

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Batna-2- Mostefa Benboulaïd



Faculté de Technologie
Département d'Électronique



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de
DOCTORAT 3^{ème} Cycle LMD
Spécialité: **Électronique**
Option: **Électronique médicale**

Par

TAFSAST Abdelghani

Thème

**Analyse d'image médicale par des méthodes de
regroupements: Application en cancérologie**

Soutenue le 31/10/2017
Devant le jury:

Nom & Prénoms	Grade	Qualité	Université/Etablissement
DIBI Zohir	Professeur	Président	Batna -2- Mostefa Benboulaïd
BENOUDJIT Nabil	Professeur	Rapporteur	Batna -2- Mostefa Benboulaïd
HADJILI Mohamed Laid	Maître de conférences A	Co-Rapporteur	HE2B-ESI Bruxelles (Belgique)
GOLEA Nouredine	Professeur	Examineur	Oum El Bouaghi
GHOOGALI Nouredine	Maître de conférences A	Examineur	Batna -2- Mostefa Benboulaïd
BENZID Redha	Professeur	Examineur	Batna -2- Mostefa Benboulaïd
BOUAKAZ Ayache	Directeur de recherche	Invité	François Rabelais Tours (France)

À mes chers parents

À mes chers frères

À mes chères sœurs

Remerciements

Je remercie avant tout Allah pour m'avoir donné la santé, et la patience pour achever ce travail.

Je tiens à remercier très sincèrement le professeur BENOUDJIT Nabil pour avoir accepté de diriger mes travaux de thèse, et aussi pour ses encouragements, son soutien, ses conseils et orientations.

Je remercie également le docteur HADJILI Mohamed Laid pour avoir accepté de codiriger mes travaux de thèse, et aussi pour ses conseils, son accueil lors de mes deux séjours au laboratoire d'automatique à l'Ecole Supérieure d'Informatique-HE2B à Bruxelles en Belgique et pour ses encouragements durant cette thèse.

Je remercie les membres du jury : le professeur DIBI Zohir, le professeur GOLEA Nouredine, le professeur BENZID Redha et le docteur GHOGGALI Nouredine d'avoir accepté de consacrer un peu de leurs temps pour lire et juger ce travail.

Je remercie également le professeur BOUAKAZ Ayache pour son aide précieuse et pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire de recherche INSERM U930 de l'université François Rabelais de Tours pendant mes deux séjours en France dans le cadre du projet franco-Algérien (Tassili 14 MDU 909).

Résumé

Le traitement des tumeurs cancéreuses est l'une des disciplines les plus importantes enregistrées en médecine. La détermination exacte du volume tumoral en radiothérapie utilisant l'imagerie de tomographie par émission de positons (TEP) est l'aspect le plus critique. La livraison ciblée et précise des drogues anticancéreuses, sans compromettre le tissu sain entourant, est également un aspect important dans le traitement des tumeurs par chimiothérapie.

C'est pourquoi l'objectif principal de cette thèse est de développer une nouvelle technique de délimitation du volume tumoral biologique (VTB) dans les images TEP pour la planification des traitements par radiothérapie sans provoquer les cellules environnantes. Cette technique est basée sur l'algorithme de regroupements de l'image avec l'identification préalable du nombre approprié de groupes (clusters) pour cette image. Le second objectif est de développer une technique d'évaluation de la réponse tumorale basée sur l'analyse de la courbe de perfusion tumorale dans les images paramétriques de l'échographie de contraste (EC) et ceci pour la démonstration du potentiel de la technique de sonoporation en terme de l'augmentation de l'efficacité du traitement chimio-thérapeutique.

Les résultats obtenus sont suffisamment satisfaisants. La technique fournie pour la segmentation précise du volume tumoral biologique en traitement par radiothérapie a donné excellents résultats comparativement aux techniques existantes. De même, la technique utilisée appréhende également mieux l'évaluation de la réponse tumorale, en traitement chimio-thérapeutique. Rentre en complément la mise en œuvre de l'analyse de la courbe de la perfusion tumorale dans les images paramétriques de l'échographie de contraste, laquelle a donnée de bons résultats et a montrée l'impact du traitement chimique par la technique de sonoporation.

Mots clés: Imagerie du cancer, TEP-FDG, Echographie de contraste, Algorithmes de regroupements, Segmentation d'image, Radiothérapie, Thérapie ciblée, Sonoporation, Perfusion tumorale.

Abstract

The treatment of cancerous tumours is one of the most important disciplines recorded in medicine. In radiotherapy using Positron Emission Tomography (PET) imaging, the most critical aspect is the exact determination of tumour volume. The targeted and accurate delivery of anti-cancer drugs, without compromising the surrounding healthy tissue, is also an important aspect in the treatment of tumours by chemotherapy.

This is why the main objective of this thesis is to develop a new technique for delimiting the Biological Tumour Volume (BTV) in PET images for the planning of radiotherapy treatments without causing the surrounding cells. This technique is based on the algorithm of clustering of the image with a prior identification of the appropriate number of clusters for this image. The second objective is to develop a technique for the evaluation of the tumour response based on the analysis of the tumour perfusion curve in the parametric images of Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) and this for the demonstration of the potential of the sonoporation technique in terms of increasing the effectiveness of chemo-therapeutic treatment.

The results obtained are sufficiently satisfactory. The technique provided for the accurate segmentation of biological tumour volume into radiotherapy treatment has given excellent results compared to existing techniques. Similarly, the technique used is also better adapted to the evaluation of the tumour response, in chemo-therapeutic treatment. Complementing the implementation of the analysis of the tumour perfusion curve in the parametric images of contrast ultrasound, which gave good results and showed the impact of chemical treatment by the sonoporation technique.

Keywords: Cancer imaging, FDG-PET, Contrast-Enhanced Ultrasound, Clustering algorithms, Image segmentation, Radiotherapy, Targeted therapy, Sonoporation, Tumour perfusion.

ملخص

علاج الأورام السرطانية هو واحد من أهم التخصصات المسجلة في ميدان الطب. في العلاج الإشعاعي باستخدام التصوير المقطعي بالإصدار البوزيتروني (PET)، الجانب الأكثر أهمية هو التحديد الدقيق لحجم الورم. إن التسليم المستهدف والدقيق للأدوية المضادة للسرطان، دون المساس بالأنسجة السليمة المحيطة، هو أيضا جانب هام في علاج الأورام عن طريق العلاج الكيميائي.

الهدف الرئيسي من هذه الرسالة هو تطوير تقنية جديدة لتحديد حجم الورم البيولوجي (BTV) في صور PET لتخطيط العلاج الإشعاعي دون التسبب في إتلاف الخلايا المحيطة بها. وتستند هذه التقنية على خوارزمية تجميع الصورة مع تحديد مسبق للعدد المناسب من المجموعات لهذه الصورة. والهدف الثاني هو تطوير تقنية لتقييم استجابة الورم من خلال تحليل منحنى نضح الورم في صور الموجات فوق الصوتية المتقاربة (CEUS) وهذا لإثبات إمكانات تقنية Sonoporation من حيث زيادة فعالية العلاج الكيميائي.

النتائج التي تم الحصول عليها مرضية بما فيه الكفاية. وقد وفرت التقنية المقدمة لتحديد الدقيق لحجم الورم البيولوجي في العلاج الإشعاعي نتائج ممتازة بالمقارنة مع التقنيات القائمة. وبالمثل، فإن التقنية المستخدمة هي أيضا أفضل لتقييم استجابة الورم في العلاج الكيميائي. استكمالا لذلك، التقنية المقدمة لتقييم استجابة الورم من خلال تحليل منحنى نضح الورم في صور الموجات فوق الصوتية (CEUS) أعطت نتائج جيدة وأظهرت تأثير العلاج الكيميائي بواسطة تقنية Sonoporation.

كلمات مفتاحية: تصوير السرطان، FDG-PET، الموجات فوق الصوتية المتقاربة، خوارزميات التجميع، تجزئة الصورة، العلاج الإشعاعي، العلاج المستهدف، Sonoporation، نضح الورم.

Table des matières

Remerciements.....	i
Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
ملخص.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des abréviations.....	xiv
Introduction.....	01
Chapitre I : Tomographie par émission de positons (TEP).....	06
I.1. Introduction.....	07
I.2. L'imagerie de tomographie par émission de positons (TEP).....	07
I.2.1. Principe et fonctionnement.....	07
I.2.1.1. Principes physiques.....	07
I.2.1.2. Détection des photons.....	12
I.2.1.3. TEP temps de vol.....	15
I.2.1.4. Acquisition 2D/3D.....	16
I.2.1.5. Reconstruction des données.....	18
I.2.1.6. Correction des données.....	19
I.2.1.7. Etalonnage.....	22
I.2.1.8. Imagerie multimodalité.....	22
I.2.2. Métabolismes mis en évidence par la TEP/TDM en cancérologie.....	23
I.3. Etude du métabolisme glucidique à l'aide de la fixation du 18F-FDG.....	23
I.3.1. Analyse qualitative.....	23
I.3.2. Mesure du métabolisme glucidique.....	24
I.3.3. Méthodes semi-quantitatives.....	24
I.3.3.1. Valeur de fixation normalisée : le SUV.....	24
I.3.3.2. Rapport tissus tumoraux / tissus sains.....	26
I.4. Conclusion.....	26
Chapitre II : Echographie de contraste (EC).....	27
II.1. Introduction.....	28
II.2. Principes physiques des méthodes d'imagerie de contraste.....	28
II.2.1. Interaction microbulles-ultrasons.....	28
II.2.2. Méthodes d'imagerie de contraste.....	31
II.2.2.1. Imagerie fondamentale.....	31
II.2.2.2. Imagerie harmonique en mode B.....	31
II.2.2.3. Imagerie harmonique des tissus (imagerie harmonique native).....	33
II.3. Imagerie paramétrique pour l'échographie de contraste.....	34
II.3.1. Obstacles à la quantification.....	35
II.3.2. Modélisation de la variation de concentration de PCUS.....	35
II.3.2.1. Approches dirigées par les modèles.....	36

II.3.2.2. Approches dirigées par les données.....	40
II.4. Conclusion.....	45
Chapitre III : Applications de l'échographie de contraste.....	46
III.1. Introduction.....	47
III.2. Application radiologiques de l'échographie de contraste.....	47
III.2.1. Imagerie de la néoangiogenèse.....	47
III.2.2. Imagerie des affections rénales.....	49
III.3. Applications thérapeutiques de l'échographie de contraste (Sonoporation). ..	52
III.3.1. Définition et principe de la sonoporation.....	53
III.3.2. Étude de la sonoporation in vitro.....	54
III.3.3. Étude de la sonoporation in vivo.....	55
III.3.4. Étude du mécanisme d'entrée des molécules dans les cellules par sonoporation.....	56
III.3.5. Application de la sonoporation à la thérapie.....	59
III.3.5.1. Évaluation du potentiel thérapeutique des ultrasons et des Microbulles.....	59
III.3.5.2. Microbulles de gaz et incorporation des agents thérapeutiques.....	60
III.4. Conclusion.....	62
Chapitre IV : Segmentation du volume tumoral biologique (VTB) en imagerie TEP.....	63
IV.1. Introduction.....	64
IV.2. Méthodes de segmentation du volume tumoral biologique (BTV).....	64
IV.2.1. Méthodes de seuillage.....	64
IV.2.1.1. Seuillage fixe.....	65
IV.2.1.2. Seuillage adaptatif.....	66
IV.2.2. Méthodes de segmentation visuelle.....	70
IV.2.3. Méthodes de modélisation stochastique.....	71
IV.2.4. Méthode de gradient «Variational approaches ».....	72
IV.2.5. Méthodes de segmentation par apprentissage.....	72
IV.3. Critères d'évaluation.....	74
IV.3.1. Critère de l'erreur du volume.....	74
IV.3.2. Critère de l'indice de similarité.....	74
IV.3.3. Critère de l'erreur de classification.....	75
IV.4. Conclusion.....	75
Chapitre V : Méthodes de regroupements pour la segmentation du VTB: Méthodes et résultats.....	76
V.1. Introduction.....	77
V.2. Etude clinique.....	77
V.2.1. Acquisition d'image.....	78
V.2.2. Traitement de l'échantillon chirurgical.....	79
V.2.3. Correction d'images (recalage).....	80

V.3. Méthodes.....	81
V.3.1. Méthode basée sur le regroupement (clustering) par le modèle de mélange de Gaussiennes (ou GMM).....	81
V.3.1.1. Images groupées par GMM.....	82
V.3.1.2. Sélection GMM en utilisant le critère d'information Akaike (AIC)..	83
V.3.1.3. Segmentation du volume tumoral biologique (VTB).....	84
V.3.2. Méthode basée sur le regroupement (clustering) par k-means.....	84
V.3.2.1. Estimation du nombre optimal de clusters (classes).....	84
V.3.2.2. Nouveau critère pour la détermination automatique du nombre optimal de classes.....	88
V.4. Résultats et discussions.....	93
V.4.1. Résultats obtenus par GMM-AIC.....	93
V.4.2. Résultats obtenus par k-means combiné avec le critère r.....	95
V.5. Conclusion.....	98
Chapitre VI : Sonoporation pour la thérapie ciblée des tumeurs: Manipulations et résultats.....	99
VI.1. Introduction.....	100
VI.2. Livraison d'Irinotécan par ultrasons assistés par microbulles.....	100
VI.2.1. Etude expérimentale.....	100
VI.2.1.1. Produits chimiques.....	100
VI.2.1.2. Les cellules.....	101
VI.2.1.3. Installation par ultrasons.....	101
VI.2.1.4. Délivrance in vivo de l'Irinotécan.....	101
VI.2.1.5. L'imagerie échographique contrastée (EC).....	102
VI.2.1.6. Prétraitement des données.....	104
VI.2.2. Résultats et discussions.....	105
VI.2.2.1. Premier traitement (Tumeur T1).....	106
VI.2.2.2. Deuxième traitement (Tumeur T2).....	110
VI.2.2.3. Deux tumeurs (T1 et T2) ensemble.....	114
VI.3. Livraison de Cétuximab par ultrasons assistés par microbulles.....	119
VI.3.1. Etude expérimentale.....	119
VI.3.2. Résultats et discussions.....	121
VI.3.2.1. 1 ^{ère} manipulation.....	121
VI.3.2.2. 2 ^{ème} manipulation.....	122
VI.4. Conclusion.....	124
Conclusion et Perspectives.....	125
Conclusion.....	126
Perspectives.....	128
Bibliographie.....	129
Publications.....	145

Liste des figures

<p>Fig. 1 : Segmentation (estimation) du volume tumoral dans l'image TEP ; Coupe axiale avec plusieurs estimations du VTB en utilisant différentes méthodes de segmentation</p>	<p>02</p>
<p>Fig. I.1 : Principe de fonctionnement de la TEP ; principe de la mesure en coïncidence (gauche) et illustration des événements issus de l'émission du positon lors de la désexcitation d'un atome de ^{18}F (droite). d : distance effective moyenne parcourue par le positon (tableau I.1) ; mesurée perpendiculairement à la ligne définie par les directions prises par les deux photons issus de l'annihilation.....</p>	<p>10</p>
<p>Fig. I.2 : Principes des différents types de coïncidences en TEP ; Principe d'une coïncidence vraie (A), d'une coïncidence diffusée (B), d'une coïncidence fortuite (C) et d'une coïncidence multiple (D).....</p>	<p>15</p>
<p>Fig. I.3 : Principe de la localisation du lieu d'annihilation en employant l'indice du temps de vol (Time of Flight, TOF).....</p>	<p>16</p>
<p>Fig. I.4 : Illustration des types d'acquisition en TEP ; acquisition 2D avec plan droit et plan croisé (A), acquisition 2D à haute sensibilité avec plan droit et plan croisé (B) et l'acquisition 3D (C).....</p>	<p>17</p>
<p>Fig. I.5 : Illustration de l'effet de la correction d'atténuation sur l'image d'un cylindre d'activité homogène.....</p>	<p>20</p>
<p>Fig. II.1: Oscillations d'une microbulle soumise à une onde de pression; (A) oscillations symétriques (linéaires) et (B) oscillations asymétriques (non linéaires).....</p>	<p>30</p>
<p>Fig. II.2: Régimes acoustiques d'une microbulle en fonction de l'index mécanique (IM).....</p>	<p>31</p>
<p>Fig. II.3: Simulations de la propagation non linéaire d'une onde ultrasonore de 2 MHz, 3 cycles, 400 kPa, générée par un transducteur focalisé à 60 mm : (A) onde à la surface du transducteur et son spectre correspondant ; (B) distorsion de l'onde ultrasonore après propagation dans le milieu et son spectre.....</p>	<p>32</p>
<p>Fig. II.4: Simulations de la propagation non linéaire d'une onde de 2 MHz, 3 cycles, 400 kPa, générée par un transducteur focalisé à 60 mm : (A) champ acoustique axial fondamentale (ligne en pointillets) et harmonique (ligne en continu), (B) champ acoustique radial fondamentale (ligne en pointillets) et harmonique (ligne en continu).....</p>	<p>34</p>
<p>Fig. II.5: Modélisation compartimentale simple de la microcirculation sanguine.</p>	<p>36</p>
<p>Fig. II.6: Imagerie paramétrique pour la mesure de la perfusion cérébrale. Patient souffrant d'un AVC ischémique du territoire sylvien (donnée G. Seidel). Les images sont calculées sans linéarisation des données. L'image des temps du pic d'intensité (TPI) ne permet pas d'identifier le déficit de perfusion. La zone infarctée apparaît plus clairement sur l'image du pic d'intensité (entourée en blanc). L'image d'aire sous la courbe (ASC) montre également la zone infarctée,</p>	

mais n'apporte pas d'autre information. Il en est de même pour la carte du maximum du gradient positif.....	38
Fig. II.7: Exemple de résultats obtenus par la méthode de classification non exclusive en échographie de contraste hépatique sur une métastase hypervasculaire sur des images prise à 8s (A), 25s(B) et 39s (C) après l'injection et (D) la courbe de perfusion correspondante obtenue, en calculant la perfusion moyenne dans la zone en dehors de la nécrose, par l'expert (points roses) et par l'algorithme (points bleus).....	42
Fig. II.8: AFSIM de métastase hépatique hypervasculaire après sélection de trames a posteriori. La séquence a été décomposée en deux sous-séquences: l'une correspondante au plan visible au minimum d'expiration et l'autre au plan visible au maximum d'expiration. L'AFSIM permet d'identifier trois cinétiques : une prise de contraste précoce dans la tumeur, une prise de contraste retardée dans le centre nécrotique et une prise de contraste tardive dans le parenchyme hépatique sain.....	44
Fig. III.1: Modèles mathématiques de rehaussement après injection du produit de contraste de type exponentiel (A) et temps-intensité (B).....	49
Fig. III.2: Détection d'un petit carcinome à cellules claires strictement intra-parenchymateux indiqué par la flèche. (A) L'échographie en mode B conventionnel. (B) L'échographie en mode harmonique tissulaire différentiel. (C) Le mode Doppler couleur. (D) à (F) Échographie de contraste réalisée en mode VRI avant et après injection de 2,4 mL de SonoVue®. (G) L'étude quantitative est réalisée avec deux ROI placées sur la tumeur et sur le parenchyme adjacent à la même profondeur.....	51
Fig. III.3: Diagnostic d'une masse rénale solide chez un patient porteur de la maladie de von Hippel Lindau. (A) et (B) L'étude en mode Doppler (Dynamic Flow). (C) et (D) L'échographie de contraste effectuée en mode VRI avant et après injection de 2,4 mL de SonoVue®. (E) L'étude quantitative est réalisée avec deux ROI placées sur la tumeur et sur le parenchyme adjacent. (F) IRM rénal.....	52
Fig. III.4: Image mettant en évidence l'expression de la GFP dans les cellules tumorales gliales par microscopie confocale à fluorescence, 24 heures après sonoporation avec des microbulles du BR14 (1 MHz, 0,4 MPa (A)). Même cellule observée en lumière blanche (B).....	54
Fig. III.5: Incorporation amplifiée de 1 In-Dota-Tyr3- Octeate par les microbulles de gaz (SonoVue®) et les ultrasons (1 MHz, 0,42 MPa) (US+microbulles), et incorporation sans association de microbulles et d'ultrasons (Control).....	55
Fig. III.6: Potentiel membranaire d'une cellule MDA-Mb231 sous l'effet des ondes ultrasonores (1 MHz, 200 kPa) seul (A) et en présence d'ultrasons (1 MHz, 200 kPa) et microbulles de SonoVue® (B).....	58
Fig. III.7: Une pression mécanique induite sur la membrane cellulaire via une pipette de verre rodée engendre une modification du potentiel de membrane	

cellulaire.....	58
Fig. III.8: Différentes techniques d'incorporation des agents thérapeutiques dans une microbulle de gaz. Les agents thérapeutiques peuvent être contenus à l'intérieur de la microbulle (A), ou être insérés dans la paroi (B) ou, également, être liés à la face externe de la paroi (C).....	61
Fig. IV.1: Segmentation (estimation) du volume tumoral dans l'image TEP ; la première estimation (en vert), la deuxième estimation (en bleu) et la troisième estimation (en rouge) : (A) Plan axial, (B) Plan coronal et (C) Plan sagittal.....	64
Fig. IV.2: Illustration d'un fantôme (TEP- <i>NEMA IEC/2001</i>).....	70
Fig. V.1: Image TEP d'un patient atteint de carcinome épidermique laryngé T3-T4 ; le volume tumoral défini par l'histologie est représenté par la ligne bleu : (A) plan axial, (B) Plan coronal et (C) Plan sagittal.....	77
Fig. V.2: Recalage entre les images macroscopiques, TDM et TEP. Les volumes sont affichés sur les plans transversal, coronal et sagittal. Le schéma montre le BTV délimité avec chaque modalité et la petite croix représente le même point dans l'espace pour chacune des modalités. L'infiltration des muscles parathyroïdes du côté gauche est clairement visible sur les images macroscopiques.....	81
Fig. V.3: Schéma de la méthode proposée.....	84
Fig. V.4: Estimation du nombre optimal de clusters k dans le processus de segmentation du VTB.....	85
Fig. V.5: Variation de l'erreur de volume (VE) par rapport à la variation de nombre de clusters.....	86
Fig. V.6 : Variation de l'erreur de volume de la coupe (SVE) par rapport à la variation de nombre de clusters.....	87
Fig. V.7: Influence du choix du nombre de clusters k (pour une coupe donnée); (A) Slice volume error (SVE), (B) le VTB estimé par 4 différentes valeurs de k ($k = 2, 8, 14$ and 20).....	88
Fig. V.8: Représentation d'un VOI incluant n tranches; $I_{\max (slice)}$ est l'intensité maximale dans la coupe correspondante et $I_{\max (VOI)}$ est l'intensité maximale dans l'ensemble de coupes dans le VOI.....	89
Fig. V.9 : La variation de l'intensité maximale par rapport à l'emplacement de la tranche dans le VOI.....	89
Fig. V.10: Variation du critère r par rapport à l'emplacement de la coupe.....	90
Fig. V.11: Analyse de la relation entre le nombre optimal de grappes k et le critère r ; (A) Variation du k optimal contre le critère r pour tous les patients et les modèles de fitting obtenus pour chaque patient. (B) Modélisation de la relation entre le nombre optimal de grappes k et le critère r pour trois (03) patients utilisés comme ensemble de validation; la fonction de puissance (ligne discontinue bleue) et la fonction exponentielle (ligne discontinue rouge). (C) Efficacité des modèles de fitting généralisés contre la tendance entre le nombre	

optimal de grappes k et le critère r	92
Fig. V.12: Schéma de l'approche proposée.....	93
Fig. V.13: Comparaison des VTBs estimés avec le VTB de référence pour une coupe (slice) donnée.....	94
Fig. V.14: Erreur moyenne du volume pour deux patients obtenue par six méthodes différentes.....	95
Fig. V.15: L'erreur moyenne du VTB, obtenue par k-means utilisant différents critères pour l'estimation du nombre optimal de grappe.....	96
Fig. V.16: Erreur moyenne du VTB, obtenue en utilisant un modèle généralisé pour l'ensemble de données de test.....	96
Fig. V.17: Erreur moyenne du VTB en utilisant le modèle généralisé pour tous les patients.....	97
Fig. VI.1: Interface du logiciel VevoCQ (VisualSonics Inc., Toronto, Canada)...	102
Fig. VI.2: Définition manuelle de la région d'intérêt (ROI) correspondante à la tumeur (ligne vert): (A) Image par mode B et (B) Image par échographie de contraste.....	103
Fig. VI.3: Courbe d'intensité temporelle obtenue pour la ROI définie.....	103
Fig. VI.4: Analyse spectrale du signal acquis.....	104
Fig. VI.5: Approximation presque similaire entre le fitting et le signal filtré.....	104
Fig. VI.6: Approximation différente entre le fitting et le signal filtré.....	105
Fig. VI.7: Représentations des 04 paramètres fondamentaux.....	105
Fig. VI.8: Evolution du peak.....	106
Fig. VI.9: Evolution du AUC.....	106
Fig. VI.10: Evolution du WiR.....	107
Fig. VI.11: Evolution du TTP.....	107
Fig. VI.12: Evolution du Peak/ROI.....	108
Fig. VI.13: Evolution du AUC/ROI.....	108
Fig. VI.14: Evolution du WiR/ROI.....	108
Fig. VI.15: Evolution du TTP/ROI.....	109
Fig. VI.16: Evolution du Peak x ROI.....	109
Fig. VI.17: Evolution du AUC x ROI.....	110
Fig. VI.18: Evolution du WiR x ROI.....	110
Fig. VI.19: Evolution du TTP x ROI.....	110
Fig. VI.20: Evolution du Peak.....	111
Fig. VI.21: Evolution du AUC.....	111
Fig. VI.22: Evolution du WiR.....	111
Fig. VI.23: Evolution du Peak/ROI.....	112
Fig. VI.24: Evolution du AUC/ROI.....	112
Fig. VI.25: Evolution du WiR/ROI.....	112
Fig. VI.26: Evolution du Peak x ROI.....	113
Fig. VI.27: Evolution du AUC x ROI.....	113
Fig. VI.28: Evolution du WiR x ROI.....	113
Fig. VI.29: Evolution du TTP x ROI.....	114

Fig. VI.30: Evolution de la moyenne des Peak.....	114
Fig. VI.31: Evolution de la moyenne des AUC.....	115
Fig. VI.32: Evolution de la moyenne des WiR.....	115
Fig. VI.33: Evolution de la moyenne des TTP.....	115
Fig. VI.34: Evolution de la moyenne des Peak/ROI.....	116
Fig. VI.35: Evolution de la moyenne des AUC/ROI.....	116
Fig. VI.36: Evolution de la moyenne des WiR/ROI.....	116
Fig. VI.37: Evolution de la moyenne des TTP/ROI.....	117
Fig. VI.38: Evolution de la moyenne des Peak x ROI.....	117
Fig. VI.39: Evolution de la moyenne des AUC x ROI.....	117
Fig. VI.40: Evolution de la moyenne des WiR x ROI.....	118
Fig. VI.41: Evolution de la moyenne des TTP x ROI.....	118
Fig. VI.42: Etapes suivies pour le traitement thérapeutique de la souris : (A) Mettre la souris sous anesthésie, (B) Mise en place de la souris, (C) Réglage du générateur des ondes ultrasonore et (D) sonoporation.....	120
Fig. VI.43: Evolution du peak.....	121
Fig. VI.44: Evolution de AUC.....	121
Fig. VI.45: Evolution de WiR.....	122
Fig. VI.46: Evolution du TTP.....	122
Fig. VI.47: Evolution du Peak.....	122
Fig. VI.48: Evolution du AUC.....	123
Fig. VI.49: Evolution du WiR.....	123
Fig. VI.50: Evolution du TTP.....	123

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Caractéristiques principales des radionucléides fréquemment utilisés en imagerie TEP.....	09
Tableau I.2 : Trois Principaux effets issus des interactions entre rayonnement et matière pour des photons de 511keV.....	11
Tableau I.3 : Propriétés physiques de certains des cristaux de scintillation couramment employés en TEP. Données pour des photons de 511 keV.....	12
Tableau V.1: L'erreur moyenne du volume de deux patients.....	94

Liste des abréviations

TEP : Tomographie par Emission de Positons.
PET : Positron Emission Tomography.
VTB : Volume Tumoral Biologique.
BTV : Biological Tumours Volume.
TDM : Tomodensitométrie.
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique.
FDG : 2-deoxy-2-18F-fluoro-Dglucose.
EC : Echographie de Contraste.
CEUS : Contrast-Enhanced Ultrasound.
LMH : Largeur à Mi-Hauteur.
PDA : Photodiodes à Avalanches.
PMSi : Photomultiplicateurs sur Silicium.
LDR : Ligne De Réponse.
TOF : Time Of Flight.
FOV : Field Of View.
EM : Expectation Maximisation.
ML-EM : Maximum Likelihood Expectation Maximisation.
OS-EM : Ordered Subsets Expectation Maximisation.
VOI : Volume Of Interest.
FDOPA : 6-18F-fluoro-L-dihydroxyphénylalanine.
FCH : 18F-fluorocholine.
SUV : Standardized Uptake Value.
DAR : Differential Absorption Ratio.
BW : Body Weight.
BSA : Body Surface Area.
EORTC : European Organisation for Research and Treatment of Cancer.
LBM : Lean Body Mass.
US : Ultrasons.
IM : Index Mécanique.
FDA : Food and Drug Administration.
PI : Pulse Inversion.
PM : Power Modulation.
AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux.
PCUS : Produits de Contraste Ultrasonores.
ASC : Aire Sous la Courbe.
AUC : Area Under the Curve.
TPI : Temps du Pic d'Intensité.
TTP : Time To Peak.
PI : Pic d'Intensité.
PE : Peak Enhancement.
ROI : Region Of Interest.
CI : Contrainte d'Intensité.

AFSIM : Analyse Factorielle des Séquences d'Images Médicales.
ACP : Analyse en Composantes Principales.
MVD : Microvessel Density.
VRI : Vascular Recognition Imaging.
GFP : Green Fluorescent Protein.
FITC : Fluoresceine Iso-Thio-Cyanate.
CHO : Chinese Hamster Ovary.
AAL : Active Acoustic Liposphère.
SBR : Signal-to-Background Ratio.
FLAB : Fuzzy Locally Adaptive Bayesian.
GVF : Gradient Vector Flow.
FCM : Fuzzy C-Means.
DSI : Dice Similarity Index.
CE : Cassification Error.
FWHM : Full Width at Half Maximum.
GMM : Gaussian Mixture Model.
AIC : Akaike Information Criterion.
BIC : Bayesian Information Criterion.
VE : Volume Error.
SVE : Slice Volume Error.
MEV : Mean Error of BTV.
WiR : Wash in Rate.

Introduction

La thérapie des tumeurs est le point le plus critique dans les recherches d'ingénierie médicale en cancérologie, d'où le but est de trouver les protocoles idéaux pendant la planification des traitements radio ou chimio-thérapeutiques en réduisant plusieurs impacts de complexités. En effet l'amélioration des techniques de traitement des tumeurs implique l'évolution des outils d'analyse et de traitement des images médicales dans différentes modalités.

Dans la radiothérapie utilisant la Tomographie par Émission de Positons (TEP), ou *Positron Emission Tomographie (PET)*, l'aspect le plus critique est de délivrer une dose de rayonnement ionisant la plus adéquate dans le volume tumoral cible que dans les tissus sains avoisinants. Ainsi, le sous-dosage de rayonnement d'une zone tumorale peut entraîner une récurrence, tandis-que le surdosage des tissus sains avoisinants peut induire des effets secondaires graves. Il est donc indispensable de bien identifier les limites des tumeurs afin de définir le Volume Tumoral Biologique (VTB), ou *Biological Tumour Volume (BTV)*, qui est l'élément le plus critique dans les planifications dosimétriques des traitements radio-thérapeutiques [1-2].

La figure ci-dessous illustre un exemple d'une image TEP, d'un patient atteint de carcinome épidermique laryngé T3-T4, avec plusieurs estimations du volume tumoral biologique.

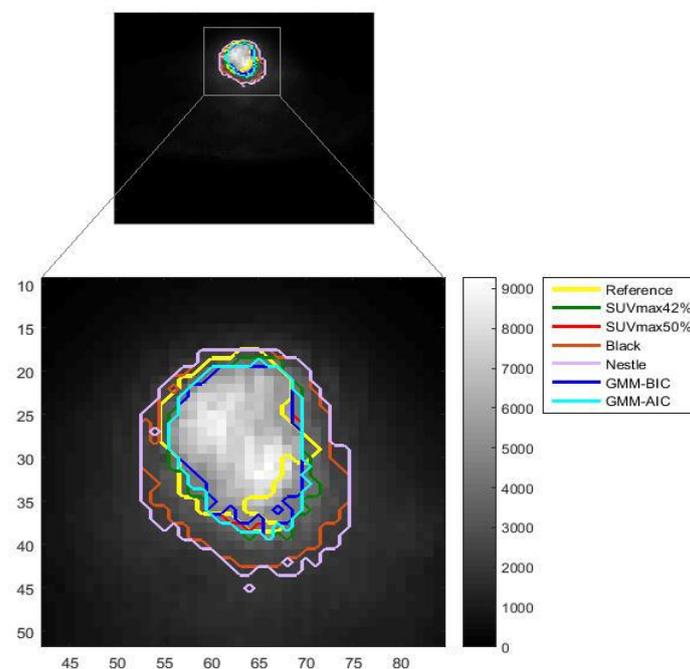


Fig. 1 : Segmentation (estimation) du volume tumoral dans l'image TEP ; Coupe axiale avec plusieurs estimations du VTB en utilisant différentes méthodes de segmentation.

La définition des volumes cibles constituait la plus grande source d'erreurs dans les protocoles des traitements par radiothérapie. Initialement, pour la planification de ces protocoles, les images anatomiques ont été utilisées, dont la tomодensitométrie (TDM) et parfois l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Ensuite, il a été démontré, pour les traitements par radiothérapie, que la TEP à 2-deoxy-2-¹⁸F-fluoro-D-glucose (FDG) peut fournir des informations biologiques supplémentaires fondamentales sur la tumeur [3]. La TEP-FDG a donc pris une importance considérable dans la définition des volumes cibles en radiothérapie dans plusieurs types de cancers. Pour cela, il est très utile de délimiter les contours sur les images TEP-FDG afin de les intégrer dans les planifications dosimétriques des traitements par radiothérapie.

Pour répondre à ce besoin, de nombreuses techniques de délimitation des tumeurs sur les images TEP sont apparues ces dernières années. Mais ces techniques de segmentation des tumeurs, sur les images TEP, présentent plusieurs problèmes et imprécisions. Cela est causé principalement par la distribution continue de la fixation du radio-isotope sur la frontière entre la tumeur et les tissus sains de l'image TEP. En plus, d'autres aspects comme la mauvaise résolution spatiale des images, les mouvements des organes, les hétérogénéités des tumeurs et l'instabilité de la capture (détection) du traceur, rendent la segmentation des tumeurs, à partir des images TEP, plus difficile.

Plusieurs méthodes de segmentation sont apparues et se sont développées pour résoudre ces problèmes. Parmi les plus importantes, nous trouvons les méthodes de segmentation visuelles [4-6], les méthodes de seuillages [7-11], les méthodes des modélisations stochastiques [12-14] et les méthodes d'apprentissage, ou *learning methods* [2, 15]. Les méthodes de segmentation des images TEP par apprentissage sont considérées parmi les méthodes les plus satisfaisantes pour segmenter les tumeurs sur les images TEP-FDG malgré leur inconvénient de complexité à mettre en œuvre [2].

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à cette catégorie de méthodes de segmentation en améliorant le compromis précision-complexité. Les méthodes de regroupements, ou *clustering methods*, font partie des méthodes d'apprentissage. Ces méthodes consistent à déterminer le volume tumoral en appliquant un regroupement des pixels de l'image en plusieurs groupes avec identification du groupe représentant le volume tumoral. Ainsi, l'utilisation des données cliniques des patients, où le

volume biologique réel est défini par histologie, est le protocole le plus prometteur pour la validation des techniques de segmentation proposées [16]. **Dans ce contexte, l'objectif est de valider une méthode de regroupement, basée sur l'utilisation des données de patients ayant des tumeurs de Larynx [2, 16-17], pour la segmentation du VTB dans les images TEP-FDG.** Donc, nous avons utilisé une série de données cliniques pour la définition de la relation entre le nombre optimal de groupes (clusters), nécessaire pour la définition du VTB, et un paramètre caractéristique de l'image TEP-FDG du patient. Ensuite, nous avons ajusté, à partir de mesures histologiques, deux fonctions utilisables pour l'identification automatique du nombre optimal de groupes désiré pour la délimitation du VTB. Puis, nous avons comparé ces deux fonctions entre-elles avec d'autres critères utilisés pour la définition du nombre optimal de groupes (clusters). Enfin, nous avons validé notre technique en utilisant une autre série de données. Cette validation a été faite en comparant les VTBs segmentés par notre technique avec les VTBs segmentés en utilisant d'autres méthodes.

La chimiothérapie des tumeurs utilisant l'imagerie par Échographie de Contraste (EC), ou *Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS)*, pour le diagnostic, a montré son impact potentiel pour l'identification des tumeurs et l'évaluation du traitement des différents types de cancer [18]. L'utilisation des agents de contraste ou des microbulles de gaz pour le traitement ciblé des tumeurs représente le point le plus critique à l'heure actuelle.

L'injection, assistée par des ondes ultrasonores, des drogues anticancéreuses et des anticorps, ce que nous appelons la sonoporation. Celle-ci a montré son ajout en terme de l'augmentation de l'efficacité du traitement, en particulier les tumeurs sous cutanées [19]. **Dans ce contexte, l'objectif est de montrer une technique d'évaluation de suivi thérapeutique des tumeurs sous cutanées en analysant, par regroupement, l'évolution de la perfusion tumorale dans les images paramétriques de l'EC, au cours du traitement chimio-thérapeutique par sonoporation, à l'intérieur de la zone tumorale.**

La présente thèse est composée de six chapitres, organisés comme suit :

Le premier chapitre décrit la technique d'imagerie tomographique par émission de positons (TEP) en commençant par ses principes physiques, puis par le biais de fonctionnement des systèmes de détection et de reconstruction tomographique. Après,

nous décrivons les différentes techniques d'analyse et de quantification des images TEP-FDG.

Le deuxième chapitre décrit l'imagerie par échographie de contraste (EC) en commençant par ses principes physiques de fonctionnement. Ensuite, nous décrivons les techniques d'analyse et de quantification des images paramétriques de l'EC.

Le troisième chapitre montre les applications radiologiques et thérapeutiques de l'imagerie par échographie de contraste en cancérologie. Ensuite, nous donnons un aperçu sur la technique de sonoporation pour le traitement et la thérapie ciblée des tumeurs, en particulier les tumeurs sous cutanées.

Dans le quatrième chapitre, nous montrons l'état de l'art des techniques de segmentation du VTB dans les images TEP et les critères d'évaluation pendant la validation et la comparaison des techniques de segmentation proposées.

La validation de notre technique de segmentation du VTB est effectuée dans le cinquième chapitre. Dans celui-ci, nous décrivons la procédure de notre approche proposée et les résultats obtenus après comparaison avec d'autres techniques, de segmentation du VTB, validées sur les mêmes données histologiques.

Le sixième chapitre montre les résultats obtenus en suivant la perfusion tumorale dans les images paramétriques de l'EC, au cours du traitement chimio-thérapeutique, pour la démonstration du potentiel de la technique de sonoporation en termes de l'augmentation de l'efficacité du traitement ciblé des tumeurs.

La dernière partie de cette thèse est consacrée aux conclusions des résultats de nos recherches doctorales ainsi que les perspectives d'applications et pistes d'amélioration.

Chapitre I

Tomographie par émission de positons (TEP)

I.1. Introduction

Les cellules cancéreuses se différencient des cellules normales par plusieurs caractéristiques. La connaissance des mécanismes physiologiques et biologiques de ces caractéristiques permet d'améliorer les techniques de diagnostic et aussi la thérapie de ces cellules cancéreuses. De plus, la distinction des tumeurs des autres tissus normaux par l'analyse de leur métabolisme glucidique se fait par l'utilisation d'imagerie de Tomographie par Emission de Positons (TEP) au 2-deoxy-2-¹⁸F-fluoro-D-glucose (ou FDG). Après la présentation du principe de l'imagerie TEP et les différentes transformations pour passer de la détection d'un signal à une image interprétable, nous exposons les différents types d'analyses d'images TEP permettant de caractériser le métabolisme glucidique des tumeurs.

I.2. L'imagerie de tomographie par émission de positons (TEP)

L'amélioration des connaissances des particularités qui caractérisent les tumeurs des tissus normaux bénéficie des progrès dans les techniques de diagnostic et de thérapie dans le domaine de l'imagerie, notamment l'imagerie TEP.

I.2.1. Principe et fonctionnement [20]

La TEP est une modalité d'imagerie fonctionnelle, comparativement aux autres modalités d'imageries anatomiques telles que la tomodensitométrie (TDM) ou l'imagerie par Résonance Magnétique (IRM), par exemple. Elle permet de mettre en évidence la fonction ciblée par un radiotracer, injecté dans l'organisme, et ceci par la mesure in-vivo du lieu de désintégration de ce dernier. Après la présentation des propriétés et les bases physiques des radiotraceurs utilisés en TEP et les moyens mis en œuvre pour les détecter, nous exposons, ensuite, les étapes qui permettent de passer des signaux détectés à une image interprétable visuellement.

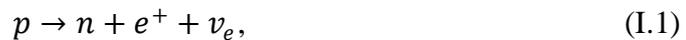
I.2.1.1. Principes physiques

L'étude du métabolisme glucidique en TEP se base sur l'emploi de marqueurs radioactifs, qui correspondent à des atomes émetteurs de positons. Le but est de localiser, dans l'organisme, les zones d'accumulation d'une molécule vectrice propre à la fonction à étudier, encore appelée traceur, qui est administrée au patient avant l'examen TEP.

I.2.1.1.1. Émetteurs de positons

Lorsqu'un noyau possède un excès de protons ou de neutrons, il devient instable. Une succession d'une ou plusieurs désintégrations radioactives permet son retour à l'équilibre. Lorsque les atomes, ou radionucléides, présentent un excès de protons, ils se désexcitent (nous parlons d'embranchement) de deux manières distinctes: soit par émission soit par capture électronique.

- La première, appelée émission, met en jeu la désintégration élémentaire suivante :



avec p correspond à un proton, n un neutron, e^+ un positon; antiparticule de l'électron, de charge opposée à celle d'un électron mais de masse égale et ν_e un neutrino (particule élémentaire de masse négligeable et de charge électrique nulle).

Appliquée au noyau mère X de nombre de masse A et de numéro atomique Z , encore noté A_ZX , on obtient la formation du noyau fille ${}^A_{Z-1}Y$ telle que :



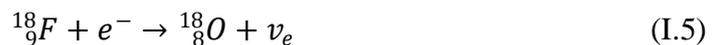
Appliquée au fluor 18, noté ${}^{18}\text{F}$, élément instable de nombre de masse $A=18$ et de numéro atomique $Z=9$, la désintégration s'écrit :



- La seconde, appelée capture électronique, s'écrit :



Appliquée au fluor ${}^{18}\text{F}$:



Le taux d'embranchement, c'est-à-dire la probabilité pour que le noyau excité (noyau mère) suive l'une ou l'autre de ces types de désintégration radioactive, dépend des propriétés du noyau mère X . Pour les noyaux de faible numéro atomique Z , il est en faveur de l'émission de positon par rapport à la désexcitation par capture électronique. Ce sont donc ces derniers qui sont considérés en imagerie TEP lors de l'élaboration de

nouveaux traceurs. Ainsi, dans le cas du ^{18}F , le taux d'embranchement est de 97% pour la désintégration β^+ et de 3% pour la capture électronique.

L'énergie générée pendant l'émission du positon, dans le cas de la désintégration β^+ , est partagée entre le positon, le noyau fils et le neutrino. Les positons produits sont émis avec une énergie cinétique E qui varie de 0 à une énergie maximale E_{max} de l'ordre du méga-électron volt (MeV). L'énergie moyenne des positons ainsi émise par la source β^+ est environ égale au tiers de E_{max} .

Une autre caractéristique importante relative à l'emploi des radiotraceurs (radionucléides) en imagerie TEP est le temps de demi-vie, qui correspond au temps nécessaire pour que la moitié des éléments de l'échantillon se désintègre.

Les principaux radionucléides utilisés en TEP sont caractérisés par les caractéristiques résumées dans le tableau suivant :

Radionucléide	Demi-vie (min)	Energie maximale du positon après annihilation (MeV)	Distance effective moyenne (\bar{d}) parcourue par le positon dans l'eau (mm)
^{11}C	20	0,96	0,92
^{13}N	10	1,20	1,4
^{15}O	2	1,73	2,4
^{18}F	110	0,64	0,54
^{68}Ga	68	1,90	2,8
^{82}Rb	1	3,36	6,1

Tableau I.1 : Caractéristiques principales des radionucléides fréquemment utilisés en imagerie TEP. (Adapté de [20]).

I.2.1.1.2. Annihilation

Une fois émis, le positon perd son énergie cinétique suite à des collisions avec les électrons du milieu. Après la dissipation de cette énergie, sur un parcours de l'ordre de $10^{-1} \sim 10^{-2}$ cm en moyenne, en fonction de l'énergie d'émission du positon, il se recombine à un électron, de charge opposée. Ensuite, la paire électron/positon ainsi formée, va alors s'annihiler (nous parlons d'Annihilation) et produire simultanément 2 photons de 511 keV émis dans des directions quasiment opposées. Vu que les positons ne sont pas complètement au repos avant cette annihilation, la distribution de l'angle entre les directions des 2 photons correspond à une Gaussienne centrée sur 180° et de largeur à mi-hauteur (LMH) d'environ $0,5^\circ$ suivant la description de Derenzo et al [21]. La figure I.1 (droite) montre l'ensemble des événements qui se produisent suite à l'émission du positon dans le milieu dans le cas du ^{18}F [20].

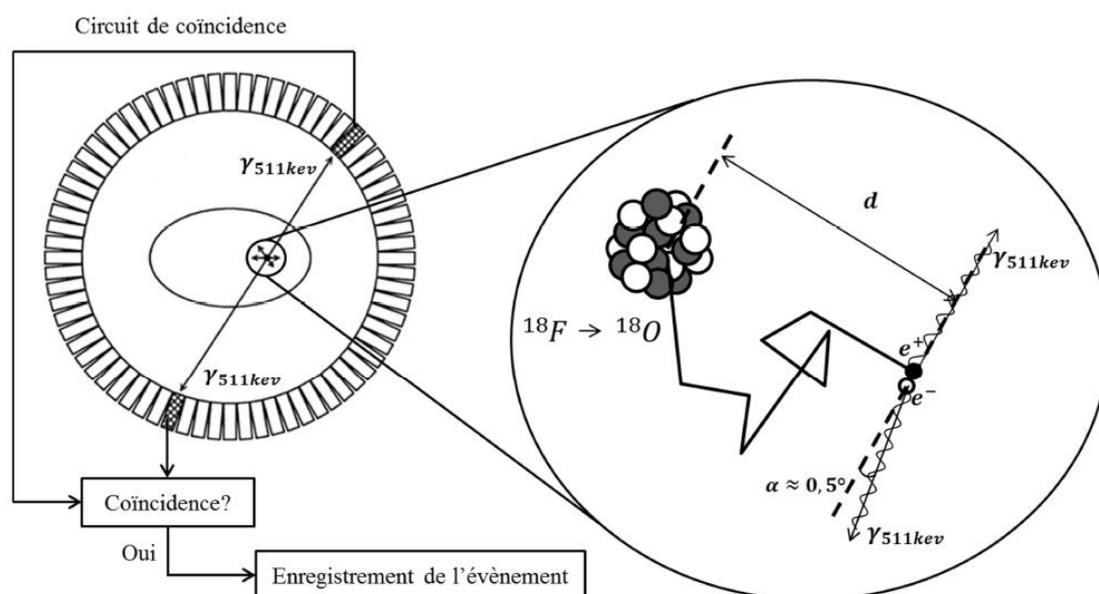


Fig. I.1 : Principe de fonctionnement de la TEP ; principe de la mesure en coïncidence (gauche) et illustration des évènements issus de l'émission du positon lors de la désexcitation d'un atome de ^{18}F (droite). d : distance effective moyenne parcourue par le positon (tableau I.1) ; mesurée perpendiculairement à la ligne définie par les directions prises par les deux photons issus de l'annihilation. (Adaptée de [20]).

I.2.1.1.3. Interaction rayonnement / matière

Les photons produits, suite à l'annihilation du positon avec l'électron du milieu, interagissent avec la matière qu'ils traversent, c'est à dire la matière qui constitue le corps du patient et celle constituant les détecteurs qui vont être utilisés pour détecter et localiser la source émettrice de positon en TEP. Dans ce qui suit, nous résumons les principales interactions subies par les photons (tableau I.2) [20].

- Effet photoélectrique

Le photon incident cède toute son énergie à un électron orbital du milieu qu'il traverse, l'électron est alors éjecté de sa couche électronique si l'énergie ainsi transférée excède l'énergie de liaison de ce dernier (photoélectron). Cet effet implique plus généralement des électrons des couches internes, c'est-à-dire les couches (K ou L). Il est d'autant plus important que l'énergie du photon incident est faible et que le numéro atomique du milieu est élevé.

