong, J., et al., *Imaging-guided high-efficient photoacoustic tumor therapy with targeting gold nanorods*. Nanomedicine, 2015. **11**(6): p. 1499-509.

303. Zhang, Y.S., et al., *Labeling human mesenchymal stem cells with gold nanocages for in vitro and in vivo tracking by two-photon microscopy and photoacoustic microscopy*. *Theranostics*, 2013. **3**(8): p. 532-43.
304. Sun, T., et al., *Using SV119-gold nanocage conjugates to eradicate cancer stem cells through a combination of photothermal and chemo therapies*. *Adv Healthc Mater*, 2014. **3**(8): p. 1283-91.
305. Topete, A., et al., *Fluorescent drug-loaded, polymeric-based, branched gold nanoshells for localized multimodal therapy and imaging of tumoral cells*. *ACS Nano*, 2014. **8**(3): p. 2725-38.
306. Song, J., et al., *Ultrasmall Gold Nanorod Vesicles with Enhanced Tumor Accumulation and Fast Excretion from the Body for Cancer Therapy*. *Adv Mater*, 2015. **27**(33): p. 4910-7.
307. Cheng, L., et al., *PEGylated WS(2) nanosheets as a multifunctional theranostic agent for in vivo dual-modal CT/photoacoustic imaging guided photothermal therapy*. *Adv Mater*, 2014. **26**(12): p. 1886-93.
308. Yang, M., et al., *Dragon fruit-like biocage as an iron trapping nanoplatfom for high efficiency targeted cancer multimodality imaging*. *Biomaterials*, 2015. **69**: p. 30-7.
309. Liu, J., et al., *Bismuth sulfide nanorods as a precision nanomedicine for in vivo multimodal imaging-guided photothermal therapy of tumor*. *ACS Nano*, 2015. **9**(1): p. 696-707.
310. Liu, T., et al., *Iron oxide decorated MoS₂ nanosheets with double PEGylation for chelator-free radiolabeling and multimodal imaging guided photothermal therapy*. *ACS Nano*, 2015. **9**(1): p. 950-60.
311. Sheng, Z., et al., *Smart human serum albumin-indocyanine green nanoparticles generated by programmed assembly for dual-modal imaging-guided cancer synergistic phototherapy*. *ACS Nano*, 2014. **8**(12): p. 12310-22.
312. Wang, S., et al., *A Facile One-Pot Synthesis of a Two-Dimensional MoS₂ /Bi₂S₃ Composite Theranostic Nanosystem for Multi-Modality Tumor Imaging and Therapy*. *Adv Mater*, 2015. **27**(17): p. 2775-82.
313. Lewinski, N., V. Colvin, and R. Drezek, *Cytotoxicity of nanoparticles*. *Small*, 2008. **4**(1): p. 26-49.
314. Yang, K., et al., *Multimodal imaging guided photothermal therapy using functionalized graphene nanosheets anchored with magnetic nanoparticles*. *Adv Mater*, 2012. **24**(14): p. 1868-72.
315. Lin, L.S., et al., *Multifunctional Fe(3)O(4)@polydopamine core-shell nanocomposites for intracellular mRNA detection and imaging-guided photothermal therapy*. *ACS Nano*, 2014. **8**(4): p. 3876-83.
316. Pu, K., et al., *Diketopyrrolopyrrole-Based Semiconducting Polymer Nanoparticles for In Vivo Photoacoustic Imaging*. *Adv Mater*, 2015. **27**(35): p. 5184-90.
317. Lin, J., et al., *Multimodal-Imaging-Guided Cancer Phototherapy by Versatile Biomimetic Theranostics with UV and gamma-Irradiation Protection*. *Adv Mater*, 2016. **28**(17): p. 3273-9.
318. Tian, G., et al., *Multifunctional Rbx WO₃ nanorods for simultaneous combined chemo-photothermal therapy and photoacoustic/CT imaging*. *Small*, 2014. **10**(20): p. 4160-70.

