Aix*Marseille université
Socialement engagée

NNT : 2024AIXM0043

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 4 mars 2024 par

Floriane CANNET

Apprentissage profond pour l'imagerie CT spectrale par Comptage de Photons et conception de traitements sur des modèles murins de cancers du foie

Discipline
Physique et Sciences de la matière

Spécialité
Instrumentation

École doctorale
N° 352 Physique et Sciences de la matière

Laboratoire/Partenaires de recherche
Centre de Physique des Particules de Marseille UMR7346 CNRS/IN2P3
Institut de Biologie du Développement de Marseille UMR7288 CNRS/INSB

Composition du jury

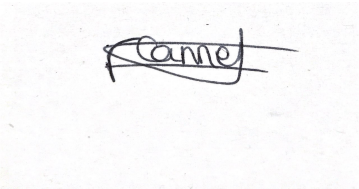
David BRASSE IPHC CNRS/IN2P3	Rapporteur
Salim SI-MOHAMED CREATIS Université Claude Bernard Lyon A - Hospices Civils de Lyon	Rapporteur
Anaïs VIRY IRA CHUV Lausanne	Examinatrice
Nicolas DUCROS CREATIS INSA de Lyon	Examinateur
Benjamin GUILLET CERIMED Aix Marseille Univ	Président du jury
Christian MOREL CPPM Aix Marseille Univ	Directeur de thèse
Flavio MAINA IBDM CNRS/INSB	Co-directeur de thèse
Yannick Boursier CPPM Aix Marseille Univ	Co-encadrant

Affidavit

Je soussigné, Floriane Cannet, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Christian Morel et Flavio Maina, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille le 18/12/2023



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

Liste des publications et/ou brevets réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. C. Sequera*, M. Grattarola*, F. Cannet, A. Dobric et al., « Histone deacetylase 1 and 2 blockage renders liver cancer addicted to Receptor Tyrosine Kinase signalling » *submitted to Journal of Hepatology*.
2. F. Cannet et al., « Distinct anticancer treatments enforce specific immune remodelling in tumours » *submitted to iScience*.

Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. F. Cannet, C. Sequera, S. Richelme, Y. Boursier, P. Michea, J.P. Borg, C. Morel, F. Maina, « Preneoplastic behaviours in hepatocellular carcinoma : cellular and molecular traits in quiescent versus evolving lesions », in Abstract Book, poster session. European Molecular Imaging Meeting 2023, 14-17 Mars, Salzburg, Autriche
2. F. Cannet, « Deep-learning data processing of spectral PC-CT longitudinal studies to design and optimize combined Immuno-anticancer Treatments in liver cancer mouse models », R&D Seminar - "Imaging 2022", Institute Marseille Imaging (IMI), 26-30 Sept. 2022, Marseille, France
3. F. Cannet, « CT Scan longitudinal study for hepatocellular carcinoma treatments efficiency and calibration of a new detector for spectral tomography », Assemblée générale GdR Mi2B, oral, 13-15 juin 2022, Orsay, France
4. F. Cannet, Y. Boursier, S. Richelme, C. Sequera, P. Michea, J.P. Borg, C. Morel, F. Maina, « Micro photon-counting computed tomography to document longitudinally treatment response in hepatocellular carcinoma mouse models », in Abstract Book, poster session. European Molecular Imaging Meeting 2022, 15-18 Mars, Thessalonik, Grèce
5. F. Cannet, « CT Scan longitudinal study for hepatocellular carcinoma treatments efficiency », Assemblée générale GdR Mi2B, oral, 27-28 Sept. 2021, Ecully, France
6. Ecole thématique « Deep learning for medical imaging school », Labex Primes, 19-24 avril 2021, édition virtuelle

Résumé

Dans le domaine de l'imagerie biomédicale, la tomodensitométrie, ou tomographie par rayons X, est une modalité d'imagerie anatomique très utilisée en clinique comme en préclinique. La tomographie spectrale quant à elle résulte de l'analyse de l'énergie des rayons X et permet de séparer des structures ayant des coefficients d'atténuations similaires. Cette dernière est rendue possible par l'utilisation notamment de détecteurs à comptage de rayons X pour lesquels un ou plusieurs seuils en énergie peuvent être définis pour chaque pixel. De plus, l'utilisation d'un détecteur à comptage de rayons X permet d'améliorer sensiblement le contraste de l'image reconstruite et de réduire la durée de pose, ce qui donne la possibilité, en préclinique, de procéder à un suivi longitudinal du petit animal. Dans ce contexte, mon travail de thèse se situe à l'interface entre la physique et la biologie et a pour but de mettre en place des outils d'imagerie à visées précliniques en tomodensitométrie par comptage de rayons X et en tomographie spectrale. D'une part, elle s'inscrit dans les travaux de l'équipe de recherche imXgam du Centre de Physique des Particules de Marseille (CPPM), qui a développé le prototype PIXSCAN-FLI, un micro tomodensitomètre à comptage de photons. D'autre part, elle abonde aux travaux de l'équipe de Flavio Maina de l'Institut de Biologie du Développement de Marseille (IBDM), qui étudie le carcinome hépatocellulaire (CHC) à l'aide d'un modèle murin.