- Effet Compton

Le photon incident transmet une partie de son énergie à un électron des couches périphériques des atomes après interaction. Cette énergie transmise est sous forme

d'énergie cinétique. L'énergie restante est attribuée à un photon secondaire (photon diffusé), émis dans une direction différente de celle du photon incident. En imagerie TEP, aux niveaux des énergies, cet effet prédomine largement dans les tissus comparativement à l'effet photoélectrique.

- Effet Rayleigh

Contrairement à l'effet Compton, l'effet Rayleigh est une diffusion élastique, c'est-à-dire il n'y a pas de transfert d'énergie. Ainsi, le photon incident est dévié par un électron du milieu sans perte d'énergie.

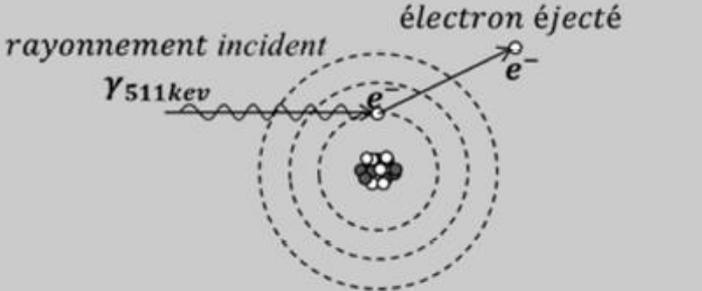
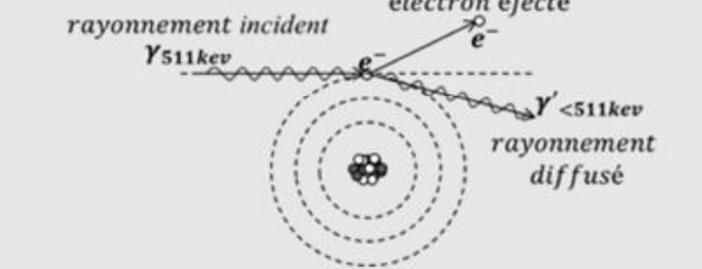
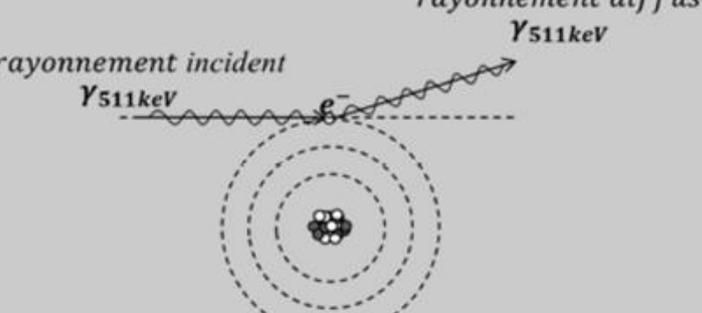
Interaction	Description
Effet photoélectrique	 <p>Diagram illustrating the photoelectric effect. An incident photon (γ_{511keV}) is absorbed by an atom, resulting in the ejection of an electron (e^-).</p>
Diffusion Compton	 <p>Diagram illustrating Compton scattering. An incident photon (γ_{511keV}) interacts with an electron (e^-), resulting in a scattered photon ($\gamma < 511keV$) and an ejected electron (e^-).</p>
Effet Rayleigh	 <p>Diagram illustrating Rayleigh scattering. An incident photon (γ_{511keV}) is deflected by an electron (e^-) without energy loss, resulting in a scattered photon (γ_{511keV}).</p>

Tableau I.2 : Trois Principaux effets issus des interactions entre rayonnement et matière pour des photons de 511keV. (Adapté de [20]).

1.2.1.2. Détection des photons

1.2.1.2.1. Types de scintillateurs

La détection des photons émis lors de l'annihilation est effectuée par l'emploi de détecteurs constitués de matériaux capables de les arrêter. Puisque la taille et le volume de ces détecteurs influent sur la résolution spatiale des images, il est nécessaire qu'ils soient les plus compacts possibles. Donc des matériaux de Z élevé sont favorisés, dans lesquels l'effet photoélectrique prédomine aux énergies considérées. En imagerie TEP, les cristaux sont principalement utilisés, dont les atomes produisent des photons de scintillation (cristaux de scintillation) de quelques eV pour revenir à l'équilibre électronique, suite à leur ionisation par les photons incidents. La lumière émise par ces cristaux est collectée par des photodétecteurs, qui la convertissent en un signal électrique. Le choix du cristal utilisé fait appelle à plusieurs paramètres qui rentrent en compte tels que la constante de décroissance lumineuse des photons de scintillation caractérisant le taux de comptage du détecteur, ou la résolution en énergie caractérisant sa capacité à différencier les photons primaires des photons diffusés avant leur arrivée dans le détecteur. Le tableau I.3 montre certaines propriétés des cristaux les plus couramment utilisés en imagerie TEP [20].

Scintillateur	NaI(Tl)	BGO	GSO	LSO	LYSO
$1/\mu$ (mm)	25,9	11,2	15,0	12,3	12,6
Constante de décroissance (ns)	230	300	60	40	40
Résolution en énergie (en % de 511 keV)	7,8	20	8,9	<9	11
Probabilité d'absorption par effet photoélectrique à 511keV (%)	18	44	26	34	33
Masse volumique (g/cm ³)	3,67	7,13	6,71	7,35	7,19
Z effectif	50	73	58	65	64
Nombre de photons produits (10 ³ photons /MeV)	41	9	8	30	30
Susceptibilité magnétique	Non	Non	Oui	Non	Non

Tableau I.3 : Propriétés physiques de certains des cristaux de scintillation couramment employés en TEP. Données pour des photons de 511 keV. (Adapté de [20]).

I.2.1.2.2. Bloc de détection

Dans la plupart des tomographies, nous trouvons des tubes photomultiplicateurs couplés à des matrices de cristaux scintillants pour l'amplification et la conversion du signal lumineux en un signal électronique. L'association des photomultiplicateurs aux matrices de cristaux scintillants forme un bloc (bloc de détection), plus compact et moins cher que les détecteurs de première génération [22].

Il existe d'autres solutions technologiques que les tubes photomultiplicateurs, basées sur l'utilisation de semi-conducteurs, tels que les photodiodes à avalanches (PDA) ou encore des photomultiplicateurs sur silicium (PMSi), mises en œuvre dans les TEP les plus modernes [23].

I.2.1.2.3. Détection en coïncidence

La localisation des zones de fixation du radiotracer dans le patient en imagerie TEP est basée sur l'annihilation des positons dans la matière constituante et l'émission en opposition et simultanément des deux photons γ mono-énergétiques qui en résulte (511 keV). Une détection (détection en coïncidence) est utilisée, pour identifier le tube d'émission des 2 photons γ d'annihilations. Celle-ci, par placement des détecteurs autour de la source émettrice de positons examinée et en ne prenant en compte que les cas où des paires de détecteurs mesurent quasi-simultanément un photon γ de 511 keV. Nous pouvons supposer que l'annihilation de la paire positon/électron, qui a donné naissance aux 2 photons γ mesurés, s'est produite n'importe où dans le tube reliant les deux détecteurs. Ce tube, décrit par une droite qui relie les centres des détecteurs, est appelée Ligne De Réponse (LDR). La détection des coïncidences issues d'un grand nombre de LDR permet d'estimer la distribution du radiotracer dans l'organisme en utilisant la reconstruction tomographique.

La détection en coïncidence, d'un point de vue technique, nécessite de relier à chaque détecteur un analyseur d'amplitude (Analyseur d'amplitude multicanal). Celui-ci permet de générer un signal binaire pendant un temps τ très bref, lorsque l'énergie d'un photon détecté (appelé single) est comprise dans un intervalle encadrant les 511 keV (fenêtre en énergie). Si un autre détecteur de l'anneau (figure I.1, gauche) génère lui aussi un signal binaire dans une durée de temps très courte définie par une fenêtre temporelle de durée égale à 2τ , nous considérons qu'une coïncidence s'est produite sur la LDR joignant les deux détecteurs, et l'évènement est alors enregistré. Plusieurs

facteurs influent sur la longueur de la fenêtre temporelle, tels que le type de cristal utilisé dans les détecteurs.

Du fait du parcours du positon avant l'annihilation, il est nécessaire de noter que le lieu d'émission du positon n'appartient pas à la LDR définie par les photons détectés. Ceci introduit une limite en résolution intrinsèque de la méthode de détection en coïncidence en plus de la non-colinéarité des directions d'émission des photons d'annihilation.

I.2.1.2.4. Types d'évènements mesurés en TEP

Du fait des résolutions finies en temps et en énergie des différents composants de la chaîne d'acquisition et de mesure des coïncidences, certaines d'entre elles ne sont pas des vrais coïncidences (coïncidences vraies) qui doivent être prise en compte, c'est-à-dire des coïncidences issus d'une même annihilation (figure I.2A). Dans ce qui suit, nous montrons les différents types de coïncidences susceptibles d'être détectées.

- Coïncidences diffusées

Lorsque les photons γ interagissent au moins une fois dans l'organisme du patient avant d'être mesurés par les détecteurs implique une coïncidence diffusée. Si la perte d'énergie qui se produit de ces interactions n'est pas suffisante pour permettre de les caractériser en énergie par l'analyseur d'amplitude, ils sont détectés par le système de coïncidence. Donc, il en résulte une LDR qui ne passe pas par le lieu d'annihilation (figure I.2B), ce qui implique une dégradation de l'image.

- Coïncidences fortuites

Si les photons détectés et enregistrés par le système de coïncidence sont issus de deux annihilations différentes (figure I.2C) implique une coïncidence fortuite.

- Coïncidences multiples

Une coïncidence multiple est mesurée lorsque le système de coïncidence enregistre de plus de deux photons γ dans une même fenêtre de coïncidence (figure I.2D). Il est possible d'annuler l'ensemble de ces évènements secondaires, si nous supposons que l'information contenue dans ces mesures implique au moins une coïncidence vraie. Donc, nous pouvons, selon certains critères temporels ou énergétiques par exemple, ignorer plusieurs mesures pour ne garder qu'une LDR.

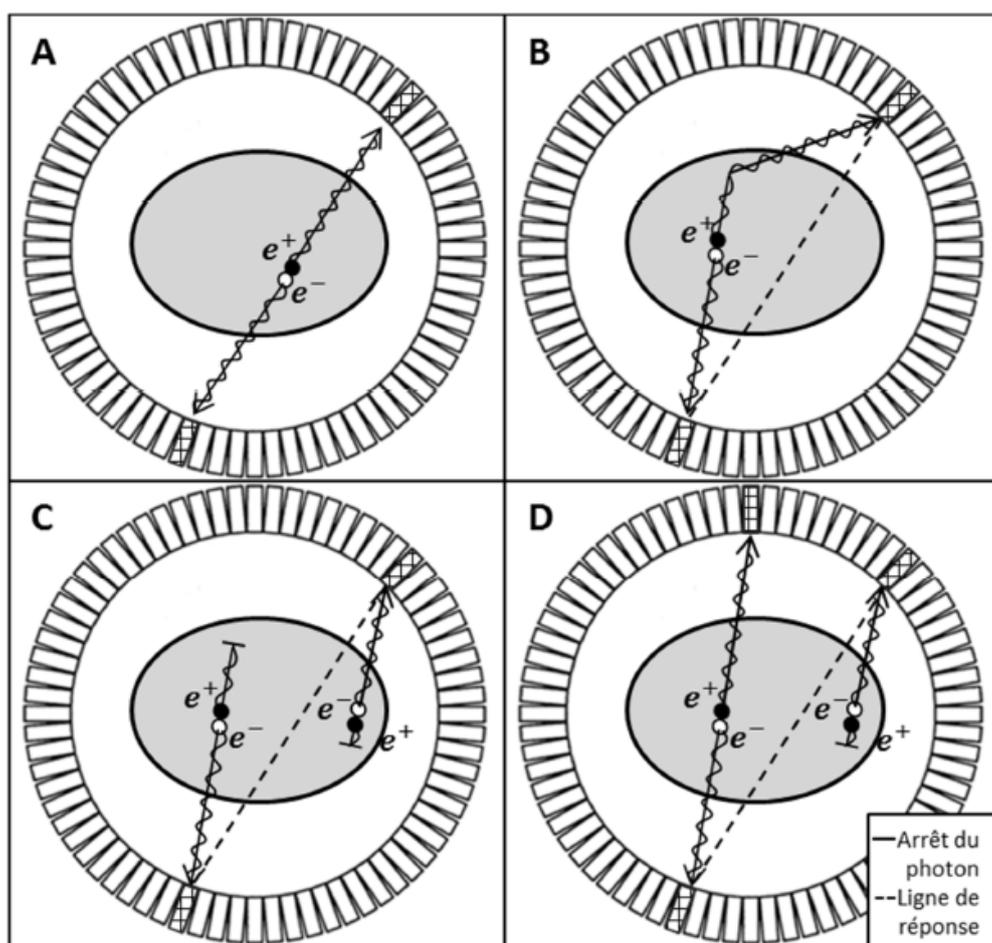


Fig. I.2 : Principes des différents types de coïncidences en TEP ; Principe d'une coïncidence vraie (A), d'une coïncidence diffusée (B), d'une coïncidence fortuite (C) et d'une coïncidence multiple (D). (Adaptée de [20]).

1.2.1.3. TEP temps de vol

Pour améliorer la résolution spatiale des images, les TEP cliniques les plus récentes permettent de mesurer le décalage entre les temps d'arrivés des photons γ sur les deux détecteurs (temps de vol), ou *Time Of Flight* (TOF) (équation I.6), pour une bonne localisation du lieu d'annihilation sur une LDR donnée. Nous prenons en considération la vitesse de la lumière (équation I.7), il est donc possible d'identifier plus précisément le lieu d'annihilation des photons γ sur la LDR (figure I.3). L'utilisation de la TOF permet d'améliorer le rapport signal sur bruit dans l'image reconstruite suite à une diminution du bruit statistique [24-25].

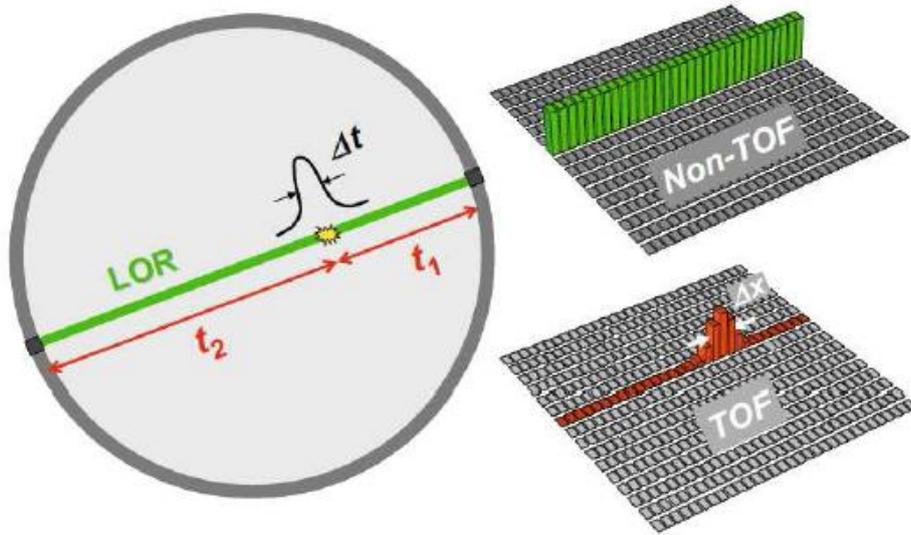


Fig. I.3 : Principe de la localisation du lieu d'annihilation en employant l'indice du temps de vol (Time of Flight, TOF). (Adaptée de [20]).

Avec :

$$\Delta t = t_2 - t_1 \quad (\text{I.6})$$

Et

$$\Delta x = \frac{c \times \Delta t}{2} \quad (\text{I.7})$$

I.2.1.4. Acquisition 2D/3D

I.2.1.4.1. Acquisition en mode 2D

L'acquisition de données en TEP clinique est basée sur l'utilisation de plusieurs anneaux de détections coaxiaux, constitués d'un ensemble de détecteurs similaires à ceux présentés précédemment. Les premières générations de TEP à anneaux multiples ne permettaient la mesure des coïncidences que dans les détecteurs d'un même anneau, appelés plan droit, ou la mesure des coïncidences dans des anneaux directement voisins, appelés plans croisés (figure I.4A). La mesure des coïncidences issues des plans croisés améliore l'échantillonnage axial. Pour éviter de mesurer des photons d'annihilation issus de plans plus éloignés et donc limiter la quantité de photons γ diffusés, la solution la plus utilisée consiste à placer des anneaux (nous parlons des septas), en plomb ou tungstène, d'environ 1 mm d'épaisseur entre les anneaux de détection.

Il est possible d'améliorer la sensibilité du système de détection par l'augmentation de la tolérance sur l'éloignement entre les plans croisés (figure I.4B), ce qui implique une diminution de la sensibilité au bord du champ de vue, ou *Field Of View* (FOV),

où seuls les détecteurs dans les plans droits et directement voisins sont pris en compte (figure I.4A).

I.2.1.4.2. Acquisition en mode 3D

Une augmentation de la sensibilité d'un facteur ~ 7 [26], suite à une suppression des septas, est possible en prenant en compte l'ensemble des coïncidences pouvant avoir lieu entre les différents plans (figure I.4C), afin de mesurer les LDR les plus obliques, engendrant alors une augmentation du nombre de coïncidences diffusées d'un facteur ~ 3 [26]. Comme l'acquisition ne se fait plus seulement dans des plans parallèles, nous parlons d'acquisition 3D. Comme avantage par rapport à l'acquisition 2D, l'augmentation de la sensibilité permet la diminution de la dose du traceur injectée, l'amélioration du rapport signal sur bruit et encore la diminution de la durée des examens. L'augmentation de la sensibilité n'est pas uniforme dans la direction axiale [27].

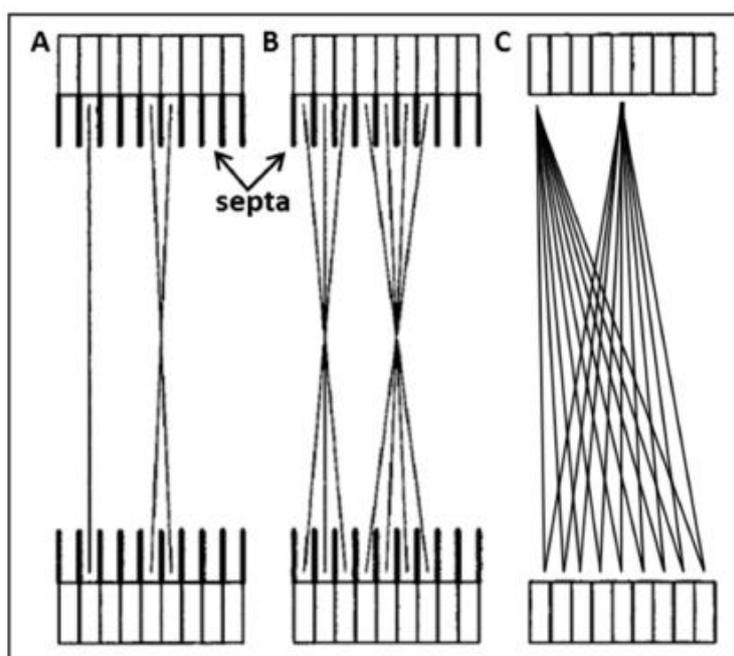


Fig. I.4 : Illustration des types d'acquisition en TEP ; acquisition 2D avec plan droit et plan croisé (A), acquisition 2D à haute sensibilité avec plan droit et plan croisé (B) et l'acquisition 3D (C). (Adaptée de [20]).

Nous trouvons deux (02) formats pour enregistrer les coïncidences détectées, qui sont: Le format séquentiel (mode-liste), consiste à stocker, par ordre chronologique de détection des coïncidences mesurées, une liste d'informations de ces coïncidences

mesurées telles que la position des cristaux ayant détecté les différents évènements, l'énergie des photons, l'instant de cette détection ou encore le temps de vol.

Un autre format, appelé sinogramme, permet de stocker, sous la forme de projections faites sur 180° autour du patient, les données enregistrées avec des échantillonnages temporel, spatial et spectral prédéfinis.

1.2.1.5. Reconstruction des données

La reconstruction consiste à passer des données stockées à la distribution en 3D de l'activité mesurée. Deux grandes catégories d'algorithmes de reconstruction sont utilisées. Nous trouvons les méthodes analytiques [28], telle que la rétroprojection filtrée, qui tendant à être de moins en moins utilisées en routine clinique, et les méthodes itératives. Dans ce qui suit, nous décrivons uniquement les méthodes itératives.

Les méthodes itératives consistent à estimer l'image par une suite d'itérations. La reconstruction se fait en 2 étapes: la première étape consiste à fournir une estimée de l'image à reconstruire et la deuxième étape consiste alors à projeter itérativement les images estimées selon chaque LDR puis à les comparer aux projections mesurées. Les différences obtenues sont alors utilisées pour ajuster l'estimée initiale le long des LDR. Ce processus est répété jusqu'à ce que les écarts entre les projections estimées et ceux mesurées atteignent un certain niveau de tolérance.

Les méthodes itératives présentent des avantages tels qu'elles permettent de prendre en considération les propriétés statistiques des données mesurées ainsi que les particularités géométriques du tomographe ou encore les phénomènes physiques interférant avec l'acquisition.

Les algorithmes de reconstruction les plus utilisés reposent sur une approche statistique. Nous notons en particulier les algorithmes basés sur la maximisation de l'espérance (*Expectation Maximisation*, EM), qui sont:

- ML-EM : consiste à maximiser la vraisemblance (*Maximum Likelihood*, ML) pour minimiser la fonction de cout [29].
- OS-EM : une version accélérée de ML-EM, consiste à minimiser la fonction de cout par sous-ensembles (*Ordered subsets*, OS) de projections réparties uniformément autour du volume [30].

En résumé, la vraisemblance représente une mesure statistique qui est maximale quand les différences entre les projections estimées et les projections mesurées sont

minimales. L'algorithme de maximisation de l'espérance (EM) est un algorithme itératif qui permet de maximiser la vraisemblance lorsque l'on fait l'hypothèse que les données sont affectées d'un bruit de Poisson (le cas des données issues des TEP). Dans le cas de l'algorithme OS-EM, nous notons que la qualité de l'image obtenue dépend en partie du nombre d'itérations utilisées et de sous-ensembles.

1.2.1.6. Correction des données

L'obtention des images TEP, en plusieurs étapes, implique des phénomènes qui peuvent dégrader la qualité de l'image reconstruite. Nous décrivons, dans la suite, certaines méthodes de corrections utilisées afin de réduire l'effet de ces phénomènes.

➤ Normalisation

La mesure en coïncidence consiste à l'utilisation d'un grand nombre de détecteurs. Cependant, les particularités de chaque détecteur telle que ses dimensions, le gain des photomultiplicateurs ou encore les propriétés physiques des cristaux de scintillations, nécessitent une correction, qui doit être appliquée, afin de réduire les différences de sensibilité entre chaque LDR (normalisation).

Parmi les méthodes de normalisation, nous trouvons les méthodes dites directes [31], consistent à mesurer l'activité d'une source de géométrie connue et uniforme. Les facteurs de normalisation appliqués à chaque LDR sont alors égaux au rapport entre le nombre de coïncidences mesurées et le nombre de coïncidences attendues.

Une autre méthode de normalisation [32], consiste à diviser les paramètres de normalisation en deux composantes : la dépendance de la sensibilité de chaque LDR à l'angle d'incidence des photons sur le cristal d'une part et l'efficacité de détection, propre à chaque détecteur, d'autre part.

➤ Correction d'atténuation

Pour l'obtention d'images interprétables en TEP, d'un point de vue quantitatif ou visuel, la correction d'atténuation est l'étape la plus importante parmi les corrections nécessaires. Comme nous l'avons décrit précédemment, il y a possibilité pour que l'un ou les deux photons issus de l'annihilation interagissent avec la matière de l'organisme, par diffusion Compton ou effet photoélectrique (tableau I.2), ce qui réduit le nombre de coïncidences mesurées et produit une sous-estimation de l'activité estimée. La figure ci-dessous montre le résultat de cette sous-estimation.

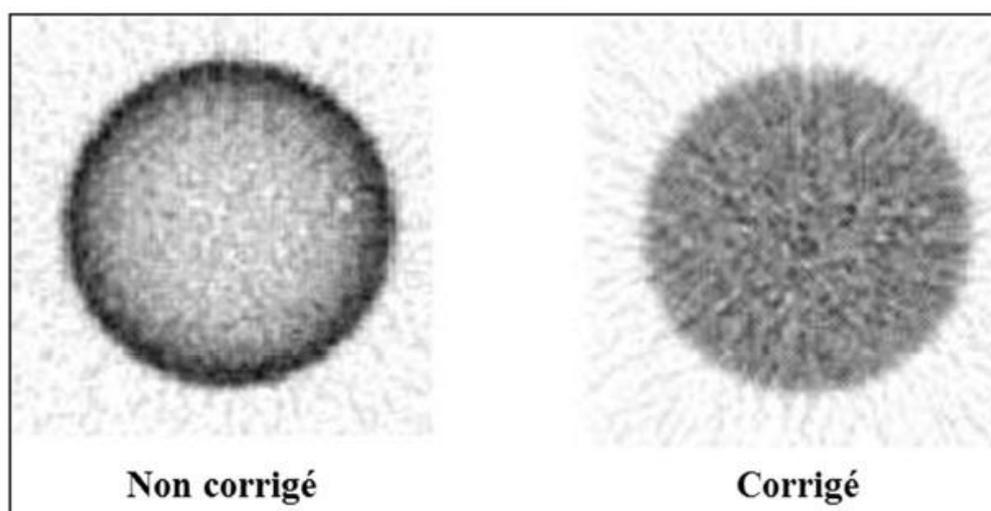


Fig. I.5 : Illustration de l'effet de la correction d'atténuation sur l'image d'un cylindre d'activité homogène. (Adaptée de [20]).

En routine clinique, la méthode de correction d'atténuation utilisée repose sur l'utilisation d'une source externe émettrice de rayons X, directement couplée au système TEP [33]. L'image anatomique, issue du TDM, consiste à déterminer la carte d'atténuation des photons en tout point du milieu. Cependant, l'utilisation d'une source émettrice de rayons X nécessite une conversion de la carte d'atténuation pour estimer l'atténuation des photons à 511keV. Pour cela, la méthode la plus classique consiste à séparer les zones de faibles atténuations des zones de fortes atténuations sur l'image TDM. Ensuite, nous appliquons, à chacune des deux sections obtenues, un facteur d'échelle [34-35]. L'application de facteurs d'échelle permet de prendre en considération les différences de sections efficaces des effets (photoélectrique et Compton) entre les photons de 100 et 511 keV.

➤ Correction de la diffusion

Les photons diffusés sont détectés avec une énergie inférieure à 511 keV. Il est donc possible de les ignorer en ne considérant que les photons compris dans une fenêtre d'énergie donnée. Cependant, cette méthode est insuffisante pour distinguer les photons ayant une énergie légèrement inférieure à 511 keV.

Parmi les méthodes de correction de diffusion les plus précises, celles qui emploient des simulations numériques pour déterminer la part du rayonnement diffusé à partir d'une estimation de la distribution de radioactivité et de la distribution de l'atténuation issue du TDM par exemple. Donc, une de ces estimations correspond à

l'image reconstruite sans correction du diffusé. L'estimation du diffusé peut alors être obtenue en utilisant :

- Un modèle analytique simplifié [36].
- Une simulation Monte-Carlo [37].

Le processus est ensuite répété en utilisant l'image ainsi corrigée comme nouvelle estimée de la distribution.

Parmi les avantages de ces méthodes, est qu'elles prennent en considération les données relatives à l'atténuation de l'objet étudié ainsi que l'hétérogénéité de la distribution mesurée.

- Correction des coïncidences fortuites

Parmi les méthodes de correction des coïncidences fortuites, il existe deux méthodes principales pour estimer la distribution des coïncidences fortuites. La première repose sur la mesure du taux de comptage des singles pour chaque cristal. En s'aidant au temps d'ouverture d'une fenêtre temporelle émise par un analyseur d'amplitude multicanal τ suite à la mesure d'un single, le nombre de coïncidences fortuites joignant les détecteurs i et j mesurées par chaque LDR vaut:

$$R_{ij} = 2\tau N_i N_j, \quad (\text{I.8})$$

avec N_i et N_j nombres de singles, mesurés par les détecteurs i et j respectivement.

Le processus consiste alors à la soustraction du nombre de coïncidences fortuites ainsi estimées du nombre de coïncidences totales détectées.

La deuxième méthode repose sur l'utilisation d'une seconde fenêtre de coïncidence décalée dans le temps [38] dont le principe est le suivant: similairement à l'enregistrement des coïncidences par la méthode décrite précédemment, chaque single détecté par un détecteur i ouvre une fenêtre temporelle de longueur τ , similaire à celle utilisée pour le premier circuit de coïncidence, mais avec un retard r . Une fois la fenêtre temporelle ouverte après un retard r , un autre single, issu d'une annihilation différente, est détecté par un détecteur j et est alors enregistré. La probabilité de détecter des coïncidences fortuites est stationnaire dans le temps. L'ensemble des événements ainsi enregistrés, qui correspondent par définition à des coïncidences fortuites, permet d'estimer, pour chaque LDR, le nombre de coïncidences fortuites moyen enregistré par le système de coïncidences utilisant la fenêtre sans retard.

1.2.1.7. Etalonnage

L'étalonnage consiste à caractériser l'activité observée en une grandeur physique en passant de la valeur numérique issue de l'image brute à l'activité des tissus par unité de volume (en Becquerel par millilitre, Bq/mL).

Cette étape consiste à acquérir la distribution d'une source d'activité connue (généralement un cylindre) et à reconstruire l'image en réalisant l'ensemble des corrections décrites précédemment. La moyenne du nombre de coups mesurés dans le volume d'intérêt (*Volume of interest*, VOI) qui correspond à la zone d'activité connue dans l'image reconstruite est alors employé pour le calcul du facteur de calibration par :

$$f_{\text{calibration}} = \frac{\text{Activité mesurée/Volume}}{\text{Nombre de coups dans le VOI}} \quad (\text{I.9})$$

1.2.1.8. Imagerie multimodalité

L'imagerie multimodalité consiste à fournir des images médicales issues de différentes modalités d'imagerie pour un même patient.

Le couplage de l'imageur TEP à un imageur TDM (TEP/TDM) permet la fusion des informations métaboliques et anatomiques en un seul examen. Cela permet d'améliorer la localisation des zones fonctionnelles dans l'organisme d'une part, et de fournir une carte d'atténuation précise d'autre part.

Le premier prototype TEP/TDM pour le domaine médical s'est produit dans l'année 2000 [33], il a remporté un succès rapide.

Si la TEP/TDM en oncologie est actuellement largement admise, le débat sur l'intérêt de la multimodalité avec le développement d'imageurs couplant la TEP avec l'IRM. Ces nouveaux systèmes permettent une amélioration du contraste dans les tissus mous, le recoupement entre les informations issues des images TEP et les images IRM fonctionnelles et enfin la réduction de la dose au patient. Cependant, les difficultés de tels systèmes résident dans des problèmes technologiques :

- La sensibilité des détecteurs TEP aux champs magnétiques de l'IRM.
- La perturbation des champs magnétiques par les détecteurs TEP.
- La difficulté d'acquérir les données simultanément sans interférence mutuelle.

I.2.2. Métabolismes mis en évidence par la TEP/TDM en cancérologie

La TEP permet d'évaluer l'activité métabolique tumorale suite à l'accumulation du traceur injecté. Dans ce qui suit, nous décrivons les fonctions mises en évidence à l'aide de la TEP en routine clinique. Ensuite, nous décrivons le métabolisme glucidique mis en évidence par le FDG.

L'utilisation de tel type de traceurs en routine clinique est basée sur le diagnostic voulu. Trois (03) grands types de radiotraceurs TEP sont employés dans le cadre du diagnostic :

- La 6-¹⁸F-fluoro-L-dihydroxyphénylalanine (FDOPA), analogue d'un acide aminé aromatique naturel transformé par les tissus cibles en dopamine (un neurotransmetteur).
- La ¹⁸F-fluorocholine (FCH), analogue de la choline (un nutriment essentiel rentrant en jeu dans de nombreux processus cellulaires).
- Le 2-deoxy-2-¹⁸F-fluoro-D-glucose (FDG), analogue du glucose (source d'énergie des cellules).

La FDOPA est principalement employé en neurologie pour mettre en évidence la perte des neurones dopaminergiques au niveau du striatum (maladie de Parkinson).

A l'heure actuelle, le FDG est le traceur le plus employé en clinique. S'il permet de déterminer le stade d'avancement de la maladie et d'évaluer la réponse à la thérapie de la plupart des cancers, il apporte cependant peu d'informations en cas de cancers de carcinomes hépatocellulaires, de la prostate et de cancers gastriques, d'où le développement de nouveaux traceurs s'est lancé.

I.3. Etude du métabolisme glucidique à l'aide de la fixation du ¹⁸F-FDG

I.3.1. Analyse qualitative

L'analyse qualitative signifie l'analyse visuelle, par le praticien, d'un examen TEP statique. Elle se base sur les différences de contraste entre la zone tumorale et les tissus sains avoisinant, qui dépendent :

- Du temps entre injection et acquisition.
- Du glucose sanguin.
- Du taux d'insuline.
- De la nature des tissus voisins de la lésion.

Ces analyses sont cependant considérées comme peu reproductibles et sont déconseillées dans le contexte du suivi thérapeutique.

I.3.2. Mesure du métabolisme glucidique

Dans le contexte de la mesure du métabolisme glucidique, plusieurs méthodes d'analyse sont utilisées. Plus de détails sur ces approches d'analyse sont disponibles dans le travail de Buvat [39]. Nous trouvons :

- Analyse cinétique complète.
- Simplifications à l'analyse cinétique complète.
- Analyses graphiques de Patlak et ses dérivées.
- Analyse cinétique simplifiée.

I.3.3. Méthodes semi-quantitatives

Les moyens à mettre en œuvre pour obtenir les données nécessaires à l'utilisation des méthodes dérivées de l'analyse cinétique complète (compartimentale), afin de déterminer des paramètres quantitatifs caractérisant les tumeurs, sont souvent incompatibles avec la pratique clinique. Le compromis entre simplicité et estimation de grandeurs quantitatives a largement favorisé l'utilisation de méthodes semi-quantitatives. Dans ce contexte, nous présentons la méthode de calcul de la valeur de fixation normalisée (*Standardized Uptake Value*, SUV), qui en a le plus bénéficié. Cette mesure utilise une unique TEP statique, généralement acquise une heure après l'injection du radiotraceur au patient, et ne nécessite que la dose injectée et le poids ou la taille du patient comme paramètres.

I.3.3.1. Valeur de fixation normalisée : SUV

La valeur de fixation normalisée a été proposée par Kenney et al [40], sous le nom de (*Differential Absorption Ratio*, DAR), et a trouvé ses applications en TEP dans les années 80 [41]. Malgré de nombreux débats relatifs à son utilisation en oncologie [42-43], il est à l'heure actuelle l'index quantitatif le plus employé en routine clinique [44]. Pour cette raison, le SUV fait l'objet de recommandations dans des protocoles de normalisation, dont le but est de limiter les sources de variabilité entre les centres. Dans la suite, nous présentons les hypothèses de simplification qui permettent de passer de la mesure du métabolisme glucidique telle que décrite par l'analyse compartimentale à celle du SUV.

I.3.3.1.1. Définition du SUV

La fixation du traceur dans l'organisme dépend en particulier du volume sanguin, dans lequel l'activité se distribue, et de la dose injectée. La normalisation de la fixation mesurée consiste donc à prendre en compte ces deux facteurs, tels que :

$$SUV_{BW} (g \cdot ml^{-1}) = \frac{\text{Concentration d'activité (kBq/mL)}}{\text{Dose injectée (kBq)} / \text{Poids du patient (g)}} \quad (I.10)$$

Cette définition du SUV normalisé par le poids, ou (*Body Weight*, BW), est généralement donnée sans dimension. Dans ce cas, nous faisons donc l'hypothèse que la masse volumique du patient est de 1 g/mL (masse volumique de l'eau).

I.3.3.1.2. Hypothèses simplificatrices et écart au modèle cinétique

Comme rappelé précédemment [39], la mesure du métabolisme glucidique par le SUV se base sur des simplifications du modèle compartimental. En utilisant la normalisation par le poids du patient (équation I.10), nous considérons que tous les tissus seins consomment une quantité totale de FDG proportionnelle au poids du patient. Comme indiqué par Keyes [42], cette hypothèse n'est pas vérifiée dont la fixation du FDG est inférieure dans le cas des tissus adipeux par rapport à celle des autres tissus. En effet, la modification de la masse grasseuse, dans le contexte du suivi thérapeutique, d'un patient durant le traitement peut produire des interprétations des variations du SUV_{BW} contradictoires.

Pour réduire la dépendance du SUV à la masse grasseuse du patient et donc remédier à ce dernier problème, d'autres définitions du volume de distribution d'activité ont été suggérées. Les définitions les plus utilisées sont :

- La surface corporelle totale, ou (*Body Surface Area*, BSA), exprimée en m^2 et couramment calculée à partir de formules empiriques en intégrant la taille et le poids du patient [45-46]. La formule préconisée par le protocole TEP pour le suivi du traitement (l'*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*, EORTC), est la formule suggérée par Du Bois et al [47]:

$$BSA (m^2) = 0,00718 \times \text{poids (kg)}^{0,425} \times \text{taille (cm)}^{0,725} \quad (I.11)$$

- La masse maigre, ou (*Lean Body Mass*, LBM), suggérée par Zasadny et al [48], est également obtenue par des formules empiriques intégrant la taille, le poids, le sexe et l'âge du patient (équations I.12, I.13).

$$\text{Femme : } LBM (kg) = 1,07 \times \text{poids} (kg) - 148 \times \left(\frac{\text{poids} (kg)}{\text{taille} (m)} \right)^2 \quad (\text{I.12})$$

$$\text{Homme : } LBM (kg) = 1,10 \times \text{poids} (kg) - 120 \times \left(\frac{\text{poids} (kg)}{\text{taille} (m)} \right)^2 \quad (\text{I.13})$$

I.3.3.2. Rapport tissus tumoraux / tissus sains

Le rapport (tissus tumoraux/tissus sains), ou rapport T/N, qui correspond au rapport de l'activité moyenne dans la zone tumorale et de l'activité dans les tissus sains, est un index qui prend lieu aux méthodes semi-quantitatif. Il se base sur les mêmes données que celles requises pour l'obtention du SUV et il possède les mêmes sources de biais que ce dernier. De plus, la définition de la zone des tissus sains est aussi complexe sachant que la définition de la zone tumorale représente un problème majeur en TEP. En effet, si la réponse tumorale est négative, l'activité des tissus sains peut évoluer du fait du traitement. Enfin, une erreur sur la valeur de l'activité dans la zone des tissus sains peut induire une erreur statistique importante dans celle du rapport T/N, sachant que l'activité dans les tissus sains est généralement faible. Pour ces raisons, le SUV est donc l'index semi-quantitatif le plus utilisé que le rapport T/N.

I.4. Conclusion

L'étude du fonctionnement de l'imagerie TEP et aussi du métabolisme glucidique des cellules tumorales, permise par l'emploi du FDG, revêt un intérêt particulier. Bien que largement utilisé pour le diagnostic et le suivi thérapeutique des tumeurs, la TEP est utile pour la délimitation et le traitement radio-thérapeutique des cancers.

Nous décrivons, dans le prochain chapitre, l'imagerie par échographie de contraste (EC), ou *Contrast-enhanced Ultrasound (CEUS)*, et son emploi en oncologie en commençant par ses principes physiques et les techniques utilisées pour l'analyse et la quantification de la perfusion tumorale dans ces images ultrasonore de contraste.

Chapitre II

Echographie de contraste

(EC)

II.1. Introduction

Les applications cliniques de l'imagerie ultrasonore se sont largement élargies ces dernières années. L'imagerie ultrasonore est reconnue aujourd'hui comme une technique de diagnostic fiable. Plusieurs progrès dans les équipements et l'appareillage ultrasonore ont contribué à la compréhension de l'anatomie et la fonction des différents organes. Avec l'introduction de l'imagerie en deux dimensions (2D) en temps réel, différentes structures anatomiques du corps sont visualisées de façon non invasive. Les applications des ondes ultrasonores (US), plus l'exploration de l'anatomie du corps, augmentent nettement les performances de l'échographie, en particulier pour la détection et la caractérisation de certaines lésions. Elles donnent aussi accès à des explorations dynamiques et à des données quantitatives.

Nous décrivons dans ce chapitre les nouvelles méthodes ultrasonores utilisées pour détecter et visualiser les produits de contraste. En plus les modèles employés pour la modélisation de la cinétique de la perfusion.

II.2. Principes physiques des méthodes d'imagerie de contraste

II.2.1. Interaction microbulles-ultrasons

Les produits de contraste pour ultrasons modifient les propriétés physiques des tissus, ce qui provoque des modifications dans le comportement des ondes ultrasonores qui les traversent. Le mécanisme d'action induit une augmentation de l'intensité du faisceau ultrasonore rétrodiffusé, une diminution de la vitesse des ultrasons et une atténuation du faisceau ultrasonore. Le principal effet employé par les agents de contraste ultrasonores est l'augmentation de l'intensité du faisceau ultrasonore rétrodiffusé.

Cette rétrodiffusion peut être classée en deux classes : passive et active. La microbulle réfléchit passivement l'onde incidente en raison de la différence d'impédance acoustique entre la microbulle et le milieu environnant. En plus de la rétrodiffusion passive, la microbulle devient une source d'ultrasons (réflecteur actif). Sous l'action d'une onde ultrasonore, la microbulle entre dans des pulsations volumétriques. Dans le cas le plus simple, la taille de la microbulle diminue pendant la pression positive (la phase de compression de l'onde US) et augmente pendant la pression négative (la phase de décompression de l'onde). Les variations de taille de la microbulle dépendent des variations de la fréquence de l'onde incidente et sont maximales pour

la fréquence de résonance. Ce phénomène de résonance est très important, par ce que la microbulle résonante augmente de façon significative l'amplitude du signal réfléchi.

La réponse de la microbulle peut être partagée en trois régimes acoustiques. Pour de faibles amplitudes acoustiques, l'étalement et la dilatation de la microbulle sont symétriques, de faible amplitude et varient linéairement avec l'amplitude de la pression acoustique. Pour des amplitudes acoustiques supérieures, la compression de la microbulle est plus faible que sa dilatation. La rigidité de la microbulle varie localement en fonction des phases de compression et de dilatation, l'expansion de la microbulle est plus faible que sa compression. Cette différence dans le comportement élastique de la microbulle pendant les phases de compression et de dilatation induit une réponse asymétrique, caractéristique de la génération des harmoniques (composantes fréquentielles non linéaires) (fig. II.1). Pour des amplitudes acoustiques beaucoup plus élevées, la microbulle se rompt. La destruction de la microbulle est un phénomène qui dépend fortement du type d'agent de contraste, et principalement de la paroi choisie pour encapsuler les microbulles. Souvent, pendant la destruction de la microbulle, elle libère le gaz, qu'elle contient, dans le milieu aqueux qui l'entoure. La figure II.2 résume les types de réponses de la microbulle et les régimes acoustiques correspondants. Naturellement, ces zones acoustiques se chevauchent entre elles en fonction de l'agent de contraste interrogé et ne sont donc pas facilement séparables. Ces régimes acoustiques sont groupés en fonction de la pression acoustique ou en fonction de l'index mécanique (IM) [49]. L'IM, imposé aux constructeurs d'échographes par l'organisme américain d'habilitation, ou *Food and Drug Administration (FDA)*, représente la quantité de travail mécanique appliqué sur une microbulle pendant la moitié d'une période ultrasonore. Il est défini comme la pression négative (P_-) en mégapascal divisée par la racine carrée de la fréquence ultrasonore (f) en mégahertz (équation II.1). En fonction des recommandations d'utilisation des ultrasons, l'IM se situe dans une plage comprise entre 0 et 1,9 (la valeur maximale autorisée).

$$IM = \frac{P_- [MPa]}{\sqrt{f [MHz]}} \quad (II.1)$$

La figure II.2 montre qu'à des indices mécaniques faibles, les microbulles réfléchissent de façon linéaire mais donnent une amélioration conséquente à l'écho ultrasonore.

Néanmoins, ce mode d'imagerie (fondamental ou conventionnel), est de moins en moins utilisé en raison de ses limitations dans plusieurs applications. Lorsque l'amplitude du champ ultrasonore est augmentée, à des index mécaniques supérieurs à 0,1, les microbulles génèrent des composantes fréquentielles harmoniques. Ces pressions sont suffisamment élevées pour induire des vibrations non linéaires stables des microbulles sans les détruire. Dans ce régime acoustique, les composantes générées par les microbulles sont stationnaires non linéaires et la détection sélective de ces composantes représente la base de l'imagerie harmonique. Ce mode est devenu, à l'heure actuelle, le mode d'imagerie par défaut en échographie de contraste. Plusieurs méthodes d'imagerie basées sur l'imagerie harmonique sont actuellement disponibles. L'imagerie par inversion de phase, ou *Pulse Inversion (PI)*, et l'imagerie par modulation d'amplitude, ou *Power modulation (PM)*, ou des combinaisons de ces deux techniques, représentent des versions améliorées de l'imagerie harmonique et sont toutes basées sur le comportement stationnaire et non linéaire des microbulles. Néanmoins, avec les nouvelles générations de produits de contraste, les variations non linéaires des microbulles peuvent être induites à des index mécaniques plus bas ($< 0,1$).

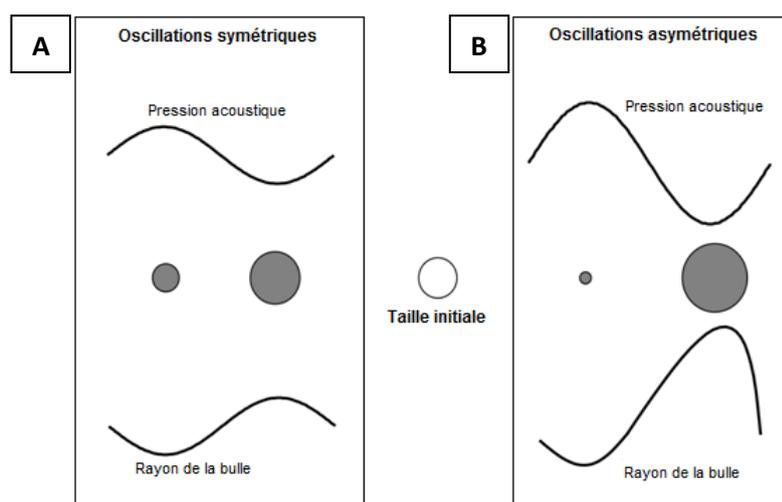


Fig. II.1: Oscillations d'une microbulle soumise à une onde de pression; (A) oscillations symétriques (linéaires) et (B) oscillations asymétriques (non linéaires).

(Adaptée de [18]).

Pour des index mécaniques plus élevés, les microbulles peuvent être détruites. Malgré que la destruction des microbulles soit évitée dans la majorité des modes d'imagerie, elle est également exploitée dans d'autres applications [50].



Fig. II.2: Régimes acoustiques d'une microbulle en fonction de l'index mécanique (IM). (Adaptée de [18]).

II.2.2. Méthodes d'imagerie de contraste

II.2.2.1. Imagerie fondamentale

Avec les premières utilisations des microbulles en imagerie ultrasonore, il était supposé que l'imagerie conventionnelle en mode B (imagerie fondamentale) serait suffisante pour détecter les microbulles et obtenir des images de contraste de meilleure qualité. Les microbulles ont montré une amélioration de l'échogénéité des cavités cardiaques. L'apport des microbulles de contraste atteint 25 à 30 dB en mode Doppler en fonction de leur concentration [51]. En utilisant ce mode conventionnel, les microbulles peuvent être détectées dans les compositions vasculaires larges, les cavités naturelles ou dans certains organes superficiels avec cependant une sensibilité médiocre aux index mécaniques utilisés.

II.2.2.2. Imagerie harmonique en mode B

La principale différence se situe dans la façon dont se comportent les microbulles et tissus en réflexion. Les tissus sont des réflecteurs ultrasonores linéaires. En d'autres termes, les tissus ne réfléchissent qu'à la fréquence d'excitation, indépendamment de la pression acoustique appliquée et de la fréquence incidente. Par contre, les bulles se comportent non linéairement, en réfléchissant de l'énergie ultrasonore à des

fréquences harmoniques multiples entières de la fréquence d'excitation. C'est sur cette propriété acoustique que se base la totalité des méthodes d'imageries harmoniques des produits de contraste.

En mode d'imagerie harmonique de contraste, la deuxième composante fréquentielle (fréquence harmonique) est employée pour construire l'image échographique en mode B. Dans ce cas, l'image reconstruite est composée uniquement autour de la fréquence $2f_0$, alors que l'onde incidente se propage à la fréquence f_0 . Cette méthode permet une très bonne détection des microbulles, car les tissus ne contenant pas des microbulles ne réfléchissent pas à cette fréquence.

L'amplitude acoustique transmise doit être suffisamment élevée pour induire les microbulles dans des vibrations non linéaires,

Néanmoins, les ultrasons transmis à fortes amplitudes acoustiques se propagent de façon non linéaire [52-53] comme montré sur la figure II.3. Ainsi, la propagation des ultrasons est accompagnée de générations de composantes harmoniques, notamment la composante à $2f_0$. Pour des pressions acoustiques à des index mécaniques suffisamment élevées, des distorsions de l'onde ultrasonore se créent et s'accumulent suivant la profondeur de propagation. Ces distorsions sont responsables de la création de composantes fréquentielles harmoniques en fonction de la distance bien qu'elles soient absentes à la source (à la surface du transducteur) (fig. II.3A).