319. Jin, Y., et al., *Encapsulating tantalum oxide into polypyrrole nanoparticles for X-ray CT/photoacoustic bimodal imaging-guided photothermal ablation of cancer*. *Biomaterials*, 2014. **35**(22): p. 5795-804.
320. Zhang, R., et al., *Engineering Melanin Nanoparticles as an Efficient Drug-Delivery System for Imaging-Guided Chemotherapy*. *Adv Mater*, 2015. **27**(34): p. 5063-9.
321. Cheng, L., et al., *Organic stealth nanoparticles for highly effective in vivo near-infrared photothermal therapy of cancer*. *ACS Nano*, 2012. **6**(6): p. 5605-13.
322. Chen, D., et al., *Ultra-broadband near-infrared excitable upconversion core/shell nanocrystals*. *Chem Commun (Camb)*, 2012. **48**(47): p. 5898-900.
323. Jose, J., et al., *Initial results of imaging melanoma metastasis in resected human lymph nodes using photoacoustic computed tomography*. *J Biomed Opt*, 2011. **16**(9): p. 096021.
324. Zhou, Y., et al., *Handheld photoacoustic microscopy to detect melanoma depth in vivo*. *Opt Lett*, 2014. **39**(16): p. 4731-4.
325. Langhout, G.C., et al., *Detection of melanoma metastases in resected human lymph nodes by noninvasive multispectral photoacoustic imaging*. *Int J Biomed Imaging*, 2014. **2014**: p. 163652.
326. Kim, C., et al., *Handheld array-based photoacoustic probe for guiding needle biopsy of sentinel lymph nodes*. *J Biomed Opt*, 2010. **15**(4): p. 046010.
327. Erpelding, T.N., et al., *Sentinel lymph nodes in the rat: noninvasive photoacoustic and US imaging with a clinical US system*. *Radiology*, 2010. **256**(1): p. 102-10.
328. Dogra, V.S., et al., *Preliminary results of ex vivo multispectral photoacoustic imaging in the management of thyroid cancer*. *AJR Am J Roentgenol*, 2014. **202**(6): p. W552-8.
329. Valluru, K.S., B.K. Chinni, and N.A. Rao, *Photoacoustic imaging: opening new frontiers in medical imaging*. *J Clin Imaging Sci*, 2011. **1**: p. 24.
330. Dogra, V.S., et al., *Multispectral Photoacoustic Imaging of Prostate Cancer: Preliminary Ex-vivo Results*. *J Clin Imaging Sci*, 2013. **3**: p. 41.
331. Valluru, K.S. and J.K. Willmann, *Clinical photoacoustic imaging of cancer*. *Ultrasonography*, 2016. **35**(4): p. 267-80.
332. Aguirre, A., et al., *Potential role of coregistered photoacoustic and ultrasound imaging in ovarian cancer detection and characterization*. *Transl Oncol*, 2011. **4**(1): p. 29-37.
333. Alqasemi, U., et al., *Recognition algorithm for assisting ovarian cancer diagnosis from coregistered ultrasound and photoacoustic images: ex vivo study*. *J Biomed Opt*, 2012. **17**(12): p. 126003.
334. Kumavor, P.D., et al., *Co-registered pulse-echo/photoacoustic transvaginal probe for real time imaging of ovarian tissue*. *J Biophotonics*, 2013. **6**(6-7): p. 475-84.
335. Peng, K., et al., *Detection of cervical cancer based on photoacoustic imaging-the in-vitro results*. *Biomed Opt Express*, 2015. **6**(1): p. 135-43.
336. Staley, J., et al., *Growth of melanoma brain tumors monitored by photoacoustic microscopy*. *J Biomed Opt*, 2010. **15**(4): p. 040510.
337. Galanzha, E.I., et al., *In vivo, noninvasive, label-free detection and eradication of circulating metastatic melanoma cells using two-color photoacoustic flow cytometry with a diode laser*. *Cancer Res*, 2009. **69**(20): p. 7926-34.
338. McCormack, D., et al., *Photoacoustic detection of melanoma micrometastasis in sentinel lymph nodes*. *J Biomech Eng*, 2009. **131**(7): p. 074519.