Le prototype PIXSCAN-FLI est doté d'une caméra XPAD constituée de plus de 500 000 pixels hybrides permettant le comptage de rayons X dont l'énergie est supérieure à un seuil de détection. Le réglage des seuils à différentes énergies est alors exploité pour développer une imagerie au K-edge d'agents de contraste tels que l'iode ou le baryum.

Ma thèse détaille différents résultats sur le CHC obtenus grâce au suivi longitudinal par tomodensitométrie à comptage de rayons X pour le modèle murin *Alb-R26*^{Met} conçu par l'équipe Maina, qui permet le développement spontané de CHC aux propriétés similaires à celles du CHC d'un sous groupe de patients. Une meilleure compréhension des tumeurs au stade prénéoplasique a été menée afin d'identifier des marqueurs de présence de CHC qui permettraient d'améliorer son diagnostic précoce pour assurer une meilleure prise en charge des patients. Des différences notables en termes de populations de cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques (cellules présentatrices de l'antigène au système immunitaire) ont été observées entre des tumeurs évolutives et des tumeurs stables dans le temps. De plus, différents traitements impliquant des mécanismes différents (inhibiteurs de récepteurs ou de mécanismes épigénétiques) ont révélé de très larges modifications de l'environnement immunitaire avec le recrutement de cellules différentes d'un traitement à l'autre, mettant ainsi en exergue des mécanismes d'action différents. De plus, mon travail a

consisté à étudier la réponse consécutive à l'ajout de l'immunothérapie, qui est très différente en fonction du traitement auquel elle est associée. J'ai pu observer la très grande hétérogénéité des réponses, qui est une caractéristique importante du modèle murin récapitulant l'hétérogénéité des patients. Malgré cela, la combinaison de traitements entre un inhibiteur de tyrosine kinase et un inhibiteur de HDAC (histones désacétylases) semble être prometteuse pour un sous-groupe de souris.

Enfin, ma thèse présente également une preuve de concept permettant d'améliorer le post-traitement des données grâce à la segmentation automatique des tumeurs du foie par une méthode d'apprentissage profond ou DL (*Deep Learning*). Les résultats obtenus sur des jeux de données sont encourageants et permettront d'automatiser le protocole d'acquisition du suivi longitudinal.

Plus récemment, un détecteur constitué d'un circuit intégré XPAD3.2-C hybridé avec des pixels d'arséniure de gallium (AsGa), qui permet d'avoir une meilleure efficacité de détection qu'avec des pixels de silicium pour des énergies supérieures à 25 keV, a pu être testé. Mon travail présente la caractérisation de ce nouveau détecteur acquis grâce au financement accordé par l'Institut Marseille Imaging (PIA AMX-19-IET-002), et son utilisation pour séparer différents matériaux comme l'iode, le baryum (matériaux composants des agents de contrastes utilisés en clinique) et l'or dans les images.

Mots clés : micro tomodensitomètre à comptage de photons, détecteur à pixels hybrides, imagerie spectrale au K-edge, apprentissage profond, carcinome hépatocellulaire, traitements, système immunitaire.

Abstract

In the field of biomedical imaging, computed tomography, or X-ray tomography, is an anatomical imaging modality widely used in both clinical and pre-clinical applications. Spectral tomography, on the other hand, is based on the analysis of X-ray energy, and enables the separation of structures with similar attenuation coefficients. This is made possible by the use of X-ray counting detectors for which one or more energy thresholds can be defined for each pixel. What's more, the use of an X-ray counting detector significantly improves the contrast of the reconstructed image and reduces the exposure time, making it possible, in pre-clinical applications, to carry out longitudinal monitoring of small animals. In this context, my thesis work lies at the interface between physics and biology, and aims to set up imaging tools for preclinical purposes in X-ray counting and spectral tomography. On the one hand, it is in line with the work of the imXgam research team at the Centre de Physique des Particules de Marseille (CPPM), which has developed the PIXSCAN-FLI prototype, a photon-counting micro CT scanner. It also supports the work of Flavio Maina's team at the Institut de Biologie du Développement de Marseille (IBDM), which is studying hepatocellular carcinoma (HCC) using a mouse model.