Toutes les méthodes d'imagerie de contraste basées sur la non linéarité des microbulles se trouvent dégradées à cause de la fréquence harmonique provenant des tissus. Par conséquent, l'onde acoustique transmise doit être réduite en amplitude, afin de minimiser cette influence.

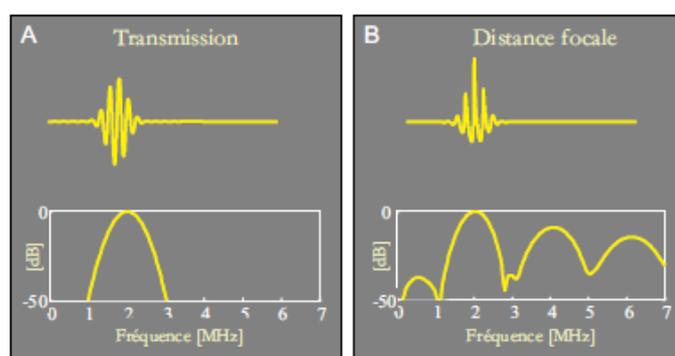


Fig. II.3: Simulations de la propagation non linéaire d'une onde ultrasonore de 2MHz, 3 cycles, 400 kPa, générée par un transducteur focalisé à 60 mm : (A) onde à la surface du transducteur et son spectre correspondant ; (B) distorsion de l'onde ultrasonore après propagation dans le milieu et son spectre. (Adaptée de [18]).

II.2.2.3. Imagerie harmonique des tissus (imagerie harmonique native)

Jusqu'à récemment, le développement de l'imagerie ultrasonore se basait sur des hypothèses assumant que les ondes ultrasonores se propagent dans les tissus de façon linéaire. Malheureusement, ces hypothèses se sont avérées invalides aux fréquences et intensités utilisées à l'heure actuelle [54]. À présent, il a été prouvé que les ondes ultrasonores subissent des distorsions dans presque toutes les utilisations médicales [53, 55-57]. La distorsion est due à d'infimes non linéarités qui dégradent graduellement l'onde ultrasonore donnant naissance à des fréquences harmoniques qui n'étaient pas présentes à la source [58-59]. L'imagerie sélective des composantes fréquentielles harmoniques améliore considérablement la qualité des images ultrasonores. Cette technique, appelée imagerie harmonique des tissus (native), a émergé récemment comme une tendance majeure de l'imagerie ultrasonore et est à l'heure actuelle installée sur toutes les machines récentes d'échographie.

Un exemple de simulations [53] montrant des composantes fréquentielles fondamentales et harmoniques de l'onde acoustique d'une sonde ultrasonore est donné sur la figure II.4. La courbe du champ harmonique axial (fig. II.4A) montre son caractère cumulatif, ce qui se traduit par une intensité trop faible de la sonde et une augmentation en fonction de la distance de propagation.

La deuxième principale caractéristique est montrée dans le champ harmonique latéral (fig. II.4B) et traduit par le niveau trop faible des lobes secondaires et des lobes images à cette fréquence. En raison de la relation non linéaire entre la composante fondamentale et la composante harmonique, le champ harmonique présente une annulation importante des lobes secondaires et des lobes images. Ces lobes sont responsables des artefacts provenant d'obstacles ou de réflecteurs trouvés loin du lobe principal. Cette caractéristique est montrée sur la figure II.4B dans laquelle sont tracés les profils latéraux normalisés du champ acoustique à la fréquence harmonique et fondamentale. Le champ harmonique montre une annulation conséquente de l'amplitude des lobes secondaires.

La largeur du faisceau ultrasonore harmonique, représente la troisième propriété du champ harmonique, responsable de l'amélioration de la qualité de l'image. Comme le montre la même figure, le champ harmonique est plus étroit que le champ fondamental, avec une diminution de la largeur du faisceau de l'ordre de 35 %. Cette diminution de la largeur du faisceau se traduit par une amélioration de la résolution latérale des images ultrasonores à cette fréquence.

Ces propriétés expliquent pourquoi le mode harmonique donne une meilleure qualité d'image.

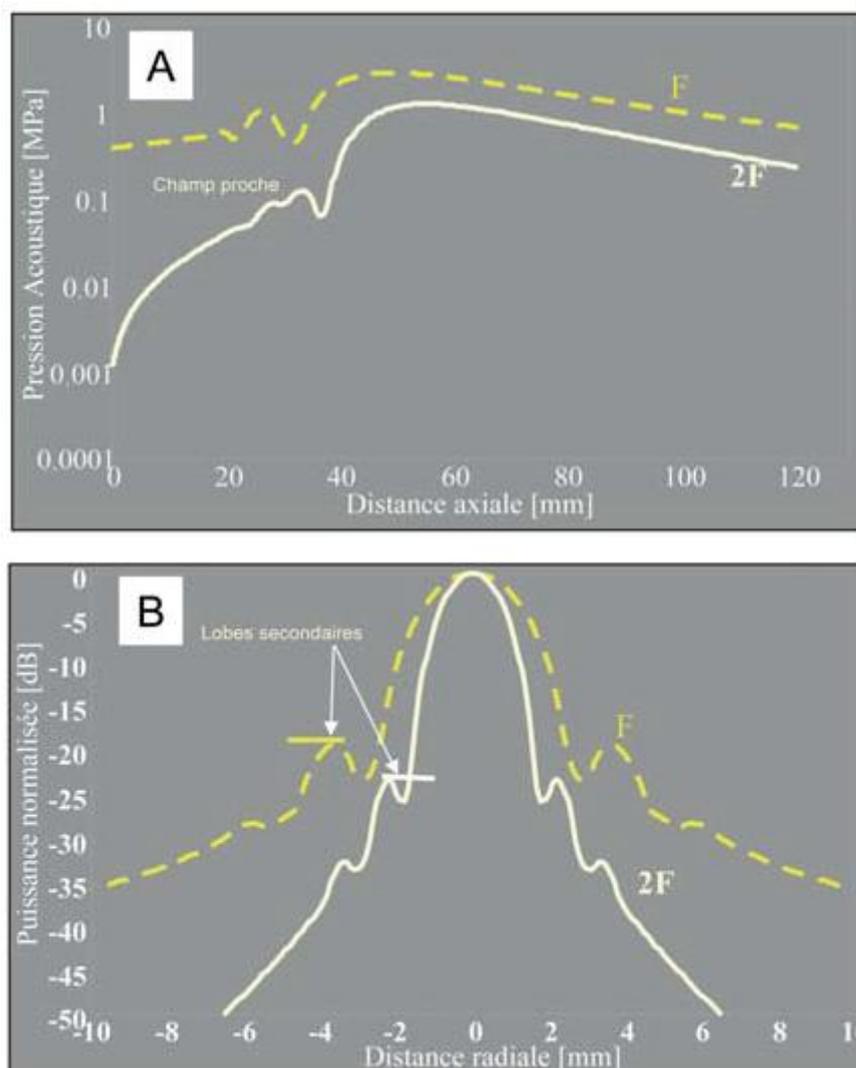


Fig. II.4: Simulations de la propagation non linéaire d'une onde de 2 MHz, 3 cycles, 400 kPa, générée par un transducteur focalisé à 60 mm : (A) champ acoustique axial fondamentale (ligne en pointillé) et harmonique (ligne en continu), (B) champ acoustique radial fondamentale (ligne en pointillé) et harmonique (ligne en continu). (Adaptée de [18]).

II.3. Imagerie paramétrique pour l'échographie de contraste

L'utilisation de l'échographie de contraste pour la mesure de la perfusion tissulaire est en plein évolution, grâce à la plus grande sensibilité et spécificité des différents modes d'imagerie ultrasonore. En effet, les avantages de cette modalité sont son faible coût, sa bonne résolution spatiale et temporelle, sa disponibilité (notamment pour réaliser

un suivi) et son innocuité. Ces propriétés font que l'échographie de contraste est de plus en plus employée pour l'évaluation de la perfusion myocardique, pour la caractérisation des lésions hépatiques et des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et pour l'imagerie du petit animal.

Plusieurs études portent maintenant sur l'estimation de la perfusion grâce à l'injection de produits de contraste ultrasonores (PCUS). Les premières approches développées à partir de l'injection en bolus reprennent les assomptions et les méthodes d'estimation de la perfusion utilisées dans les autres modalités.

Cette partie présente les conditions à vérifier pour estimer la perfusion ainsi que les différentes techniques employées à l'heure actuelle afin d'estimer globalement la perfusion en échographie de contraste.

II.3.1. Obstacles à la quantification

Actuellement, la quantification peut être réalisée en utilisant des modes ultrasonores spécifiques à l'imagerie et aux produits de contraste. Une relation linéaire existe entre l'intensité du signal de l'image et la concentration du PCUS, pouvant être quantifiée par des approches ou logiciels spécifiques, permettant la linéarisation des données (Visilog, Qontraxt, Qlab, Chi-Q...) pour produire des courbes de prise de contraste. Cependant, sans précautions, différents artefacts tels que les mouvements respiratoires et aussi l'atténuation liée au produit de contraste peuvent provoquer la proportionnalité entre l'intensité du signal dans l'image et la concentration de microbulles.

Une fois les corrections (correction de l'effet des mouvements respiratoires et d'atténuation) sont effectuées, il est possible de quantifier la perfusion à partir de deux type d'approches: approches dirigées par les modèles et approches dirigées par les données [18].

II.3.2. Modélisation de la variation de concentration de PCUS [18]

Comme indiqué précédemment, la modélisation de la variation de la concentration de PCUS s'effectue à partir deux types d'approches : les approches dirigées par les modèles et les approches dirigées par les données. Dans la suite, les détails sur les fondements et les équations mathématiques se trouvent dans les références correspondantes.

II.3.2.1. Approches dirigées par les modèles

L'estimation de la perfusion est basée sur l'étude de la variation de concentration du produit de contraste. En admettant que l'on ait accès à la mesure de la concentration de l'agent de contraste par le système d'imagerie, nous pouvons modéliser la variation de PCUS en suivant la théorie de dilution d'un indicateur. Les produits de contraste ultrasonores (PCUS) étant exclusivement intravasculaires, la modélisation compartimentale de la variation de concentration de PCUS prend en compte sa dilution au sein du compartiment vasculaire qui est exprimée par son volume par unité de tissu (mL/100 g de tissu) et son flux sanguin par unité de tissu (mL/min/100 g).

L'agent de contraste, à la différence des produits de contraste utilisés dans les autres modalités, peut être détruit par une impulsion de forte amplitude. Cette destruction peut être modélisée par une fuite hors du volume étudié (taux de destruction d), proportion de microbulles détruites à un temps donné (fig. II.5).

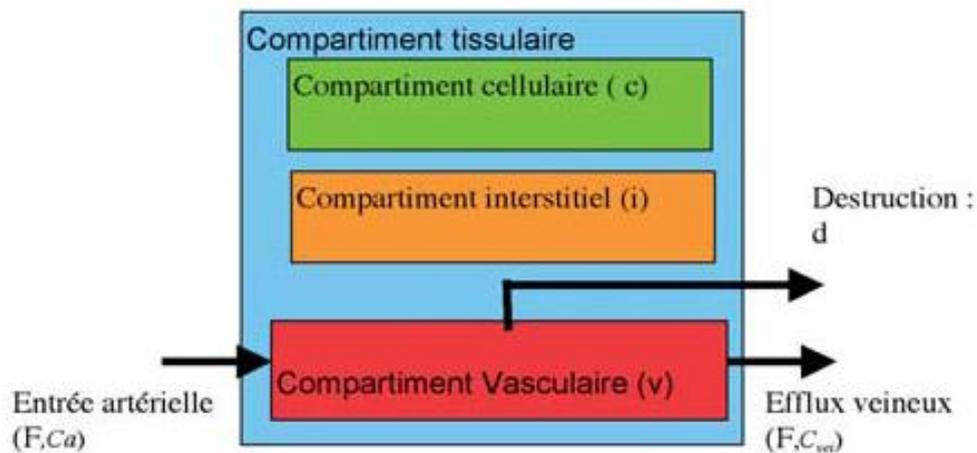


Fig. II.5: Modélisation compartimentale simple de la microcirculation sanguine.

(Adaptée de [18]).

La variation de quantité de produit de contraste dans le volume étudié peut être caractérisée par la variation de quantité dans le compartiment vasculaire parce qu'il n'y a pas d'échange :

$$\frac{dQ_t}{dt} = F \cdot C_a - F \cdot C_v \cdot v - d \cdot C_v \cdot V_v \cdot v, \quad (\text{II.2})$$

avec v la fraction vasculaire du voxel considéré $v = \frac{V_v}{V_t}$, $(F \cdot C_a)$ l'entrée artérielle et $(F \cdot C_v)$ l'efflux veineux.

II.3.2.1.1. Imagerie paramétrique du bolus

Lorsque le produit de contraste est injecté en bolus, les conditions d'exams permettent souvent de considérer que l'effet destructif est égal à 0 (faible taux d'acquisition, ou faible index mécanique), ramenant l'équation II.2 à un modèle de perfusion purement vasculaire. Pour mesurer la perfusion à partir de ce modèle, la méthode des pentes est couramment utilisée dans la littérature [60]. Celle-ci utilise une simplification du problème en supposant un efflux veineux théorique. La variation de concentration peut s'écrire comme suit :

$$\frac{dC_v}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (C_a - C_{vel}) \quad (\text{II.3})$$

Dans la pratique, la sortie veineuse est presque indisponible, la méthode des pentes se place alors dans le cas singulier où l'efflux veineux est nul (égale à 0), c'est-à-dire pour des temps convenablement précoces après l'arrivée du bolus [60]. L'expression de la perfusion peut alors se simplifier comme suit :

$$\frac{F}{V} = \frac{C_v(t)}{\int_0^t C_a(t) dt}, (t < t_{vel}) \quad (\text{II.4})$$

Néanmoins, comme pour des flux lents, l'hypothèse d'indisponibilité d'efflux veineux peut ne pas être vérifiée, des auteurs ont suggéré une dérivation de l'équation ci-dessus pour calculer le rapport $\frac{F}{V}$. Cette dérivée étant mieux déterminée pour la valeur maximale de la dérivée de C_v , nous pouvons alors écrire :

$$\frac{F}{V} = \frac{\frac{d}{dt} C_v(t_{max}^*)}{C_a t_{max}^*}, \quad (\text{II.5})$$

avec t_{max}^* est le temps du maximum du gradient, c-à-d le temps auquel la dérivée de C_v est maximale et auquel l'efflux veineux est généralement nul. Le volume de microcirculation, quant à lui, est déterminé à partir des rapports des aires sous la courbe (ASC), ou *Area Under the Curve (AUC)*. Le volume relatif de microcirculation est donc donné comme suit :

$$V = \frac{\int_0^\infty C_v(t) dt}{\int_0^\infty C_a(t) dt} \quad (\text{IV.6})$$

Ces équations justifient le calcul de cartes paramétriques telles que le maximum du gradient positif et la carte de l'aire sous la courbe qui sont étudiés pour mesurer le flux et le volume de microcirculation, respectivement. En pratique, ces cartes sont souvent associées à des cartes décrivant certains paramètres de la courbe tels le temps du pic d'intensité (TPI), ou *Time To Peak (TTP)*, ou le pic d'intensité (PI), ou *Peak Enhancement (PE)*, notamment pour les études de perfusion cérébrale. Leur spécificité et leur sensibilité peuvent être évaluées d'un point de vue clinique pour l'analyse qualitative des séquences d'images, particulièrement en échographie de contraste cérébrale [61-62] (fig. II.6).

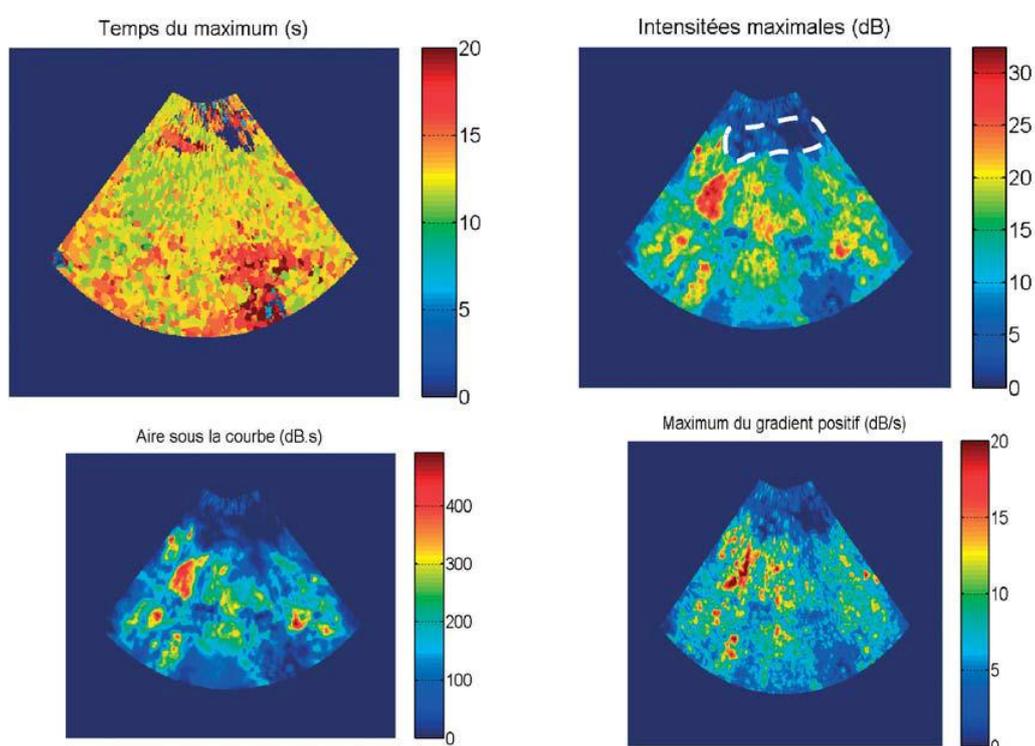


Fig. II.6: Imagerie paramétrique pour la mesure de la perfusion cérébrale. Patient souffrant d'un AVC ischémique du territoire sylvien (donnée G. Seidel). Les images sont calculées sans linéarisation des données. L'image des temps du pic d'intensité (TPI) ne permet pas d'identifier le déficit de perfusion. La zone infarctée apparaît plus clairement sur l'image du pic d'intensité (entourée en blanc). L'image d'aire sous la courbe (ASC) montre également la zone infarctée, mais n'apporte pas d'autre information. Il en est de même pour la carte du maximum du gradient positif.

(Adaptée de [18]).

II.3.2.1.2. Mode reperfusion

Le mode de remplissage, introduit par Wei et al. [63], nécessite une concentration stable de PCUS dans l'organisme, cette stabilité de concentration peut être obtenue en injectant de manière continue le produit de contraste ultrasonore (PCUS) ou après avoir attendu l'homogénéisation du PCUS dans l'organisme. Le niveau stable de concentration atteint, le PCUS est détruit dans la zone imagée par des impulsions combinant une intensité acoustique forte et une haute cadence image.

Le remplissage des tissus par le produit de contraste ultrasonore est ensuite observé à bas index mécanique pour éviter la destruction des bulles, le champ de l'image où il ne reste plus de PCUS se remplit de produit de contraste à partir des vaisseaux et tissus hors du faisceau. Cette cinétique de remplissage a été modélisée par une exponentielle croissante comme suit :

$$C_t(t) = A. (1 - e^{-B.t}) \quad (\text{II.7})$$

Le paramètre A étant proportionnel au volume de microcirculation et le paramètre B est proportionnel à la vitesse de microcirculation. Le produit $A.B$ est proportionnel au flux F de microcirculation. Vogel et al. [64] ont précisé le sens de A et B , ceci en reprenant l'expression de la modélisation compartimentale classique [60] et en négligeant l'influence de la destruction. La concentration dans le voxel examiné s'écrit alors comme suit :

$$\frac{dC_t}{dt} = \beta. C_a - \beta. C_t. v \quad (\text{II.8})$$

Or, C_a étant constante et $C_t(0)$ supposée nulle, ceci à cause de la phase de destruction. Nous pouvons résoudre l'équation de manière simple et obtenir une forme analytique de l'augmentation de produit de contraste dans le volume examiné :

$$C_t(t) = C_a. v. \left(1 - e^{-\frac{\beta}{v}.t}\right) \quad (\text{II.9})$$

Dans ce modèle, la pente de l'exponentielle $B = \frac{\beta}{v}$ croissante représente cette fois une combinaison de la fraction capillaire v et de la vitesse de microcirculation β . Le plateau final $A = C_a. v$ abouti permet d'identifier la fraction volumique d'un pixel.

Certains auteurs se sont penchés sur ce modèle afin de rendre compte de la destruction du produit de contraste lorsque l'entrée artérielle est dans le plan de l'image [65], où lorsque plusieurs entrées peuvent compliquer la forme de la courbe [66]. L'imagerie paramétrique associée ajuste l'exponentielle croissante aux données mesurées. Les images ayant le plus de sens concernent le PCUS qui est proportionnel au flux de microcirculation et l'image du plateau A qui donne une approximation du volume de microcirculation.

II.3.2.2. Approches dirigées par les données

Les mesures de paramètres montrées ci-dessus sont basées sur l'ajustement d'un modèle compartimental bien déterminé. D'autres approches ont été proposées en se basant sur les données elles-mêmes et pas sur une modélisation compartimentale. Le but est de déterminer les principales cinétiques k de perfusion $C_k(t)$, de distribution spatiale $D_k(p)$, présentes dans la série (séquence) d'image $S(p, t)$, où p représente les coordonnées des pixels et t représente le temps.

Ces méthodes sont basées sur des connaissances a priori, qui portent sur la localisation ou sur les cinétiques des différentes prises de contraste recherchées.

II.3.2.2.1. Approche par région d'intérêt

C'est l'approche la plus fréquemment utilisée. L'a priori introduit par l'utilisateur consiste à la localisation $D_k(p)$ dans les images des cinétiques à mesurer $C_k(t)$. Typiquement, les régions sont définies sur une image de la séquence, puis repositionnées manuellement. Dans chaque région d'intérêt, ou *Region Of Interest (ROI)*, la cinétique de contraste est exprimée par la valeur moyenne des intensités acoustiques. Cette méthode est très fastidieuse et souvent sujette à de différentes erreurs liées à la variabilité inter et/ou intra-observateurs.

II.3.2.2.2. Approche avec recalage de la région d'intérêt

Il est possible de définir, de manière automatique, la région d'intérêt, en mesurant localement le champ de déplacements entre les images. La plupart des méthodes de recalage existantes peuvent être classées en quatre classes: les méthodes de corrélation, les méthodes différentielles, les méthodes s'appuyant sur des modèles paramétrés de mouvement et les méthodes spatio-temporelles basées sur l'énergie. Une évaluation de ces méthodes pour la quantification de la perfusion dans les images

échocardiographiques de contraste a été suggérée par Malpica et al. [67]. L'auteur propose d'utiliser les méthodes différentielles.

Les méthodes différentielles sont basées sur la conservation de la distribution de l'intensité E d'un point qui se déplace selon l'équation suivante :

$$Et + E.v = 0, \quad (\text{II.10})$$

où Et est la dérivée partielle de E par rapport au temps et v le vecteur vitesse.

Cette équation appelée contrainte d'intensité (CI), repose sur deux suppositions: le déplacement faible entre deux images consécutives de la séquence et la conservation de l'intensité au cours du mouvement. Il est souhaitable, pour que la différenciation ait un sens, que les déplacements restent inférieurs au pixel. En pratique cette condition n'est souvent pas vérifiée à cause du bruit de speckle et des mouvements respiratoires. L'approche doit alors être combinée avec des approches multi-résolution [67] et des méthodes de réduction de bruit [68].

II.3.2.2.3. Approche par classification

Une autre approche consiste à déterminer, d'une manière automatique, les distributions spatiales D_k . Ces approches sont basées sur des méthodes de classification [64]. Dans ces techniques, nous assimilons chaque structure physiologique à une classe. La segmentation consiste alors à regrouper automatiquement l'ensemble des pixels en C_k classes (groupes), de sorte que les classes (clusters) obtenus contiennent des pixels ayant des comportements hémodynamiques les plus similaires possibles.

En pratique, un pixel n'appartient pas seulement à une classe. Mais il peut avoir des similitudes avec des éléments d'autres classes, si bien que son appartenance peut être partagée sur plusieurs classes. Le concept d'ensembles flous permet alors d'exprimer ces données imprécises de façon compacte et intuitive.

La segmentation, de la région d'intérêt, par regroupements, *ou clustering*, non exclusive a pour but d'engendrer une partition floue en minimisant la fonction J suivante [69]:

$$J = \sum_{i=1}^C \sum_{j=1}^N (u_{ij})^2 (d_{ij})^2 - \alpha \sum_{i=1}^C [\sum_{j=1}^N u_{ij}]^2, \quad (\text{IV.11})$$

où C est le nombre de compartiments physiologiques, N le nombre de pixels dans l'image, α un paramètre facilitant le regroupement (clustering) et $u = [u_{ik}]$ de degré d'appartenance de chaque pixel i à la classe k .

L'affectation d'un pixel à une classe s'effectue à l'aide d'une phase de décision en intégrant un critère spatial exposant le contexte (le voisinage dans lequel sont situés les points).

L'avantage de cet algorithme est qu'il ne nécessite aucune contrainte singulière. Cet algorithme a été testé sur des images échographiques de contraste hépatiques (fig. II.7). L'analyse de données nécessite au préalable une phase de réduction de bruit.

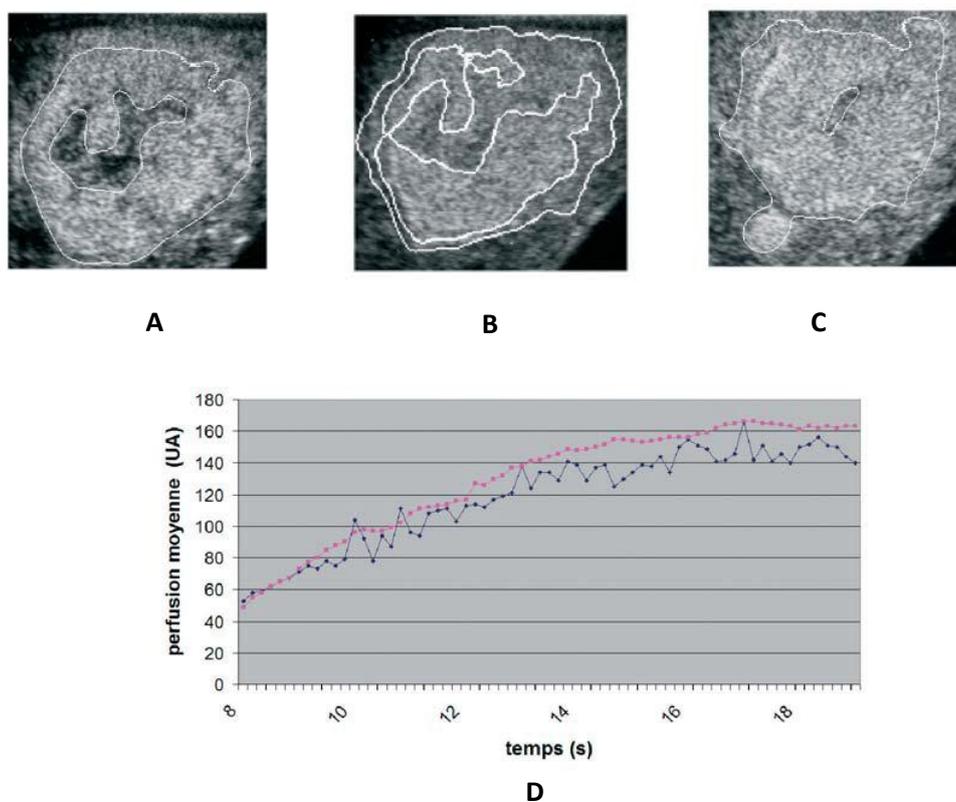


Fig. II.7: Exemple de résultats obtenus par la méthode de classification non exclusive en échographie de contraste hépatique sur une métastase hypervasculaire sur des images prise à 8s (A), 25s (B) et 39s (C) après l'injection et (D) la courbe de perfusion correspondante obtenue, en calculant la perfusion moyenne dans la zone en dehors de la nécrose, par l'expert (points roses) et par l'algorithme (points bleus).

(Adaptée de [18]).

II.3.2.2.4. Approche par analyse factorielle des séquences d'images médicales (AFSIM)

Les méthodes précédentes se basent que sur des a priori spatiaux (dessin d'une région d'intérêt ou classification). Il est possible également de se baser sur les décours temporels pour connaître les modes de perfusion d'intérêt. L'analyse factorielle des séquences d'images médicales (AFSIM) permet de résumer la séquence (série) d'images en la combinaison de quelques fonctions physiologiques primordiales. Cette méthodologie fait l'hypothèse qu'il existe un nombre N de fonctions physiologiques $C_k(t)$, présentes dans la séquence, qui se combinent linéairement pour former la séquence d'images. Nous pouvons alors exprimer la séquence comme la combinaison linéaire de décours temporels $C_k(t)$, les poids des différentes courbes qui forment des images paramétriques associée $D_k(p)$ indiquant la répartition spatiale des fonctions identifiées.

$$S(p, t) = \sum_1^N D_k(p) \cdot C_k(t) \quad (\text{II.12})$$

Cette méthode est fondée sur la décomposition des décours temporels de la séquence d'images par Analyse en composantes principales (ACP) qui consiste à diminuer l'information sur Q premières composantes. Nous pouvons alors réduire la séquence d'images $S(p, t)$ constituées de p pixels en Q premières composantes de l'ACP et une combinaison linéaire de la cinétique moyenne.

$$S(p, t) = S_{moy}(t) + \sum_{q=1}^Q \sqrt{\lambda_q} v_q(p) v_q(t) \quad (\text{II.13})$$

En ne retenant que les premières composantes, nous pouvons représenter aisément l'essentiel de l'information sous forme d'images factorielles $v_q(p)$ et cinétiques associées $v_q(t)$. Cette décomposition de la séquence ne permet pas d'interpréter les images factorielles et les cinétiques d'un point de vue physiologique, notamment parce qu'elles sont négatives et positives, alors que la prise de contraste se traduit par un phénomène purement positif.

Cette approche applique donc des contraintes de positivité pour que les cinétiques de prise de contraste $C_k(t)$ et les images associées $D_k(p)$ soient des cinétiques exclusivement positives ($I_k(p) > 0$ et $C_k(t) > 0$). Ainsi, une contrainte d'exclusivité sur les images factorielles a été additionnée pour une très bonne identification des facteurs $\forall p$ si $I_k(p) > 0, \sum_N I_i(p) = 0$, pour $i \neq k$.

L'approche a été effectuée à l'étude des séquences dynamiques de perfusion dans différentes modalités [70]. La figure II.8 présente l'application de l'AFSIM en image échographique hépatique.

L'AFSIM constitue une technique intéressante pour l'estimation qualitative des cinétiques de perfusion. En outre, elle permet d'examiner la qualité des acquisitions et de détecter les phénomènes d'atténuation.

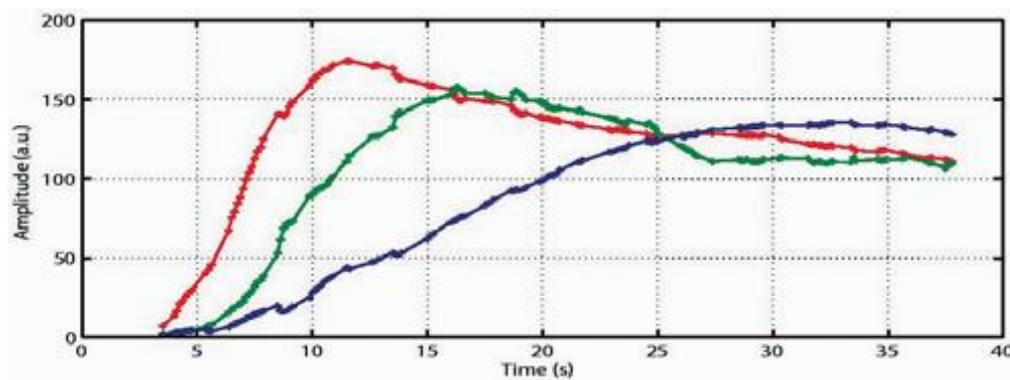
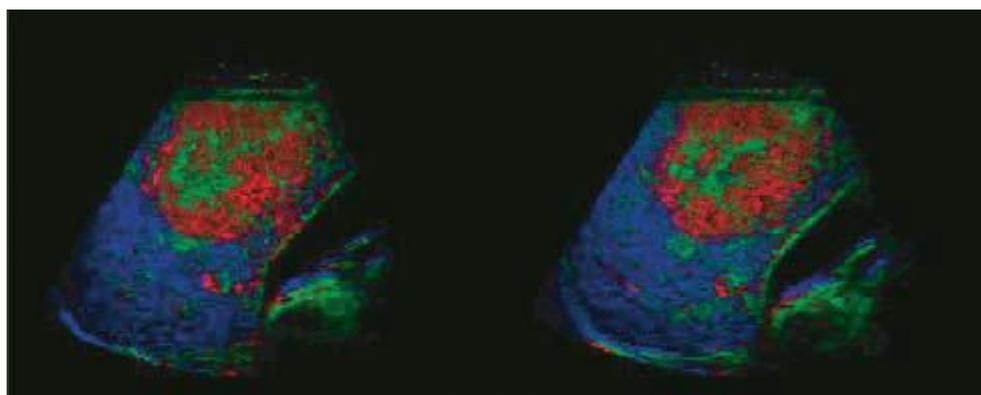


Fig. II.8 : AFSIM de métastase hépatique hypervasculaire après sélection de trames a posteriori. La séquence a été décomposée en deux sous-séquences: l'une correspondante au plan visible au minimum d'expiration et l'autre au plan visible au maximum d'expiration. L'AFSIM permet d'identifier trois cinétiques : une prise de contraste précoce dans la tumeur, une prise de contraste retardée dans le centre nécrotique et une prise de contraste tardive dans le parenchyme hépatique sain.

(Adaptée de [18]).

II.4. Conclusion

L'échographie de contraste devient une modalité d'imagerie important grâce à son mode de fonctionnement et ses capacités pour l'aide au diagnostic et au traitement.

Il existe un grand nombre de protocoles disponibles pour estimer la perfusion. Les modes destructifs et de reperfusion sont encore assez peu utilisés, car ils sont apparus très récemment et n'ont pas d'équivalent dans les autres modalités, contrairement à l'imagerie de bolus qui reste la méthode la mieux maîtrisée malgré ses imperfections. L'AFSIM est une approche très utilisée pour l'estimation qualitative de la perfusion. Les cartes paramétriques basées sur une modélisation (aire sous la courbe, maximum du gradient positif, ...), appliquent un modèle assez rigide. Lorsque ce modèle n'est pas respecté (atténuation, mouvement), il est difficile de détecter des ajustements aberrants. En outre, la relation entre l'intensité du signal mesuré dans l'image et la concentration effective de PCUS est encore assez peu fiable, ce qui fait appel à l'utilisation des approches dirigées par les données telles que les approches d'analyse par région d'intérêt.

Nous allons voir dans le prochain chapitre les différentes applications de l'échographie de contraste, dans la routine clinique en cancérologie (diagnostiques et thérapeutiques), en employant l'approche des cartes paramétriques, par région d'intérêt, pour l'analyse de la cinétique de la perfusion.

Chapitre III

**Applications de
l'échographie de contraste
en cancérologie**

III.1. Introduction

L'échographie de contraste (EC) est très souvent utilisée en première intention dans l'approche de diagnostic des lésions secondaires hépatiques en raison de sa facilité de mise en œuvre, de son faible coût et de son innocuité.

Dans ce chapitre, nous montrons les applications de l'échographie de contraste en cancérologie pour le diagnostic. Ensuite, nous décrivons son application pour la thérapie des tumeurs (sonoporation).

III.2. Applications radiologiques de l'échographie de contraste

Le diagnostic utilisant l'image paramétrique d'échographie de contraste pour l'identification des maladies et des lésions, notamment les lésions malignes, repose sur l'analyse de la courbe de l'intensité du signal, proportionnel à la concentration des microbulles, dans l'organe, et ceci dans les différentes phases après l'injection du produit de contraste y compris la phase artérielle (0-30 sec), phase portale (30-120 sec) et la phase tardive (>120 sec).

III.2.1. Imagerie de la néoangiogenèse [18]

L'introduction des produits de contraste ultrasonores (PCUS) a permis de remplir les lacunes issues du diagnostic utilisant l'imagerie conventionnelle. En effet, la taille des bulles, voisine de 3 μm , est adaptée au passage de ces produits au sein des capillaires autorisant l'éventualité théorique de détection de ces vaisseaux par échographie non linéaire. Ceci ouvre des avantages importants en termes d'identification des néovaisseaux au sein d'une tumeur.

Le caractère exclusivement intravasculaire des produits de contraste ultrasonores permet d'expliquer des différences de comportement de certaines lésions en comparaison avec des produits de contraste utilisés pour d'autres modalités. Ce phénomène est remarqué par la nature même des néovaisseaux tumoraux dont la paroi hyper-perméable laisse encore plus diffuser les produits de contraste diffusibles hors du compartiment vasculaire, pouvant expliquer des obstacles de quantification de néovaisseaux au sein de ces lésions. En revanche, il n'est pas possible d'estimer la perméabilité capillaire par l'échographie de contraste (EC), la découverte de bulles en dehors de ce compartiment vasculaire étant le témoin d'une brèche vasculaire uniquement.

Une corrélation étroite a été rapportée entre les mesures effectuées en résonance magnétique nucléaire (RMN) et en échographie de contraste pour la mesure du débit sanguin tumoral dans un modèle de tumeur chez la souris quelle que soit la valeur du débit [71].

Enfin, les ultrasons ont la capacité d'identifier distinctement les microbulles, ce qui n'est pas le cas des autres modalités pour lesquelles la sensibilité d'identification est de ce fait réduite. Il n'est pas possible d'avoir une corrélation parfaite entre les mesures effectuées en échographie de contraste et la densité des microvaisseaux, ou *microvessel density (MVD)*, malgré des protocoles bien conduits.

L'explication la plus habituellement avancée est celle de l'obtention de deux informations distinctes : la densité des microvaisseaux quantifie tous les vaisseaux détectables au sein d'une région, alors que l'échographie de contraste n'objective que les vaisseaux fonctionnels au sein de cette même région. Ces distinctions importantes renforcent toute la valeur diagnostique de l'échographie de contraste pour établir le potentiel de la réponse à une intervention thérapeutique ou de croissance tumorale. Cependant, il a été découvert une corrélation entre les paramètres calculés à partir des modélisations du rehaussement sur des muscles sains de volontaires et la MVD [72]. Quels paramètres sont caractéristiques des néovaisseaux présents dans une lésion ? Selon le type d'injection du produit de contraste retenu, les paramètres classiques reposent sur des modèles de rehaussement de type : courbe de temps-intensité (ou *time-intensity curve*) ou destruction-reperfusion [73-75], comme le montre la figure III.1. Ces deux modèles sont fondés sur des injections en bolus ou en infusion respectivement.

Le premier modèle est moins employé pour quantifier la néoangiogenèse même si les paramètres de wash-in ou de wash-out sont bien corrélés à la néovascularisation tumorale. Malheureusement la contrainte de standardisation, même en prenant en compte la fonction d'entrée, reste une limite à la mesure de la néovascularisation.

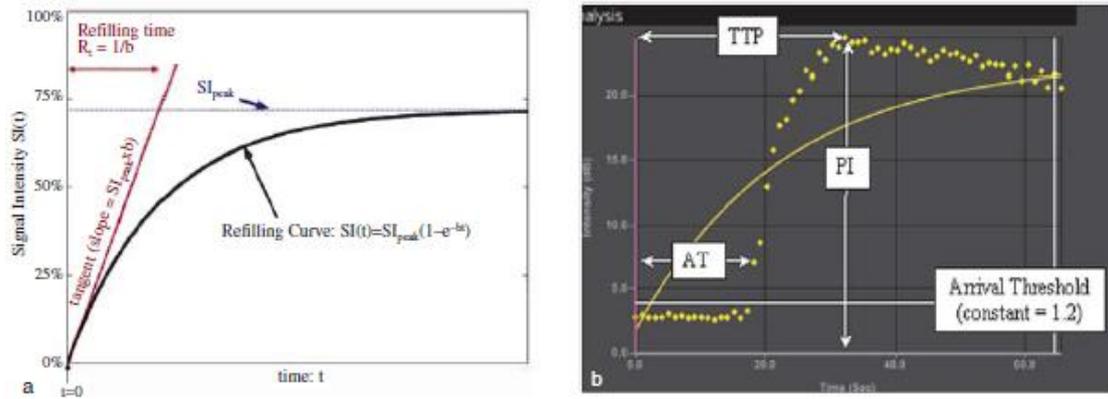


Fig. III.1: Modèles mathématiques de rehaussement après injection du produit de contraste de type exponentiel (A) et temps-intensité (B). (Adaptée de [18]).

III.2.2. Imagerie des affections rénales

L'échographie abdominale représente actuellement le premier cas de découverte des tumeurs du rein. L'examen Doppler est utile pour l'identification de vaisseaux au sein des cloisons d'une masse kystique ou le diagnostic d'une masse comme une hypertrophie d'une colonne de Bertin. L'absence de critères Doppler permettant la distinction des masses malignes et bénignes explique l'intérêt limité du Doppler [76]. Après injection de produit de contraste ultrasonore (PCUS), l'étude des masses rénales, du parenchyme rénal normal ou de ses variantes, peut s'effectuer en mode non linéaire ou en mode Doppler. Les premières études, réalisées avec Levovist® en mode Doppler couleur ont montré l'amélioration de l'identification de la vascularisation tumorale [77]. Cette amélioration pourrait avoir un impact diagnostique significatif pour les masses kystiques atypiques et les kystes [78]. L'imagerie non linéaire présente comme avantage majeur une très bonne résolution spatiale en comparaison avec le mode Doppler couleur ou puissance, en raison des artefacts du blooming. Selon l'expérience, il a été montré une amélioration de la visualisation des kystes typiques par un rehaussement considérable du parenchyme rénal normal qui les entoure. Les petits kystes typiques de moins de 5 mm sont aisément identifiés et correctement caractérisés [18].

La détection d'une masse tumorale rénale au sein du cortex qui l'entoure dépend de deux facteurs, le débit et le volume sanguin local (fig. III.2 et III.3). Précisément, la tumeur se rehausse de façon moins homogène et moins intense que le cortex normal, avec un retard parfois minime s'il s'agit d'une lésion très vascularisée. Après

l'injection, il est essentiel de balayer, de façon continue, le rein jusqu'à élimination du produit de contraste, car il est difficile de prévoir à quel moment le contraste entre le parenchyme et la lésion sera maximal (fig. III.2). L'échographie en mode B conventionnel ne montre aucune masse rénale (fig. III.2A). Cette coupe est sélectionnée à partir du Cineloop rétrospectivement après avoir réalisé l'échographie de contraste. L'échographie en mode harmonique tissulaire différentiel permet une identification d'une petite tumeur solide intra parenchymateuse (indiquée par la flèche) (fig. III.2B). En mode Doppler couleur, la vascularisation corticale est relativement pauvre et il n'existe pas de vaisseau intra-tumoral visible, comme le montre la sous figure III.2C. L'échographie de contraste réalisée en mode *Vascular Recognition Imaging (VRI)* avant et après injection de 2,4 mL de SonoVue® (fig. III.2D à III.2F). Au temps artériel précoce (fig. III.2D), le rehaussement tumoral se fait avec cinétique semblable à celle du parenchyme périphérique, mais présente un signal discrètement supérieur. Notez la présence d'une petite portion kystique intra-tumorale.

L'étude quantitative est effectuée avec deux régions d'intérêts (ROI) placées sur la tumeur et sur le parenchyme adjacent à la même profondeur (fig. III.2G). Cette sous figure confirme la même prise du produit de contraste et un signal tumoral supérieur au cortex adjacent d'environ 4,4 dB au pic de contraste et de 2,5 dB en phase tardive.

La figure III.3, montre un diagnostic d'une masse rénale solide chez un patient porteur de la maladie de von Hippel Lindau. Le Bilan est avant traitement par radiofréquence. L'étude en mode Doppler (fig. III.3A et III.3B), avec soustraction du signal vasculaire (fig. III.3A), montre une masse discrètement hyperéchogène (indiquée par la flèche) dont l'aspect pourrait évoquer une hypertrophie d'une colonne de Bertin. La vascularisation est développée de façon harmonieuse autour de la lésion, mais les vaisseaux en son sein sont chaotiques et nombreux (indiquée par la flèche).

L'échographie de contraste effectuée en mode VRI avant et après injection de 2,4 mL de SonoVue® (fig. III.3C et III.3D). Au temps artériel (28 sec) (fig. III.3C), le rehaussement tumoral est intense, supérieur au cortex rénal. Au temps vasculaire tardif (70 sec) (fig. III.3D), la lésion présente toujours un hypersignal trop marqué par rapport au cortex voisin.

L'étude quantitative est effectuée avec deux ROI placées sur la tumeur et sur le parenchyme adjacent (fig. III.3E). Cette sous figure confirme la prise de contraste intense et rapide de la tumeur. Cependant le gradient avec le cortex normal ne dépasse

5 dB durant la phase d'ascension et 3-4 dB durant le plateau. L'IRM rénal montrant la tumeur en hyposignal hétérogène en écho de spin pondéré en T2 (en haut à gauche) comme le montre la sous figure III.3F. Cette sous figure montre la prise de contraste intense en écho de gradient pondéré T1 avec saturation du signal de la graisse (en haut à droite), au temps artériel précoce (en bas à gauche) et au temps tubulaire (en bas à droite).

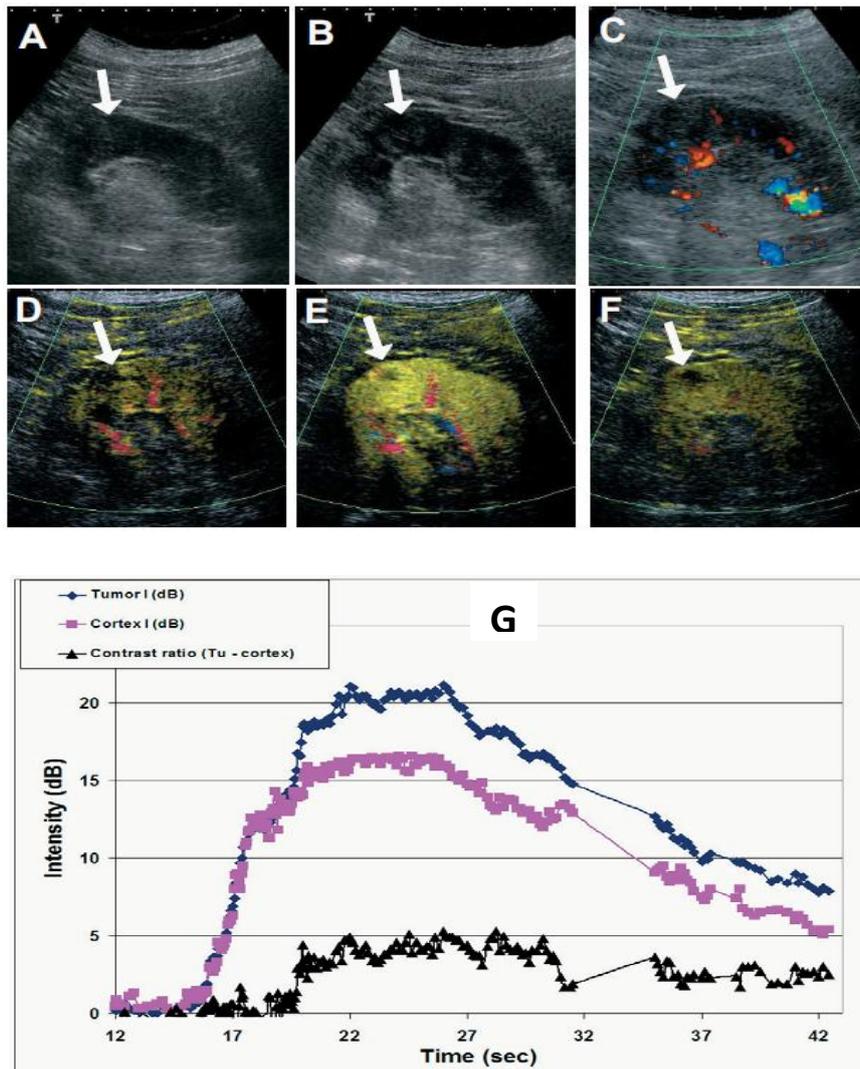


Fig. III.2: Détection d'un petit carcinome à cellules claires strictement intra-parenchymateux indiqué par la flèche. (A) L'échographie en mode B conventionnel. (B) L'échographie en mode harmonique tissulaire différentiel. (C) Le mode Doppler couleur. (D) à (F) Échographie de contraste réalisée en mode VRI avant et après injection de 2,4 mL de SonoVue®. (G) L'étude quantitative est réalisée avec deux ROI placées sur la tumeur et sur le parenchyme adjacent à la même profondeur.

(Adaptée de [18]).