339. Favazza, C.P., et al., *In vivo photoacoustic microscopy of human cutaneous microvasculature and a nevus*. J Biomed Opt, 2011. **16**(1): p. 016015.
340. Petri, M., et al., *Photoacoustic imaging of real-time oxygen changes in chronic leg ulcers after topical application of a haemoglobin spray: a pilot study*. J Wound Care, 2016. **25**(2): p. 87, 89-91.
341. Knieling, F., et al., *Multispectral Optoacoustic Tomography for Assessment of Crohn's Disease Activity*. N Engl J Med, 2017. **376**(13): p. 1292-1294.
342. Manohar, S., et al., *Initial results of in vivo non-invasive cancer imaging in the human breast using near-infrared photoacoustics*. Opt Express, 2007. **15**(19): p. 12277-85.
343. Ermilov, S.A., et al., *Laser optoacoustic imaging system for detection of breast cancer*. J Biomed Opt, 2009. **14**(2): p. 024007.
344. Heijblom, M., et al., *The state of the art in breast imaging using the Twente Photoacoustic Mammoscope: results from 31 measurements on malignancies*. Eur Radiol, 2016. **26**(11): p. 3874-3887.
345. Heijblom, M., et al., *Visualizing breast cancer using the Twente photoacoustic mammoscope: what do we learn from twelve new patient measurements?* Opt Express, 2012. **20**(11): p. 11582-97.
346. Kitai, T. and M. Toi, [*Photoacoustic mammography for the diagnosis of breast cancer*]. Nihon Rinsho, 2012. **70 Suppl 7**: p. 326-30.
347. Kitai, T., et al., *Photoacoustic mammography: initial clinical results*. Breast Cancer, 2014. **21**(2): p. 146-53.
348. Lavaud, J., et al., *Exploration of melanoma metastases in mice brains using endogenous contrast photoacoustic imaging*. Int J Pharm, 2017. **532**(2): p. 704-709.
349. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
350. Brooks, P.C., et al., *Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1157-64.
351. Aumailley, M., et al., *Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1*. FEBS Lett, 1991. **291**(1): p. 50-4.
352. Garanger, E., et al., *Multivalent RGD synthetic peptides as potent alphaVbeta3 integrin ligands*. Org Biomol Chem, 2006. **4**(10): p. 1958-65.
353. Atallah, I., et al., *Role of near-infrared fluorescence imaging in head and neck cancer surgery: from animal models to humans*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2014.
354. Dufort, S., et al., *Nebulized gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization*. Small, 2015. **11**(2): p. 215-21.
355. Guilleminault, L., et al., *Fate of inhaled monoclonal antibodies after the deposition of aerosolized particles in the respiratory system*. J Control Release, 2014. **196**: p. 344-54.
356. Yameogo, J.B., et al., *Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as potential Artemisinin nanocarriers. II: In vitro behavior toward the immune system and in vivo biodistribution assessment of unloaded nanoparticles*. Eur J Pharm Biopharm, 2014.
357. Rich, L.J. and M. Seshadri, *Photoacoustic imaging of vascular hemodynamics: validation with blood oxygenation level-dependent MR imaging*. Radiology, 2015. **275**(1): p. 110-8.