The PIXSCAN-FLI prototype is equipped with an XPAD camera featuring over 500 000 pixel hybrids for counting X-rays with energies above a discriminating threshold. Threshold settings at different energies are then exploited to develop K-edge imaging of contrast agents such as iodine or barium.

My thesis details various results on HCC obtained through longitudinal follow-up by X-ray counting computed tomography for the mouse model *Alb-R26*^{Met} designed by the Maina team, which allows the spontaneous development of HCC with properties similar to those of HCC from a subgroup of patients. A better understanding of pre-neoplastic tumors was pursued in order to identify markers for the presence of HCC, which would improve early diagnosis of HCC and ensure better patient management. Notable differences in the populations of immune cells such as dendritic cells (antigen-presenting cells to the immune system) were observed between progressive tumors and tumors stable over time. In addition, different treatments involving different mechanisms (receptor or epigenetic mechanism inhibitors) have revealed very broad changes in the immune environment, with the recruitment of different cells from one treatment to another, highlighting different mechanisms of action. My work also studies the response following the addition of immunotherapy, which is very different depending on the treatment with which it is associated. I was able to observe the very great heterogeneity of responses, which is an important feature of the mouse model used, as it recapitulates the heterogeneity of patients. Despite this, the combination of a tyrosine kinase inhibitor and an HDAC (histone deacetylase) inhibitor appears to

hold promise for a subgroup of mice.

In addition, my thesis also presents a proof-of-concept for improving data post-processing by automatically segmenting liver tumors using Deep Learning (DL). The results obtained on datasets are encouraging and will enable us to automate the acquisition protocol for longitudinal follow-up.

More recently, a detector consisting of an XPAD3.2 integrated circuit hybridized with gallium arsenide (AsGa) pixels, which offers better detection efficiency than silicon pixels at energies above 25 keV, has been tested. My work presents the characterization of this new detector and its use to separate different materials such as iodine, barium (materials used in clinical contrast agents) and gold in images.

Keywords: photon-counting micro CT scanner, hybrid pixel detector, K-edge spectral imaging, deep learning, hepatocellular carcinoma, treatments, immune system.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon jury de thèse. Merci Benjamin Guillet d'avoir accepté de présider mon jury et de me faire confiance pour la suite au CERIMED. David Brasse et Salim Si-Mohamed, merci d'avoir rapporté mon manuscrit ainsi que pour les échanges constructifs qui m'ont permis d'enrichir mon travail de thèse. Anaïs Viry et Nicolas Ducros, merci d'avoir accepté d'examiner mon travail et participé aux échanges constructifs lors de la soutenance. Je souhaiterais aussi remercier Cristinel Diaconu, directeur du CPPM de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour pouvoir mener mes travaux (et d'avoir accepté mes petites souris).

Je tiens maintenant à remercier mes directeurs de thèse. Merci Christian Morel pour ton accompagnement tout au long de ma thèse, pour ta bienveillance et tes précieux conseils même si la biologie te paraissait être du chinois quand je t'en parlais. Merci à Yannick Boursier d'avoir co encadré cette thèse et merci surtout pour ces points travail autour d'un café qui se sont transformés en pause comérages. Flavio Maina, la partie biologie était celle pour laquelle je possédais le plus de lacunes mais toutes nos discussions, nos échanges, ta manière d'aborder les problématiques, de me faire réfléchir, m'ont permis d'apprendre beaucoup dans ce domaine. Merci sincèrement d'avoir accepté de co diriger cette thèse à l'IBDM, pour ta confiance et pour ces heures de dissections pendant lesquelles tu ne lâchais pas le scalpel tant que tu n'avais pas trouvé la tumeur que je t'avais indiquée.