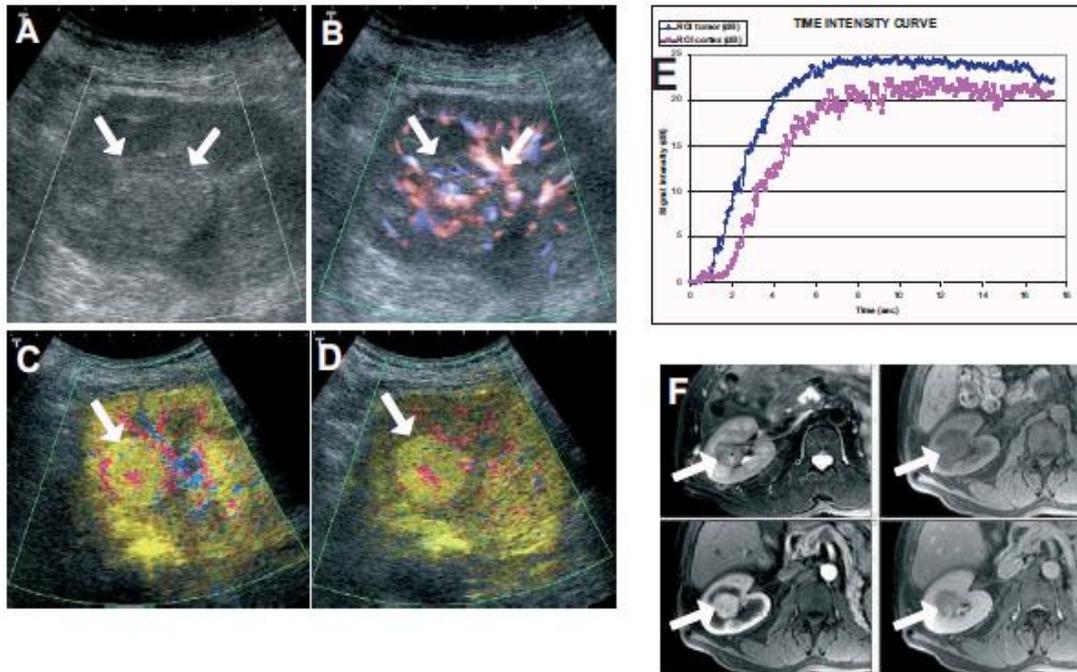


Fig. III.3: Diagnostic d'une masse rénale solide chez un patient porteur de la maladie de von Hippel Lindau. (A) et (B) L'étude en mode Doppler (Dynamic Flow). (C) et (D) L'échographie de contraste effectuée en mode VRI avant et après injection de 2,4 mL de SonoVue®. (E) L'étude quantitative est réalisée avec deux ROI placées sur la tumeur et sur le parenchyme adjacent. (F) IRM rénal. (Adaptée de [18]).

III.3. Applications thérapeutiques de l'échographie de contraste (Sonoporation)

Les applications futures de l'association des microbulles de gaz et des ondes ultrasonores s'étendent au-delà de l'imagerie. En effet, de nombreux travaux ont démontré que, sous l'effet des ultrasons, l'activité des bulles de gaz modulait transitoirement la perméabilité de la membrane cellulaire, facilitant ainsi l'entrée de molécules étrangères dans la cellule, par un processus connu sous le nom de sonoporation. Cette nouvelle technique de transfert moléculaire suscite de plus en plus d'intérêt pour des applications thérapeutiques ultrasonores.

Dans cette partie, nous présentons une synthèse de résultats de l'application de la technique de sonoporation, obtenus sur culture de cellules et sur modèles animaux, ainsi que les applications thérapeutiques (in vivo) possibles, pour aboutir à une estimation de l'intérêt thérapeutique de cette technique de thérapie.

III.3.1. Définition et principe de la sonoporation

La sonoporation est une technique physique de transfert de molécules étrangères (drogues ou gènes) dans la cellule utilisant l'association d'ultrasons et de microbulles de gaz. Les fréquences ultrasonores utilisées dans ce contexte restent proches des intervalles de fréquences employées en imagerie ultrasonore. Les microbulles utilisées, à l'heure actuelle, sont celles utilisées en imagerie ultrasonore de contraste (Optison®, Albunex®, SonoVue®, etc.). En outre, différentes molécules de poids moléculaires différents ont pu être testées et incorporées avec succès dans les cellules par sonoporation, telles que les plasmides, le dextran-FITC ou des molécules de poids moléculaire faible comme les traceurs radioactifs [79] et les oligonucléotides [80].

L'évaluation de l'efficacité de la sonoporation est définie par le taux d'incorporation, c'est-à-dire la partie de cellules ayant reçu la molécule sur la totalité des cellules. Pour évaluer le potentiel de cette approche, différentes méthodes de quantification sont disponibles. L'efficacité d'incorporation peut être évaluée à l'aide de gènes rapporteurs contenus dans des vecteurs bactériens (plasmides) dont l'expression protéique est mesurable. Les gènes codant pour la protéine fluorescente verte, ou *green fluorescent protein (GFP)*, sont généralement utilisés comme marqueurs. Un exemple de transfert de gène codant pour la GFP dans une cellule est montré dans la figure III.4. Il s'agit d'une cellule cancéreuse gliale provenant d'un glioblastome humain soumise à des ondes ultrasonores de 1 MHz et 400 kPa en présence de microbulles de gaz du BR14 (Bracco Research, Genève). La cellule est examinée au microscope confocal à fluorescence 24 heures après sonoporation. L'image en fluorescence montre l'incorporation du plasmide contenant le gène de la GFP dans la cellule. Cette protéine est plus régulièrement exprimée au niveau du cytoplasme [81]. Dans le cas de gènes codant pour la GFP, au-delà de l'observation optique, la quantification de la population de cellules qui expriment la GFP est effectuée par la cytométrie en flux. Cependant, il existe d'autres classes de gènes rapporteurs qui codent pour des enzymes dont l'activité peut être mesurée, notamment par la production, soit d'un fluorophore, soit d'un chromatophore. C'est le cas approprié des gènes de la luciférase et de la β -galactosidase. Des nanoparticules de dextran associées à un fluorophore, la fluoresceine iso-thio-cyanate (FITC) peuvent être également employées comme marqueur afin d'évaluer le taux de transfert en cytométrie en flux. Enfin, le transfert peut être identiquement estimé par l'étude de

l'incorporation de traceurs radioactifs [79] dans des cellules tumorales. Un exemple est montré sur le graphe de la figure III.5 qui montre une augmentation importante de l'incorporation de l'agent radioactif, In- DOTA-Tyr3-Octreotate, en présence des microbulles de SonoVue® et des ondes ultrasonores (1 MHz, 0, 42 MPa) en comparaison avec l'administration de l'agent radioactif seul.

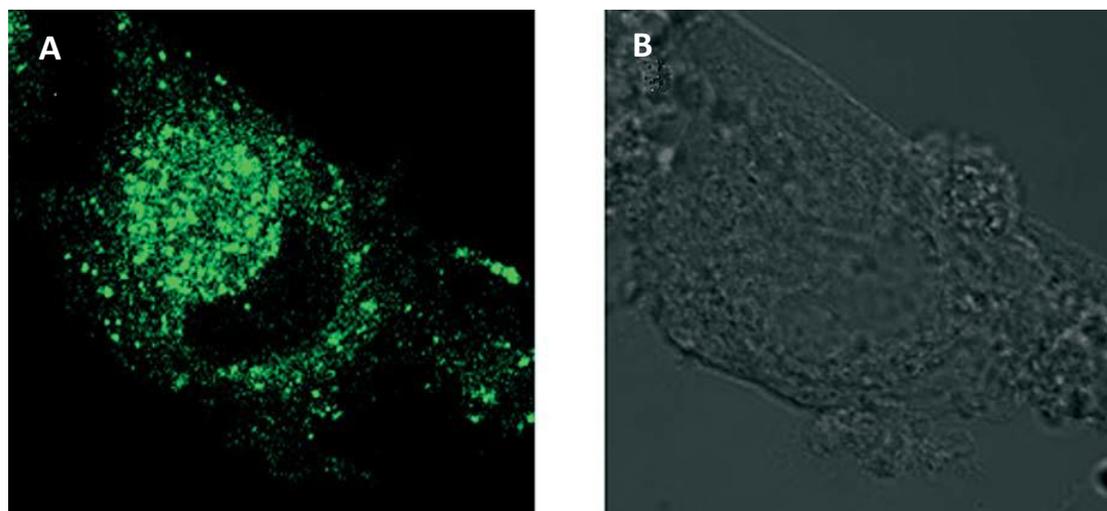


Fig. III.4: Image mettant en évidence l'expression de la GFP dans les cellules tumorales gliales par microscopie confocale à fluorescence, 24 heures après sonoporation avec des microbulles du BR14 (1 MHz, 0,4 MPa (A)). Même cellule observée en lumière blanche (B). (Adaptée de [18]).

III.3.2. Étude de la sonoporation in vitro

Les résultats de quantification de l'efficacité d'incorporation ou du transfert de gène ont montré que la sonoporation permet un transfert moléculaire à une large gamme de cellules, y compris des types cellulaires dont la membrane présente un obstacle à l'incorporation de molécules étrangères [82]. Les cellules en culture primaire, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales sont connues pour être très résistantes aux méthodes traditionnelles d'incorporation [83]. Des lignées de cellules tumorales telles que l'ovaire de hamster chinois, ou *chinese hamster ovary* (CHO) [84], MATB III (rat mammary carcinoma cells) [85], les cellules tumorales pancréatiques de rat y compris le CA20948 [79] et identiquement des cellules indifférenciées de la lignée 293 (undifferentiated human embryonic kidney cells) [86] ont pu être testées avec succès par cette technique [18].

L'ensemble des résultats a souligné un taux d'incorporation variable en fonction du type cellulaire, du temps d'exposition aux ondes ultrasonores variant de 10 secondes à 30 minutes et des fréquences allant de 1 à 3 MHz. Ces résultats démontrent également que le couplage des ultrasons et des microbulles est nécessaire pour induire une incorporation optimale, alors que l'utilisation des ondes ultrasonores seule n'entraîne qu'un faible transfert moléculaire [83]. L'obtention d'un passage transmembranaire de molécules a nécessité par ailleurs l'étude et la recherche de facteurs pouvant moduler l'efficacité d'incorporation. Des travaux ont alors démontré que l'efficacité de transfert dépend des facteurs liés aux caractéristiques de l'onde ultrasonore.

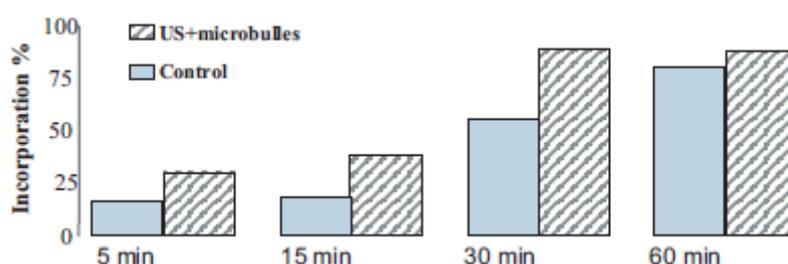


Fig. III.5: Incorporation amplifiée de 1 In-Dota-Tyr3- Octeate par les microbulles de gaz (SonoVue®) et les ultrasons (1 MHz, 0,42 MPa) (US+microbulles), et incorporation sans association de microbulles et d'ultrasons (Control). (Adaptée de [18]).

L'efficacité de la sonoporation est particulièrement dépend de la pression acoustique [87], de la période effective d'excitation (duty cycle, DC) en pourcentage [81] et de la durée d'exposition des cellules aux ondes ultrasonores.

III.3.3. Étude de la sonoporation in vivo

La majorité des modèles d'études de sonoporation sont effectués chez les rongeurs. Devant la miniaturisation et le développement des sondes échographiques, divers types d'organes accessibles ont pu être examinés. Le système cardiovasculaire est le premier système qui a suscité l'intérêt de cette technique dans une perspective thérapeutique. Plusieurs expériences de sonoporation effectuées sur le cœur et les vaisseaux sanguins (ex vivo). Les fréquences, des ondes ultrasonores, utilisées sont relativement semblables dans toutes les expériences.

Afin d'évaluer le potentiel de la sonoporation in vivo, différents marqueurs moléculaires, ainsi que différents agents de contraste ont été testés [18].

Le muscle cardiaque [88], le muscle squelettique [84] ont également été explorés avec succès avec cette technique de transfert. En outre, Hynynen [89] a démontré que l'application transcrâniale des ondes ultrasonores (200 kHz, 0,57 MPa) sur le lapin, couplée avec une injection intravasculaire de microbulles de gaz (Optison®), perméabilise de manière réversible la barrière hémato-encéphalique. Le système nerveux central, indiqué comme une barrière inaccessible aux agents thérapeutiques, a pu ainsi être traversé en utilisant cette technique.

La technique de sonoporation permet l'accroissement de la perméabilité des capillaires sanguins, aussi bien au niveau du cerveau qu'au niveau du muscle squelettique et d'autres tissus [90-91]. Une étude [90] a souligné l'extravasation de microsphères à partir des vaisseaux sanguins et le transport de ces derniers vers le tissu squelettique à 1 MHz et à 0,75 MPa, en présence de microbulles d'Optison®.

Le mode d'application des ondes ultrasonores semble avoir une influence sur l'efficacité d'incorporation moléculaire *in vivo* [88]. Le transfert de gène est important, au niveau du foie et du muscle cardiaque, lorsque les ondes ultrasonores sont transportées en mode pulsé à l'instar du mode continu. L'étude de Chen [76] a également montré que les ondes ultrasonores de basses fréquences (1,3 MHz) améliorent la délivrance de gène au niveau du myocarde en comparaison avec les fréquences supérieures (5 MHz et 12 MHz). De plus, la destruction des microbulles qui se découvre amplifiée aux basses fréquences semble jouer un rôle significatif dans la sonoporation [88-95]. En outre, la transmission des ondes ultrasonores à fortes pressions acoustiques induit également une destruction des microbulles et a montré une délivrance optimale de gènes dans les tissus [88].

III.3.4. Étude du mécanisme d'entrée des molécules dans les cellules par sonoporation

Le mécanisme de passage des molécules au niveau de la cellule n'est pas encore clarifié, mais l'hypothèse la plus couramment étudiée repose sur les dynamismes acoustiques des microbulles de gaz, induites par les ultrasons, qui possiblement provoquent la constitution de pores transitoires au niveau de la membrane cellulaire. Afin de comprendre le mécanisme de passage, divers approches ont été développées. Les travaux [96] ont permis, d'une part, de suivre la déformation et la délivrance du contenu fluorescent d'une vésicule lipidique mimant la cellule à l'aide d'une caméra rapide. Cette délivrance du traceur est engendrée grâce à la rupture transitoire de la membrane à proximité d'une microbulle oscillante. Par ailleurs, des études [97-98]

ont permis, d'autre part, d'enregistrer, en temps réel, les variations des courants transmembranaires et du potentiel membranaire.

L'étude suggérée par Deng et al [98] est effectuée sur ovocyte de xénope en configuration cellule entière. Les résultats démontrent que les ondes ultrasonores, en présence de microbulles de gaz, augmentent de manière transitoire le courant transmembranaire dû à une réduction de la résistance membranaire provoquée par la production de pores. L'amplitude de ce courant dépend fortement de la durée d'excitation par les ultrasons et de l'amplitude acoustique.

Des épreuves récentes réalisées à l'aide d'une caméra ultrarapide (107 images/s) démontrent que les microbulles ont la capacité d'interagir avec les cellules, mais que leurs effets dépendent de l'amplitude acoustique appliquée [99]. Pour des faibles pressions ultrasonores, les microbulles, en s'accolant à la cellule, produisent une force mécanique au niveau de la membrane cellulaire [97]. Cette stimulation membranaire, par les microbulles de gaz, pourrait être à l'origine de l'accroissement de la perméabilité membranaire et de la formation de pores, préfigurant ainsi, un accroissement de la capacité cellulaire à incorporer diverses matières. Par contre, des amplitudes acoustiques plus élevées peuvent induire des événements acoustiques violents tels que des microjets [100], qui apparaissent se projeter contre la membrane plasmique.

La vitesse des microjets peut atteindre 100 m/s, et peut, par conséquent, confirmer ces phénomènes d'accroissement de la perméabilité membranaire. Visuellement, il semblerait que les produits de contraste, sous l'effet des ondes ultrasonores, entraînent des forces mécaniques déformant la membrane cellulaire.

L'exploration des caractéristiques électro-physiologiques de la cellule, par la technique de patch clamp [101], montre que la cellule réagit à cette stimulation par un changement de son potentiel de membrane [97]. Ce changement électro-physiologique est induit par l'activation de canaux ioniques mécanosensibles. Ainsi, comme mentionné sur les cellules MDA-MB-231 (de cancer mammaire), l'activation ultrasonore des microbulles de gaz, en contact avec la cellule, entraîne instantanément une réduction du potentiel membranaire, comme le montre la figure III.6. Cette réduction du potentiel membranaire (hyperpolarisation) résulte de l'excitation de canaux ioniques mécanosensibles produisant donc un changement des répartitions des charges ioniques d'une part, et d'autre part, de la membrane plasmique cellulaire. Les

canaux ioniques hyperpolarisants majoritaires sont, sur cette classe de cellules, les canaux potassiques à grande conductance sensible au calcium, BKCa [102].

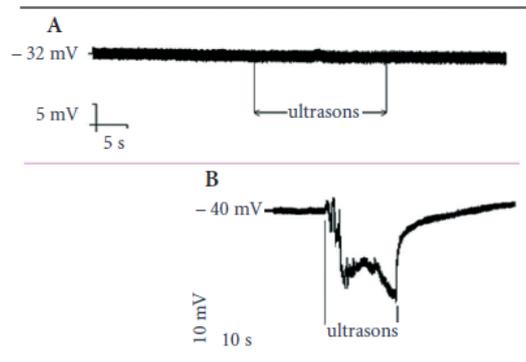


Fig. III.6: Potentiel membranaire d'une cellule MDA-Mb231 sous l'effet des ondes ultrasonores (1 MHz, 200 kPa) seul (A) et en présence d'ultrasons (1 MHz, 200 kPa) et microbulles de SonoVue® (B). (Adaptée de [18]).

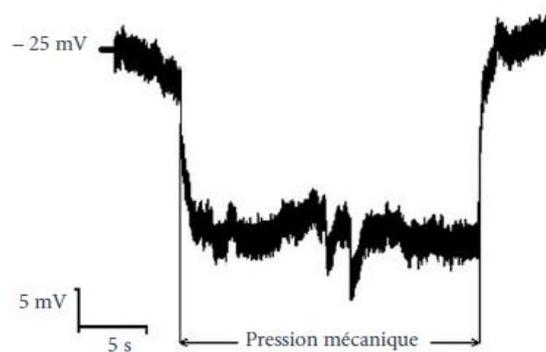


Fig. III.7: Une pression mécanique induite sur la membrane cellulaire via une pipette de verre rodée engendre une modification du potentiel de membrane cellulaire.

(Adaptée de [18]).

L'effet mécanique des microbulles sur la cellule est accentué par l'emploi d'une pipette de verre rodée. Cette pipette est employée pour produire une pression mécanique sur la membrane de la cellule afin de simuler un contact entre cette dernière et les microbulles oscillantes [97]. Cette perturbation mécanique de la membranaire reproduit similairement les hyperpolarisations induites par les oscillations des microbulles (fig. III.7).

Malgré les contraintes mécaniques induites par les microbulles de gaz, il est essentiel de souligner que les produits de contraste ne produisent aucune modification de la viabilité cellulaire. En effet, il a été montré, *in vitro*, dans la même étude que la

viabilité cellulaire n'est pas changée par une exposition aux microbulles en présence des ondes ultrasonores.

Enfin, l'étude du transfert et de la distribution intracellulaire d'un plasmide marqué a démontré que le passage du plasmide dans la cellule lors de la sonoporation se fait, d'une manière indépendante, de la voie d'endocytose traditionnelle des cellules. Cette voie est empruntée pour d'autres méthodes d'incorporation, particulièrement lors de la lipofection.

III.3.5. Application de la sonoporation à la thérapie

III.3.5.1. Évaluation du potentiel thérapeutique des ultrasons et des microbulles

L'éventualité d'incorporer des gènes dits thérapeutiques par ondes ultrasonores et microbulles de gaz formerait une technique alternative aux techniques de thérapies géniques. Le développement de cette méthode non invasive forme alors un enjeu majeur, car elle peut être employée à un large panel de maladies. Les pathologies intéressées peuvent être les maladies héréditaires monogéniques dont le gène muté responsable est connu. Les maladies métaboliques, cardiovasculaires, et enfin les cancers pourront être l'objectif d'une approche thérapeutique par cette méthode. Néanmoins, avant de pouvoir appliquer cette technique de thérapie à l'échelle humaine, il est essentiel de valider dans une première étape la dimension thérapeutique de la sonoporation chez des modèles animaux.

Dans le contexte des maladies cardiovasculaires, un exemple d'examen thérapeutique a été étudié par Taniyama [83] chez un modèle de rat de resténose après angioplastie. L'effet avantageux de l'angioplastie est limité par le phénomène de resténose qui apparaît chez près de 40 % des patients. Ce processus est issu par une reproduction anormale des cellules musculaires lisses générant l'intima des vaisseaux sanguins. Afin d'évaluer la faisabilité de la thérapie génique par les microbulles de gaz et les ondes ultrasonores, le gène anti-oncogène p53 a été délivré dans les cellules d'intérêt en présence des microbulles de gaz (Optison®) et ondes ultrasonores (2, 5W/cm²). Suite à l'expression de la protéine p53 dans le tissu, un blocage de l'augmentation des cellules musculaires lisses, de la néo-intima de la carotide, a été examinée chez le rat ayant subi une angioplastie [83]. Le traitement hygiénique des patients ayant une angioplastie pourrait être conduit de manière réaliste par cette stratégie thérapeutique.

Un autre exemple d'examen est la thérapie du cancer dont deux principaux examens de sonoporation, sur des modèles de tumeurs de rat ont été effectuées pour examiner notamment la délivrance de gène au sein des tumeurs.

Les travaux de Hauff [103], effectués sur une tumeur du foie obtenue par implantation de cellules de carcinome de côlon de rats, ont montré une délivrance significative de plasmides contenant le gène de la β -galactosidase induite en mode Doppler en présence de microbulles de gaz.

Une expression de cette protéine est observée au sein d'une coupe histologique de la tumeur. Humbert et al [104] ont encore effectué des études expérimentales de sonoporation sur un modèle de tumeurs obtenues par implantation de cellules de carcinomes mammaires de rats dans le tissu adipeux mammaire. Dans cette étude, la solution, contenant les microbulles de gaz (Bracco) et le gène rapporteur de la luciférase ou de la GFP, est délivré de manière intra-tumorale. Les résultats de cette étude ont montré la possibilité d'induire une délivrance des plasmides dans les cellules tumorales sans provocation de réactions de nécrose (liées à l'injection) ou d'inflammation.

La dimension thérapeutique des ondes ultrasonores et des microbulles pour la délivrance de gènes thérapeutiques afin de traiter les tumeurs cancéreuses a été évaluée dans l'étude de Hauff [103]. Au bout de trois traitements, à des intervalles de quinze jours, par le gène p16 en association avec les microbulles et les ondes ultrasonores (mode Doppler couleur, IM = 1,5), il a été remarqué une diminution de près de 50 % du taux de croissance tumorale. Cette étude montre que les exigences d'ultrasons employées en diagnostic sont compatibles avec la possibilité de délivrer de manière efficace des molécules thérapeutiques. Cette technique de délivrance (sonoporation) présente des caractéristiques intéressantes qui permettent de contourner les obstacles liés aux autres techniques de thérapies cancéreuses.

III.3.5.2. Microbulles de gaz et incorporation des agents thérapeutiques

Les microbulles de gaz, en plus de leur capacité à augmenter la perméabilité membranaire de la cellule, elles peuvent également servir au transport de gènes thérapeutiques ou drogues anticancéreuses. Elles montrent la possibilité de transmettre ces gènes thérapeutiques dans leur paroi et permettent ainsi l'incorporation des médicaments exclusivement au niveau de la région sur laquelle les ultrasons sont focalisés. Ce principe confirme deux principaux avantages. Les effets

supplémentaires liés à la spécificité d'action cellulaire des drogues anticancéreuses seront diminués. En effet, toutes les cellules de l'organe examiné sont agressées, lors du traitement des tumeurs par chimiothérapie. L'autre avantage est lié à la diminution des doses de drogues anticancéreuses à administrer, car le système d'incorporation de ces drogues est potentialisé.

Diverses techniques d'insertion de gènes ou de drogues dans les bulles de gaz ont été exposées. Les molécules d'ADN (plasmide), chargées négativement, ont la capacité de s'adsorber au niveau des têtes de phospholipides cationiques, par interactions électrostatiques, constituant la paroi de certaines microbulles de gaz et être portées dans la circulation sanguine de cette manière. Des drogues anticancéreuses liposolubles, telle que le paclitaxel, ont la capacité d'être incorporées au sein d'une couche huileuse couvrant la face interne de la paroi des microbulles de gaz (*Active Acoustic Liposphère, AAL*) [105].

Les agents thérapeutiques peuvent être aussi reliés à la paroi des produits de contraste par une liaison covalente ou bien être insérés au sein même de la paroi [106]. La figure III.8 illustre quelques exemples de techniques d'incorporations ou d'insertions des agents thérapeutiques au sein des microbulles de gaz. Les trois modes d'incorporation nécessitent toutefois des compromis en termes de réflexion ultrasonore, d'efficacité et de volume de composants thérapeutiques inséré.

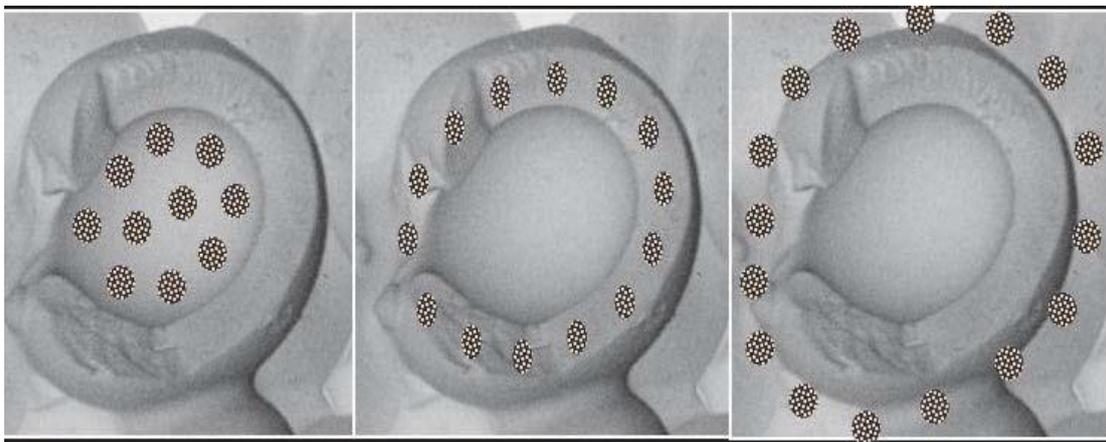


Fig. III.8: Différentes techniques d'incorporation des agents thérapeutiques dans une microbulle de gaz. Les agents thérapeutiques peuvent être contenus à l'intérieur de la microbulle (A), ou être insérés dans la paroi (B) ou, également, être liés à la face externe de la paroi (C). (Adaptée de [18]).

La sonoporation présente une technique de transfert de drogue ou de gènes facile à mettre en oeuvre. De plus, elle présente le bénéfice d'être adaptable à différents types de cellules et à l'application *in vivo*. Il reste toutefois à démontrer le mécanisme de passage des molécules lors de la sonoporation. Cela n'empêche pas l'étude de l'impacte de cette méthode pour un objectif thérapeutique, sachant que d'autres méthodes de délivrances moléculaires ont exposé leurs limites, soit par leur toxicité (infection virale), soit par leur insuffisance d'efficacité (lipofection). Le développement de méthodes de délivrances efficaces et non toxiques pour les tissus sains est une étape limitante pour le succès de la thérapie chimique. La technique de sonoporation semble d'être une technique qui répond à ces besoins. En effet, la sonoporation permet le couplage de la thérapie et de l'imagerie en temps réel, et ceci par l'intermédiaire des microbulles de gaz. Ces dernières ont la capacité d'être employées comme médicaments, tout en conservant leurs caractéristiques acoustiques. La possibilité de focaliser les ultrasons sur des zones limitées de l'organisme et les particularités des parois des produits de contraste font de cette approche une méthode de thérapie ciblée. L'incorporation des agents thérapeutiques dans les cellules examinées est également potentialisée, d'une part, par l'augmentation de la perméabilité membranaire produite par l'interaction des ultrasons avec les microbulles de gaz, et d'autre part, par l'accumulation des drogues transportées par les agents de contraste ultrasonores sur une faible surface.

III.4. Conclusion

L'imagerie par échographie de contraste devient de plus en plus une technique largement utilisée en cancérologie, grâce à sa facilité de mise en œuvre. En outre, les applications de l'association des microbulles de gaz et des ondes ultrasonores (sonoporation) s'étendent au-delà de l'imagerie. En effet, divers travaux ont démontré que, sous l'effet des ultrasons, l'activité des microbulles de gaz modulait transitoirement la perméabilité de la membrane de la cellule examinée, facilitant l'entrée de molécules étrangères (drogues ou gènes) dans la cellule.

Nous présentons dans le prochain chapitre, un état de l'art des méthodes existantes pour la segmentation du volume tumoral biologique (VTB) dans les images TEP-FDG et les critères utilisés pour la comparaison et l'évaluation des techniques suggérées.

Chapitre IV

Segmentation du volume tumoral biologique (VTB) en imagerie TEP

IV.1. Introduction

Nous avons déjà vu dans l'introduction générale le principe de fonctionnement de l'imagerie TEP et son impact en diagnostic. Dans ce chapitre nous voyons l'intérêt et l'importance de la segmentation des tumeurs sur les images TEP pour la définition des volumes cibles pour les traitements en radiothérapie. Ensuite, nous détaillons les principales méthodes de segmentation du volume tumoral biologique (VTB) et les critères employés pour la validation de ces techniques.

IV.2. Méthodes de segmentation du volume tumoral biologique (BTV)

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, la segmentation du volume tumoral biologique dans les images TEP est très importante pour le traitement radiothérapeutique et le suivi thérapeutique. La figure suivante montre une image TEP d'un patient atteint de carcinome épidermique laryngé T3-T4 avec plusieurs estimations du volume tumoral biologique. D'après cette figure, nous remarquons qu'il est très indispensable de bien définir les limites du volume tumoral dans le traitement radio-thérapeutique.

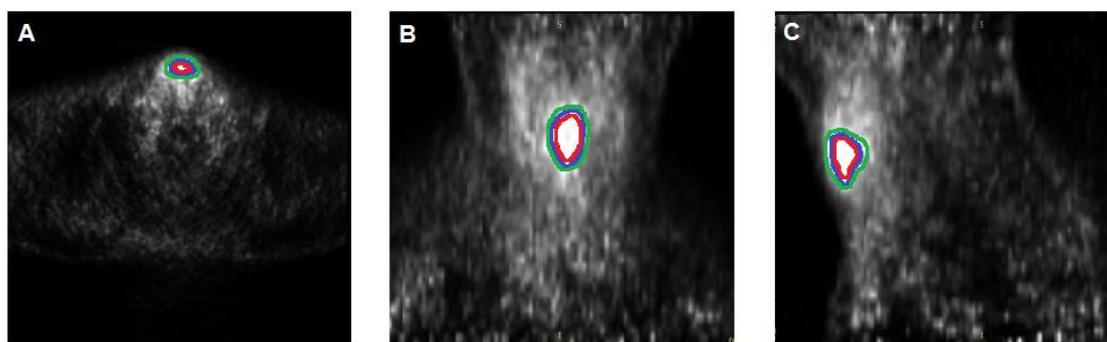


Fig. IV.1 : Segmentation (estimation) du volume tumoral dans l'image TEP ; la première estimation (en vert), la deuxième estimation (en bleu) et la troisième estimation (en rouge) : (A) Plan axial, (B) Plan coronal et (C) Plan sagittal.

Les méthodes de segmentation du volume tumoral biologique (VTB) se classent en cinq grandes classes [2, 107], nous trouvons :

IV.2.1. Méthodes de seuillage

Les méthodes de seuillage [7-11, 108-118] consistent à définir le contour de la tumeur en se référant à un seuil de l'image que nous voulons segmenter, pour délimiter la

tumeur des autres tissus qui l'entourent. Ce sont les premières méthodes utilisées pour la segmentation des tumeurs grâce à leur simplicité.

Le rôle de l'utilisateur est juste de prédéfinir un seuil pour la segmentation, et isoler ensuite les pixels de l'image qui ont des intensités supérieures au seuil de ceux qui ont des intensités inférieures. La région formée par les pixels supérieurs au seuil, représente la tumeur, et le reste de l'image représente les tissus sains qui l'entourent.

La technique est donc très simple, très rapide et très facile à mettre en œuvre, étant de plus applicable directement aux images en 3D.

En général, ces méthodes sont divisées principalement en deux grandes catégories, où nous trouvons les méthodes basées sur un seuillage fixe et d'autres basées sur un seuillage adaptatif.

IV.2.1.1. Seuillage fixe

Paulino et al [108] ont proposé, après avoir converti les intensités des pixels de l'image TEP en valeurs de fixation normalisée, ou *Standard Uptake Value (SUV)*, de segmenter le volume tumoral en générant dans les images des isocontours avec un seuil constant de SUV, égal à 2,5.

Le SUV représente le rapport de la concentration de l'activité mesurée dans une région d'intérêt, ou *Région Of Interest (ROI)*, par rapport à l'activité pondérale injectée au patient. Il est donné par cette formule :

$$SUV = \frac{\text{Activité corrigée dans un volume choisi des voxels} / \text{Volume choisi}}{\text{Activité injectée au patient} / \text{Masse du patient}} \quad (\text{IV.1})$$

D'autres études [7, 109-111, 119-120] ont suggéré l'utilisation d'un seuil constant représenté par une valeur constante de niveaux de gris de l'intensité lumineuse des pixels de l'image TEP. Généralement, ce seuil est un pourcentage (entre 40 et 75 %) de la valeur maximale des intensités des pixels qui forment la zone du volume tumoral biologique à segmenter de l'image TEP.

Ultérieurement, des études ont montré que la valeur du seuil fixe utilisée pour segmenter les tumeurs dans les images TEP dépend du volume tumoral [8-9], de la stabilité de captation du traceur et de l'hétérogénéité intra-tumorale [121], etc.

Pour cette raison, d'autres études suggèrent d'utiliser des valeurs de seuils variables, qui dépendent des images de différentes tumeurs. D'où l'apparition de l'idée des

méthodes des seuillages adaptatifs [10-11, 112-116, 122] que nous décrivons dans la suite.

IV.2.1.2. Seuillage adaptatif

Les méthodes de seuillage adaptatif, nommées aussi méthodes d'ajustement du seuil, ou *adaptive thresholding technics* [10-11, 112-116, 122], consistent à caractériser chaque image TEP par des données spécifiques, tel que le bruit de fond de l'image TEP, la valeur de l'intensité maximale de niveaux de gris des pixels de la ROI (qui représente la tumeur sur l'image TEP), l'ordre de la grandeur de la tumeur dans l'image TEP, etc. Cela permet de donner un seuil propre à la segmentation de chaque image identifiée par les valeurs de ces paramètres qui la caractérisent.

Pour assigner un seuil à chaque image, il faut ajuster une fonction mathématique appelée fonction d'ajustement du seuil. Généralement, cet ajustement s'effectue en simulant le corps du patient et les tumeurs par des fantômes de tailles connues.

Dans les fantômes les plus souvent utilisés, le corps est représenté par un cylindre de faible concentration de radio-isotope et les tumeurs sont représentées par des sphères creuses, remplies d'une concentration de radio-isotope plus élevée que celle de la solution du cylindre afin de simuler des lésions hyperfixantes, plongées dans la solution du cylindre. Plusieurs acquisitions d'images TEP doivent être effectuées, en changeant les concentrations du cylindre et des sphères afin d'avoir des images de la lésion qui couvrent toutes les plages possibles.

Pour chaque image, il faut tester différentes valeurs de seuil de segmentation de la tumeur simulée pour retenir celui qui génère le contour le plus proche de la taille de la tumeur simulée, connue à partir du fantôme. Ensuite, nous cherchons la fonction mathématique de la courbe de tendance, qui représente la relation entre les paramètres caractéristiques des images TEP et les seuils correspondants utilisés pour la segmentation des volumes tumoraux représentés sur ces images TEP. Cette fonction mathématique d'ajustement du seuil sera appliquée dans la routine clinique pour segmenter les tumeurs réelles des patients.

Nous décrivons, dans la suite, les méthodes de seuillage adaptatif les plus utilisées et leurs limites.

IV.2.1.2.1. Méthode de Daisne

Le modèle décrit par Daisne [122] propose le seuil suivant :

$$Seuil = a + b \times \frac{1}{SBR}, \quad (IV.2)$$

où *Seuil* est le pourcentage d'intensité maximale de la lésion définissant les voxels gardés dans le volume, *a* et *b* sont des paramètres qui servent à l'étalonnage de cette fonction. *SBR*, pour *Signal-to-Background Ratio*, est obtenu par le rapport entre la moyenne des 9 voxels voisins de celui possédant le maximum d'activité au sein de l'objet et la moyenne d'une région d'intérêt *ROI* (approximativement 100 ml) et manuellement placée sur le fond loin de l'objet à segmenter.

Daisne et al, ont représenté le seuil sous forme de pourcentage de maximum d'activité, où le maximum d'activité est défini comme la moyenne d'activité de ces 9 voxels.

Nous pouvons conclure qu'ils ont ajusté la fonction du seuil en utilisant directement les volumes en 3D au lieu d'utiliser des surfaces de la tumeur en 2D. Il a été démontré que la fonction du seuil dépend aussi de la méthode de reconstruction utilisée pour construire les images TEP.

Bien que Daisne et al, aient amélioré les méthodes de seuillages adaptatifs, leur méthode souffre de deux problèmes. Le premier est que l'ajustement est basé sur des fantômes, qui ne représentent pas parfaitement le corps humain. Ce qui paraît plus problématique dans la routine clinique, où les tumeurs ont habituellement des formes complexes et hétérogènes. Le deuxième problème est le bruit de fond qui est souvent aussi hétérogène, ce qui rend difficile le choix de la région d'intérêt.

IV.2.1.2.2. Méthode de Black

Le modèle décrit par Black [10] suggère le seuil suivant :

$$Threshold\ SUV = 0,307 \times (mean\ target\ SUV) + 0,588, \quad (IV.3)$$

où *Threshold SUV* est le seuil utilisé pour la segmentation des tumeurs dans l'image TEP.

Black et al, ont trouvé que ce seuil, représenté sous forme d'une valeur de SUV, varie en fonction de la moyenne du SUV d'une cible, ou *mean target SUV* en Anglais.

Ils ont donc remarqué que, pour définir la zone tumorale, le seuil de SUV dépend à la fois de la moyenne de SUV pour cette zone, de la concentration de FDG du fond, ou *background FDG concentration*, et du volume tumoral cible, ou *target volume*.

Ces deux derniers paramètres ont un impact indirect sur le *SUV* moyen de la zone cible. Les auteurs ont également comparé les volumes segmentés en utilisant leur méthode, de seuillages adaptatifs proposée, aux volumes déterminés en utilisant un seuillage fixe (seuil fixe égal à 42 % du maximum de concentration d'activité au sein de la tumeur).

Pour la validation de leur approche, ils ont effectué cette comparaison en utilisant des images TEP des sphères d'un fantôme puis ceux des lésions de cancer bronchique de 15 patients. Ils ont trouvé que la différence moyenne entre les deux méthodes était de 21 % par rapport au volume de référence du fantôme.

Puis, cet écart a augmenté pour devenir 67 % lorsqu'ils ont appliqué ces deux méthodes au volume d'un véritable patient. Cela est dû à un plus grand degré d'hétérogénéité de *SUV* dans les tumeurs réelles comparées à celles relevées sur les fantômes.

Donc, ils ont pris en compte le degré d'hétérogénéité de la lésion en utilisant la valeur moyenne de *SUV* dans leur modèle. Néanmoins, cette méthode a besoin de beaucoup d'améliorations afin d'être acceptable pour l'utilisation en processus routinier clinique.

IV.2.1.2.3. Méthode de Nestle

Plus récemment, Nestle et al ont proposé un algorithme appelé GTV_{bg} (pour *GTV background*) [11] qui peut être considéré comme une version améliorée du modèle de Black.

Les auteurs ont converti les valeurs d'activités des voxels de l'image TEP (qui sont en kBq/ml) en des intensités visuelles (*I*) des images en 2D. Ils ont réussi à traiter le problème de l'hétérogénéité des tissus en suggérant le modèle de la forme suivante :

$$I_{threshold} = (0,15 \times I_{mean}) + I_{background} , \quad (IV.4)$$

où $I_{threshold}$ est la valeur d'intensité en dessous de laquelle les pixels ne sont pas gardés dans le volume cible, I_{mean} est la moyenne des pixels définis avec un seuillage fixé à 70% de l'intensité maximale et $I_{background}$ est la moyenne des pixels d'une région d'intérêt manuellement placée sur le fond, loin de l'objet à segmenter, mais en restant dans le même organe, ce qui peut être compliqué par la position et la taille de la tumeur par rapport à l'organe de référence.

En comparaison avec la méthode proposée par Black et al [10], les auteurs ont cependant ajouté un facteur représentant la concentration de fond des tissus qui entoure la lésion ($I_{background}$) et non le fond du corps entier (mentionné indirectement dans la valeur du SUV utilisée par Black). Par la suite, en faisant des études cliniques sur des patients, les auteurs ont trouvé que leur méthode semblait être la plus stable face à l'absorption hétérogène de la tumeur, et face à la variation importante des valeurs de SUV maximal.

Plus récemment, en 2006, Nestle et son équipe ont recommandé l'utilisation d'une méthode de contraste orientée vers un algorithme semi-automatique à la place d'une méthode de seuillage par un pourcentage d'accumulation maximale de l'activité [123].

Bien que l'intérêt donné à l'approche suggérée par Nestle et al, cette dernière souffre de plusieurs problèmes. Tout d'abord, le placement manuel de la région d'intérêt sur le fond qui dépend de l'utilisateur, en particulier si le fond est hétérogène. Ensuite, le choix d'un seuillage à 70 % d'intensité maximale pour I_{mean} peut donner des mauvais résultats avec certaines tumeurs hétérogènes (de diamètres inférieurs à 2 cm) dans lesquelles l'effet de volume partiel est très important.

IV.2.1.2.4. Seuillage adaptatif proposé par Brambilla

Encore plus récemment, Brambilla et al [113] ont montré que le changement de l'activité au début de l'acquisition ou du temps de l'acquisition des images TEP, n'implique aucune influence sur la variation du seuil. De même, ils ont ajouté un terme représentant la taille de la tumeur. Ils ont partagé les sphères en deux groupes. Pour les sphères de diamètres supérieurs à 10 mm, ils ont suggéré la formule suivante:

$$TH(\%) = 151,1 - 101,8 \times \left(1 - \frac{1}{T/B}\right) - 0,976 \times ID \quad (IV.5)$$

Et pour l'autre type de sphères (de diamètres inférieurs à 10 mm), ils ont suggéré la formule suivante :

$$TH(\%) = 309,2 - 171,9 \times \left(1 - \frac{1}{T/B}\right) - 9,643 \times ID, \quad (IV.6)$$

où T/B est le rapport de la concentration dans la cible (sphère) sur la concentration du fond, ID est le diamètre interne d'une sphère, $TH(\%)$ est le seuil qui représente un pourcentage de la concentration maximale d'activité dans la sphère.

Les auteurs ont utilisé dans cette étude le fantôme (PET Phantom - NEMA IEC/2001) représenté dans la figure IV.2. Ce fantôme contient une série de sphères creuses de diamètres intérieurs de 10, 13, 17, 22, 28, et 37 mm. Ensuite, les auteurs ont ajouté à ce fantôme une série de microsphères de diamètres intérieurs de 4.1, 4.7, 6.5 et 8.1 mm. Ils ont déduit, de ces deux fonctions, que pour les sphères de diamètres supérieurs à 10 mm, le T/B a une influence sur le seuil beaucoup plus grande que celle du diamètre de la sphère (ID). Par contre pour une sphère de diamètre inférieur à 10 mm, son diamètre a une plus grande influence sur le seuil. Néanmoins cette méthode n'est pas validée sur des tumeurs réelles ; elle rencontre les mêmes problèmes que ceux du modèle de Daisne et al.

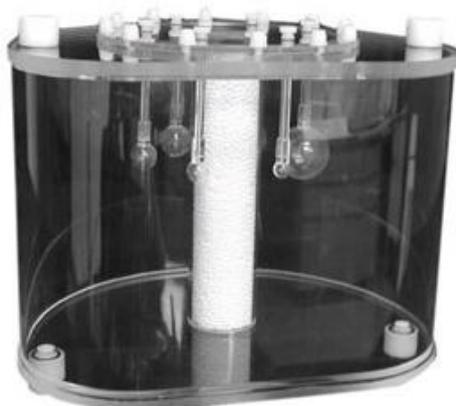


Fig. IV.2: Illustration d'un fantôme (TEP- NEMA IEC/2001).

IV.2.2. Méthodes de segmentation visuelle

Ces méthodes consistent à définir, manuellement, les contours du volume tumoral biologique par un expert en médecine nucléaire [4, 5, 124]. Le médecin a pour rôle de sélectionner manuellement la zone qu'il juge pertinente et cela est fait en général à l'aide d'un logiciel de visualisation.

Les limites de cette catégorie de méthodes est qu'elles ne sont pas automatiques et elles sont subjectives, donc affectées par une variation importante entre les différents observateurs [6]. De plus, en TEP, les contours des objets sont flous et difficiles à identifier, donc l'expert peut dans certains cas avoir beaucoup de difficultés à séparer correctement un objet du fond. Néanmoins, malgré ces limitations, ces méthodes restent les techniques les plus largement utilisées en routine clinique [125].

IV.2.3. Méthodes de modélisation stochastique

Les méthodes de modélisation stochastique consistent à exploiter les différences statistiques de la distribution d'intensité entre l'absorption des tissus tumoraux et les tissus sains voisins dans les images TEP [12-14, 126-127]. Ces méthodes mettent l'hypothèse que les intensités de l'image sont distribuées suivant une densité de probabilité d'une fonction qui représente les différentes régions (regroupements) de l'image.

Le champ de cette catégorie de méthode est vaste et fondé sur l'utilisation de modèles probabilistes et statistiques pour classer les éléments (les voxels par exemple) par rapport à des classes et sur la formule de Bayes (Bayésienne), dont on estime les paramètres telles que la moyenne et la variance. Nous utilisons un modèle combiné à une estimation des paramètres de l'observation souvent sous forme de modèles de « *Markov* » cachés tels que des chaînes, des champs ou des arbres. Alors, les décisions de ces méthodes se basent sur la corrélation spatiale entre les pixels et l'intensité du pixel (deux pixels voisins et d'intensités proches ont plus de chance d'appartenir à la même classe). En plus, ces méthodes fondent leurs décisions sur la répartition statistique des pixels dans l'image suivant des lois différentes (en général gaussiennes), ce qui permet de segmenter des images fortement bruitées.

Récemment, Mathieu Hatt [127] et son équipe ont proposé une approche de segmentation en imagerie TEP, qui est fondée sur l'utilisation de ce contexte méthodologique de segmentation statistique des images TEP. Plusieurs approches ont tenté d'utiliser ce type de méthodologies dans le cadre de l'imagerie d'émission, mais ces travaux se limitaient à l'utilisation d'une mesure statistique dite dure où seule une somme de Dirac est considérée. Cette mesure permet de modéliser l'aspect de bruit des images, mais n'est pas adaptée aux images d'émission qui sont floues. En effet, l'hypothèse de la modélisation dure consiste à considérer qu'un voxel appartienne à une classe et que son observation est bruitée. En conséquence elle ne permet pas de modéliser un voxel contenant un mélange de classes.

La modélisation de la nouvelle approche est fondée sur l'utilisation d'une mesure statistique définie par un mélange de masses de Dirac, pour les classes homogènes. Les mesures continues de Lesbegue, pour les transitions floues entre les régions. Ceci permet de prendre en compte, en même temps, les deux principaux défauts des images d'émission qui sont le bruit statistique et le flou induit par la résolution spatiale. Cette mesure floue a été utilisée dans le cadre d'une modélisation par chaînes de Markov

[127] puis d'une approche locale adaptative [128] offrant des performances supérieures. En effet, cette dernière approche a été nommée FLAB, pour *Fuzzy Locally Adaptive Bayesian*. Des résultats prometteurs sont obtenus par cette méthode en les comparant aux résultats des autres techniques de segmentation. Néanmoins, cette méthode n'est pas tout à fait automatique, car le choix d'utiliser la méthode binaire (deux classes dures et une transition floue) ou la méthode à trois classes (trois classes dures et trois transitions floues), repose sur l'utilisateur en fonction de son appréciation de l'hétérogénéité de la tumeur à segmenter [129]. Or, jusqu'à maintenant, aucune implémentation de cette technique n'a eu lieu dans la pratique clinique. En effet, ces méthodes sont considérées aussi parmi les méthodes de regroupements (clustering), dont les pixels de l'image sont regroupés en plusieurs clusters (classes).