358. Gothelf, A., P. Hojman, and J. Gehl, *Change in Hemoglobin Levels due to Anesthesia in Mice: An Important Confounder in Studies on Hematopoietic Drugs*. Biol Proced Online, 2009. **11**: p. 325-30.
359. Kai, S., et al., *The volatile anesthetic isoflurane differentially suppresses the induction of erythropoietin synthesis elicited by acute anemia and systemic hypoxemia in mice in an hypoxia-inducible factor-2-dependent manner*. Eur J Pharmacol, 2014. **732**: p. 43-9.
360. Masamoto, K. and K. Tanishita, *Oxygen transport in brain tissue*. J Biomech Eng, 2009. **131**(7): p. 074002.
361. Giavarina, D., *Understanding Bland Altman analysis*. Biochem Med (Zagreb), 2015. **25**(2): p. 141-51.
362. Hu, S., K. Maslov, and L.V. Wang, *Second-generation optical-resolution photoacoustic microscopy with improved sensitivity and speed*. Opt Lett, 2011. **36**(7): p. 1134-6.
363. Shao, P., et al., *Mosaic acquisition and processing for optical-resolution photoacoustic microscopy*. J Biomed Opt, 2012. **17**(8): p. 080503-1.
364. Laufer, J., et al., *Quantitative spatially resolved measurement of tissue chromophore concentrations using photoacoustic spectroscopy: application to the measurement of blood oxygenation and haemoglobin concentration*. Phys Med Biol, 2007. **52**(1): p. 141-68.
365. Jiang, Y., et al., *Blood oxygen flux estimation with a combined photoacoustic and high-frequency ultrasound microscopy system: a phantom study*. J Biomed Opt, 2012. **17**(3): p. 036012.
366. Yu, M. and J. Zheng, *Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles*. ACS Nano, 2015. **9**(7): p. 6655-74.
367. Jolesz, F., *Intraoperative Imaging and Image-Guided Therapy*. 2014: Springer-Verlag New York. XVII, 893.
368. Mery, E., et al., *Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal dissemination of ovarian carcinomas. A preclinical study*. Gynecol Oncol, 2011. **122**(1): p. 155-62.
369. Wang, S., et al., *Recent Advances in Photoacoustic Imaging for Deep-Tissue Biomedical Applications*. Theranostics, 2016. **6**(13): p. 2394-2413.
370. Kruskal, J.B., et al., *Hepatic colorectal cancer metastases: imaging initial steps of formation in mice*. Radiology, 2007. **243**(3): p. 703-11.
371. Kruskal, J.B., et al., *Hepatic colon cancer metastases in mice: dynamic in vivo correlation with hypoechoic rims visible at US*. Radiology, 2000. **215**(3): p. 852-7.
372. Mannheim, J.G., et al., *Comparison of small animal CT contrast agents*. Contrast Media Mol Imaging, 2016. **11**(4): p. 272-84.
373. Desmettre, T., J.M. Devoisselle, and S. Mordon, *Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography*. Surv Ophthalmol, 2000. **45**(1): p. 15-27.
374. Miyata, A., et al., *Photoacoustic tomography of human hepatic malignancies using intraoperative indocyanine green fluorescence imaging*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112667.

Résumé

L'imagerie préclinique *in vivo* en oncologie représente un outil de choix pour étudier les mécanismes qui régissent cette pathologie mais également pour évaluer des solutions diagnostiques et thérapeutiques innovantes. Chaque modalité d'imagerie possède ses propres atouts et limites et c'est pourquoi il existe un réel bénéfice à associer plusieurs modalités pour recueillir des informations complémentaires. Dans la première partie de ce travail, la combinaison de l'imagerie de fluorescence 3-D avec l'imagerie microCT a été mise en œuvre et s'est montrée particulièrement pertinente pour la caractérisation de différents modèles animaux de cancers pulmonaires représentant chacun spécifiquement une ou plusieurs étapes du développement tumoral primaire à l'invasion métastatique. Dans une seconde partie, nous avons évalué le potentiel de l'imagerie photoacoustique pour l'imagerie non-invasive de la vascularisation et de l'oxygénation tissulaire dans différents contextes physiopathologiques chez la souris ainsi que chez l'homme, démontrant ainsi son fort potentiel translationnel. Des agents de contrastes fluorescents et photoacoustiques ont été utilisés pour augmenter le contraste tumoral et suivre les variations de niveau d'expression de biomarqueurs d'intérêt et le bénéfice apporté par l'utilisation d'un marqueur présentant une spécificité tumorale a été démontré. En parallèle des études biologiques, des développements technologiques en imagerie photoacoustique ont été initiés en vue d'améliorer le potentiel applicatif de cette modalité d'imagerie.

Abstract

In vivo preclinical imaging in oncology is a tool of choice to study the mechanisms that govern this pathology as well as for the evaluation of innovative diagnostic and therapeutic solutions. Each imaging modality has its own strengths and limitations and that's why there is a real benefit to combine several modalities to collect complementary information. In the first part of this work, the combination of 3-D fluorescence imaging with microCT imaging has been implemented and has been particularly relevant for the characterization of different animal models of lung cancer mimicking one or several stages from primary tumor development to metastatic invasion. In a second part, we assessed the potential of photoacoustic imaging for non-invasive imaging of vascularization and tissue oxygenation in different pathophysiological contexts in mice as well as in humans, thus demonstrating its high translational potential. Fluorescent and photoacoustic contrast agents have been used to increase tumor contrast and monitor changes in the level of expression of biomarkers of interest and the benefit provided by the use of a tumor specific marker has been demonstrated. In parallel with biological studies, technological developments in photoacoustic imaging have been initiated in order to improve the application potential of this imaging modality.