IV.2.4. Méthode de gradient «*Variational approaches* »

Ces méthodes de segmentation consistent à exploiter les informations fournies par la variation d'intensité en manipulant la variation de gradients d'intensité entre le volume tumorale biologique et le fond [17, 130-138]. Une étude, basée sur le flux de vecteur gradient, ou *Gradient Vector Flow (GVF)*, a réussi à segmenter des images TEP de foie avec succès [135]. En plus Geets et son équipe [17] ont proposé une méthode basée sur les gradients d'intensité pour la segmentation des tumeurs du cou. Cependant, pour le foie, les effets de volume partiel sont négligeables par rapport à la taille de l'objet à segmenter. Par contre, la méthode de GVF [135] paraît mal adaptée à la segmentation des tumeurs de petites tailles, dans lesquels les effets de volume partiel sont plus significatifs. En général, cette catégorie de méthodes souffre d'un problème de sensibilité qui est dû au bruit de l'image [139].

IV.2.5. Méthodes de segmentation par apprentissage

Les méthodes de segmentation par apprentissage, ou *Learning methods* en anglais, sont des techniques développées dans le domaine de la reconnaissance des formes pour estimer les dépendances à partir des données [15, 126, 140].

La tâche d'apprentissage, dans le cas de la segmentation des tumeurs en TEP, consiste à entourer les voxels des tissus normaux en se basant sur un ensemble de paramètres caractéristiques extraits de l'image. De cette manière, la connaissance des contours de la tumeur devient possible de prime à bord.

Les méthodes de regroupement, ou *clustering methods* en anglais, sont les méthodes de segmentation par apprentissage les plus connues et les plus utilisables [12, 126, 140-149]. Ces méthodes consistent à regrouper les pixels de l'image en les classifiant par rapport à un critère donné.

Parmi ces méthodes, nous trouvons le C-moyennes floue, ou *Fuzzy C-Means (FCM)*. Dans cette approche, un degré d'appartenance à un centroïde d'une classe est attribué à chaque pixel. Cette attribution se fait en utilisant l'information de la distance qui le sépare par rapport au centroïde de la classe et de l'intensité du pixel. Pour que cette méthode fonctionne, il est indispensable de préciser au début le nombre de clusters (regroupements) dans l'image à segmenter. Ensuite, les centroïdes de chaque classe peuvent être déterminés par différentes techniques tels que la distance euclidienne. Pour chaque pixel, la distance qui le sépare du centroïde de sa classe est calculée. Mais il faut noter que dans le cas d'application de cet algorithme pour la segmentation des images, la distance ne signifie pas la position d'un pixel par rapport à celle des centroïdes. Par contre, cette distance signifie la variation de l'intensité d'un pixel par rapport aux intensités des pixels centroïdes. Ainsi, chaque pixel aura donc une valeur d'appartenance à la classe de ce centroïde comprise entre 0 et 1. Dès lors, chaque pixel est attribué à la classe dont la distance avec son centroïde est la plus faible. Pour réaliser ce regroupement, un algorithme itératif est utilisé dont le but est de minimiser la fonction suivante :

$$J_f = \sum_{j=1}^c \sum_{i=1}^p [u_j(x_i)]^b \|x_i - m_j\|^2, \quad (\text{IV.7})$$

où x_i est le vecteur caractéristique (le pixel de l'image avec ses caractéristiques), c est le nombre de clusters, p est le nombre de pixels, m_j est le centroïde du cluster j , $\|x_i - m_j\|^2$ est la distance euclidienne entre le pixel de l'image et le centroïde du cluster et b est un paramètre de flou. Si b est égale à 1, cela veut dire qu'il n'y a pas de flou, et si b est égale à 2 cela veut dire qu'il y a un flou maximum. La valeur de b est généralement fixée à 2 [107]. Il faut noter que $u_j(x_i)$ suit la condition suivante :

$$\sum_{j=1}^c u_j(x_i) = 1 \quad (\text{IV.8})$$

Donc il s'agit d'estimer la valeur de $u_j(x_i)$ en utilisant la formule de ré-estimation suivante [2, 147] :

$$u_j(x_i) = \frac{\frac{1}{\|x_i - m_j\|^2} \frac{1}{b-1}}{\sum_{j=1}^c \frac{1}{\|x_i - m_j\|^2} \frac{1}{b-1}} \quad (\text{IV.9})$$

Et la mise à jour du centroïde du cluster selon la formule suivante [2, 147] :

$$m_j = \frac{\sum_{i=1}^n [u_j(x_i)]^b x_i}{\sum_{i=1}^n [u_j(x_i)]^b} \quad (\text{IV.10})$$

Une fois que les centroïdes ne changent plus d'emplacement, l'algorithme s'arrête.

IV.3. Critères d'évaluation

Pour évaluer la précision de segmentation du volume tumoral des différentes méthodes, Trois (03) grands critères sont utilisés pour l'évaluation et la validation de la technique suggérée.

IV.3.1. Critère de l'erreur du volume

Le critère de l'erreur du volume, ou *Volume Error (VE)*, utilisé par Black et al [10], et aussi par Belhassen et al [15], appartient comme étant le premier critère utilisé pour la validation des techniques de segmentation pendant la comparaison. Le *VE* se calcule en utilisant la formule suivante :

$$VE = \frac{V_e - V_d}{V_d} \times 100\%, \quad (\text{IV.11})$$

où V_e est le volume estimé par la méthode correspondante (proposée) et V_d est le volume désiré (volume de référence).

IV.3.2. Critère de l'indice de similarité

L'indice de similarité, ou *Dice Similarity Index (DSI)* [2, 150-151], est défini en fonction du rapport de pixel des régions chevauchantes (entre le volume définie par la méthode proposée et le volume de référence), où à n'importe quel seuil donné, les valeurs DSI vont de 0%, indiquant aucun chevauchement spatial entre deux ensembles de résultats de segmentation binaire, à 100% indiquant un chevauchement complet [150]:

$$DSI = \frac{2|V_e \cap V_r|}{|V_e + V_r|} \times 100\% \quad (\text{IV.12})$$

IV.3.3. Critère de l'erreur de classification

L'erreur de classification, ou *Classification Error (CE)*, a été calculée sur une base voxel-par-voxel pour les études cliniques en utilisant la formule suivante [128, 150]:

$$CE = \frac{(PCE+NCE)}{VolL} \times 100\%, \quad (IV.13)$$

où *PCE* se réfère aux erreurs de classification positives, y compris les voxels du fond qui sont classés comme appartenant à la tumeur, *NCE* se réfère aux erreurs de classification négatives, y compris les voxels de la tumeur qui sont classés comme appartenant au fond et *VolL* est le nombre de voxels définissant la lésion comme identifié par l'histologie (nombre exacte de voxels reflétant le volume réel).

IV.4. Conclusion

Plusieurs méthodes ont été proposées dans la littérature pour la segmentation du volume tumoral biologique. Cependant, dans la routine clinique, nous ne trouvons aucune méthode automatique satisfaisante utilisée pour la segmentation des tumeurs sur les images TEP. Ensuite la validation d'une technique proposée utilisant les échantillons chirurgicaux avec des volumes de références réels devient la procédure la plus performante en comparaison avec les techniques de validation utilisant les fantômes.

Les méthodes de segmentation du VTB par apprentissage (*Learning methods*), incluant les méthodes de regroupements (clustering), sont les méthodes les plus performantes jusqu'à maintenant. Et c'est pour cette raison que nous avons choisi de développer une nouvelle technique basée sur le clustering pour la segmentation du BTV que nous allons présenter dans le prochain chapitre.

Chapitre V

Méthodes de regroupements pour la segmentation du VTB: Méthodes et résultats

V.1. Introduction

L'utilisation des échantillons macroscopiques pour la validation des techniques de segmentation dans les images TEP est l'une des approches les plus prometteuses rapportées jusqu'ici dans les études cliniques. La procédure consiste à comparer les volumes tumoraux définis sur les données TEP avec les volumes tumoraux réels mesurés sur les échantillons macroscopiques enregistrés à partir de l'histologie (où une image TEP a été réalisée avant la chirurgie). Dans ce chapitre, nous allons résumer les étapes suivies pour la création de l'ensemble des échantillons chirurgicaux macroscopiques utilisés pour la validation des techniques de segmentation. Les données macroscopiques de cette base de données sont créées au centre hospitalier Saint-Luc de l'université catholique de Louvain-La-Neuve (UCL), Belgique. Ensuite nous décrivons notre méthode proposée pour la segmentation du volume tumoral biologique (VTB) en discutant les résultats obtenus.

V.2. Etude clinique

Comme décrit dans la base de données de Louvain [16], plusieurs étapes ont été mises en place pour créer le VTB réel défini par l'histologie, qui sera utilisé comme référence. De plus amples informations sur la sélection des patients et le traitement des données sont disponibles dans la référence [16]. Sept (07) patients atteints de carcinome épidermique laryngé T3-T4 qui avaient subi une étude TEP- ^{18}F -FDG avant le traitement ont été inclus en vue de l'évaluation des méthodes de segmentation d'images TEP. La figure ci-dessous montre une image TEP d'un patient sélectionné depuis cette base de données pour la démonstration du volume tumoral (défini par l'histologie) utilisé comme référence.

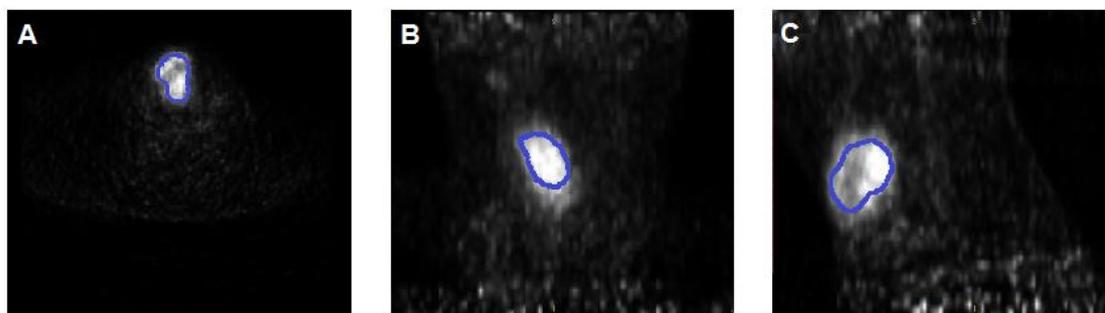


Fig. V.1 : Image TEP d'un patient atteint de carcinome épidermique laryngé T3-T4 ; le volume tumoral défini par l'histologie est représenté par la courbe bleu : (A) plan axial, (B) Plan coronal et (C) Plan sagittal.

Pour éviter les mouvements du cou, les patients ont été immobilisés avec un masque thermoplastique personnalisé fixé sur un plateau plat. Par la suite, nous résumons les étapes suivies pour la création du VTB réel (référence) [16].

V.2.1. Acquisition d'image

Pour l'acquisition de toutes les images, les patients ont été immobilisés avec un masque thermoplastique personnalisé (Sinmed, Reeuwijk, Pays-Bas) fixé sur un plateau plat. Tous les patients ont subi une tomodensitométrie, une IRM et une TEP-FDG; Les trois premiers examens ont été effectués sans ordre prédéfini. En moyenne, ces examens ont été effectués dans un délai de 4 jours pour chaque patient. Pour les patients devant subir une laryngectomie totale, la chirurgie a été réalisée en moyenne cinq (05) jours après la première étude d'imagerie.

Les acquisitions de tomodensitométrie, ou TDM, ont été réalisées avec un scanner à double détecteur (CT Twin, Elscint, Haifa, Israël) en utilisant une épaisseur de section de 2,7 mm à un intervalle de reconstruction de 2,5 mm et à un pas de 0,7. Les images transversales ont été acquises à l'aide d'une matrice de 512 x 512 pixels et ont été reconstruites avec une largeur totale à mi-hauteur (Full Width at Half Maximum, FWHM) de 1,2 - 1,2 - 2,5 mm dans les directions x, y et z respectivement. Des injections par voie intraveineuse de 60 millilitres de produit de contraste iodé (350 mg/ml de Xenetix, Guerbet, Roissy, France) à raison de 2,5 ml/s; Ceci a été suivi, après une période de repos de 3 minutes, avec une injection en bolus de 50 ml à un débit de 1,5 ml/sec. Un protocole biphasique associe les avantages d'une imprégnation suffisante dans la phase initiale de la perfusion du médium de contraste se traduisant par une opacification totale optimale du corps et par une opacification en bolus de la lumière des vaisseaux brevetés dans la seconde phase, qui est synchronisée à l'initiation d'acquisition d'image. L'acquisition de l'image a débuté immédiatement après la fin de l'injection de bolus et le champ de vision longitudinal relevant typiquement de l'articulation sternoclaviculaire aux sinus frontaux.

Les images de résonance magnétique, ou IRM, ont été toutes acquises en utilisant un système supraconducteur 1,5-T (Intera, Philips Medical Systems, Best, Pays-Bas). Des données de séquence d'impulsions similaires ont été utilisées sur tous les patients et comprenaient un champ de vision de 300 mm, une matrice 256 x 256 et une épaisseur de section de 3,5 mm sans interstice d'intersection ou une épaisseur de section de 3,1 mm avec une fente d'intersection de 0,4 mm. La largeur totale à mi-

hauteur était de 1,4 x 1,4 x 3,5 mm dans les directions x, y et z, respectivement. Pour limiter le temps d'acquisition, seules les acquisitions bidimensionnelles ont été effectuées. Nous avons obtenu des images RM pondérées (T1) en pré et en post-contraste (temps de répétition msec/temps d'écho en msec, 770/10) et des images MR pondérées (T2, 5000/100). Les patients ont été invités à éviter la déglutition ou la toux pendant l'acquisition (chaque acquisition a duré environ 5 minutes).

Les acquisitions TEP, ont été réalisées à l'aide d'une caméra (ECAT Exact HR, Siemens / CTI, Knoxville, Tenn) en utilisant un champ de vision transversal de 275 mm (deux positions de lit, avec un chevauchement de 25 mm entre les positions). Les images tridimensionnelles ont été acquises en utilisant une matrice de 128 x 128 pixels. Un balayage de transmission bidimensionnel, de 10 minutes sur chaque position du lit, a été premièrement obtenu. Ensuite, 50 minutes après injection intraveineuse de 185-370 MBq (5-10 mCi) de FDG, Un balayage d'émission tridimensionnel, de 20 minutes pour chaque position du lit, a été obtenu. Les images ont été reconstruites avec un algorithme de rétroprojection filtré avec correction de décroissance, aléatoire, dispersion et atténuation en utilisant un filtre Hanning de 0.3. Cet algorithme de reconstruction a été choisi étant donné qu'il livrait l'estimation de volume la plus précise [122]. A une distance de 10 cm du centre du champ de vision, la largeur totale à mi-hauteur atteignant respectivement 7,7 - 6,9 - 7,9 mm dans les directions x, y et z.

V.2.2. Traitement de l'échantillon chirurgical

Pour les patients ayant subi une laryngectomie totale, une procédure a été développée pour permettre une correction en trois dimensions de l'échantillon macroscopique avec des modalités d'imagerie pré-chirurgicale. En résumé, l'échantillon chirurgical frais a été recueilli en bloc dans la salle d'opération et a été placé dans une coulée de polystyrène contenant trois tiges de bois placées longitudinalement (diamètre, 3 mm) qui étaient également espacées dans le plan transversal de l'échantillon. La fonte a été remplie avec une solution de gélatine à 16% (Amersham, Roosendaal, Pays-Bas) et maintenue à -20 ° C pendant 48 heures et ensuite à -80 ° C pendant au moins 72 heures.

Lors de l'exécution de cette procédure, il a été constaté que, par rapport à d'autres procédures de fixation (par exemple, fixation au formol), la méthode de congélation induisait très peu de rétraction des tissus. Dans les échantillons chirurgicaux obtenus

de patients, l'absence de rétraction tissulaire a été évaluée chez cinq patients en évaluant le volume de la glande thyroïde et la distance entre les bords postérieurs du cartilage thyroïdien. La comparaison a été effectuée en utilisant les images TDM. La coulée contenant l'échantillon congelé a ensuite été coupée dans le plan transversal avec une scie à ruban de menuiserie (EBS 3601, Elu, Köln, Allemagne) pour générer des tranches (slices), parallèles et contiguës.

Il a été montré lors de la validation de la procédure (sur des blocs de bois et des spécimens animaux) que le matériau perdu en raison de l'épaisseur de la scie était similaire à l'épaisseur de la tranche. En conséquence, pour chaque spécimen laryngé, l'épaisseur de la tranche a été calculée en divisant la longueur du moulage par le double du nombre de tranches transversales obtenues. L'épaisseur des tranches était typiquement comprise entre 1,7 et 2,0 mm. Chaque tranche a été numérisée sur les deux faces à l'aide d'un scanner à plat (Snap scan 1236s, Agfa, Köln, Allemagne) et a été stockée dans un format d'image d'étiquette, ou TIFF, avec une résolution de 150 x 150 points par pouce. Les tranches numérisées ont été alignées en utilisant les tiges en bois comme marqueurs de référence avec le logiciel Zeiss KS 400 (Carl Zeiss, Iena, Allemagne). Le volume de l'échantillon chirurgical a été finalement reconstruit en utilisant le logiciel IMREviewer (Université Catholique de Louvain-La-Neuve, Belgique) pour interpoler l'épaisseur de la section et a été enregistré au format intermédiaire.

V.2.3. Correction d'images (recalage)

Les images obtenues à la tomодensitométrie (TDM), à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), à l'imagerie TEP et à l'échantillon chirurgical macroscopique, ont été transférées au poste de correction (recalage) et converties en format ECAT-CTI (Siemens / CTI). Les volumes ont été regroupés en utilisant une méthode rigide semi-automatisée basée sur la segmentation de surface, comme décrit dans la référence [152]. En résumé, chaque volume a été réséqué à une taille de voxel commune et a été affiché simultanément dans les plans transverses et dans les plans coronal et sagittal reconstruits (fig. V.2). Une segmentation automatique de différents contours externes ou internes, a été effectuée sur le volume de la TDM et a été superposée sur les images des autres modalités. Un transformateur avec une visualisation en temps réel a permis de traduire et de faire tourner le volume à enregistrer dans les directions x, y et z jusqu'à obtenir une adaptation visuelle adéquate des volumes. Selon la nécessité, les

paires de volumes ont été fusionnées pour affiner l'enregistrement de noyau. Les paramètres de transformation ont été stockés dans un format de langage de balisage extensible pour l'affichage ultérieur des volumes regroupés. Cette procédure de recalage de corpus a été validée pour la région de la tête et du cou et a été jugée exacte et reproductible avec des analyses de recalage moyennes effectuées à moins de 1,1 mm (TDM et TDM), 1,5-2,0 mm (IRM et TDM) et 1,2-2,1 mm (TEP et TDM) [152].

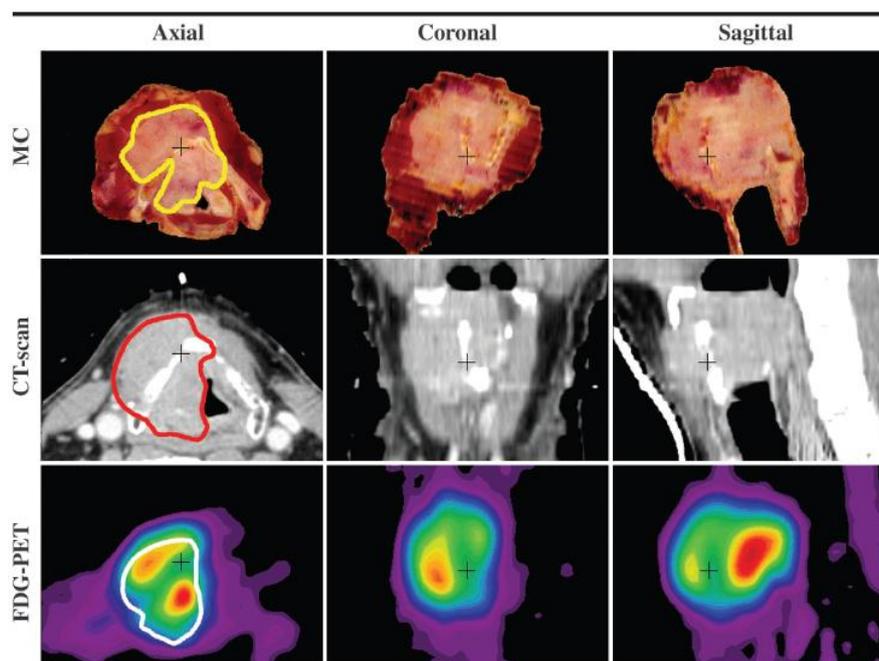


Fig. V.2: Recalage entre les images macroscopiques, TDM et TEP. Les volumes sont affichés sur les plans transversal, coronal et sagittal. Le schéma montre le BTB délimité avec chaque modalité et la petite croix représente le même point dans l'espace pour chacune des modalités. L'infiltration des muscles parathyroïdes du côté gauche est clairement visible sur les images macroscopiques. (Adaptée de [16]).

V.3. Méthodes

V.3.1. Méthode basée sur le regroupement (clustering) par le modèle de mélange de Gaussiennes (ou GMM) [153]

L'algorithme de la méthode proposée est basé sur le schéma représenté dans la figure V.3. Le processus contient les étapes décrites ci-dessous. À partir du chargement de l'image.

V.3.1.1. Images groupées par GMM

Le problème de segmentation de l'image TEP utilisant le modèle de mélange Gaussien, ou *Gaussian mixture model (GMM)*, est formulé comme une estimation de la vraisemblance maximale des paramètres inconnus de la distribution de probabilité de l'intensité du voxel (nous pouvons la supposer d'être une distribution Gaussienne). La procédure optimise la probabilité du modèle de mélange Gaussien (GMM) en utilisant l'algorithme itératif d'élimination et de maximisation (EM).

L'algorithme EM se produit en deux étapes, où l'étape E consiste à calculer les probabilités et l'étape M estime les paramètres du cluster en supposant que la distribution d'intensité de chaque classe ne soit pas Gaussienne.

Dans cette approche, nous avons choisi d'utiliser l'algorithme k-means ++ [154, 155] pour initialiser l'algorithme EM afin de sélectionner les paramètres initiaux pour le modèle de mélange Gaussien ajusté.

L'algorithme k-means ++ suppose que le nombre de clusters est k et choisit les paramètres initiaux pour un GMM comme suit:

- 1) Sélectionner la probabilité de mélange des composantes (Gaussiennes) comme étant la probabilité uniforme P_i , où $P_i = \frac{1}{k}$, où $i = 1, \dots, k$.
- 2) Sélectionner les matrices de covariance pour qu'elles soient diagonales et identiques, où

$$\sigma_i = \text{diag}(a_1, a_2, \dots, a_k) \quad (\text{V.1})$$

$$\text{et } a_j = \text{var}(X_j) \quad (\text{V.2})$$

- 3) Sélectionner le premier centre (centroïde) initial μ_1 uniformément de tous les points de X , où X est l'image correspondante (TEP en 2D et en niveaux de gris).
- 4) Pour choisir le centre j :
 - a) Calculer la distance de Mahalanobis de chaque observation à chaque centroïde et attribuer chaque observation à son centroïde le plus proche.
 - b) Sélectionner le centroïde j de manière aléatoire de X avec une probabilité

$$P_{mp} = \frac{d^2(x_m, \mu_p)}{\sum_{h; x_h \in M_p} d^2(x_h, \mu_p)}, \quad (\text{V.3})$$

où $d(x_m, \mu_p)$ est la distance entre l'observation m et μ_p , M_p est l'ensemble de toutes les observations les plus proches du centroïde μ_p et x_m fait partie du M_p .

5) Répéter la 4ème étape jusqu'à ce que les k centroïdes soient choisis.

V.3.1.2. Sélection du GMM optimal en utilisant le critère d'information Akaike (AIC)

Les critères d'information, ou *information criteria (IC)*, sont des outils de sélection de modèles que nous pouvons utiliser pour comparer tous les modèles aux mêmes données.

Fondamentalement, les critères d'information sont des mesures de modèle basées sur la vraisemblance qui incluent une pénalité pour la complexité (en particulier, le nombre de paramètres). Les différents critères d'information se distinguent par la forme de la pénalité et peuvent préférer différents modèles.

Le critère d'information Akaike, ou *Akaike information criterion (AIC)* [156], compare les modèles du point de vue de l'entropie de l'information. L'AIC pour un modèle donné est montré ci-dessous:

$$AIC = -2 \log L(\theta) + 2k, \quad (V.4)$$

où $\log L(\theta)$ indique la valeur de la fonction d'objectif de vraisemblance maximisée pour un modèle avec k paramètres adaptés à N points de données. Lors de la comparaison des valeurs AIC pour plusieurs modèles, les valeurs plus petites du critère sont les meilleures.

Les modèles de mélange Gaussien nécessitent une spécification du nombre de composantes (Gaussiennes) avant d'être conformes aux données. Pour de nombreuses applications, il peut être difficile de connaître le nombre approprié de Gaussiennes.

La procédure pour sélectionner le GMM optimal avec un nombre optimal prédéfini de Gaussiennes (clusters), en utilisant AIC [156] ou d'autres critères tels que le critère BIC [157], le critère de Caliński-Harbarz [158] et le critère de Davies-Buldin [159], est basée sur la variation du nombre de composantes et choisir le GMM optimal selon le critère correspondant.

Dans cette étude, nous avons testé les GMM en utilisant différents nombres de Gaussiennes à partir de deux jusqu'à 100 Gaussiennes (clusters) pour chaque image et nous avons choisi le meilleur modèle, selon le critère AIC, pour regrouper l'image.

V.3.1.3. Segmentation du volume tumoral biologique (VTB)

Après avoir sélectionné le modèle de mélange Gaussien optimal selon les critères d'information Akaike (AIC), dans cette étape, nous classons l'image à l'aide du modèle sélectionné et identifions le groupe qui appartient au volume tumoral biologique (VTB).

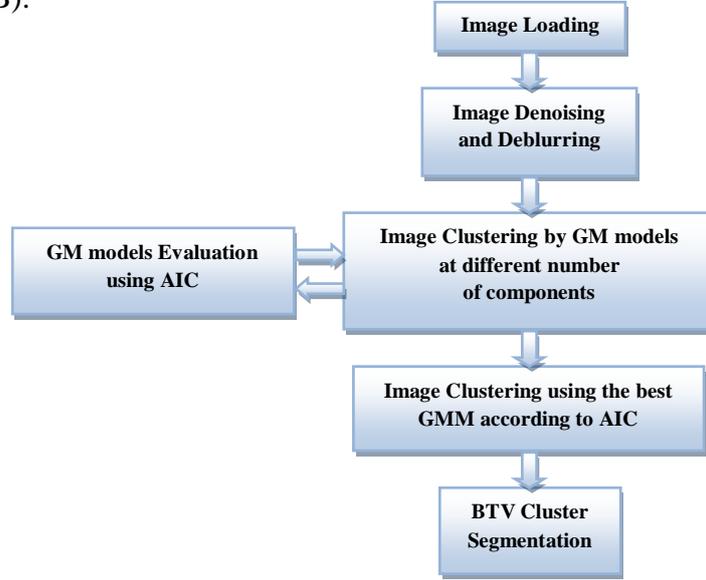


Fig. V.3: Schéma de la méthode proposée.

V.3.2. Méthode basée sur le regroupement (clustering) par k-means [160]

V.3.2.1. Estimation du nombre optimal de clusters (classes)

L'algorithme k-means introduit par MacQueen [161], est le plus utilisé en raison de sa simplicité d'implémentation. Ceci, consiste à la minimisation de la fonction objective suivante :

$$J(x, c) = \sum_{i=1}^N \sum_{k=1}^K \|x_i - c_k\|^2, \quad (V.5)$$

où $\|x_i - c_k\|^2$ est une mesure de distance choisie entre les points de données x_i et c_k est le k -ième centroïde de cluster, x_i est le vecteur caractéristique au i -ième emplacement (ici le x_i contient trois (03) caractéristiques qui sont les deux coordonnées du voxel x (dans l'image TEP-2D) et son intensité), N est le nombre de voxels et K est le nombre de classes (clusters).

L'algorithme k-means se déroule comme suit :

- 1) L'initialisation des K centroïdes $\{c_1, c_2, c_k, \dots, c_K\}$.
- 2) Mise à jour itérative des membres (voxels) x_i du k -ième cluster. C'est l'ensemble des voxels proches du centroïde c_k qu'au centroïde $c_j, j \neq k$ en utilisant la mesure de distance $\|x_i - c_k\|^2$.
- 3) Mise à jour des centroïdes $\{c_1, c_2, c_k, \dots, c_K\}$ itérativement, en calculant la moyenne des voxels (membres) de chaque cluster comme suit: $c_k = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m x_i$, où m est le nombre de voxels dans le k -ième cluster.
- 4) Répétition des étapes 2 et 3 jusqu'à l'obtention de valeurs stables (inchangables) des centroïdes des K clusters.

Le choix de l'algorithme k-means dans cette approche pour regrouper l'image est basé sur sa simplicité et sa solidité, par rapport à d'autres algorithmes de cluster tels que le modèle de mélange Gaussien (GMM) [12, 153], le C-moyennes floue, ou *Fuzzy C-means (FCM)*, sans incorporation des informations spatiales [162] ou FCM avec incorporation des informations spatiales [15, 127-128, 150].

La mise en œuvre de l'algorithme de clustering k-means pour la segmentation commence de 2 à 50 clusters. Ceci est suivi d'un processus de réduction d'erreur pour atteindre le nombre souhaité de clusters (classes) qui se caractérise par une faible erreur selon une connaissance anatomique antérieure du volume de la tumeur (volume de référence) (voir la figure suivante).

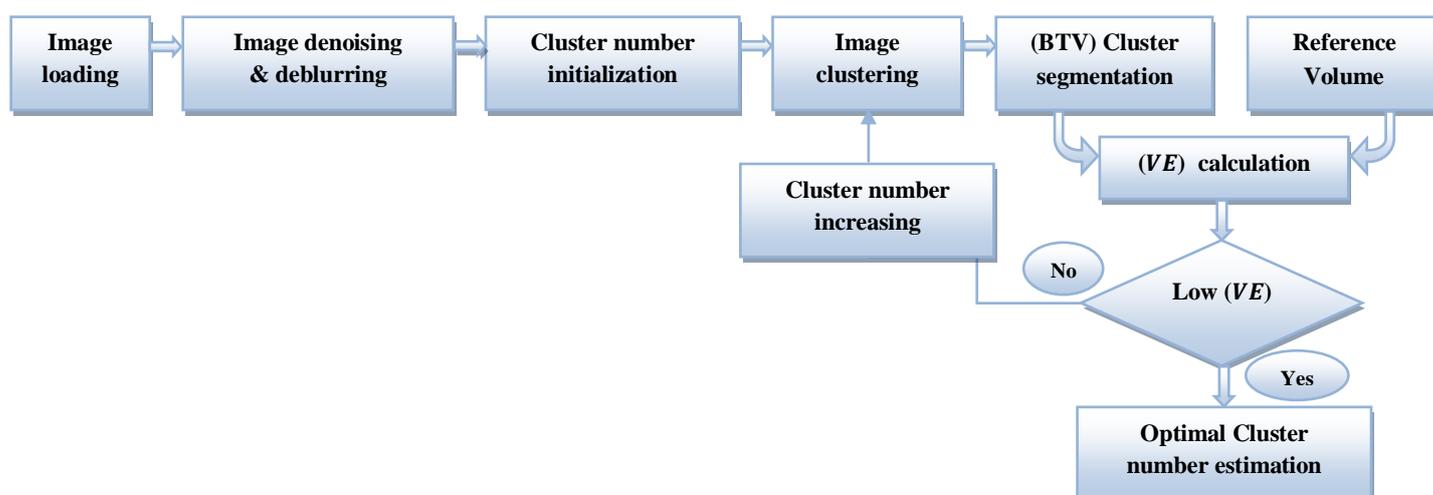


Fig. V.4: Estimation du nombre optimal de clusters k dans le processus de segmentation du VTB.

L'erreur de volume, ou *volume error* (VE), est égale à la différence entre les volumes estimés et les volumes souhaités (volume de référence obtenu comme décrit dans la section V.2) divisé par le volume de référence, tel que décrit par Black et al [10].

$$VE = \frac{V_e - V_d}{V_d} \times 100\% \quad (V.6)$$

À chaque niveau, le VTB est estimé et comparé au volume de référence, de sorte qu'une erreur de volume (VE) soit calculée.

L'organigramme de la figure V.4 se résume comme suit:

- Prétraitement de l'image.
- Le regroupement d'images par l'algorithme k-means, à partir de 2 à 50 clusters (calcul récursif). À chaque niveau, un volume estimé est comparé au volume souhaité pour évaluer l'erreur de volume.
- Estimation du nombre optimal, de clusters, correspondant au VE faible.

Dans la première approche, le nombre optimal de clusters (k) est le même pour toutes les coupes (pour chaque patient), comme présenté dans la figure V.5. Il est démontré que pour le faible nombre de clusters, l'erreur de volume est significative, mais elle diminue drastiquement pour un nombre élevé de clusters. Le k optimal est déterminé comme le nombre correspondant à la valeur d'erreur de faible volume. Notez que nous utilisons la valeur absolue de VE .

Le principal inconvénient de cette approche est la sous-estimation ou la surestimation du nombre de clusters en fonction de la coupe (tranche) frontière ou intermédiaire de la tumeur.

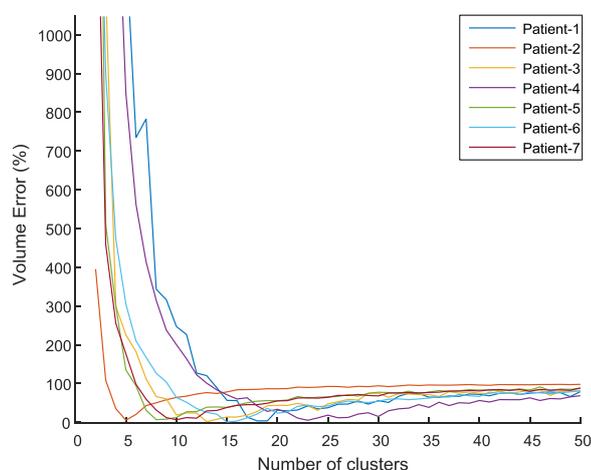


Fig. V.5: Variation de l'erreur de volume (VE) par rapport à la variation de nombre de clusters.

Comme le volume de la tumeur est différent pour chaque tranche, le nombre optimal de grappes doit être adapté pour chaque coupe individuellement.

Dans la section suivante, nous développons une nouvelle approche pour estimer le nombre optimal de grappes pour chaque coupe à l'aide de son volume local, de sorte que le nombre optimal de clusters est déterminé en minimisant le critère d'erreur de volume de la coupe, ou *slice volume error (SVE)*.

De manière similaire à l'équation V.6, l'erreur de volume en coupe est la différence entre les volumes estimés et les volumes souhaités pour la tranche correspondante, divisée par la valeur de volume de la tranche souhaitée.

La figure V.6 montre la variation de l'erreur de volume en tranches (SVE) sur chaque tranche en fonction du nombre de grappes k (pour une image de patient choisie). Nous pouvons remarquer que le k optimal se diffère d'une tranche à l'autre.

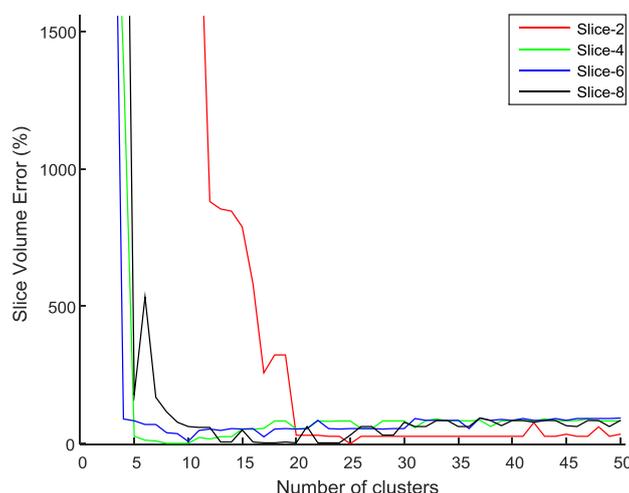


Fig. V.6 : Variation de l'erreur de volume de la coupe (SVE) par rapport à la variation de nombre de clusters.

Afin de démontrer l'importance du choix du nombre optimal de grappes (clusters) k dans la segmentation des images TEP, une coupe est choisie et SVE et VTB sont calculés pour quatre valeurs testées de k ($k = 2, 8, 14$ et 20). La figure V.7(A) montre la valeur SVE pour chaque cas de k . Le k optimal pour cette tranche est égale à 8, car il correspond à la valeur minimale de SVE qui est égale à (1,43%) par rapport aux autres erreurs de nombre de k .

Le VTB de référence (défini par histologie) et le VTB estimé sont présentés dans la figure V.7(B). La meilleure estimation du VTB est représentée en ligne bleue. Elle est plus proche du VTB de référence représenté en ligne rouge.

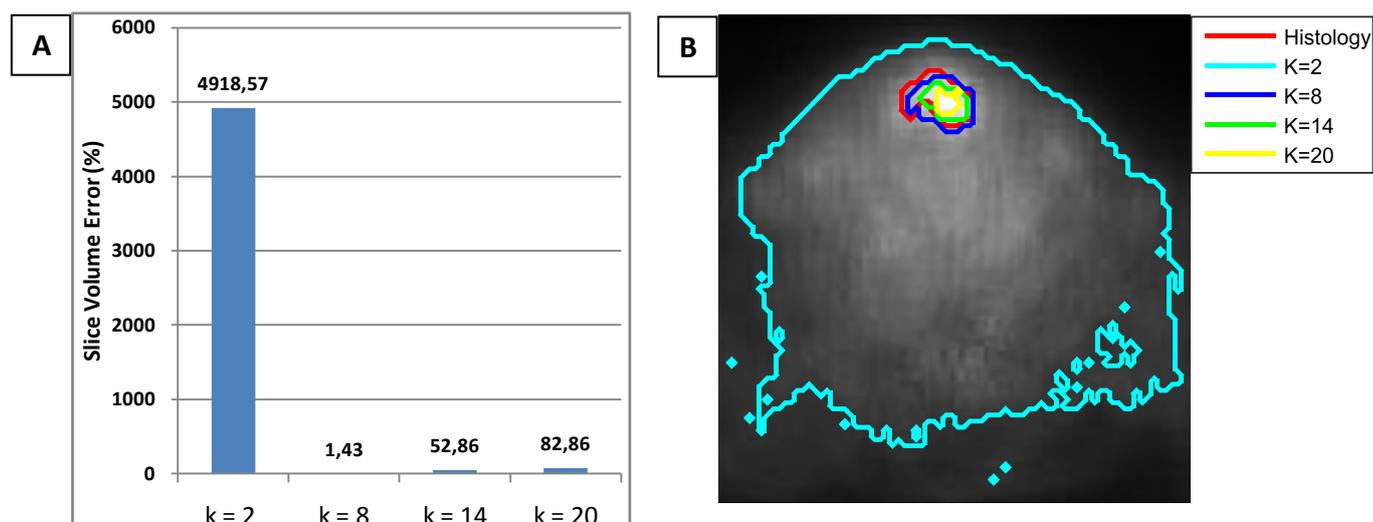


Fig. V.7: Influence du choix du nombre de clusters k (pour une coupe donnée); (A) Slice volume error (SVE), (B) le VTB estimé par 4 différentes valeurs de k ($k=2, 8, 14$ and 20).

V.3.2.2. Nouveau critère pour la détermination automatique du nombre optimal de classes

V.3.2.2.1. Analyse

Jusqu'à présent, nous avons calculé l'erreur de volume (VE) pour une plage de k (2 à 50 clusters) et le nombre optimal correspondant au minimum de SVE. Cette méthode donne de bons résultats mais consomme un temps de calcul significatif en effectuant le clustering pour une large gamme de valeurs de k avant de sélectionner le nombre optimal de clusters. Plusieurs approches ont été proposées dans la littérature pour identifier le nombre optimal de grappes (clusters) pour mieux adapter les données, trois d'entre elles sont utilisées [158-159, 163]. Malheureusement, les résultats ne sont pas prometteurs car ils ne sont pas adaptés à la segmentation d'images TEP.

Ainsi, notre objectif, dans cette étude, est d'améliorer la méthode de regroupement (clustering) k -means, en incorporant une détermination automatique du nombre optimal de clusters en utilisant un nouveau critère basé sur les caractéristiques de l'image TEP.

Après avoir analysé la variation de l'activité maximale (intensité) de l'absorption du ^{18}F -FDG (I_{\max}) dans un volume d'intérêt, ou *volume of interest* (VOI), en balayant toutes les coupes (tranches) (voir fig. V.8), nous concluons, pour tous les patients, que la valeur d'intensité maximale diminue en allant des tranches situées dans le centre du

VOI aux tranches situées aux frontières du VOI. L'intensité maximale est souvent située presque au centre du VTB.

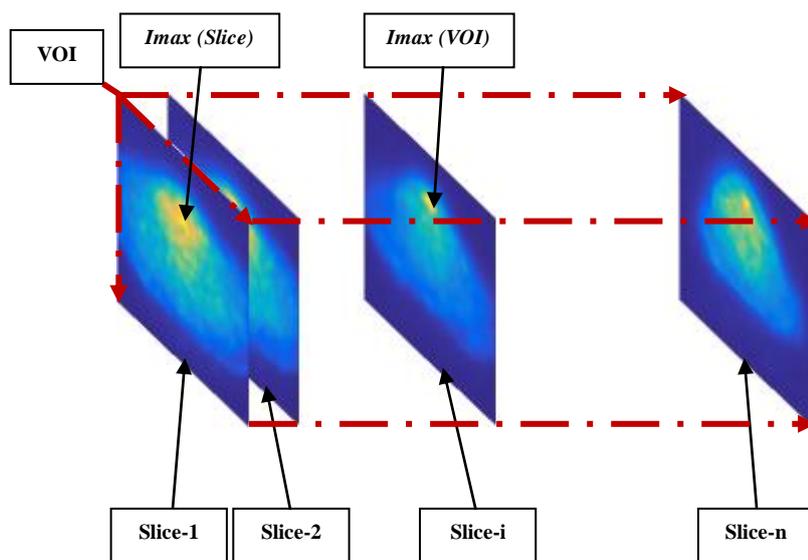


Fig. V.8: Représentation d'un VOI incluant n tranches; $I_{\max (slice)}$ est l'intensité maximale dans la coupe correspondante et $I_{\max (VOI)}$ est l'intensité maximale dans l'ensemble de coupes dans le VOI.

La variation de l'intensité maximale par rapport à l'indice de localisation de la tranche est illustrée dans la figure V.9. En partant de cette figure, il est clair que presque tous les patients ont une forme de variation similaire. Notez que le nombre de tranches (axe des x) est normalisé pour la visualisation (le nombre de tranches change d'un patient à l'autre et ce n'est pas le même pour tous les patients).

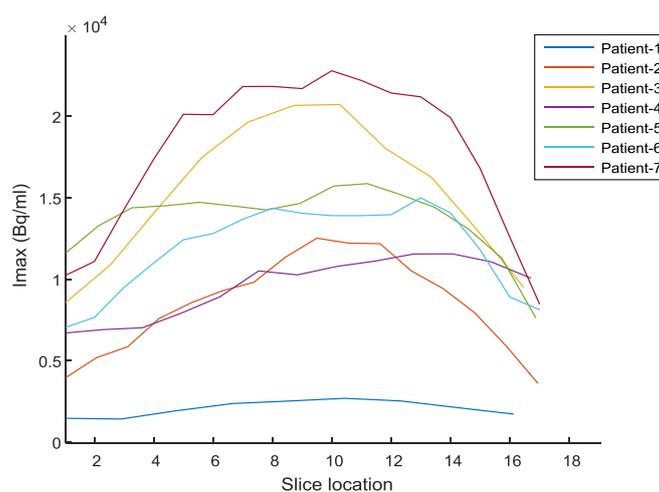


Fig. V.9 : Variation de l'intensité maximale par rapport à l'emplacement de la tranche dans le VOI.

D'autre part, nous concluons qu'à partir des sections précédentes (voir la section V.3.2.1), le nombre optimal de clusters a une valeur minimale au centre du VTB et augmente en allant des tranches centrales aux tranches frontières. Cette corrélation entre le nombre optimal de grappes (clusters) et l'intensité maximale motive notre choix du critère représentatif de l'image suivant :

$$r = \frac{I_{\max}(slice)}{I_{\max}(VOI)} \times \left[range \left(\frac{I_{\max}(slice)}{I_{\max}(VOI)} \right)_{(VOI)} \right]^2, \quad (V.7)$$

où $I_{\max}(slice)$ est l'activité maximale (intensité) de l'absorption du ^{18}F -FDG dans la tranche correspondante, $I_{\max}(VOI)$ est l'activité maximale dans toutes les tranches qui englobent le volume de la tumeur VTB à l'intérieur du VOI tel que défini dans la figure V.8 et $\left[range \left(\frac{I_{\max}(slice)}{I_{\max}(VOI)} \right)_{(VOI)} \right]$ est la différence entre la valeur maximale et la valeur minimale de $\left(\frac{I_{\max}(slice)}{I_{\max}(VOI)} \right)$ dans le VOI.

De la même manière que $I_{\max}(slice)$, le nouveau critère r , a une valeur maximale pour les tranches du milieu et diminue pour les tranches des frontières du VTB. Notez que les valeurs de r varient de «0» à «1» pour tous les patients, comme le montre la figure V.10.

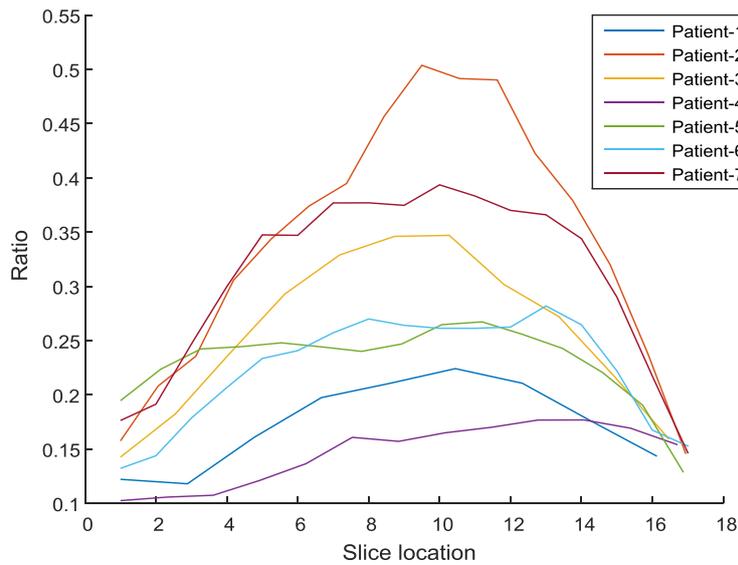


Fig. V.10: Variation du critère r par rapport à l'emplacement de la coupe.

V.3.2.2.2. Modélisation

Cette section est consacrée à trouver une relation entre le nombre optimal de grappes k (obtenues dans la section V.3.2.1) et le nouveau critère r . Cette relation pourrait être utilisée pour déterminer le nombre optimal de clusters pour la segmentation de nouvelles images TEP en utilisant uniquement le nouveau critère de l'image r . Après avoir analysé la variation de k en fonction du critère r (pour tous les patients pris comme échantillons dans cette étude), comme le montre la figure V.11(A), nous utilisons deux modèles d'ajustement : une fonction exponentielle et une fonction puissance données par les équations V.8 et V.9 respectivement:

$$k = \alpha \cdot e^{\beta r} + 1, \quad (\text{V.8})$$

$$k = a \cdot r^b + 1, \quad (\text{V.9})$$

où α , β , a et b sont des coefficients des modèles de fitting et r est le critère proposé.

L'évaluation de la précision de l'ajustement est basée sur le critère R^2 :

$$R^2 = 1 - \frac{SSR}{SST}, \quad (\text{V.10})$$

où SSR est la somme des carrés des résidus et SST la somme des carrés totaux.

Notez que nous avons additionné "1" à l'équation d'ajustement d'origine pour éviter de regrouper l'image en un seul cluster (pour les valeurs élevées de r).

V.3.2.2.3. Généralisation

L'objectif de cette étape est d'automatiser le choix du nombre optimal de grappes (clusters) pour tous les patients utilisant une fonction relationnelle correspondante en définissant un modèle généralisé pour tous les patients. Pour cette raison, nous avons divisé la base de données au hasard en deux parties de 42% pour la validation et 58% pour le test. Idéalement il faut utiliser 50% pour chaque partie, mais ce choix est impossible puisque notre base de données est composée de 7 patients.

La première partie (ensemble de validation), contenant trois (03) patients, est utilisée pour optimiser les coefficients du modèle et pour fixer le modèle exponentiel optimal généralisé ainsi que le modèle de puissance généralisé. La deuxième partie (ensemble de test), qui contient 4 patients, est utilisée pour tester la précision du modèle optimal fixé. Selon le critère du R^2 , la fonction exponentielle et puissance généralisées peut être réécrite comme suit:

$$k = 46,52e^{-5,918 \times r} + 1 \quad (V.11)$$

$$k = 1,683 \times r^{-1,264} + 1 \quad (V.12)$$

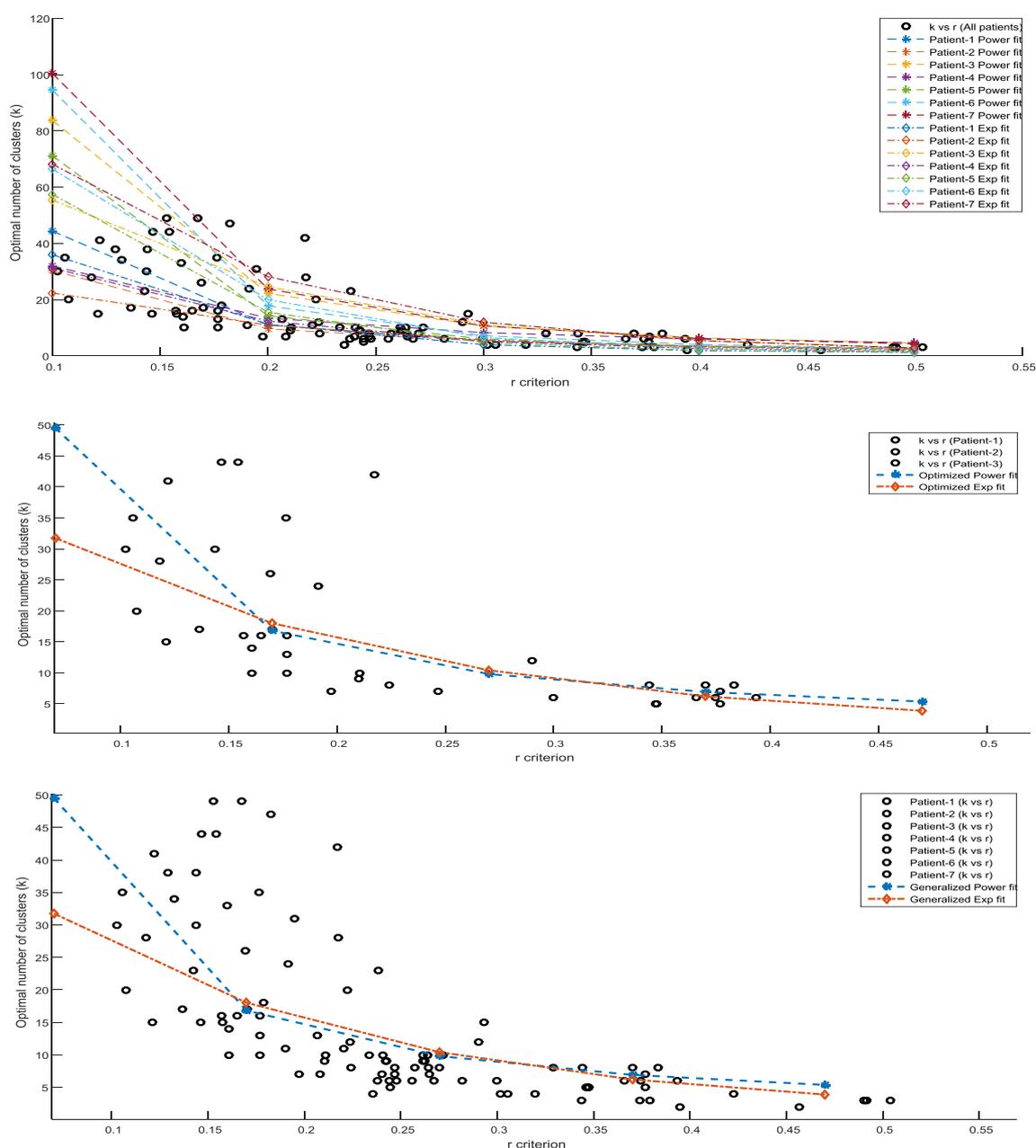


Fig. V.11: Analyse de la relation entre le nombre optimal de grappes k et le critère r ;
 (A) Variation du k optimal en fonction du critère r pour tous les patients et les modèles de fitting obtenus pour chaque patient. (B) Modélisation de la relation entre le nombre optimal de grappes k et le critère r pour trois (03) patients utilisés comme ensemble de validation; la fonction de puissance (ligne discontinue bleue) et la fonction exponentielle (ligne discontinue rouge). (C) Efficacité des modèles de fitting généralisés contre la tendance entre le nombre optimal de grappes k et le critère r .

Les modèles de fitting optimisés et généralisés, de la relation entre le nombre optimal de grappes k et le critère r pour l'ensemble de données de validation sont présentés dans la figure V.11(B), tandis que la figure V.11(C) illustre l'efficacité de ces modèles, de fitting généralisés, pour calculer le nombre optimal de clusters pour l'ensemble des données (ensemble de données de validation et de test), en comparaison avec la relation obtenue entre le k optimal et le critère r suivant le schéma de la figure V.4.

Le processus de segmentation, mettant en œuvre la détermination automatique du nombre optimal de grappes utilisant les équations V.11 et V.12, est résumé dans le schéma illustré dans la figure suivante :

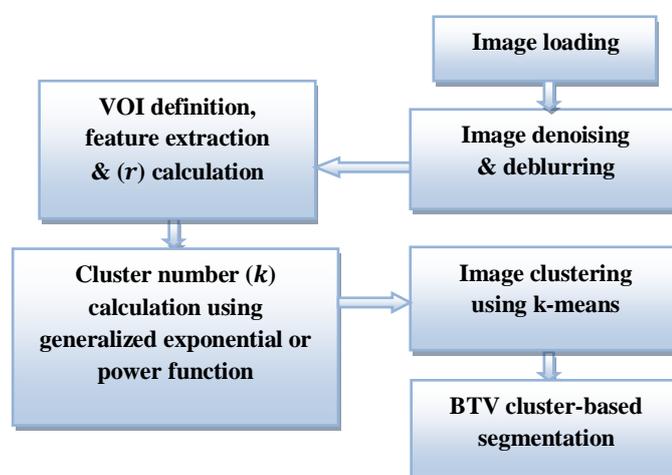


Fig. V.12: Schéma de l'approche proposée.

V.4. Résultats et discussions

V.4.1. Résultats obtenus par GMM-AIC [153]

Nous avons utilisé la moyenne de l'erreur de volume VE absolue comme la moyenne de VE calculée à partir de deux patients.

Les résultats obtenus avec la nouvelle méthode automatique GMM-AIC ont été comparés à un autre GMM automatique basé sur les critères d'information bayésiens GMM-BIC, comme indiqué dans le tableau V.1.

Le GMM-AIC était plus précisément que GMM-BIC avec $(50,55 \pm 4,21\%)$.

La figure V.13 montre les résultats obtenus, sur une coupe (slice) donnée, par la méthode de GMM-AIC comparativement à d'autres méthodes existantes.

Approaches	Patient-1 (V=32,9 ml)	Patient-2 (V=26,64ml)	Mean Volume Error (%)
GMM-BIC	55,55	55,11	87,82 ± 26,87
GMM-AIC	48,56	40,91	50,55 ± 4,21

Tableau V.1: Erreur moyenne du volume de deux patients.

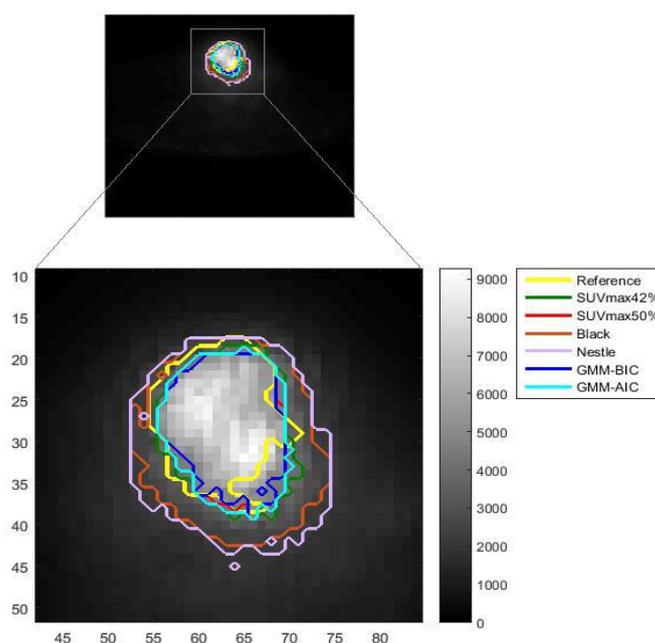


Fig. V.13 : Comparaison des VTBs estimés avec le VTB de référence pour une coupe (slice) donnée.

De l'erreur de volume moyenne de ces deux patients étudiés, les résultats obtenus par les différentes méthodes sont présentés dans la figure V.14. Toutes les méthodes basées sur le seuil ont surestimé le VTB réel, la segmentation du VTB par la méthode $SUV_{max\ 50\%}$ était la bonne méthode à partir des méthodes basées sur le seuil avec une erreur de $(363,19 \pm 429,10\%)$.

La méthode de segmentation GMM-AIC proposée était la plus précise dans l'estimation du volume tumoral biologique VTB avec $(50,55 \pm 4,21\%)$.

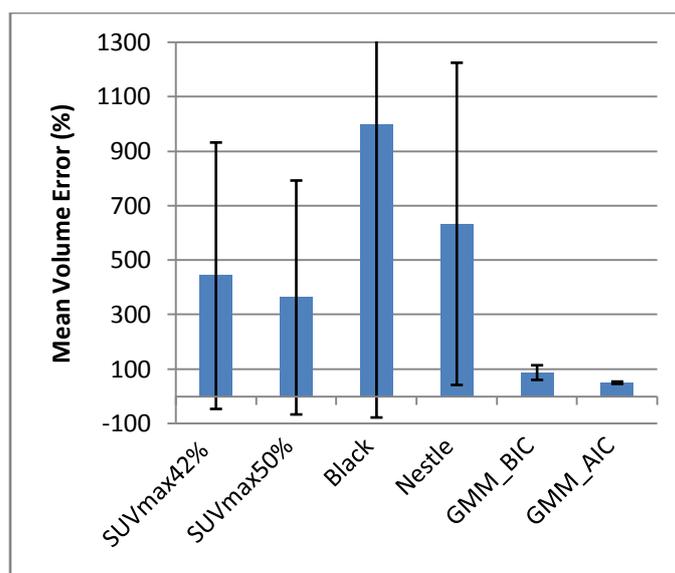


Fig. V.14: Erreur moyenne du volume pour deux patients, obtenue par six méthodes différentes.

V.4.2. Résultats obtenus par k-means combiné avec le critère r [160]

Pour valider notre approche, nous effectuons la segmentation des images TEP pour tous les patients de l'ensemble en utilisant notre méthode et d'autres méthodes existantes dans la littérature. Pour l'évaluation de chaque méthode, nous calculons l'erreur de volume pour chaque patient et nous utilisons la valeur d'erreur moyenne des sept patients inclus dans notre étude. Nous appelons *MEV*, cette erreur moyenne du volume tumoral biologique *VTB*, ou *mean error of BTV*.

Tout d'abord, nous comparons le critère proposé pour la détermination du nombre optimal de clusters avec trois critères existants qui sont utilisés pour le clustering [158-159, 163]. Les résultats de validation, basés sur *MEV*, sont donnés dans la figure V.15. Il est démontré que le k-means, en utilisant les modèles généralisés proposés (voir Eq. V.11, Eq. V.12) pour définir la valeur optimale de k , que ce soit avec la fonction exponentielle ou la fonction de puissance, donnent des faibles erreurs *MEV* avec (-1,7%) et (0,7%) respectivement. Cependant, la segmentation basée sur les k-means en utilisant le critère de Calinski-Harabasz [158], le critère de Davies-Buldin [159] et Silhouette [163], donnent des *MEVs* significatives avec les valeurs suivantes (-80,1%), (1074,87%) et (2699,59%) respectivement. Ces résultats ont confirmé l'efficacité du critère proposé.

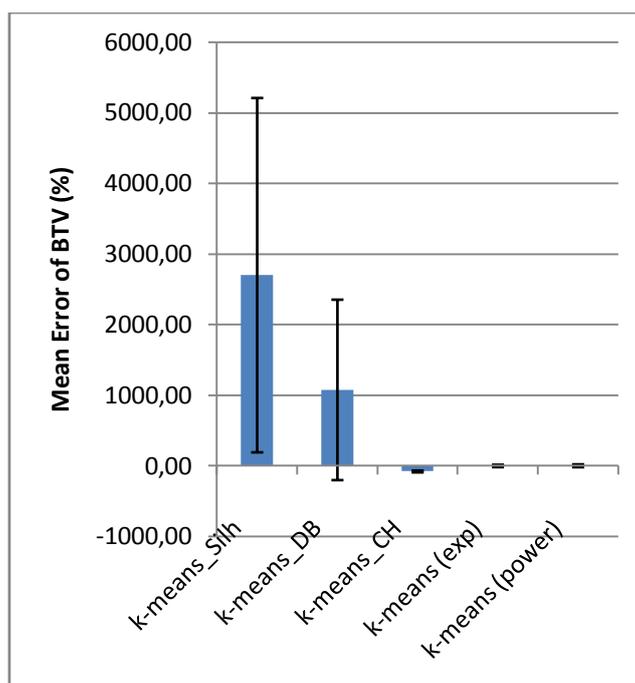


Fig. V.15: Erreur moyenne du VTB, obtenue par k-means utilisant différents critères pour l'estimation du nombre optimal de grappe.

Afin d'évaluer la méthode proposée, nous l'avons comparé avec certaines méthodes existantes. Premièrement, l'évaluation a été établie sur l'ensemble de données de test (sur 4 patients). La figure V.16 suivante montre les résultats obtenus en utilisant des modèles généralisés (adaptés à tous les patients), donnés par Eq. V.11 et Eq. V.12, pour la détermination automatique du nombre optimal de grappes requis pour la segmentation du volume tumoral biologique (VTB).

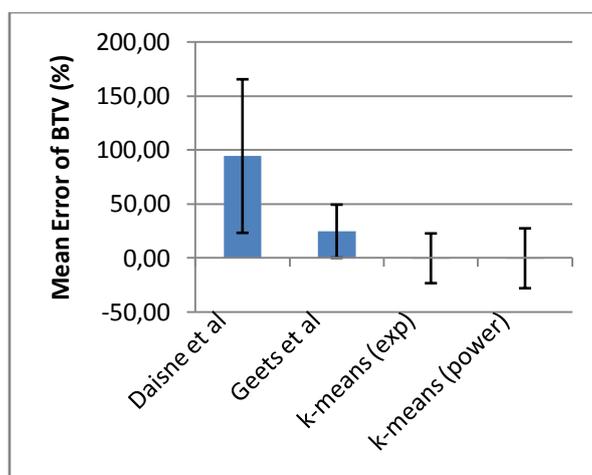


Fig. V.16: Erreur moyenne du VTB, obtenue en utilisant un modèle généralisé pour l'ensemble de données de test.

Le regroupement (clustering) k-means incorporant la détermination automatique k , en utilisant des modèles d'ajustement généralisés, donne toujours la valeur d'erreur moyenne la plus faible par rapport à d'autres méthodes. Nous concluons que le modèle basé sur la fonction de puissance garantit un MEV réduit avec (-0.3%) comparativement au modèle exponentiel avec (-0.32%).

Le clustering k-means, incorporant la détermination du k optimal (en utilisant un modèle de puissance généralisé donné par Eq. V.12), donne de bons résultats par rapport à la méthode de Geets et al [17] basée sur le gradient avec (24,75%) et la méthode proposée par Daisne et al [122] avec (94,25%).

Pour savoir plus sur la précision de la méthode proposée, toutes les méthodes ont été évaluées sur la base de données complète (sur sept patients) [2]. La figure suivante illustre les résultats obtenus. Il est démontré que la méthode proposée donne l'erreur la plus faible par rapport aux méthodes existantes étudiées dans cette étude avec (-1,7%) et (0,7%) pour les k-means en utilisant le modèle exponentiel et le modèle de la fonction de puissance respectivement. En comparaison avec les autres méthodes ; La FCM-SW proposée par Belhassen et al [15] avec (-5,32%), la méthode, de Geets et al [17], basée sur le gradient avec (19,14%), la méthode basée sur le contour actif [2, 164] avec (27,2%), la méthode de C-moyennes floue FCM avec (35,58%) et la méthode de seuillage proposée par Daisne et al [122] avec (91,29%).

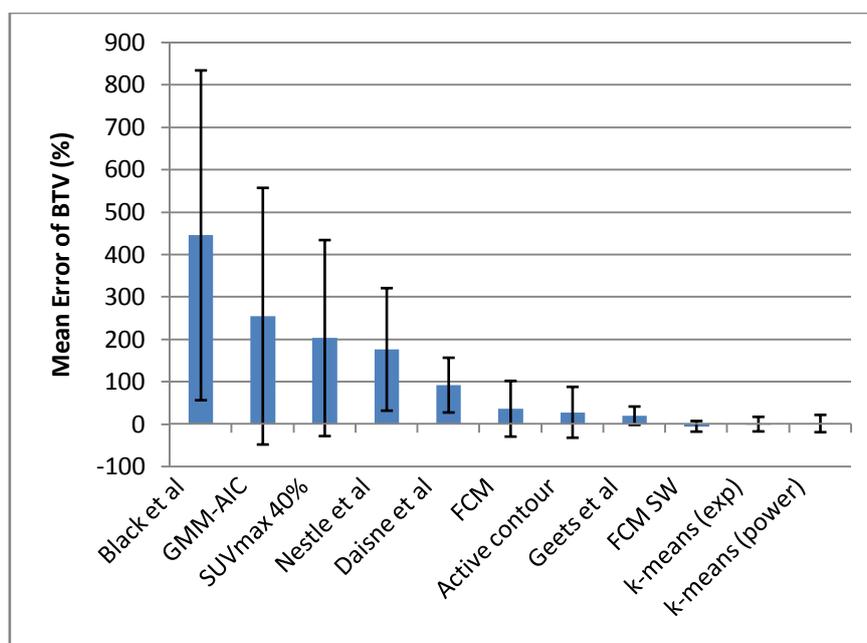


Fig. V.17: Erreur moyenne du VTB en utilisant le modèle généralisé pour tous les patients.

V.5. Conclusion

Par cette étude, nous proposons une nouvelle approche non supervisée basée sur le clustering pour segmenter le VTB dans les images ^{18}F -FDG-PET en cas de tumeurs laryngées. Une étude de comparaison entre les méthodes existantes pour la segmentation d'image est réalisée en premier lieu, et les résultats obtenus confirment que la méthode de clustering, par k-means, proposée est très efficace. Deuxièmement, un nouveau critère basé sur les caractéristiques intrinsèques de l'image TEP, pour déterminer le nombre optimal de grappes, est proposé et comparé aux critères généralement utilisés dans la littérature.

En comparaison avec d'autres méthodes existantes, y compris les méthodes basées sur le seuil et le gradient, l'approche proposée, basée sur le clustering par k-means intégrant l'estimation automatique du nombre optimal de clusters, donne de bons résultats pour la segmentation du volume tumoral biologique VTB en utilisant une base de données concernant les sept patients de cette étude.

Nous concluons que la méthode proposée est très prometteuse et nous espérons la valider encore, à travers de futures travaux de recherche, en utilisant des bases de données contenant un grand nombre d'images TEP.

Chapitre VI

Sonoporation pour la thérapie ciblée des tumeurs: Manipulations et résultats

VI.1. Introduction

L'objectif de ce travail est de montrer le potentiel de la technique de sonoporation en termes de l'augmentation de l'efficacité du traitement chimique des tumeurs en couplant un anti cancer (Irinotécan) avec des microbulles de gaz excitées par des ondes ultrasonores. Ensuite, l'impact de la sonoporation pour l'augmentation de la fixation d'un anticorps (Cétuximab). En effet, la démonstration du potentiel de la technique de sonoporation en terme de l'augmentation de l'efficacité du traitement chimique s'effectue par l'analyse de l'image échographique contrastée (EC) en suivant l'évolution de la courbe de la perfusion dans la région tumorale.

VI.2. Livraison d'Irinotécan par ultrasons assistés par microbulles

L'Irinotécan est un anticancéreux puissant avec des effets secondaires systémiques sévères qui limitent son application clinique.

La livraison ciblée avec des méthodes non invasives est nécessaire pour améliorer localement la concentration de médicament et pour réduire ces effets indésirables.

L'échographie assistée par microbulles est devenue une méthode prometteuse pour l'administration non invasive de médicaments ciblés.

Le but de cette étude est d'évaluer, *in vivo*, l'efficacité thérapeutique de l'administration de l'Irinotécan basée sur la combinaison de l'échographie et des microbulles.

D'après l'analyse de l'évolution de la perfusion tumorale, les conclusions tirées de cette étude démontrent le potentiel de cette approche thérapeutique pour la thérapie ciblée contre le cancer en termes de l'augmentation de l'efficacité du traitement.

VI.2.1. Etude expérimentale

VI.2.1.1. Produits chimiques

L'Irinotécan dans le sel de HCl (Camptosar, Pfizer France) a été un généreux don du Dr Tournamille (CHRU Tours.CRC Henry S. Kaplan, Tours, France). Les agents de contraste (QA 3411, Bracco Research Genève, Suisse) ont été utilisés pour l'imagerie ultrasonore contrastée et la délivrance de médicaments en utilisant des ultrasons assistés par microbulles. Ces agents de contraste sont des microbulles constitués d'un noyau gazeux d'azote et d'un mélange de perfluorobutane entouré d'une coquille de phospholipide PEGylé. Le diamètre médian en volume varie de 2,3 à 2,6 μm [19].

VI.2.1.2. Les cellules

Les cellules d'astrocytome du glioblastome humain (U-87 MG) proviennent d'un gliome malin (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Royaume-Uni). Ces cellules sont capables de développer une tumeur maligne de glioblastome chez des souris nues. Les cellules ont été cultivées sous la forme d'une monocouche dans le milieu d'Eagle modifié de Dulbecco (DMEM High W / GlutaMAX-I, Life Technologies, Saint-Aubin, France) complété par un sérum de veau foetal 10% calorifuge (FCS, Life Technologies, Saint-Aubin, France). Les cellules ont été systématiquement sous cultivées tous les 4 jours et incubées à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée avec un incubateur de CO₂ à 5% [19].

VI.2.1.3. Installation par ultrasons

Les ondes ultrasonores ont été générées par un transducteur personnalisé d'un seul élément avec une fréquence centrale de 1 MHz. Le transducteur avait un diamètre de 15 mm et était naturellement concentré à 30 mm. Il a été conduit avec un signal électrique généré par un générateur de forme d'onde arbitraire (Agilent, Santa Clara, CA) puis amplifié par un amplificateur de puissance (ADECE, Artannes sur Indre, France). La pression négative maximale de l'onde acoustique a été mesurée dans une configuration séparée à l'aide d'un hydrophone à aiguille PVDF calibré (diamètre 0,2 mm; Precision Acoustics Ltd., Dorschester, Royaume-Uni) à la distance focale naturelle du transducteur.

VI.2.1.4. Délivrance in vivo de l'Irinotécan

Toutes les procédures ont été effectuées selon les directives éthiques et ont été approuvées par le Comité régional pour l'éthique dans les expériences animales, Val-de-Loire (n ° 2011-09-2). Des mâles de souris nues ont été achetés auprès de Charles River (L'Arbresle, France). Ils ont été maintenus à une température ambiante constante avec un cycle de lumière de 12 h dans des cages d'isolement ventilées. Les souris avaient 6 semaines au début des expériences, pesant 25 à 30 g. Sous anesthésie gazeuse (Aerrane, Baxter, Deerfield, IL), des cellules U-87 MG (3×10^6 cellules / souris dans 100 μ L de PBS) ont été injectées par voie sous cutanée dans les deux flancs de chaque souris.

Au total, 15 souris ont été divisées en trois groupes expérimentaux: (1) groupe de contrôle (c'est-à-dire, sans traitement), (2) groupe Irinotécan (c'est-à-dire injection d'Irinotécan seul), et (3) Irinotécan + sonoporation (c'est-à-dire injection d'Irinotécan suivie d'une sonoporation).

Sous anesthésie gazeuse, le traitement tumoral a été initié lorsque toute la tumeur a été perfusée et atteint un volume de 100 mm³. Il s'agissait d'une administration intraveineuse directe d'Irinotécan via la veine péniennne (20 mg / kg pc). Suivi 1 heure plus tard par injection en bolus de microbulles de gaz (70 µL). Ce délai est nécessaire pour atteindre le pic pharmacologique de SN-38 dans le sang [165]. La tumeur a été recouverte d'un gel de transmission par ultrasons et exposée à des ondes ultrasonores sinusoïdales de 1 MHz avec une période de répétition d'impulsions de 100 µs, 40 cycles par impulsion (40% Cycle de service), à une pression maximale de 400 kPa pendant 3 min. Le traitement a été effectué aux jours 28, 32 et 36 de la croissance tumorale.

VI.2.1.5. L'imagerie échographique contrastée (EC)

L'échographie de contraste a été réalisée aux 31ème, 35ème et 39ème jours de la croissance de la tumeur. Une injection de bolus de 70 µL de microbulles de gaz a été injectée par voie péniennne. Immédiatement après l'injection de l'agent de contraste, un premier ensemble d'images de contraste non linéaire à faible puissance transmise a été effectué. Les clips vidéo de 36 s ont été enregistrés à 10 images / s pour étudier la perfusion tumorale. Après l'acquisition de l'image, une analyse quantitative de la perfusion tumorale a été réalisée à l'aide du logiciel VevoCQ (VisualSonics Inc., Toronto, Canada), comme le montre la figure VI.1.



Fig. VI.1 : Interface du logiciel VevoCQ (VisualSonics Inc., Toronto, Canada).

Les artefacts de mouvement ont été corrigés grâce à ce logiciel. A cet égard une région d'intérêt (ROI) correspondant à la tumeur a été définie manuellement (Fig. VI.2). Ensuite, une courbe d'intensité temporelle pour la ROI a été calculée, et l'amélioration du pic (PE), qui correspond au volume relatif du sang, a été déterminée [166-167] (Fig. VI.3).

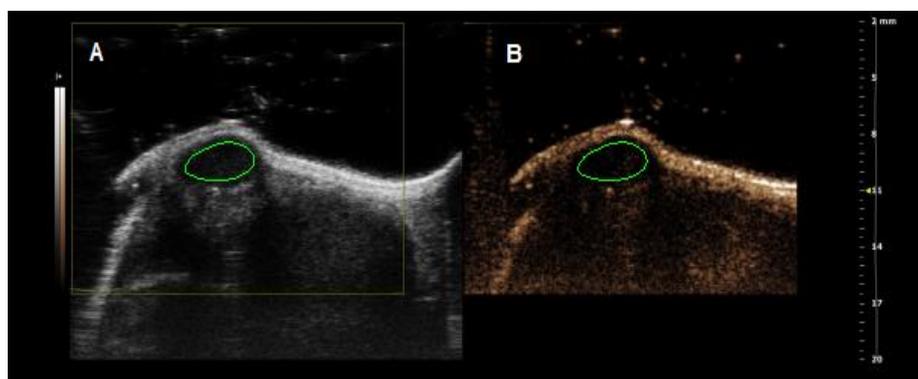


Fig. VI.2 : Définition manuelle de la région d'intérêt (ROI) correspondante à la tumeur (ligne vert): (A) Image par mode B et (B) Image par échographie de contraste.

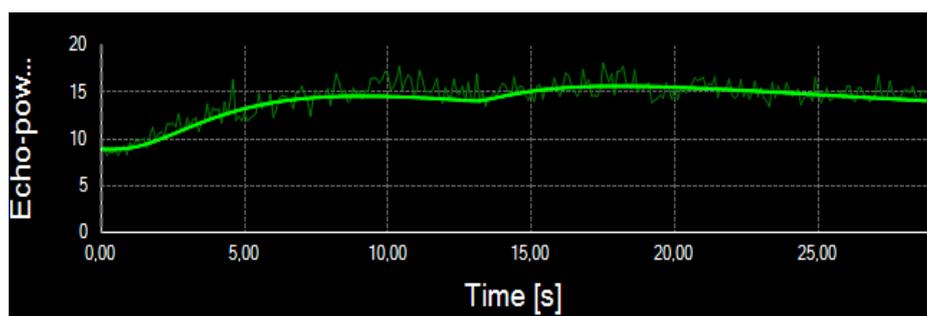


Fig. VI.3 : Courbe d'intensité temporelle obtenue pour la ROI définie.

L'effet de la délivrance d'Irinotécan à l'aide d'une échographie, couplée avec des microbulles, sur la perfusion tumorale a été surveillé trois jours après chaque traitement par imagerie par ultrasons à contraste élevé.

Comme indiqué précédemment, trois (03) groupes de souris sont utilisés dans cette étude expérimentale : un groupe de contrôle (sans traitement), un groupe traité chimiquement par l'Irinotécan seul et un groupe traité et sonopéré.

La procédure utilisée dans cette étude est le traitement et le suivi de l'évolution de la perfusion tumorale de deux tumeurs (T1 et T2) dans chaque souris pendant trois (03) cycles de traitement.

Les signaux sont acquis et quantifiés en utilisant le logiciel VevoCQ, par la suite ces signaux sont prétraités par un filtre passe bas pour éliminer les hautes fréquences issues des mouvements respiratoires ou d'autres effets expérimentaux.

VI.2.1.6. Prétraitement des données

Les signaux acquis récupérés du logiciel VevoCQ sont filtrés en utilisant un filtre passe-bas de Butterworth à une fréquence de coupure trop basse pour éliminer toutes les hautes fréquences, comme l'illustre la Fig. VI.4.

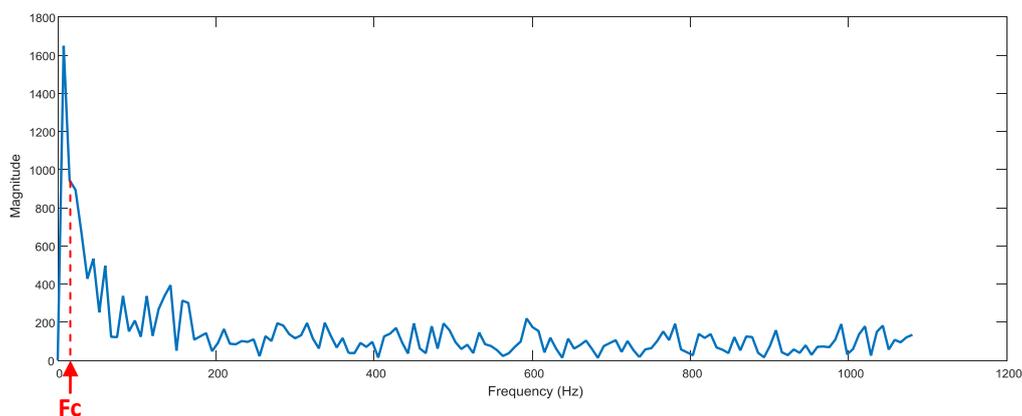


Fig. VI.4:Analyse spectrale du signal acquis.

Les figures VI.5 et VI.6 montrent que le signal filtré donne la meilleure approximation du signal acquis par rapport au fitting. Le fitting représenté dans la figure VI.6 (couleur noir) ne donne pas une bonne approximation du signal écho (couleur rouge).

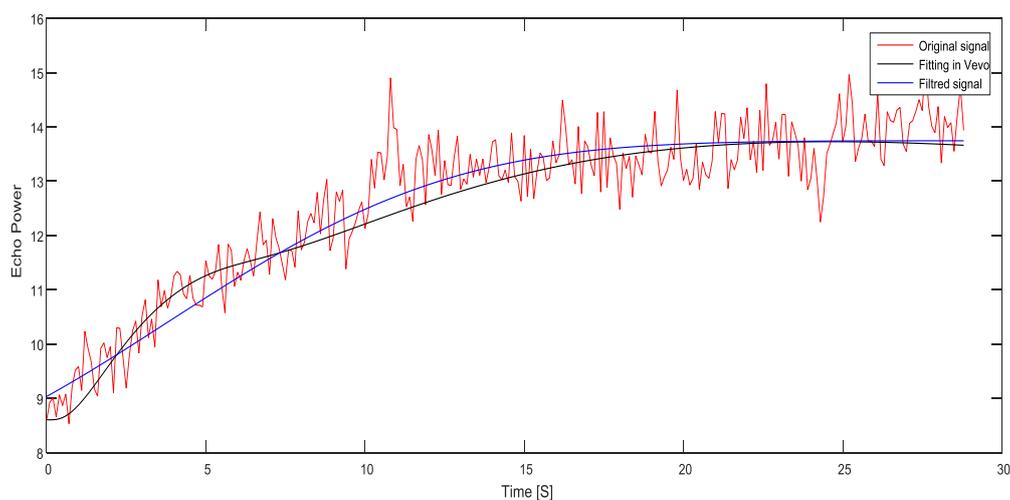


Fig. VI.5: Approximation presque similaire entre le fitting et le signal filtré.

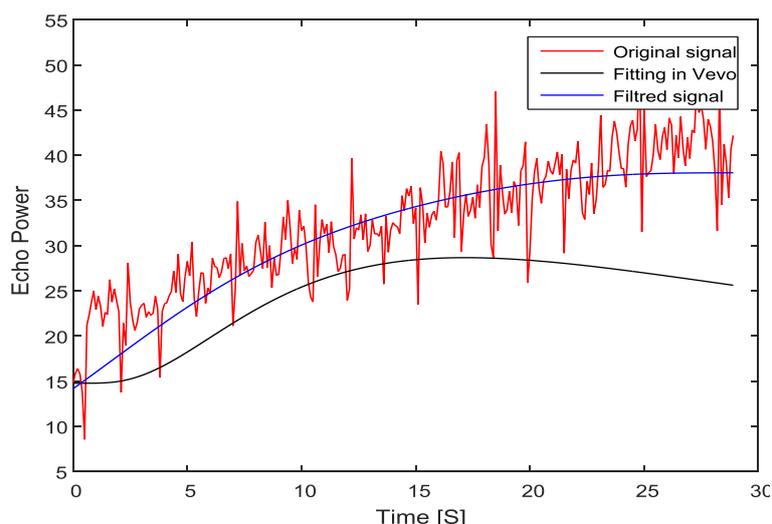


Fig. VI.6: Approximation différente entre le fitting et le signal filtré.

VI.2.2. Résultats et discussions

Pour l'analyse de l'évolution de la perfusion tumorale au cours du traitement, des paramètres, qui la caractérisent, ont été générées depuis l'évolution de l'intensité de signal issue de la concentration des microbulles dans une région d'intérêt (ROI) prédéfinie.

La figure VI.7 montre les paramètres (caractéristiques) fondamentaux pour le suivi de l'évolution de la perfusion tumorale. Ces 04 paramètres sont : le maximum (ou *Peak*), l'aire sous la courbe (ou *area under the curve, AUC*), le temps du peak d'intensité (ou *time to peak, TTP*) et la pente (ou *wash in rate, WiR*).

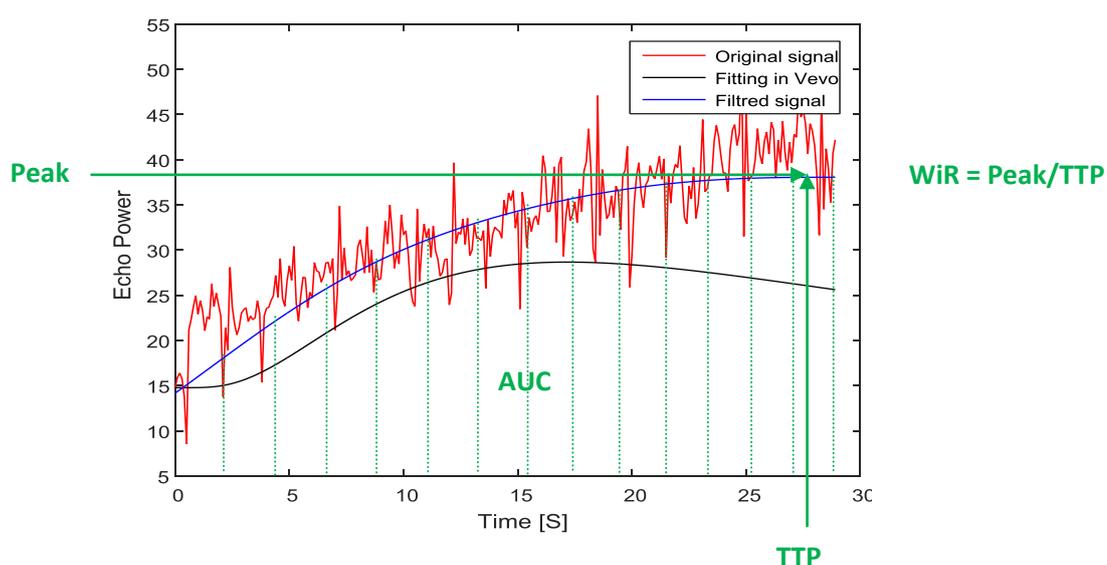


Fig. VI.7: Représentations des 04 paramètres fondamentaux.

Des paramètres secondaires issues de ces derniers (paramètres fondamentaux) sont aussi utilisées dans cette étude afin de voir s'ils améliorent l'influence du choix de la région ROI et le suivi de l'évolution du volume combiné avec l'évolution de la perfusion. Les paramètres normalisés utilisés sont les mêmes paramètres fondamentaux mais normalisés par la surface de la région d'intérêt ROI pour réduire l'influence de la manière de définir cette région ROI : Peak/ROI, AUC/ROI, TTP/ROI et le WiR/ROI. Les paramètres pondérés sont aussi les mêmes paramètres fondamentaux mais cette fois-ci sont multipliés par la surface de la région d'intérêt ROI, pour combiner l'évolution de l'indice de la perfusion avec l'évolution du volume tumoral représenté par la surface ROI : Peak x ROI, AUC x ROI, TTP x ROI et le WiR x ROI.

VI.2.2.1. Premier traitement (Tumeur T1)

VI.2.2.1.1. Analyse de l'évolution des paramètres fondamentaux

Les figures VI.8, VI.9 et VI.10 montrent les résultats obtenus en suivant l'évolution des trois (03) paramètres Peak, AUC et WiR. Nous remarquons une différence non significative entre le groupe sonoporé et le groupe traité par l'Irinotécan seul après trois cycles de traitement (28^{ème}, 32^{ème} et 36^{ème} jour).

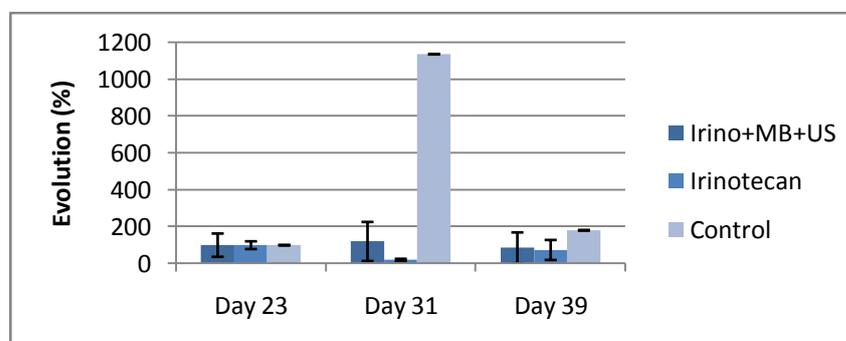


Fig. VI.8: Evolution du peak.

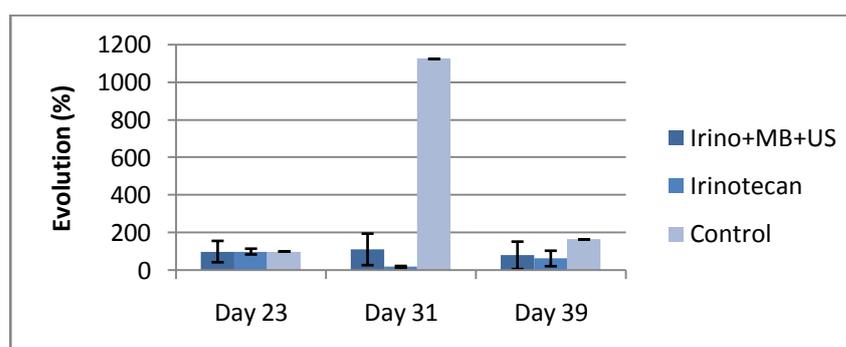


Fig. VI.9: Evolution du AUC.

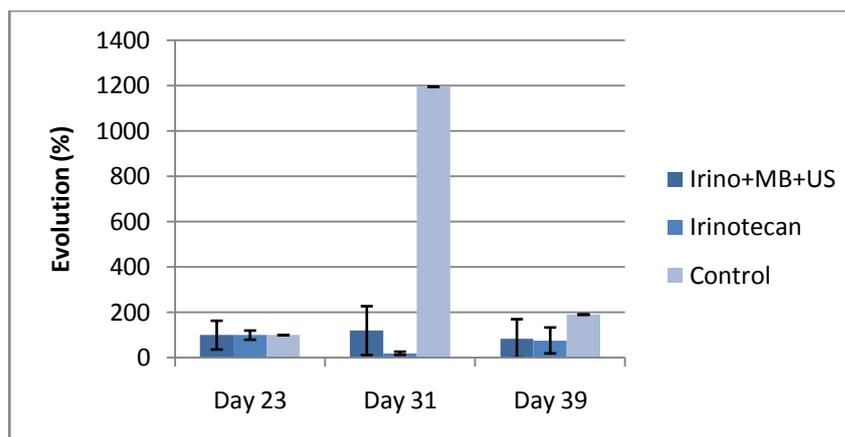


Fig. VI.10: Evolution du WiR.

La figure VI.11 montre une légère augmentation du TTP du groupe sonopéré comparativement au groupe traité par l'Irinotécan seul et le groupe de control (non traité).

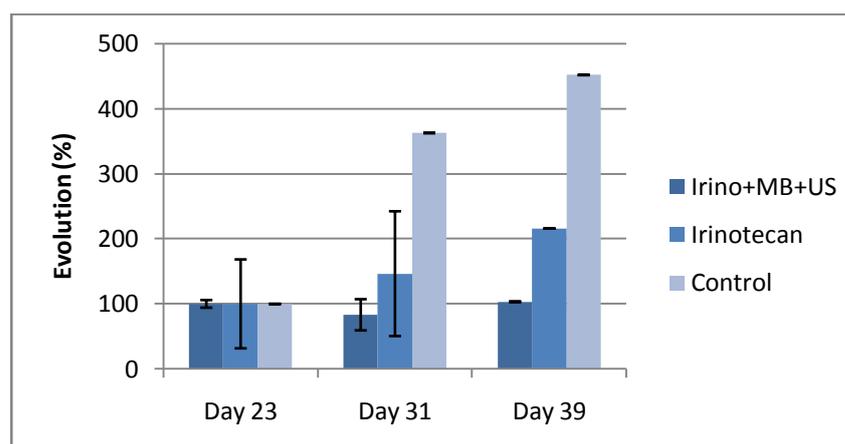


Fig. VI.11: Evolution du TTP.

VI.2.2.1.2. Analyse de l'évolution des paramètres normalisés

Les figures VI.12, VI.13 et VI.14 montrent les résultats obtenus en suivant l'évolution des paramètres normalisés par la surface de la région ROI.

Nous constatons aussi une différence non significative de l'évolution des trois (03) paramètres normalisés (Peak/ROI, AUC/ROI, WiR/ROI) pour les trois (03) groupes après trois (03) cycles de traitement.

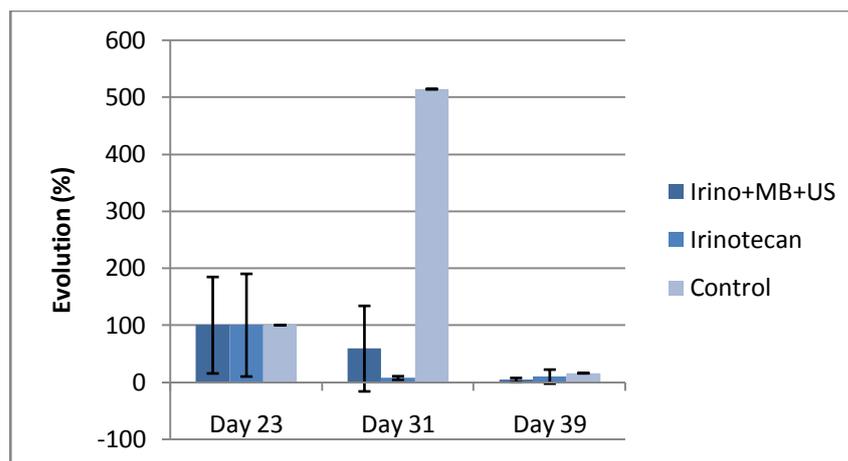


Fig. VI.12: Evolution du Peak/ROI.

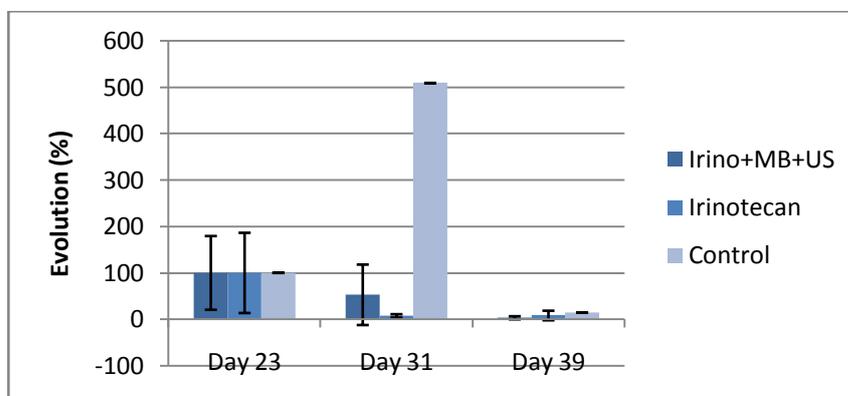


Fig. VI.13: Evolution du AUC/ROI.

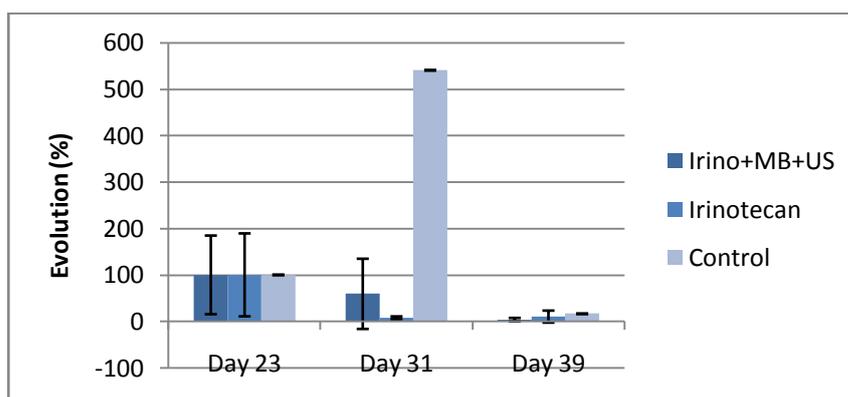


Fig. VI.14: Evolution du WiR/ROI.

La figure VI.15 montre une diminution importante du paramètre TTP/ROI pour le groupe sonoporé comparativement aux deux autres groupes. La diminution est due à l'influence de l'évolution de la région ROI (Volume de la tumeur).

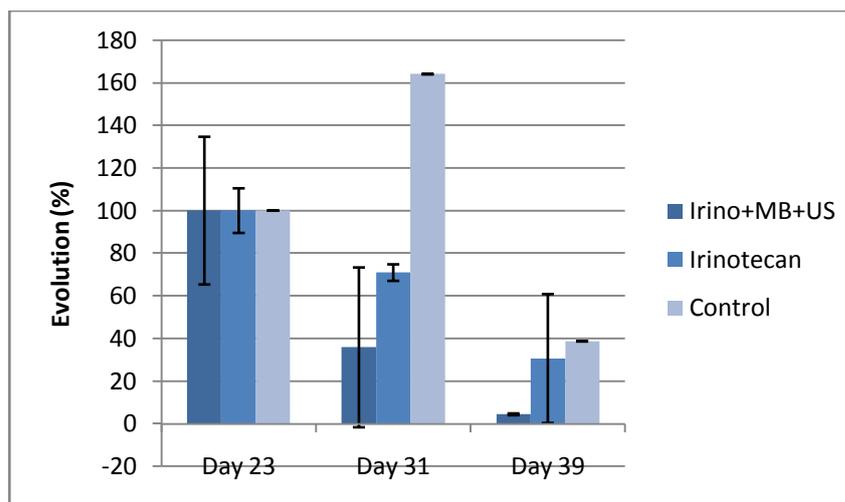


Fig. VI.15: Evolution du TTP/ROI.

VI.2.2.1.3. Analyse de l'évolution des paramètres pondérés

Les figures VI.16, VI.17, VI.18 et VI.19 montrent les résultats obtenus en suivant l'évolution des 4 paramètres pondérés (Peak x ROI, AUC x ROI, WiR x ROI, TTP x ROI). Nous remarquons ici une légère augmentation des paramètres pondérés pour le groupe traité par l'Irinotécan seul par rapport au groupe traité et sonopéré.

Nous attendons l'inverse entre le groupe sonopéré et le groupe traité par l'Irinotécan seul (c-à-d une légère évolution dans les 4 paramètres pondérés à cause d'une légère évolution du volume pour le groupe sonopéré par rapport au groupe traité par l'Irinotécan seul).

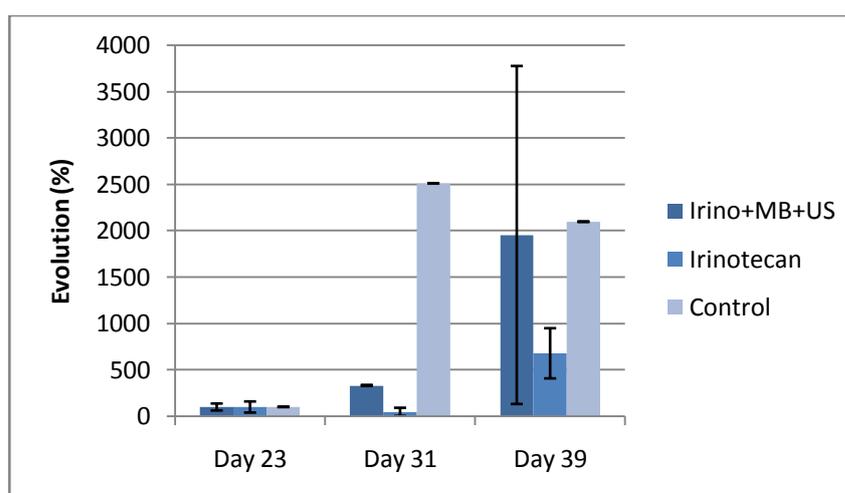


Fig. VI.16: Evolution du Peak x ROI.

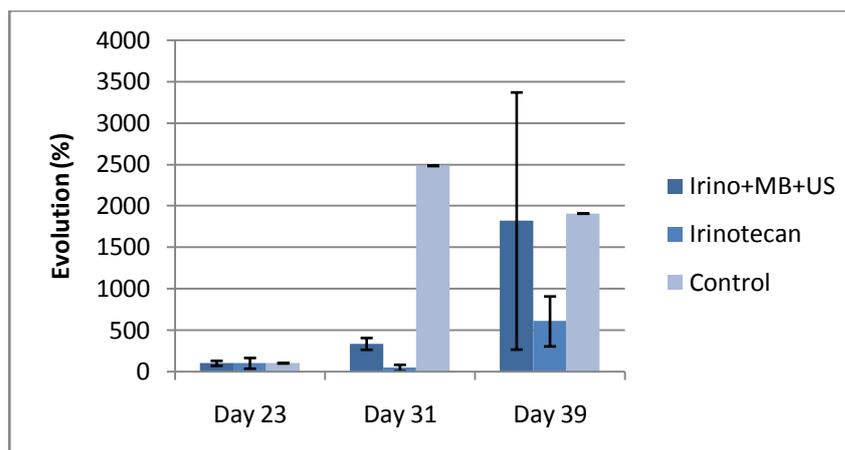


Fig. VI.17: Evolution du AUC x ROI.

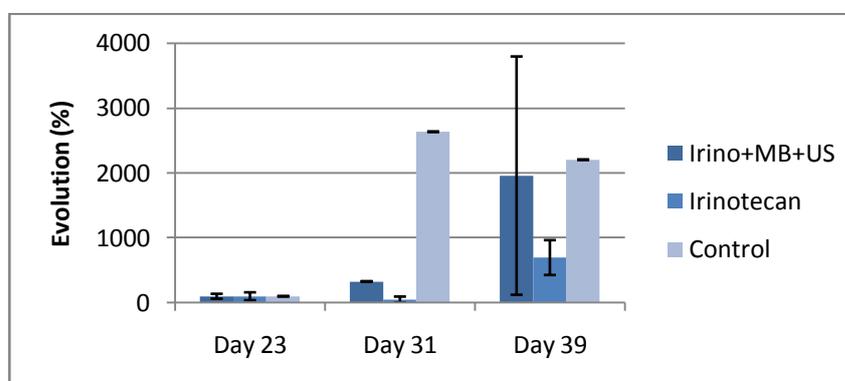


Fig. VI.18: Evolution du WiR x ROI.

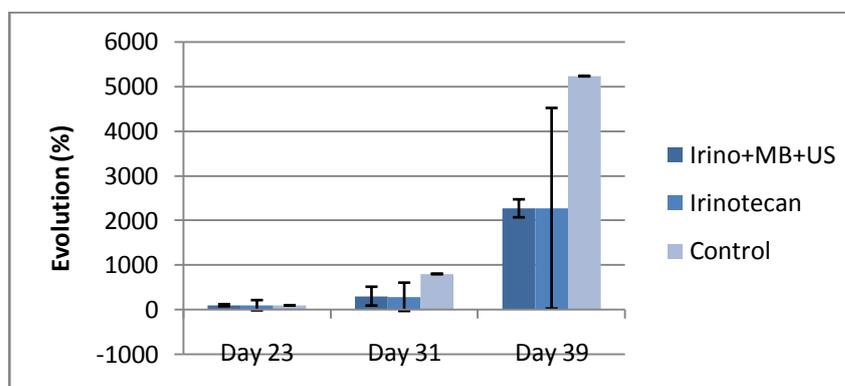


Fig. VI.19: Evolution du TTP x ROI.

VI.2.2.2. Deuxième traitement (Tumeur T2)

VI.2.2.2.1. Analyse de l'évolution des paramètres fondamentaux

Les figures VI.20, VI.21 et VI.22 montrent une diminution importante des valeurs (Peak, AUC et WiR) pour le groupe sonopore en comparaison avec le groupe traité par l'Irinotécan seul après trois (03) cycles de traitement.

Nous constatons que cette différence entre les deux groupes va augmenter si nous avons continué à traiter les tumeurs plus de 3 cycles (28^{ème}, 32^{ème} et 36^{ème} jour).

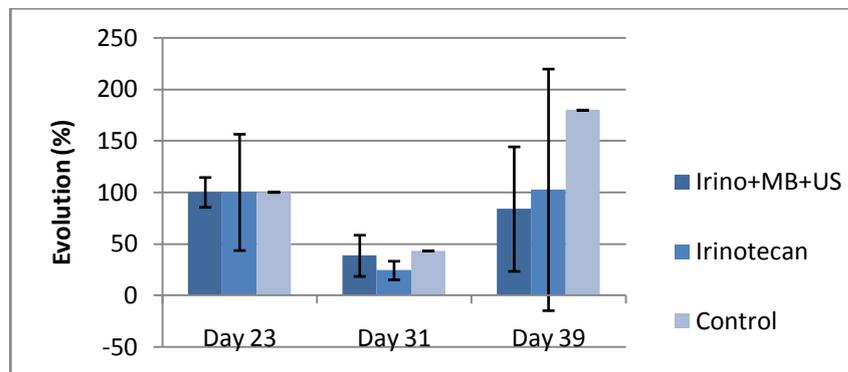


Fig. VI.20: Evolution du Peak.

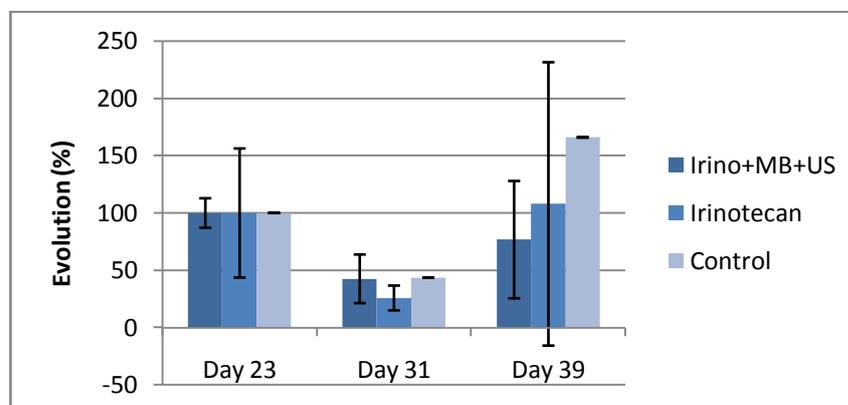


Fig. VI.21: Evolution du AUC.

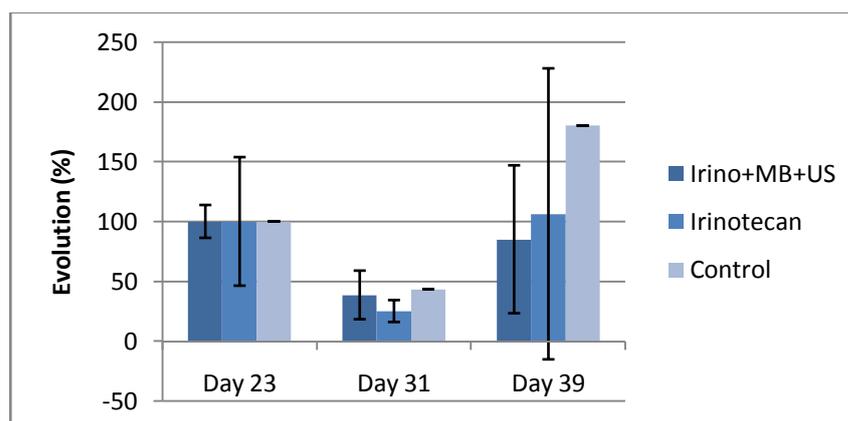


Fig. VI.22: Evolution du WiR.

VI.2.2.2.2. Analyse de l'évolution des paramètres normalisés

Les figures VI.23, VI.24 et VI.25 montrent une diminution presque identique dans les trois (03) groupes en tenant compte de l'évolution du ROI (Volume).

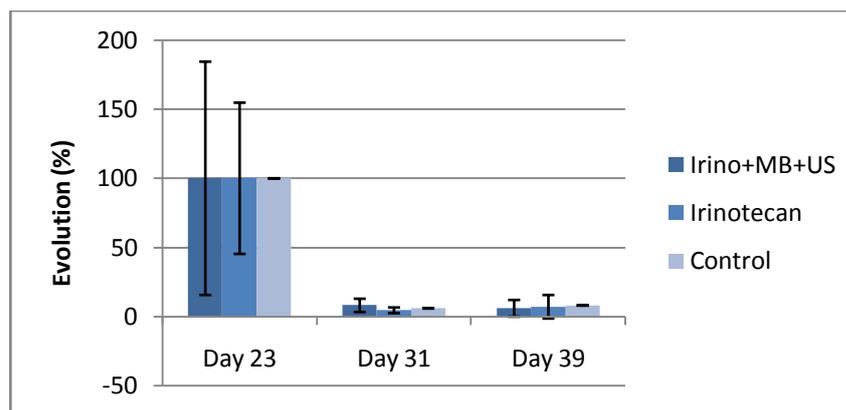


Fig. VI.23: Evolution du Peak/ROI.

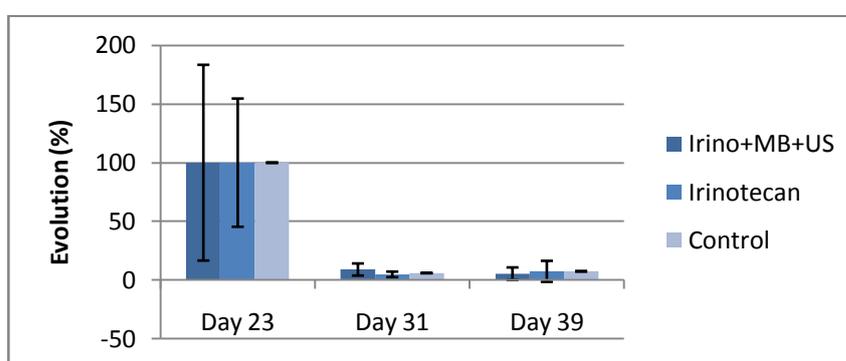


Fig. VI.24: Evolution du AUC/ROI.

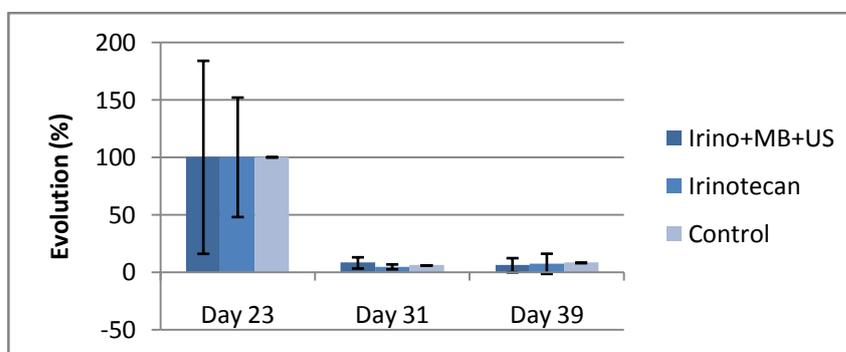


Fig. VI.25: Evolution du WiR/ROI.

VI.2.2.2.3. Analyse de l'évolution des paramètres pondérés

Les figures VI.26, VI.27, VI.28 et VI.29 montrent une légère augmentation des valeurs des 4 paramètres (peak x ROI, AUC x ROI, TTP x ROI et WiR x ROI) pour le groupe sonopore comparativement au groupe traité par l'Irinotecan seul et le groupe de control.

Ici les résultats sont opposés aux résultats obtenus sur la première tumeur (T1), comme le montre les figures VI.16, VI.17, VI.18 et VI.19.

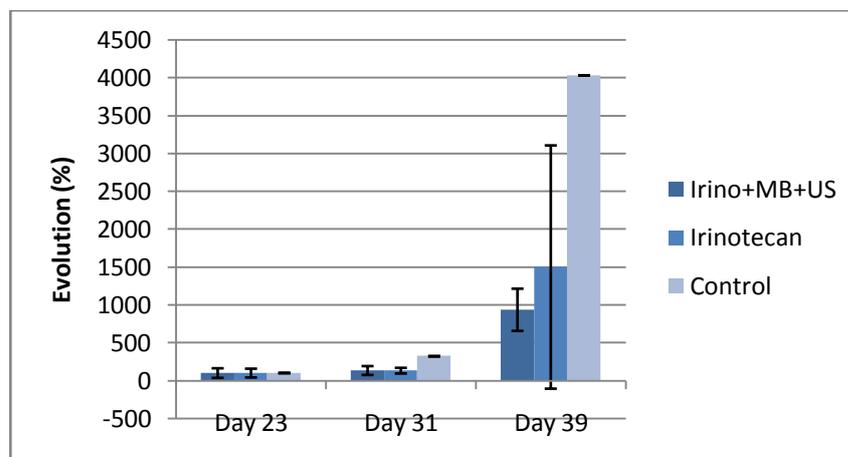


Fig. VI.26: Evolution du Peak x ROI.

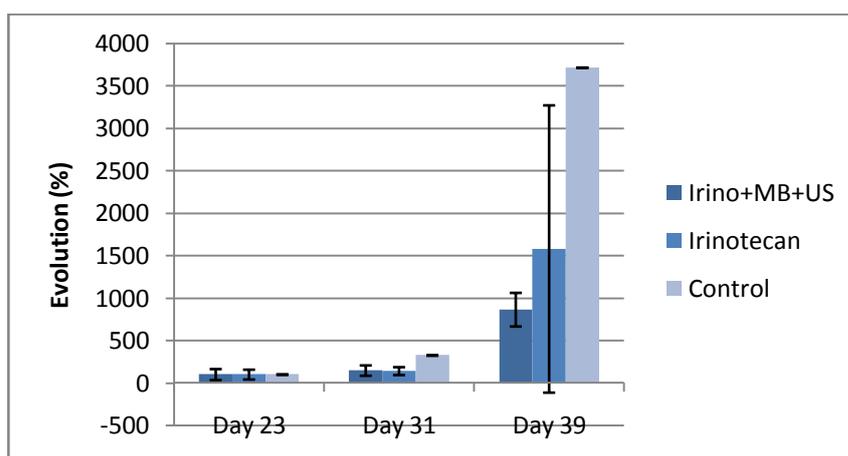


Fig. VI.27: Evolution du AUC x ROI.

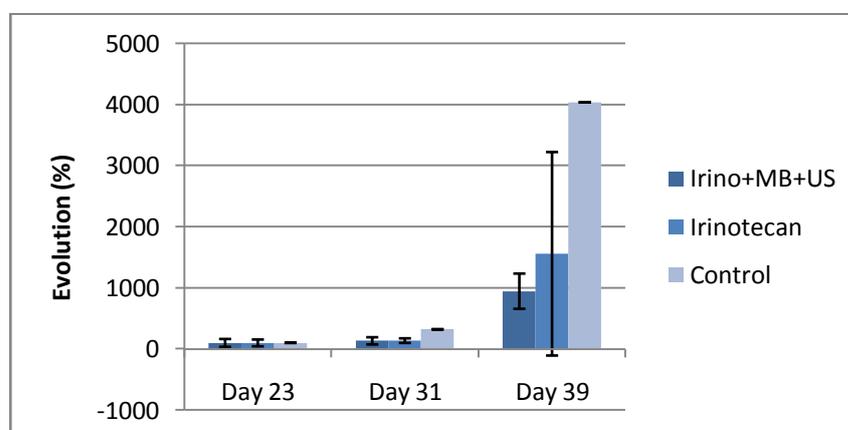


Fig. VI.28: Evolution du WiR x ROI.

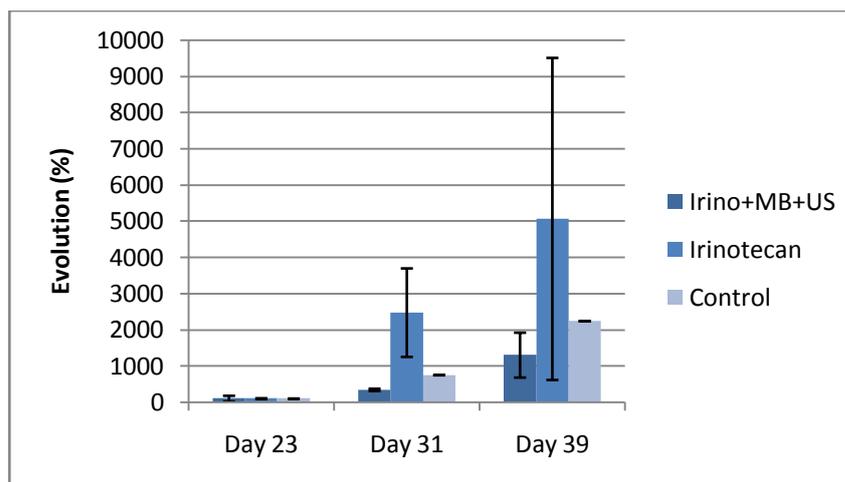


Fig. VI.29: Evolution du TTP x ROI.

VI.2.2.3. Deux tumeurs (T1 et T2) ensemble

VI.2.2.3.1. Analyse de l'évolution des paramètres fondamentaux

Les résultats obtenus en analysant l'évolution des moyennes des paramètres (Peak, AUC, et WiR) pour les deux tumeurs (T1 et T2).

D'après les résultats obtenus présentés sur les figures VI.30, VI.31 et VI.32 nous constatons une amélioration non significative entre le groupe sonopéré et le groupe traité par l'Irinotécan seul.

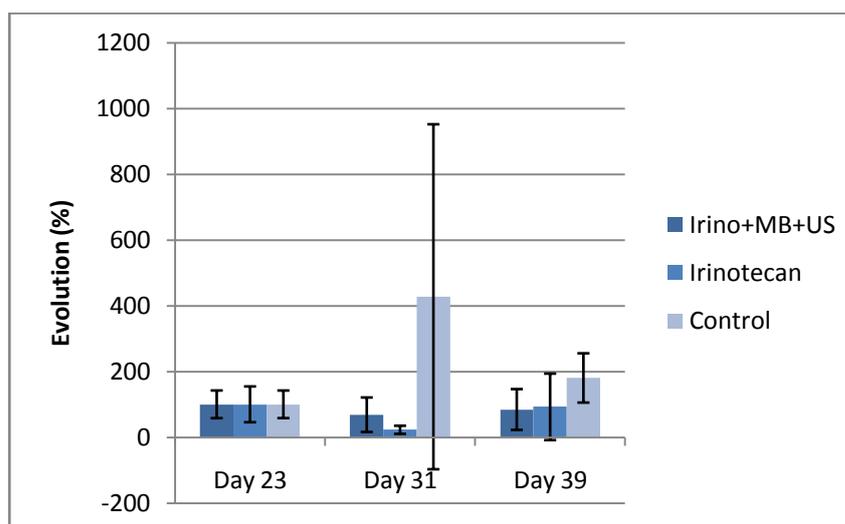


Fig. VI.30: Evolution de la moyenne des Peak.

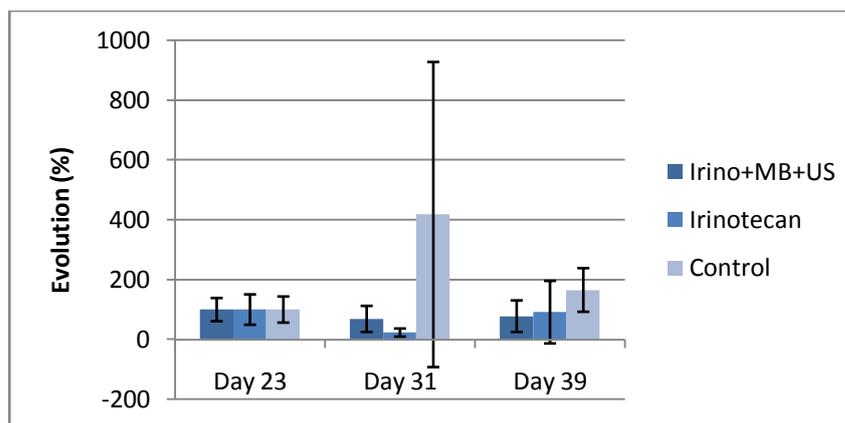


Fig. VI.31: Evolution de la moyenne des AUC.

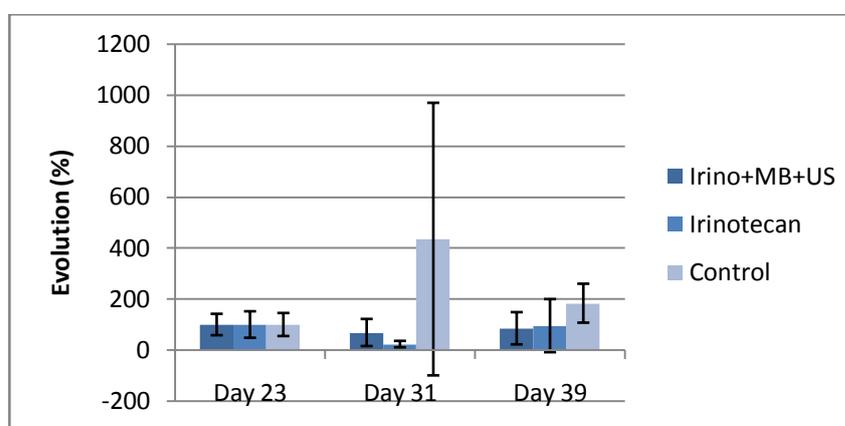


Fig. VI.32: Evolution de la moyenne des WiR.

La figure VI.33 montre une légère augmentation de la moyenne des TTP (T1 et T2) pour le groupe sonopéré par rapport aux deux autres groupes.

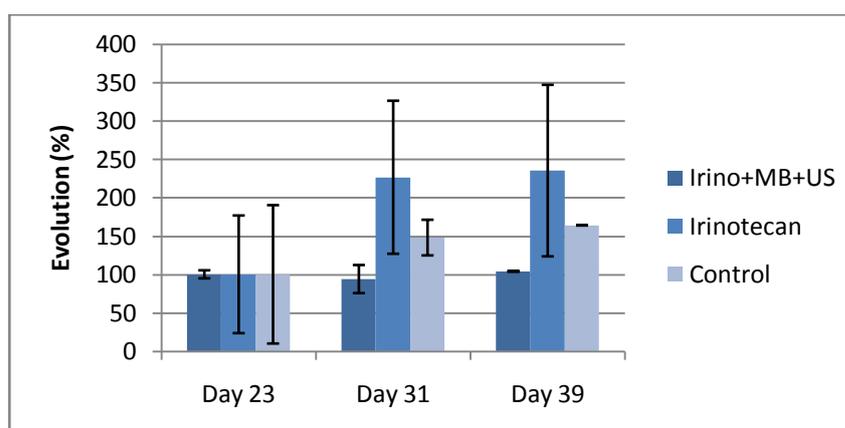


Fig. VI.33: Evolution de la moyenne des TTP.

VI.2.2.3.2. Analyse de l'évolution des paramètres normalisés

Les résultats obtenus avec ces paramètres ne montrent pas une amélioration significative au niveau de l'évolution des moyennes des paramètres normalisés par la surface du ROI comme le montre les figures VI.34, VI.35 et VI.36.

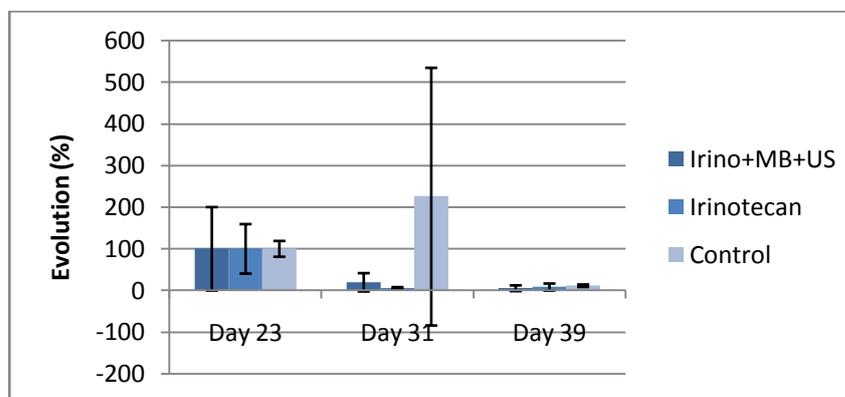


Fig. VI.34: Evolution de la moyenne des Peak/ROI.

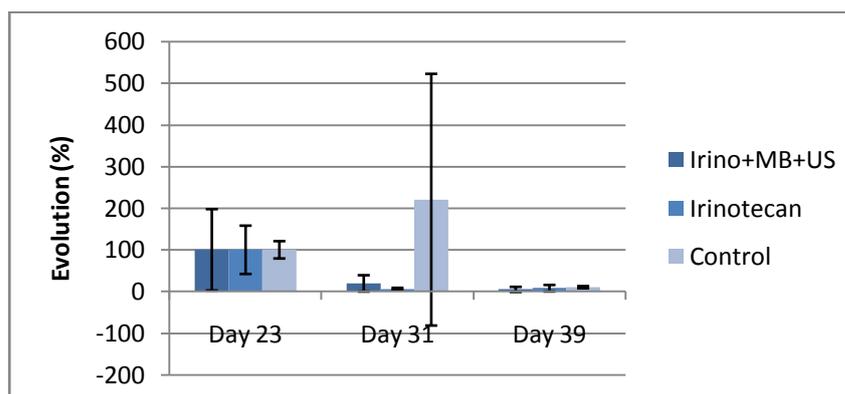


Fig. VI.35: Evolution de la moyenne des AUC/ROI.

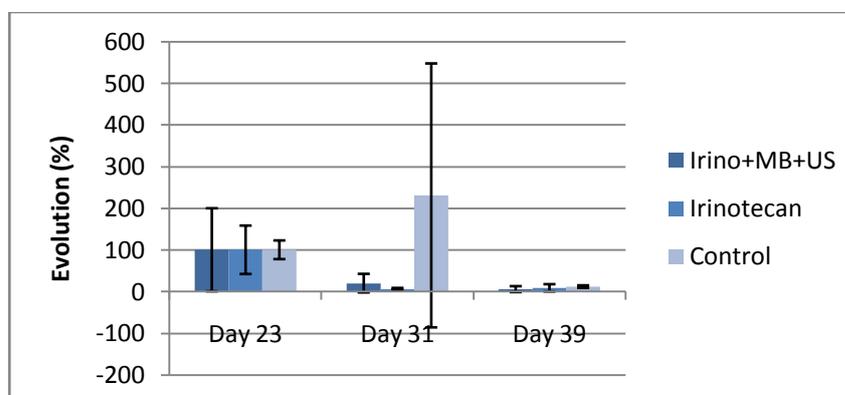


Fig. VI.36: Evolution de la moyenne des WiR/ROI.

La figure VI.37 illustre une diminution importante des moyennes des TTP/ROI en tenant compte de l'évolution de la surface de la région ROI (volume).

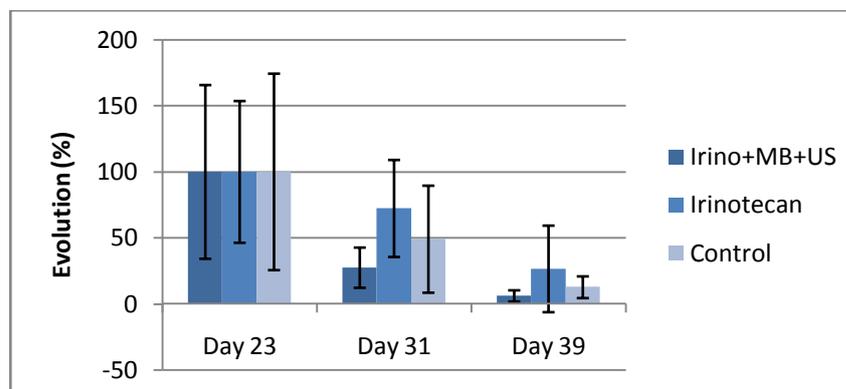


Fig. VI.37: Evolution de la moyenne des TTP/ROI.

VI.2.2.3.3. Analyse de l'évolution des paramètres pondérés

Les figures VI.38, VI.39 et VI.40 illustrent une différence non significative dans l'évolution des moyennes des paramètres pondérés entre les trois groupes.

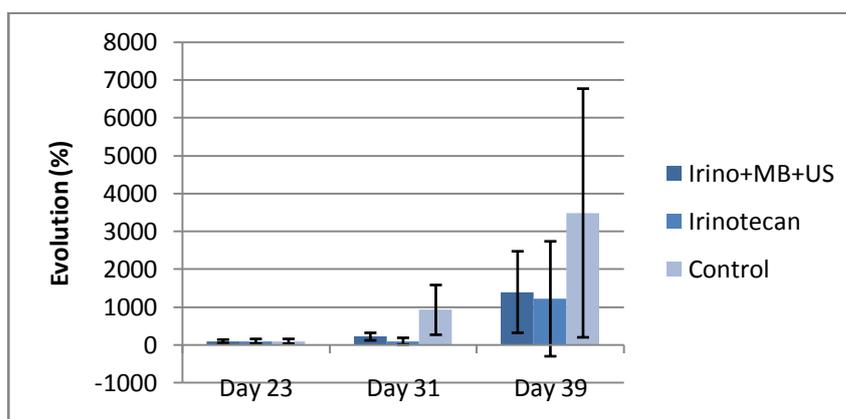


Fig. VI.38: Evolution de la moyenne des Peak x ROI.

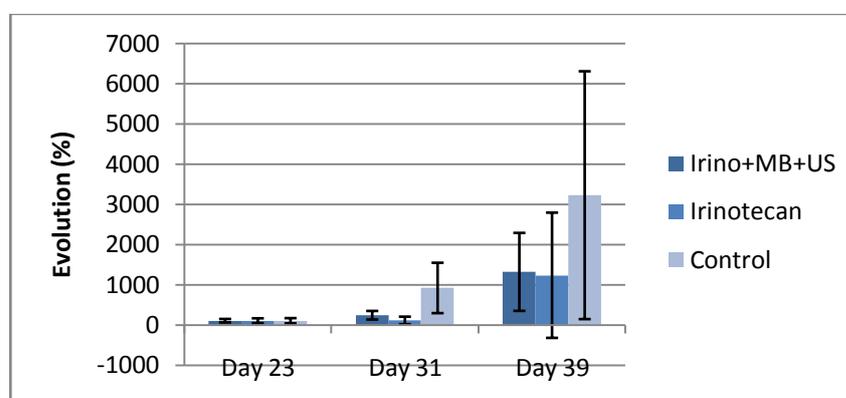


Fig. VI.39: Evolution de la moyenne des AUC x ROI.

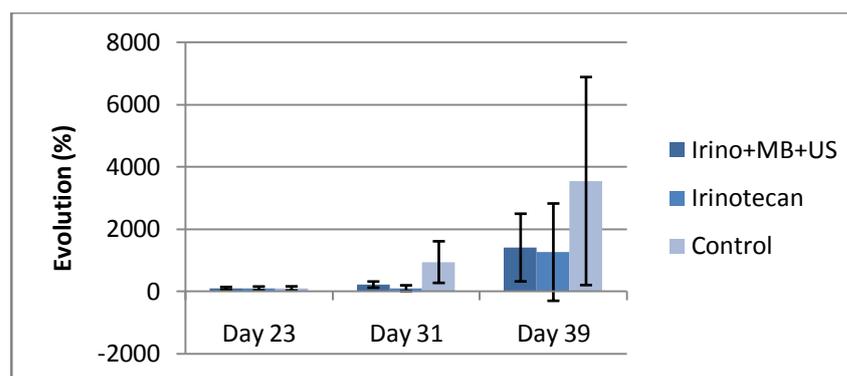


Fig. VI.40: Evolution de la moyenne des WiR x ROI.

La figure VI.41 montre une légère augmentation de la moyenne des TTP x ROI pour les deux tumeurs (T1 et T2) dans le groupe sonopéré par rapport aux deux autres groupes.

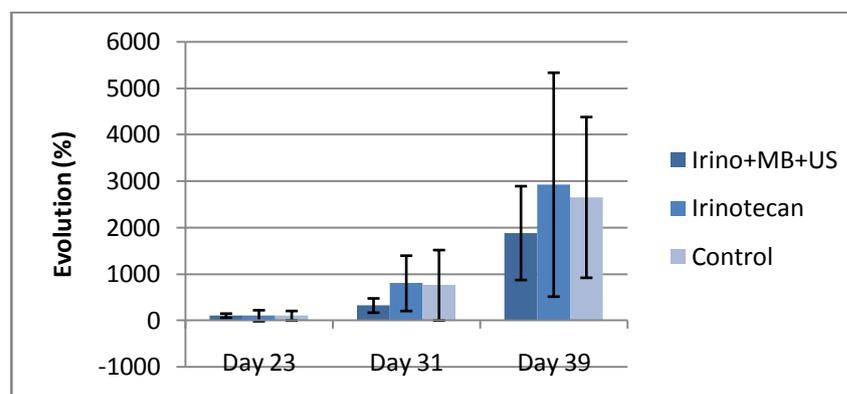


Fig. VI.41: Evolution de la moyenne des TTP x ROI.

Les paramètres normalisés (divisés par la surface de la région d'intérêt ROI) sont inclus dans cette étude pour réduire l'influence de la définition de la région ROI.

Les paramètres pondérés (multipliés par la surface du ROI) sont inclus dans cette étude pour combiner l'évolution des paramètres fondamentaux fonctionnels avec l'évolution de la surface de la région ROI qui représente le volume.

Pour la première tumeur (T1) on n'a pas eu de grande différence dans les évolutions des paramètres entre les trois groupes sauf pour l'évolution du TTP avec une légère augmentation de ce dernier dans le groupe sonopéré par rapport au groupe traité par l'Irinotécan seul (voir fig. VI.11).

Pour la deuxième tumeur (T2) une différence significative dans l'évolution des paramètres fondamentaux (Peak, AUC, et WiR) et pondérés (Peak x ROI, AUC x

ROI, WiR x ROI et TTP x ROI) dans le groupe sonoporé par rapport au groupe traité par l'Irinotécan seul (voir fig. VI.20, VI.21 et VI.22) et (voir fig. VI.26, VI.27, VI.28 et VI.29) respectivement.

En analysant l'évolution des moyennes des paramètres entre les deux tumeurs (T1) et (T2), les résultats sont presque similaires à ceux obtenus sur la première tumeur(T1) seule, sauf pour l'évolution du TTP et TTP x ROI avec une légère augmentation de ces derniers dans le groupe sonoporé comparativement au groupe traité par l'Irinotécan seul et le groupe de control (voir fig. VI.33) et (voir fig. VI.41) respectivement.

D'après l'analyse des résultats obtenus, nous remarquons que l'Irinotécan s'accumule d'avantage dans la tumeur après un traitement par sonoporation comparativement au traitement sans sonoporation.

VI.3. Livraison de Cétuximab par ultrasons assistés par microbulles

Les anticorps thérapeutiques ont révolutionné la prise en charge de nombreuses maladies, notamment certains cancers d'origine hématopoïétique. Par contre, leurs résultats sont plus modestes pour les tumeurs solides. Une explication pourrait être la mauvaise distribution intra-tumorale de ces macromolécules après leur administration par voie systémique.

La sonoporation, comme décrite dans le troisième chapitre, est un processus couplant l'utilisation des ultrasons associés à des microbulles de gaz. C'est une méthode innovante qui entraîne l'augmentation de perméabilité des membranes biologiques facilitant ainsi le passage de molécules. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'intérêt de la sonoporation pour améliorer la délivrance ciblée du Cétuximab, un anticorps anti-EGFR indiqué dans le traitement du cancer colorectal métastatique, et démontrer son efficacité thérapeutique.

VI.3.1. Etude expérimentale

Pour cette étude, un modèle murin, de tumeur colorectale sur-exprimant l'EGF en implantant des cellules HT29 en sous-cutanée chez des souris nues, a été développé. La croissance tumorale et la perfusion tumorale ont été suivies par imagerie échographique (Vevo2100 VisualSonics Inc., Toronto, Canada). La cinétique de distribution tumorale du Cétuximab couplé à un fluorophore et administré par voie systémique, a été évaluée sur des tumeurs de $\pm 153 \text{ mm}^3$ par imagerie de fluorescence

dans le proche infrarouge (Xenogen - IVIS ® Lumina II) avec ou sans sonoporation. Trois conditions de sonoporation ont été testées : (i) 3 min d'insonification, une PRF de 100µs, 40% de duty cycle, et une pression de 560 kPa ; (ii) 5 min, 10 ms de PRF, 20% de duty cycle, et une pression de 565 kPa ; (iii) 15 min, 1s de PRF, 5% de duty cycle, et une pression de 300 kPa.

L'imagerie de contraste (Vevo2100TM) est utilisée après injection des microbulles MM1 (Bracco®, Genève, Suisse) pour suivre la perfusion tumorale qui peut être quantifiée grâce au logiciel VevoCQTM.

Les étapes suivies pour le traitement thérapeutique, par sonoporation pour l'augmentation de la fixation de l'anticorps (Cétuximab), des souris sont illustrées dans les photos indiquées dans la figure suivante (Fig. VI.42) où les souris sont déjà traitées chimiquement par Cétuximab.

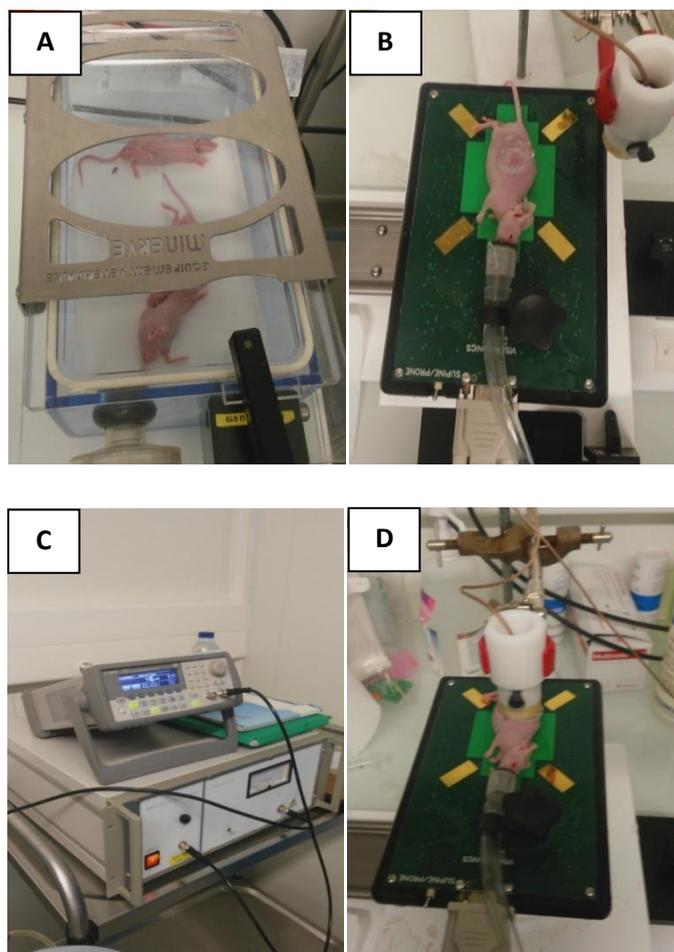


Fig. VI.42: Etapes suivies pour le traitement thérapeutique de la souris : (A) Mettre la souris sous anesthésie, (B) Mise en place de la souris, (C) Réglage du générateur des ondes ultrasonores et (D) sonoporation.

VI.3.2. Résultats et discussions

En analysant l'évolution de la perfusion tumorale, deux manipulations de traitement ont été effectuées.

VI.3.2.1. 1^{ère} manipulation

Dans cette manipulation, deux cycles de traitement en utilisant trois (03) groupes de souris, ont été effectués ; le premier groupe sans traitement (témoin), le deuxième groupe traité chimiquement avec le Cétuximab seulement et le troisième groupe traité et sonopéré (Cét+US).

Les résultats indiquent que le Cétuximab s'accumule davantage de façon durable dans la tumeur après sonoporation en analysant l'évolution des paramètres peak, AUC, WiR et TTP (voir fig. VI.43, VI.44, VI.45 et VI.46).

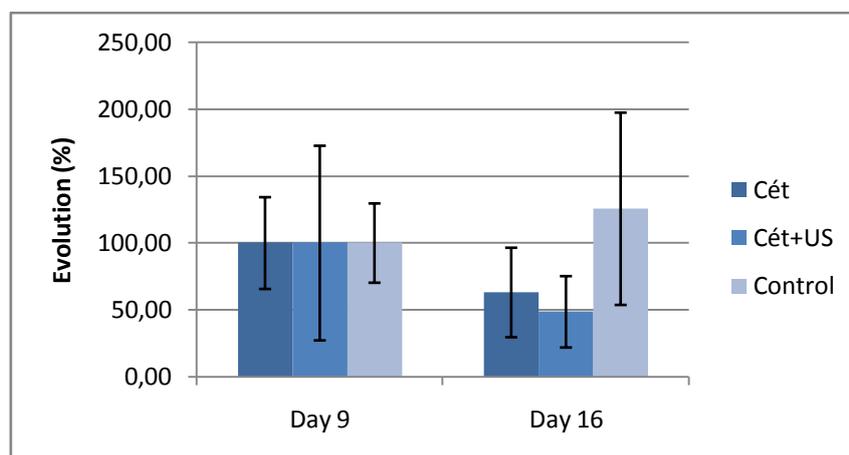


Fig. VI.43: Evolution du peak.

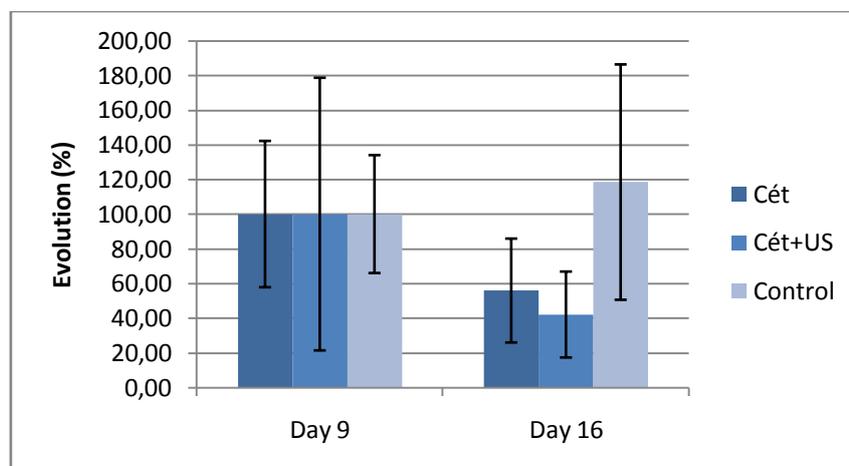


Fig. VI.44: Evolution de AUC.

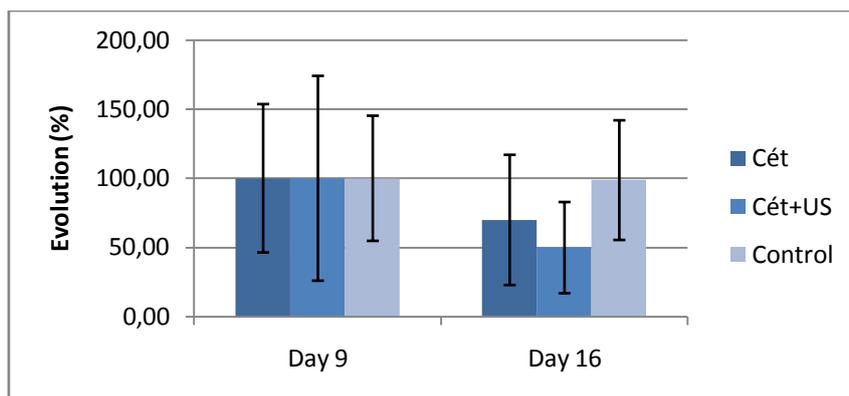


Fig. VI.45: Evolution de WiR.

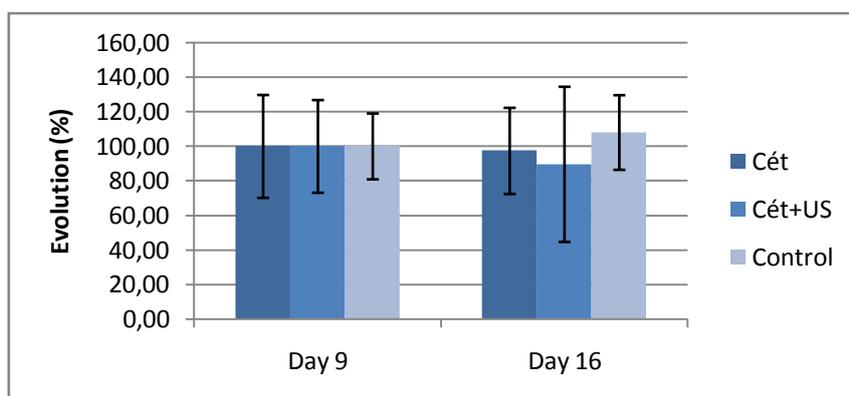


Fig. VI.46: Evolution du TTP.

VI.3.2.2. 2^{ème} manipulation

Dans cette manipulation, trois (03) cycles de traitement en utilisant deux (02) groupes de souris, ont été effectués ; le premier groupe traité chimiquement avec le Cétuximab seulement et le deuxième groupe traité et sonopéré (Cét+US).

Les résultats indiquent que le Cétuximab s'accumule davantage et durablement dans la tumeur après un traitement par sonoporation en comparaison au traitement sans sonoporation, (voir fig. VI.47, VI.48, VI.49 et VI.50).

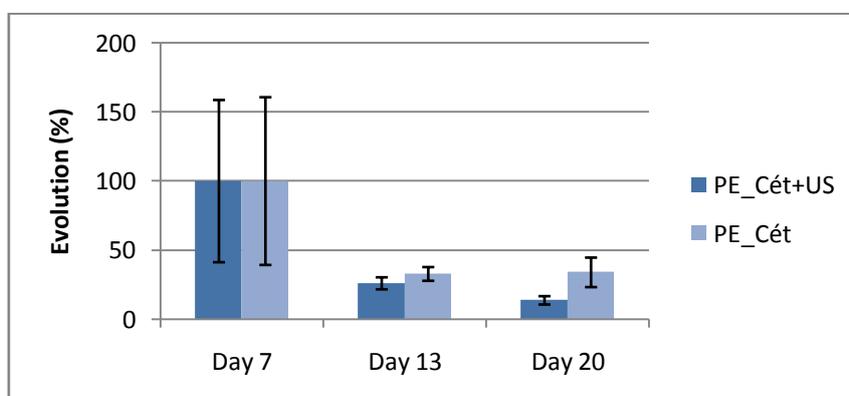


Fig. VI.47: Evolution du Peak.

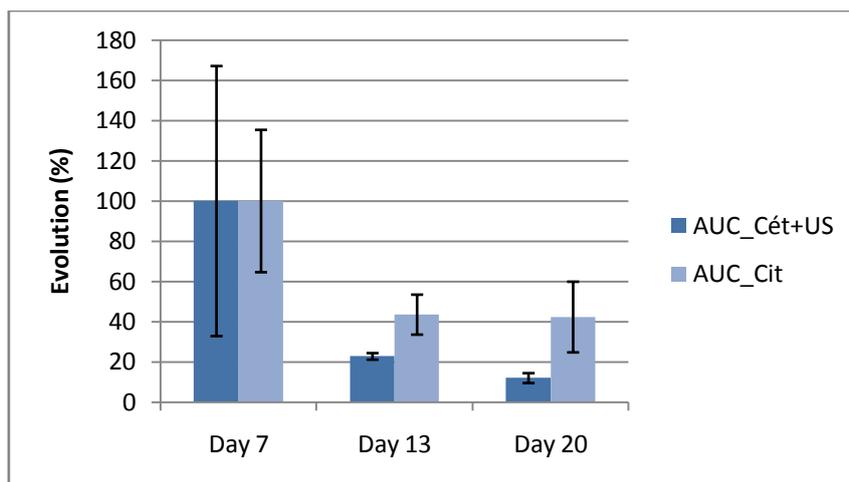


Fig. VI.48: Evolution du AUC.

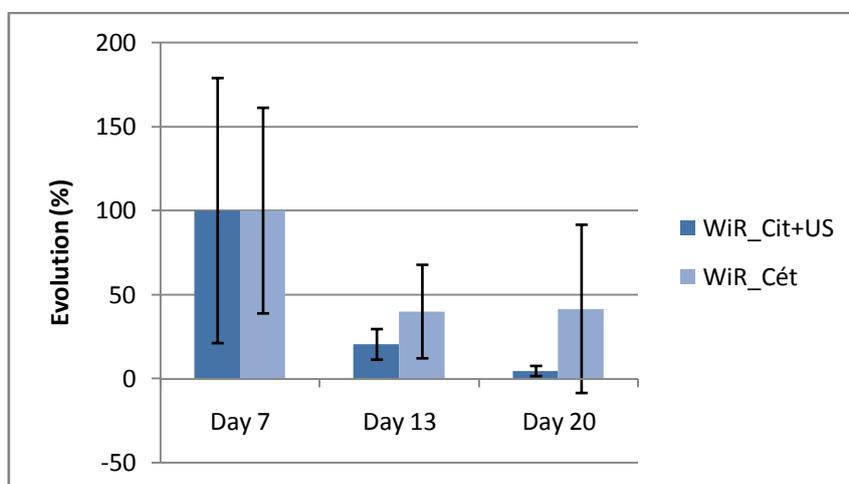


Fig. VI.49: Evolution du WiR.

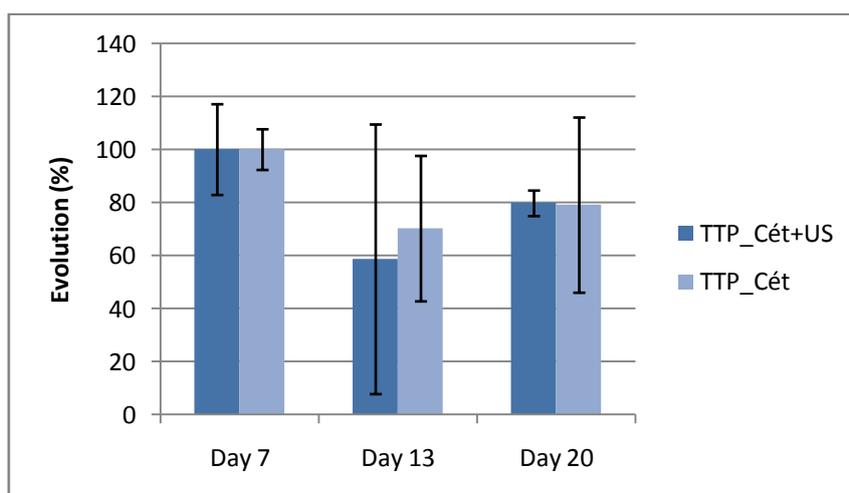


Fig. VI.50: Evolution du TTP.

VI.4. Conclusion

En résumé, notre travail montre que l'analyse de l'évolution de la courbe de la perfusion tumorale à l'intérieur d'une ROI dans l'image EC donne une bonne évaluation du suivi thérapeutique des tumeurs après un traitement par sonoporation. Ainsi que, la délivrance d'Irinotécan ou de Cétuximab à l'aide d'une échographie assistée par microbulles (sonoporation) améliore l'efficacité thérapeutique in vivo, comparativement au traitement en absence des ultrasons assistés par microbulles. Cependant, d'autres améliorations sont encore nécessaires pour potentialiser ce protocole thérapeutique. La co-administration des microbulles et des médicaments anticancéreux cliniquement approuvés, combinée à une échographie, pourrait inaugurer une nouvelle stratégie d'amélioration de l'efficacité et de la sécurité du traitement de la chimiothérapie conventionnelle avec la facilité exprimable en processus clinique.

Conclusion

Et

Perspectives

Conclusion

Commercialisées ces dernières années, la TEP et l'EC présentent des avantages largement admis de nos jours notamment en cancérologie, pour leur pouvoir efficace de détection, le bilan d'extension, le diagnostic ou le suivi thérapeutique, dont la démarche est largement décrite dans les deux premiers chapitres.

La segmentation des volumes tumoraux utilisant la TEP est l'un des aspects les plus critiques pour la planification des traitements par radiothérapie [1]. Pour cela, comme nous avons vu dans le quatrième chapitre, diverses techniques de segmentation des tumeurs sur les images TEP sont développées. Mais, jusqu'à l'heure actuelle, aucune de ces techniques n'est qualifiée pour être employée pour la segmentation des tumeurs en routine clinique. Parmi les méthodes de segmentation actuelles les plus satisfaisantes, la segmentation par les méthodes d'apprentissage [2] occupe un rang de premier plan, notamment par les méthodes de regroupements (clustering) [15]. Les méthodes de segmentation des images TEP par apprentissage sont basées sur le regroupement de l'image en plusieurs classes (clusters) suivant des critères de minimisation des fonctions d'objectif. En général le critère de distance s'impose.

Ces méthodes, malgré leur avantage de segmentation précise, souffrent d'un problème majeur qui est l'automatisation et la complexité de mise en œuvre. En effet, il est très difficile de trouver le nombre optimal de groupes (clusters) nécessaire pour la segmentation de l'image TEP.

Comme première contribution de cette thèse nous avons développé une nouvelle méthode de segmentation du volume tumoral biologique (VTB) dans les images TEP-FDG, dans le cas des tumeurs du cou, en réduisant le taux de complexité comparativement aux méthodes existantes ainsi que l'automatisation du choix du nombre optimal de clusters.

La validation et la comparaison des méthodes de segmentation développées utilisant des données chirurgicales cliniques est l'aspect le plus prometteur [16]. Pour cela, il est très recommandé d'évaluer la justesse de la technique de segmentation proposée sur des données cliniques réelles. Cette nouvelle étape est exaltante en termes de poursuite de la recherche amorcée.

La méthode proposée se base sur l'utilisation de l'algorithme k-means pour le regroupement de l'image, combiné avec un paramètre caractéristique de l'image pour modéliser le choix automatique du nombre optimal de clusters nécessaire pour la

segmentation du VTB. Nous avons utilisé une série de données cliniques, enregistrées au sein du centre hospitalier Saint-Luc de l'université catholique de Louvain La Neuve (Belgique), pour la définition de la relation entre le nombre optimal de clusters nécessaire pour la segmentation du VTB, et un paramètre caractéristique de l'image TEP-FDG du patient. Le cinquième chapitre en donne certains détails. Notre méthode suggérée a été comparée à diverses techniques de segmentation telle que la méthode de gradient proposée par Geets et al [17], la méthode de seuillage proposée par Daisne et al [122] et la méthode de regroupements (clustering) proposée par Belhassen et al [15]. Des résultats très satisfaisants ont été obtenus par notre technique de segmentation du VTB dans les images TEP-FDG dans le cas de cancer du cou.

Comme présentée au troisième chapitre, la chimiothérapie des tumeurs utilisant l'imagerie par échographie de contraste (EC), ou *Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS)*, pour le diagnostic et le suivi, a montré son impact potentiel pour l'exploration des tumeurs et l'évaluation de traitement des différents types de cancer [18]. Par ailleurs, l'injection des microbulles de gaz, assistée par des ondes ultrasonores, des drogues anticancéreuses et des anticorps. Nous appelons cela la sonoporation, ce qui en fait confirme son ajout en termes de l'augmentation de l'efficacité du traitement, en particulier les tumeurs sous cutanées [19].

Dans ce contexte, et comme une deuxième contribution de cette thèse, nous avons montré, dans le dernier chapitre, une technique d'évaluation de suivi thérapeutique des tumeurs sous cutanées en analysant l'évolution de la courbe de la perfusion tumorale dans les images paramétriques de l'EC, au cours du traitement chimiothérapeutique, à l'intérieur de la zone tumorale. Deux manipulations ont été effectuées pour cet objectif, dont la première était de montrer le potentiel de la technique de sonoporation en termes de l'augmentation de l'efficacité du traitement par une livraison ciblée de l'Irinotécan anticancéreux [19]. Cette analyse a été faite en suivant l'évolution des paramètres caractéristiques de cette courbe dans trois (03) groupes de souris ; un groupe de contrôle laissé sans traitement anticancéreux, un groupe traité chimiquement par l'Irinotécan seul et un troisième groupe traité avec l'Irinotécan assisté par microbulles et ultrasons. Ainsi, dans la deuxième manipulation, il a été montré l'impact de la méthode de sonoporation en termes de l'augmentation de la fixation de l'anticorps (Cétuximab). En effet, les deux manipulations précédentes ont également montré une augmentation de la perméabilité membranaire due aux oscillations des microbulles de gaz injectées et excitées par les ondes ultrasonores.

Perspectives

Il faut également noter que notre technique de segmentation du VTB peut être appliquée pour d'autres localisations tumorales. Nous aurons alors une fonction du choix du nombre optimal de clusters bien spécialisée et ajustable pour chaque localisation. Avec l'utilisation, par ailleurs, des localisations autres que les localisations au sein du cou, il est indispensable de trouver d'autres modèles d'ajustement (fitting) pour le choix automatique du nombre optimal de clusters nécessaire à la délimitation du VTB.

Ainsi, puisque la technique proposée nécessite un traitement préalable des données tels que le filtrage et la déconvolution, il est très intéressant d'investiguer de nouvelles techniques de filtrage et de déconvolution pour l'amélioration des images TEP-FDG. Cette amélioration apportée aux images TEP joue un rôle très important en regroupement (clustering) par une amélioration de la qualité de l'image et le rapport entre la région tumorale et les tissus sains qui l'entourent.

Une autre amélioration des images TEP peut ainsi être apportée dans la phase de post-reconstruction telle que les algorithmes de correction de l'effet du volume partiel (EVP) ainsi que la correction d'atténuation.

L'implémentation des techniques d'analyse des images TEP et l'extraction des caractéristiques, peut potentialiser l'identification du changement au niveau des voxels pour l'évaluation précoce du suivi thérapeutique des tumeurs.

Par ailleurs, la technique proposée peut avoir une application dans la segmentation automatique de la zone tumorale dans les images d'EC pour le suivi thérapeutique en analysant l'évolution de la courbe de la perfusion tumorale à l'intérieur de cette zone.

La délimitation de la région d'intérêt dépend amplement des mouvements respiratoires pendant l'examen utilisant l'EC, pour cela il est très intéressant de développer de nouvelles techniques de recalage des frames dans les images d'EC.

Ainsi, l'algorithme de la méthode proposée nécessite un prétraitement de l'image correspondante. Nous suggérons d'approfondir le développement de nouveaux algorithmes d'amélioration de la qualité des images d'EC dont la réduction du bruit de speckle. En outre, l'implémentation des techniques d'analyse et d'extraction des paramètres caractérisant l'image de l'EC peut révéler l'identification du changement lié aux tumeurs dans les images au cours du traitement, pour l'évaluation précoce de surveillance de potentielle situation symptomatique éventuelle.

Bibliographie

Bibliographie

- [1] Lee, J. A. (2010). Segmentation of positron emission tomography images: some recommendations for target delineation in radiation oncology. *Radiotherapy and oncology*, 96(3), 302-307.
- [2] Zaidi, H., Abdoli, M., Fuentes, C. L., & El Naqa, I. M. (2012). Comparative methods for PET image segmentation in pharyngolaryngeal squamous cell carcinoma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 39(5), 881-891.
- [3] Grégoire, V., Haustermans, K., Geets, X., Roels, S., & Lonneux, M. (2007). PET-based treatment planning in radiotherapy: a new standard?. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(1 suppl), 68S-77S.
- [4] Kiffer, J. D., Berlangieri, S. U., Scott, A. M., Quong, G., Feigen, M., Schumer, W., ... & Daniel, F. J. (1998). The contribution of 18 F-fluoro-2-deoxy-glucose positron emission tomographic imaging to radiotherapy planning in lung cancer. *Lung cancer*, 19(3), 167-177.
- [5] Nestle, U., Hellwig, D., Schmidt, S., Licht, N., Walter, K., Ukena, D., ... & Kirsch, C. M. (2002). 2-Deoxy-2-[18 F] fluoro-D-glucose positron emission tomography in target volume definition for radiotherapy of patients with non-small-cell lung cancer. *Molecular Imaging & Biology*, 4(3), 257-263.
- [6] Riegel, A. C., Berson, A. M., Destian, S., Ng, T., Tena, L. B., Mitnick, R. J., & Wong, P. S. (2006). Variability of gross tumor volume delineation in head-and-neck cancer using CT and PET/CT fusion. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 65(3), 726-732.
- [7] Erdi, Y. E., Mawlawi, O., Larson, S. M., Imbriaco, M., Yeung, H., Finn, R., & Humm, J. L. (1997). Segmentation of lung lesion volume by adaptive positron emission tomography image thresholding. *Cancer*, 80(S12), 2505-2509.
- [8] Biehl, K. J., Kong, F. M., Dehdashti, F., Jin, J. Y., Mutic, S., El Naqa, I., ... & Bradley, J. D. (2006). 18F-FDG PET Definition of Gross Tumor Volume for Radiotherapy of Non-Small Cell Lung Cancer: Is a Single Standardized Uptake Value Threshold Approach Appropriate?. *Journal of Nuclear Medicine*, 47(11), 1808-1812.
- [9] Ford, E. C., Kinahan, P. E., Hanlon, L., Alessio, A., Rajendran, J., Schwartz, D. L., & Phillips, M. (2006). Tumor delineation using PET in head and neck cancers: threshold contouring and lesion volumes. *Medical physics*, 33(11), 4280-4288.
- [10] Black, Q. C., Grills, I. S., Kestin, L. L., Wong, C. Y. O., Wong, J. W., Martinez, A. A., & Yan, D. (2004). Defining a radiotherapy target with positron emission

tomography. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 60(4), 1272-1282.

[11] Nestle, U., Kremp, S., Schaefer-Schuler, A., Sebastian-Welsch, C., Hellwig, D., Rube, C., & Kirsch, C. M. (2005). Comparison of different methods for delineation of ^{18}F -FDG PET-positive tissue for target volume definition in radiotherapy of patients with non-small cell lung cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, 46(8), 1342-1348.

[12] Aristophanous, M., Penney, B. C., Martel, M. K., & Pelizzari, C. A. (2007). A Gaussian mixture model for definition of lung tumor volumes in positron emission tomography. *Medical physics*, 34(11), 4223-4235.

[13] Van Leemput, K., Maes, F., Vandermeulen, D., & Suetens, P. (1999). Automated model-based tissue classification of MR images of the brain. *IEEE transactions on medical imaging*, 18(10), 897-908.

[14] Ashburner, J., & Friston, K. J. (2005). Unified segmentation. *Neuroimage*, 26(3), 839-851.

[15] Belhassen, S., & Zaidi, H. (2010). A novel fuzzy C-means algorithm for unsupervised heterogeneous tumor quantification in PET. *Medical physics*, 37(3), 1309-1324.

[16] Daisne, J. F., Duprez, T., Weynand, B., Lonneux, M., Hamoir, M., Reychler, H., & Grégoire, V. (2004). Tumor volume in pharyngolaryngeal squamous cell carcinoma: comparison at CT, MR imaging, and FDG PET and validation with surgical Specimen 1. *Radiology*, 233(1), 93-100.

[17] Geets, X., Lee, J. A., Bol, A., Lonneux, M., & Grégoire, V. (2007). A gradient-based method for segmenting FDG-PET images: methodology and validation. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 34(9), 1427-1438.

[18] Tranquart, F., Correas, J. M., & Bouakaz, A. (2007). *Echographie de contraste: méthodologie et applications cliniques*. Springer Science & Business Media.

[19] Escoffre, J. M., Novell, A., Serriere, S., Lecomte, T., & Bouakaz, A. (2013). Irinotecan delivery by microbubble-assisted ultrasound: in vitro validation and a pilot preclinical study. *Molecular pharmaceutics*, 10(7), 2667-2675.

[20] Maisonobe, J. A. (2012). *Caractérisation des tumeurs et de leur évolution en TEP/TDM au ^{18}F -FDG pour le suivi thérapeutique* (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).

[21] Derenzo, S. E., Moses, W. W., Huesman, R. H., & Budinger, T. F. (1993). Critical instrumentation issues for < 2 mm resolution, high sensitivity brain PET. *Annals of nuclear medicine*, 7, S3-S3.

- [22] Casey, M. E., & Nutt, R. (1986). A multicrystal two dimensional BGO detector system for positron emission tomography. *Ieee transactions on nuclear science*, 33(1), 460-463.
- [23] Lecomte, R. (2009). Novel detector technology for clinical PET. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 36(1), 69-85.
- [24] Budinger, T. F. (1983). Time-of-flight positron emission tomography: status relative to conventional PET. *Journal of nuclear medicine*, 24(1), 73-78.
- [25] Soussan, M., Galas, J. L., Ouvrier, M. J., Pop, G., Neuman, A., & Weinmann, P. (2011). Impact clinique de la technique du temps-de-vol en TEP. *Médecine Nucléaire*, 35(7), 401-405.
- [26] Cherry, S. R., Dahlbom, M., & Hoffman, E. J. (1991). 3D PET using a conventional multislice tomograph without septa. *Journal of computer assisted tomography*, 15(4), 655-668.
- [27] Fahey, F. H. (2002). Data acquisition in PET imaging. *Journal of nuclear medicine technology*, 30(2), 39-49.
- [28] Cherry, S. R., & Dahlbom, M. (2006). PET: physics, instrumentation, and scanners. In *PET* (pp. 1-117). Springer New York.
- [29] Shepp, L. A., & Vardi, Y. (1982). Maximum likelihood reconstruction for emission tomography. *IEEE transactions on medical imaging*, 1(2), 113-122.
- [30] Hudson, H. M., & Larkin, R. S. (1994). Accelerated image reconstruction using ordered subsets of projection data. *IEEE transactions on medical imaging*, 13(4), 601-609.
- [31] Defrise, M., Townsend, D. W., Bailey, D., Geissbuhler, A. M. C., & Jones, T. (1991). A normalization technique for 3D PET data. *Physics in medicine and biology*, 36(7), 939-952.
- [32] Hoffman, E. J., Guerrero, T. M., Germano, G., Digby, W. M., & Dahlbom, M. (1989). PET system calibrations and corrections for quantitative and spatially accurate images. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 36(1), 1108-1112.
- [33] Beyer, T., Townsend, D. W., Brun, T., & Kinahan, P. E. (2000). A combined PET/CT scanner for clinical oncology. *The Journal of nuclear medicine*, 41(8), 1369-1379.
- [34] Burger, C., Goerres, G., Schoenes, S., Buck, A., Lonn, A., & Von Schulthess, G. (2002). PET attenuation coefficients from CT images: experimental evaluation of the transformation of CT into PET 511-keV attenuation coefficients. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 29(7), 922-927.

- [35] Kinahan, P. E., Townsend, D. W., Beyer, T., & Sashin, D. (1998). Attenuation correction for a combined 3D PET/CT scanner. *Medical physics*, 25(10), 2046-2053.
- [36] Ollinger, J. M. (1996). Model-based scatter correction for fully 3D PET. *Physics in medicine and biology*, 41(1), 153-176.
- [37] Levin, C. S., Dahlbom, M., & Hoffman, E. J. (1995). A Monte Carlo correction for the effect of Compton scattering in 3-D PET brain imaging. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 42(4), 1181-1185.
- [38] Williams, C. W., Crabtree, M. C., & Burgiss, S. G. (1979). Design and Performance Characteristics of a Positron Emission Computed Axial Tomograph--ECAT®-II. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 26(1), 619-627.
- [39] Buvat, I. (2007). Les limites du SUV. *Médecine Nucléaire*, 31(4), 165-172.
- [40] Kenney, J. M., Marinelli, L. D., & Woodard, H. Q. (1941). Tracer Studies with Radioactive Phosphorus in Malignant Neoplastic Disease 1. *Radiology*, 37(6), 683-690.
- [41] Kubota, K., Matsuzawa, T., Ito, M., Ito, K., Fujiwara, T., Abe, Y., ... & Watanuki, S. (1985). Lung tumor imaging by positron emission tomography using C-11 L-methionine. *Journal of nuclear medicine*, 26(1), 37-42.
- [42] Keyes Jr, J. W. (1995). SUV: standard uptake or silly useless value?. *Journal of Nuclear Medicine*, 36(10), 1836-1839.
- [43] Thie, J. A. (2004). Understanding the standardized uptake value, its methods, and implications for usage. *Journal of Nuclear Medicine*, 45(9), 1431-1434.
- [44] Beyer, T., Czernin, J., & Freudenberg, L. S. (2011). Variations in clinical PET/CT operations: results of an international survey of active PET/CT users. *Journal of Nuclear Medicine*, 52(2), 303-310.
- [45] Haycock, G. B., Schwartz, G. J., & Wisotsky, D. H. (1978). Geometric method for measuring body surface area: a height-weight formula validated in infants, children, and adults. *The Journal of pediatrics*, 93(1), 62-66.
- [46] Mosteller, R. D. (1987). Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med*, 317, 1098.
- [47] Du Bois, D., and Du Bois, E.F. (1916). A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch Int Med* 17, 863-871.
- [48] Zasadny, K. R., & Wahl, R. L. (1993). Standardized uptake values of normal tissues at PET with 2-[fluorine-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose: variations with body weight and a method for correction. *Radiology*, 189(3), 847-850.

- [49] Christopher, T. (1999). Computing the mechanical index. *Journal of ultrasound in medicine*, 18(1), 63-68.
- [50] Bouakaz, A., Frinking, P. J., de Jong, N., & Bom, N. (1999). Noninvasive measurement of the hydrostatic pressure in a fluid-filled cavity based on the disappearance time of micrometer-sized free gas bubbles. *Ultrasound in medicine & biology*, 25(9), 1407-1415.
- [51] Burns, P. N., Hilpert, P., & Goldberg, B. B. (1990, November). Intravenous contrast agent for ultrasound Doppler: In vivo measurement of small tumor vessel dose-response. In *Engineering in Medicine and Biology Society, 1990., Proceedings of the Twelfth Annual International Conference of the IEEE* (pp. 322-324). IEEE.
- [52] Bouakaz, A., Lancée, C. T., Frinking, P. J. A., & De Jong, N. (1999). Simulations and measurements of nonlinear pressure field generated by linear array transducers. In *Ultrasonics Symposium, 1999. Proceedings. 1999 IEEE* (Vol. 2, pp. 1511-1514). IEEE.
- [53] Bouakaz, A., Lancée, C. T., & de Jong, N. (2003). Harmonic ultrasonic field of medical phased arrays: Simulations and measurements. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 50(6), 730-735.
- [54] Carstensen, E. L., Dalecki, D., Gracewski, S. M., & Christopher, T. (1999). Nonlinear propagation and the output indices. *Journal of ultrasound in medicine*, 18(1), 69-80.
- [55] Christopher T (1997) Finite amplitude distortions-based inhomogeneous pulse echo ultrasonic imaging, *IEEE Trans Ultrason Ferr Freq Con*, 44(1), 125-139
- [56] Fatemi, M., & Greenleaf, J. F. (1996). Real-time assessment of the parameter of nonlinearity in tissue using “nonlinear shadowing”. *Ultrasound in medicine & biology*, 22(9), 1215-1228.
- [57] Averkiou, M. A., & Hamilton, M. F. (1997). Nonlinear distortion of short pulses radiated by plane and focused circular pistons. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 102(5), 2539-2548.
- [58] Bakhvalov, N. S., Zhileikin, I. M., & Zabolotskaia, E. A. (1987). *Nonlinear theory of sound beams*. Amer Inst of Physics.
- [59] Hamilton, M., Blackstock, D. (1992). *Nonlinear acoustics*. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press
- [60] Miles, K., Dawson, P. H., & Blomley, M. (Eds.). (1997). *Functional computed tomography* (pp. 117-132). Oxford, UK: Isis Medical Media.

- [61] Seidel, G., Meyer-Wiethe, K., Berdien, G., Hollstein, D., Toth, D., & Aach, T. (2004). Ultrasound perfusion imaging in acute middle cerebral artery infarction predicts outcome. *Stroke*, 35(5), 1107-1111.
- [62] Krogias, C., Postert, T., Meves, S., Wilkening, W., Przuntek, H., & Eyding, J. (2005). Semiquantitative analysis of ultrasonic cerebral perfusion imaging. *Ultrasound in medicine & biology*, 31(8), 1007-1012.
- [63] Wei, K., Jayaweera, A. R., Firoozan, S., Linka, A., Skyba, D. M., & Kaul, S. (1998). Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of microbubbles administered as a constant venous infusion. *Circulation*, 97(5), 473-483.
- [64] Vogel, R., Indermühle, A., Reinhardt, J., Meier, P., Siegrist, P. T., Namdar, M., ... & Seiler, C. (2005). The quantification of absolute myocardial perfusion in humans by contrast echocardiography. *Journal of the American College of Cardiology*, 45(5), 754-762.
- [65] Lucidarme, O., Franchi-Abella, S., Correas, J. M., Bridal, S. L., Kurtisovski, E., & Berger, G. (2003). Blood Flow Quantification with Contrast-enhanced US: "Entrance in the Section" Phenomenon—Phantom and Rabbit Study 1. *Radiology*, 228(2), 473-479.
- [66] Krix, M., Plathow, C., Kiessling, F., Herth, F., Karcher, A., Essig, M., ... & Delorme, S. (2004). Quantification of perfusion of liver tissue and metastases using a multivessel model for replenishment kinetics of ultrasound contrast agents. *Ultrasound in medicine & biology*, 30(10), 1355-1363.
- [67] Malpica, N., Santos, A., Zuluaga, M. Á., Ledesma, M. J., Pérez, E., García-Fernández, M. A., & Desco, M. (2004). Tracking of regions-of-interest in myocardial contrast echocardiography. *Ultrasound in medicine & biology*, 30(3), 303-309.
- [68] Kissi, A., Cormier, S., Pourcelot, L., Bleuzen, A., & Tranquart, F. (2005, April). Perfusion analysis of nonlinear liver ultrasound images based on nonlinear matrix diffusion. In *International Conference on Scale-Space Theories in Computer Vision* (pp. 528-535). Springer Berlin Heidelberg.
- [69] Kissi, A., Cormier, S., Pourcelot, L., Bleuzen, A., & Tranquart, E. (2004, September). Contrast enhanced ultrasound image segmentation based on fuzzy competitive clustering and anisotropic diffusion. In *Engineering in Medicine and Biology Society, 2004. IEMBS'04. 26th Annual International Conference of the IEEE* (Vol. 1, pp. 1613-1615). IEEE.
- [70] Delzescaux, T., Frouin, F., De Cesare, A., Philipp-Foliguet, S., Todd-Pokropek, A., Herment, A., & Janier, M. (2003). Using an adaptive semiautomated self-evaluated registration technique to analyze MRI data for myocardial perfusion assessment. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 18(6), 681-690.

- [71] Yankeelov, T. E., Niermann, K. J., Huamani, J., Kim, D. W., Quarles, C. C., Fleischer, A. C., ... & Gore, J. C. (2006). Correlation Between Estimates of Tumor Perfusion From Microbubble Contrast-Enhanced Sonography and Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Journal of ultrasound in medicine*, 25(4), 487-497.
- [72] Weber, M. A., Krakowski-Roosen, H., Delorme, S., Renk, H., Krix, M., Millies, J., ... & Hildebrandt, W. (2006). Relationship of Skeletal Muscle Perfusion Measured by Contrast-Enhanced Ultrasonography to Histologic Microvascular Density. *Journal of ultrasound in medicine*, 25(5), 583-591.
- [73] Lucidarme, O., Nguyen, T., Kono, Y., Corbeil, J., Choi, S. H., Varner, J., & Mattrey, R. F. (2004). Angiogenesis model for ultrasound contrast research: exploratory study1. *Academic radiology*, 11(1), 4-12.
- [74] Krix, M., Kiessling, F., Vosseler, S., Kiessling, I., Le-Huu, M., Fusenig, N. E., & Delorme, S. (2003). Comparison of intermittent-bolus contrast imaging with conventional power Doppler sonography: quantification of tumour perfusion in small animals. *Ultrasound in medicine & biology*, 29(8), 1093-1103.
- [75] Pollard, R. E., Sadlowski, A. R., Bloch, S. H., Murray, L., Wisner, E. R., Griffey, S., & Ferrara, K. W. (2002). Contrast-assisted destruction-replenishment ultrasound for the assessment of tumor microvasculature in a rat model. *Technology in cancer research & treatment*, 1(6), 459-470.
- [76] Kier, R., Taylor, K. J., Feyock, A. L., & Ramos, I. M. (1990). Renal masses: characterization with Doppler US. *Radiology*, 176(3), 703-707.
- [77] Filippone, A., Muzi, M., Basilico, R., Di Giandomenico, V., Trapani, A. R., & Bonomo, L. (1994). Color Doppler flow imaging of renal disease. Value of a new intravenous contrast agent: SH U 508 A (Levovist). *La Radiologia medica*, 87(5 Suppl 1), 50-58.
- [78] Kim, A. Y., Kim, S. H., Kim, Y. J., & Lee, I. H. (1999). Contrast-enhanced power Doppler sonography for the differentiation of cystic renal lesions: preliminary study. *Journal of ultrasound in medicine*, 18(9), 581-588.
- [79] van Wamel, A., Bouakaz, A., Bernard, B., ten Cate, F., & de Jong, N. (2004). Radionuclide tumour therapy with ultrasound contrast microbubbles. *Ultrasonics*, 42(1), 903-906.
- [80] Kodama, T., Tan, P. H., Offiah, I., Partridge, T., Cook, T., George, A. J., & Blomley, M. J. (2005). Delivery of oligodeoxynucleotides into human saphenous veins and the adjunct effect of ultrasound and microbubbles. *Ultrasound in medicine & biology*, 31(12), 1683-1691.

- [81] Kaddur, K., Tran, T. A., Tranquart, F., & Bouakaz, A. (2007). Transfert de drogues et de gènes par microbulles et ultrasons. In *Échographie de contraste* (pp. 311-320). Springer Paris.
- [82] Lawrie, A., Brisken, A. F., Francis, S. E., Tayler, D. I., Chamberlain, J., Crossman, D. C., ... & Newman, C. M. (1999). Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro. *Circulation*, *99*(20), 2617-2620.
- [83] Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., ... & Morishita, R. (2002). Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation*, *105*(10), 1233-1239.
- [84] Li, T., Tachibana, K., Kuroki, M., & Kuroki, M. (2003). Gene Transfer with Echo-enhanced Contrast Agents: Comparison between Albunex, Optison, and Levovist in Mice—Initial Results 1. *Radiology*, *229*(2), 423-428.
- [85] Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., & Guy, R. H. (2005). Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: implication for drug delivery. *Journal of controlled release*, *104*(1), 213-222.
- [86] Frenkel, P. A., Chen, S., Thai, T., Shohet, R. V., & Grayburn, P. A. (2002). DNA-loaded albumin microbubbles enhance ultrasound-mediated transfection in vitro. *Ultrasound in medicine & biology*, *28*(6), 817-822.
- [87] Greenleaf, W. J., Bolander, M. E., Sarkar, G., Goldring, M. B., & Greenleaf, J. F. (1998). Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound in medicine & biology*, *24*(4), 587-595.
- [88] Chen, S., Shohet, R. V., Bekeredjian, R., Frenkel, P., & Grayburn, P. A. (2003). Optimization of ultrasound parameters for cardiac gene delivery of adenoviral or plasmid deoxyribonucleic acid by ultrasound-targeted microbubble destruction. *Journal of the American College of Cardiology*, *42*(2), 301-308.
- [89] Hynynen, K., McDannold, N., Vykhodtseva, N., & Jolesz, F. A. (2003). Non-invasive opening of BBB by focused ultrasound. In *Brain Edema XII* (pp. 555-558). Springer Vienna.
- [90] Song, J., Chappell, J. C., Qi, M., VanGieson, E. J., Kaul, S., & Price, R. J. (2002). Influence of injection site, microvascular pressure and ultrasound variables on microbubble-mediated delivery of microspheres to muscle. *Journal of the American College of Cardiology*, *39*(4), 726-731.
- [91] Miller, D. L., & Quddus, J. (2002). Diagnostic ultrasound-induced membrane damage in phagocytic cells loaded with contrast agent and its relation to Doppler-mode images. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, *49*(8), 1094-1102.

- [92] Shohet, R. V., Chen, S., Zhou, Y. T., Wang, Z., Meidell, R. S., Unger, R. H., & Grayburn, P. A. (2000). Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation*, *101*(22), 2554-2556.
- [93] Bekeredjian, R., Chen, S., Frenkel, P. A., Grayburn, P. A., & Shohet, R. V. (2003). Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation*, *108*(8), 1022-1026.
- [94] Tsunoda, S., Mazda, O., Oda, Y., Iida, Y., Akabame, S., Kishida, T., ... & Matsubara, H. (2005). Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart. *Biochemical and biophysical research communications*, *336*(1), 118-127.
- [95] Wei, K., Skyba, D. M., Firschke, C., Jayaweera, A. R., Lindner, J. R., & Kaul, S. (1997). Interactions between microbubbles and ultrasound: in vitro and in vivo observations. *Journal of the American College of Cardiology*, *29*(5), 1081-1088.
- [96] Marmottant, P., & Hilgenfeldt, S. (2003). Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature*, *423*(6936), 153-156.
- [97] Tran, T. A., Roger, S., Le Guennec, J. Y., Tranquart, F., & Bouakaz, A. (2007). Effect of ultrasound-activated microbubbles on the cell electrophysiological properties. *Ultrasound in medicine & biology*, *33*(1), 158-163.
- [98] Deng, C. X., Sieling, F., Pan, H., & Cui, J. (2004). Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound in medicine & biology*, *30*(4), 519-526.
- [99] van Wamel, A., Bouakaz, A., Versluis, M., & de Jong, N. (2004). Micromanipulation of endothelial cells: ultrasound-microbubble-cell interaction. *Ultrasound in medicine & biology*, *30*(9), 1255-1258.
- [100] Postema, M., van Wamel, A., ten Cate, F. J., & de Jong, N. (2005). High-speed photography during ultrasound illustrates potential therapeutic applications of microbubbles. *Medical physics*, *32*(12), 3707-3711.
- [101] Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European journal of physiology*, *391*(2), 85-100.
- [102] Roger, S., Potier, M., Vandier, C., Le Guennec, J. Y., & Besson, P. (2004). Description and role in proliferation of iberiotoxin-sensitive currents in different human mammary epithelial normal and cancerous cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1667*(2), 190-199.
- [103] Hauff, P., Seemann, S., Reszka, R., Schultze-Mosgau, M., Reinhardt, M., Buzasi, T., ... & Schirner, M. (2005). Evaluation of Gas-filled Microparticles and

Sonoporation as Gene Delivery System: Feasibility Study in Rodent Tumor Models
1. *Radiology*, 236(2), 572-578.

[104] Humbert, S. (2005). *Mechanistic investigation of microbubble-mediated sonoporation for intracellular gene delivery* (Doctoral dissertation, Université de Genève).

[105] Unger, E. C., McCreery, T. P., Sweitzer, R. H., Caldwell, V. E., & Wu, Y. (1998). Acoustically active lipospheres containing paclitaxel: a new therapeutic ultrasound contrast agent. *Investigative radiology*, 33(12), 886-892.

[106] Unger, E. C., Hersh, E., Vannan, M., Matsunaga, T. O., & McCreery, T. (2001). Local drug and gene delivery through microbubbles. *Progress in cardiovascular diseases*, 44(1), 45-54.

[107] Moussallem, M. (2011). *Optimisation de la délimitation automatique des tumeurs pulmonaires à partir de l'imagerie TEP/TDM pour les planifications dosimétriques des traitements par radiothérapie* (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).

[108] Paulino, A. C., & Johnstone, P. A. (2004). FDG-PET in radiotherapy treatment planning: Pandora's box?. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 59, 4-5.

[109] Giraud, P., Grahek, D., Montravers, F., Carette, M. F., Deniaud-Alexandre, E., Julia, F., ... & Touboul, E. (2001). CT and 18 F-deoxyglucose (FDG) image fusion for optimization of conformal radiotherapy of lung cancers. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 49(5), 1249-1257.

[110] Ciernik, I. F., Dizendorf, E., Baumert, B. G., Reiner, B., Burger, C., Davis, J. B., ... & Von Schulthess, G. K. (2003). Radiation treatment planning with an integrated positron emission and computer tomography (PET/CT): a feasibility study. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 57(3), 853-863.

[111] Scarfone, C., Lavelly, W. C., Cmelak, A. J., Delbeke, D., Martin, W. H., Billheimer, D., & Hallahan, D. E. (2004). Prospective feasibility trial of radiotherapy target definition for head and neck cancer using 3-dimensional PET and CT imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 45(4), 543-552.

[112] Geets, X., Daisne, J. F., Gregoire, V., Hamoir, M., & Lonnew, M. (2004). Role of 11-C-methionine positron emission tomography for the delineation of the tumor volume in pharyngo-laryngeal squamous cell carcinoma: comparison with FDG-PET and CT. *Radiotherapy and oncology*, 71(3), 267-273.

[113] Brambilla, M., Matheoud, R., Secco, C., Loi, G., Krenkli, M., & Inglese, E. (2008). Threshold segmentation for PET target volume delineation in radiation

treatment planning: The role of target-to-background ratio and target size. *Medical physics*, 35(4), 1207-1213.

[114] Schaefer, A., Kremp, S., Hellwig, D., Rube, C., Kirsch, C. M., & Nestle, U. (2008). A contrast-oriented algorithm for FDG-PET-based delineation of tumour volumes for the radiotherapy of lung cancer: derivation from phantom measurements and validation in patient data. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 35(11), 1989-1999.

[115] Jentzen, W., Freudenberg, L., Eising, E. G., Heinze, M., Brandau, W., & Bockisch, A. (2007). Segmentation of PET volumes by iterative image thresholding. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(1), 108-114.

[116] Nehmeh, S. A., El-Zeftawy, H., Greco, C., Schwartz, J., Erdi, Y. E., Kirov, A., ... & Humm, J. L. (2009). An iterative technique to segment PET lesions using a Monte Carlo based mathematical model. *Medical physics*, 36(10), 4803-4809.

[117] Turkington, T. G., DeGrado, T. R., & Sampson, W. H. (2001). Small spheres for lesion detection phantoms. In *Nuclear Science Symposium Conference Record, 2001 IEEE* (Vol. 4, pp. 2234-2237). IEEE.

[118] Segars, W. P., & Tsui, B. M. (2009). MCAT to XCAT: The evolution of 4-D computerized phantoms for imaging research. *Proceedings of the IEEE*, 97(12), 1954-1968.

[119] Mah, K., Caldwell, C. B., Ung, Y. C., Danjoux, C. E., Balogh, J. M., Ganguli, S. N., ... & Tirona, R. (2002). The impact of 18 FDG-PET on target and critical organs in CT-based treatment planning of patients with poorly defined non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 52(2), 339-350.

[120] Bradley, J., Thorstad, W. L., Mutic, S., Miller, T. R., Dehdashti, F., Siegel, B. A., ... & Bertrand, R. J. (2004). Impact of FDG-PET on radiation therapy volume delineation in non-small-cell lung cancer. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 59(1), 78-86.

[121] Aerts, H. J., Bosmans, G., van Baardwijk, A. A., Dekker, A. L., Oellers, M. C., Lambin, P., & De Ruyscher, D. (2008). Stability of 18 F-deoxyglucose uptake locations within tumor during radiotherapy for NSCLC: a prospective study. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 71(5), 1402-1407.

[122] Daisne, J. F., Sibomana, M., Bol, A., Doumont, T., Lonneux, M., & Gregoire, V. (2003). Tri-dimensional automatic segmentation of PET volumes based on measured source-to-background ratios: influence of reconstruction algorithms. *Radiotherapy and Oncology*, 69(3), 247-250.

- [123] Nestle, U., Kremp, S., & Grosu, A. L. (2006). Practical integration of [18 F]-FDG-PET and PET-CT in the planning of radiotherapy for non-small cell lung cancer (NSCLC): the technical basis, ICRU-target volumes, problems, perspectives. *Radiotherapy and oncology*, 81(2), 209-225.
- [124] Nestle, U., Walter, K., Schmidt, S., Licht, N., Nieder, C., Motaref, B., ... & Sybrecht, G. W. (1999). 18 F-deoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) for the planning of radiotherapy in lung cancer: high impact in patients with atelectasis. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 44(3), 593-597.
- [125] Steenbakkens, R. J., Duppen, J. C., Fitton, I., Deurloo, K. E., Zijp, L. J., Comans, E. F., ... & De Jaeger, K. (2006). Reduction of observer variation using matched CT-PET for lung cancer delineation: a three-dimensional analysis. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 64(2), 435-448.
- [126] Montgomery, D. W., Amira, A., & Zaidi, H. (2007). Fully automated segmentation of oncological PET volumes using a combined multiscale and statistical model. *Medical physics*, 34(2), 722-736.
- [127] Hatt, M., Lamare, F., Boussion, N., Turzo, A., Collet, C., Salzenstein, F., ... & Visvikis, D. (2007). Fuzzy hidden Markov chains segmentation for volume determination and quantitation in PET. *Physics in Medicine and Biology*, 52(12), 3467-3491.
- [128] Hatt, M., Le Rest, C. C., Turzo, A., Roux, C., & Visvikis, D. (2009). A fuzzy locally adaptive Bayesian segmentation approach for volume determination in PET. *IEEE transactions on medical imaging*, 28(6), 881-893.
- [129] Hatt, M., Rest, C., Dekker, A., De Ruysscher, D., Oellers, M., Lambin, P., ... & Visvikis, D. (2009). A new automatic methodology for functional volumes determination in emission imaging for oncology applications. *Irbm*, 30(4), 144-149.
- [130] Marr, D., & Hildreth, E. (1980). Theory of edge detection. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 207(1167), 187-217.
- [131] Huertas, A., & Medioni, G. (1986). Detection of intensity changes with subpixel accuracy using Laplacian-Gaussian masks. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, (5), 651-664.
- [132] Canny, J. (1986). A computational approach to edge detection. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, (6), 679-698.
- [133] Drever, L. A., Robinson, D., McEwan, A., & Roa, W. (2007). A comparison of three image segmentation techniques for PET target volume delineation. *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, 8(2). 93-109.

- [134] El Naqa, I., Bradley, J., Deasy, J., Biehl, K., Laforest, R., & Low, D. (2004). Improved analysis of PET images for radiation therapy. In *14th International Conference on the Use of Computers in Radiation Therapy. Seoul, Korea* (pp. 361-63).
- [135] Hsu, C. Y., Liu, C. Y., & Chen, C. M. (2008). Automatic segmentation of liver PET images. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 32(7), 601-610.
- [136] Li, H., Thorstad, W. L., Biehl, K. J., Laforest, R., Su, Y., Shoghi, K. I., ... & Lu, W. (2008). A novel PET tumor delineation method based on adaptive region-growing and dual-front active contours. *Medical physics*, 35(8), 3711-3721.
- [137] Sethian, J. A. (1999). *Level set methods and fast marching methods: evolving interfaces in computational geometry, fluid mechanics, computer vision, and materials science* (Vol. 3). Cambridge university press.
- [138] Xu, C., Pham, D. L., & Prince, J. L. (2000). Image segmentation using deformable models. *Handbook of medical imaging*, 2, 129-174.
- [139] Long, D. T., King, M. A., & Sheehan, J. (1992). Comparative evaluation of image segmentation methods for volume quantitation in SPECT. *Medical physics*, 19(2), 483-489.
- [140] Duda, R. O., Hart, P. E., & Stork, D. G. (2001). Pattern classification. 2nd. Edition. New York : Wiley.
- [141] Jain, A. K., Duin, R. P. W., & Mao, J. (2000). Statistical pattern recognition: A review. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 22(1), 4-37.
- [142] Champier, J., Cinotti, L., Bordet, J. C., Lavenne, F., & Mallet, J. J. (1996). Delineation and quantitation of brain lesions by fuzzy clustering in positron emission tomography. *Computerized medical imaging and graphics*, 20(1), 31-41.
- [143] Zhu, W., & Jiang, T. (2003, October). Automation segmentation of PET image for brain tumors. In *Nuclear Science Symposium Conference Record, 2003 IEEE* (Vol. 4, pp. 2627-2629). IEEE.
- [144] Bezdek, J. C., Hall, L. O., Clark, M. C., Goldgof, D. B., & Clarke, L. P. (1997). Medical image analysis with fuzzy models. *Statistical Methods in Medical Research*, 6(3), 191-214.
- [145] Jain, A. K., Murty, M. N., & Flynn, P. J. (1999). Data clustering: a review. *ACM computing surveys (CSUR)*, 31(3), 264-323.
- [146] De Luca, A., & Termini, S. (1972). A definition of a nonprobabilistic entropy in the setting of fuzzy sets theory. *Information and control*, 20(4), 301-312.

- [147] Hall, L. O., Bensaid, A. M., Clarke, L. P., Velthuizen, R. P., Silbiger, M. S., & Bezdek, J. C. (1992). A comparison of neural network and fuzzy clustering techniques in segmenting magnetic resonance images of the brain. *IEEE transactions on neural networks*, 3(5), 672-682.
- [148] Pham, D. L., & Prince, J. L. (1999). An adaptive fuzzy C-means algorithm for image segmentation in the presence of intensity inhomogeneities. *Pattern recognition letters*, 20(1), 57-68.
- [149] Janssen, M. H., Aerts, H. J., Öllers, M. C., Bosmans, G., Lee, J. A., Buijsen, J., ... & Dekker, A. L. (2009). Tumor delineation based on time-activity curve differences assessed with dynamic fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography in rectal cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 73(2), 456-465.
- [150] Dewalle-Vignion, A. S., Betrouni, N., Lopes, R., Huglo, D., Stute, S., & Vermandel, M. (2011). A new method for volume segmentation of PET images, based on possibility theory. *IEEE transactions on medical imaging*, 30(2), 409-423.
- [151] Zou, K. H., Warfield, S. K., Bharatha, A., Tempany, C. M., Kaus, M. R., Haker, S. J., ... & Kikinis, R. (2004). Statistical validation of image segmentation quality based on a spatial overlap index 1: Scientific reports. *Academic radiology*, 11(2), 178-189.
- [152] Daisne, J. F., Sibomana, M., Bol, A., Cosnard, G., Lonneux, M., & Grégoire, V. (2003). Evaluation of a multimodality image (CT, MRI and PET) coregistration procedure on phantom and head and neck cancer patients: accuracy, reproducibility and consistency. *Radiotherapy and Oncology*, 69(3), 237-245.
- [153] Tafstast, A., Hadjili, M. L., Hafdaoui, H., Bouakaz, A., & Benoudjit, N. (2015, December). Automatic Gaussian mixture model (GMM) for segmenting 18F-FDG-PET images based on Akaike information criteria. In *Electrical Engineering (ICEE), 2015 4th International Conference on* (pp. 1-4). IEEE.
- [154] Arthur, D., & Vassilvitskii, S. (2007, January). k-means++: The advantages of careful seeding. In *Proceedings of the eighteenth annual ACM-SIAM symposium on Discrete algorithms* (pp. 1027-1035). Society for Industrial and Applied Mathematics.
- [155] <https://www.mathworks.com/help/stats/fitgmdist.html>.
- [156] Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control*, 19(6), 716-723.
- [157] Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics*, 6(2), 461-464.
- [158] Caliński, T., & Harabasz, J. (1974). A dendrite method for cluster analysis. *Communications in Statistics-theory and Methods*, 3(1), 1-27.

- [159] Davies, D. L., & Bouldin, D. W. (1979). A cluster separation measure. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, (2), 224-227.
- [160] Tafsast, A., Hadjili, M. L., Bouakaz, A., & Benoudjit, N. (2017). Unsupervised cluster-based method for segmenting biological tumour volume of laryngeal tumours in 18F-FDG-PET images. *IET Image Processing*, 11(6), 389-396.
- [161] MacQueen, J. (1967, June). Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In *Proceedings of the fifth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability* (Vol. 1, No. 14, pp. 281-297).
- [162] Bezdek, J. C., Ehrlich, R., & Full, W. (1984). FCM: The fuzzy c-means clustering algorithm. *Computers & Geosciences*, 10(2-3), 191-203.
- [163] Rousseeuw, P. J. (1987). Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of computational and applied mathematics*, 20, 53-65.
- [164] El Naqa, I., Yang, D., Apte, A., Khullar, D., Mutic, S., Zheng, J., ... & Deasy, J. O. (2007). Concurrent multimodality image segmentation by active contours for radiotherapy treatment planning. *Medical physics*, 34(12), 4738-4749.
- [165] Kaneda, N., Nagata, H., Furuta, T., & Yokokura, T. (1990). Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. *Cancer research*, 50(6), 1715-1720.
- [166] Novell, A., Escoffre, J. M., & Bouakaz, A. (2013). Ultrasound contrast imaging in cancer—technical aspects and prospects. *Current Molecular Imaging*, 2(1), 77-88.
- [167] Needles, A., Arditi, M., Rognin, N. G., Mehi, J., Coulthard, T., Bilan-Tracey, C., ... & Foster, F. S. (2010). Nonlinear contrast imaging with an array-based micro-ultrasound system. *Ultrasound in medicine & biology*, 36(12), 2097-2106.

Publications

1. Articles dans les revues

- **Tafsast, A.**, Hadjili, M. L., Bouakaz, A., & Benoudjit, N. (2017). Unsupervised cluster-based method for segmenting biological tumour volume of laryngeal tumours in 18F-FDG-PET images. *IET Image Processing*, 11(6), 389-396.

2. Communications

- **Tafsast, A.**, Hadjili, M. L., Hafdaoui, H., Bouakaz, A., & Benoudjit, N. (2015, December). Automatic Gaussian mixture model (GMM) for segmenting 18F-FDG-PET images based on Akaike information criteria. In *Electrical Engineering (ICEE), 2015 4th International Conference on* (pp. 1-4). IEEE.
- Douak, F., **Tafsast, A.**, Fouan, D., Ferroudji, K., Bouakaz, A., & Benoudjit, N. (2016, September). A wavelet optimization approach for microemboli classification using RF signals. In *Ultrasonics Symposium (IUS), 2016 IEEE International* (pp. 1-4). IEEE.