Je vais rester du côté de l'IBDM pour remercier sincèrement Célia Sequera, post-doctorante dans l'équipe qui m'a aussi énormément appris au cours de ma thèse. Travailler avec toi a été très enrichissant, merci pour ton implication et ta détermination et pour toutes ces manips partagées ! Merci aussi à Sylvie Richelme, qui m'a tout appris sur les petites souris et qui a été d'une aide précieuse pour bien prendre soin d'elles ainsi que pour toutes les expériences. Merci d'avoir toujours été disponible, bienveillante et à l'écoute. Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe, j'étais moins présente à l'IBDM, mais mes échanges avec vous lors de mes venues étaient toujours plaisants. Merci à Fabienne pour ses précieux conseils et les échanges enrichissants, Aurélie pour sa gentillesse, Olivier, Margherita et Thomas. Merci aussi à l'équipe du CRCM pour la collaboration pour les analyses FACS : Paula merci pour tous ces échantillons (et on sait qu'ils étaient toujours bien plus nombreux qu'annoncé) analysés et pour le temps accordé à l'analyse.

Je reviens maintenant au CPPM et je voudrais remercier sincèrement Mathieu Dupont pour tous ses debugs informatiques. Le PIXSCAN n'écoute que toi... merci pour

ta disponibilité et pour tous les petits tips code et info. Je ne comprendrai jamais pourquoi quand toi tu le fais ça fonctionne alors que quand je le fais... Un immense merci à Afef, post-doctorante de l'équipe qui a toujours été à l'écoute et si bienveillante. Merci aux thésardes Alicia et Mélissa de m'avoir supportée surtout à la fin quand la rédaction devenait difficile. Merci de m'avoir permis de me défouler au bad, avec aussi mon super co-bureau Hichem qui a été courageux de me supporter sur la fin de ma thèse, surtout quand j'étais aigrie parce que j'avais faim.

Je voudrais remercier l'atelier mécanique pour leur disponibilité et leur aide à chaque fois que j'avais besoin d'une pièce. Merci à Jérôme, Olivier pour tous mes petits fantômes et Fabrice pour ta bonne humeur, toutes nos discussions et tous les dépannages. De manière plus générale je voudrais remercier toutes les personnes du laboratoire avec qui j'ai pu échanger dans les couloirs ou à la pause café. Merci à la team Marseille-Cassis (coach Laurence, Marie, Guy, Philippe) de m'avoir permis de réussir ce défi. Merci Éric de m'avoir poussé à venir à vélo (tu as presque réussi). Merci à tous les doctorants pour leur soutien, et de m'avoir permis de me changer les idées : Maxime, Jean, Arthur, Tyann, Marie, Luc, et petite pensée pour Camille et Damien qui m'ont accompagnés pendant une période de la thèse.

Je voudrais remercier mes amis de m'avoir soutenus pendant ces années, même si j'ai été un peu plus absente merci à vous d'avoir été présents.

Je ne saurais pas comment assez remercier ma copine... Merci pour tout, pour ton soutien, ton aide, ton temps passé à me remotiver et me remonter le moral, à supporter ma mauvaise humeur et surtout pour tout le bonheur que tu m'as apporté, et pour encore longtemps.

Enfin je voudrais remercier ma famille d'avoir toujours cru en moi. Merci à mes grands-parents d'être aussi fiers quand ils parlent de leurs petits-enfants. Merci à ma soeur, coach sportive et mentale pour tes coups de pieds aux fesses quand il le fallait. Et enfin, merci à mes parents, d'être toujours à mes côtés, de me supporter même quand je suis chiante, merci maman pour toutes tes relectures pour les fautes d'orthographes. Merci d'être mon premier soutien depuis toutes ces années.

Table des matières

Affidavit 2

Liste de publications et participation aux conférences 3

Résumé 4

Abstract 6

Remerciements 8

Table des matières 10

Table des figures 13

Liste des tableaux 20

Liste des acronymes 21

Introduction 22

1. Chapitre 1. Des rayonnements X à la tomodensitométrie 25
- 1.1. Principes physiques de la tomodensitométrie . . . 26
  - 1.1.1. Interaction des rayons X avec la matière . . . 26
  - 1.1.2. Production de rayons X . . . 32
  - 1.1.3. Détection des rayons X . . . 35
  - 1.1.4. Principe de la TDM . . . 37
- 1.2. Reconstruction tomographique . . . 38
  - 1.2.1. Ligne de projection : interprétation par la Transformée de Radon 38
  - 1.2.2. La rétroprojection : sommer les projections . . . 39
  - 1.2.3. Théorème de la coupe centrale . . . 40
  - 1.2.4. Rétroprojection filtrée . . . 41
- 1.3. Caractéristiques des images en TDM . . . 43
  - 1.3.1. Bruit et artefacts . . . 43
  - 1.3.2. Résolution spatiale . . . 47

2. Chapitre 2. Application au petit animal : le prototype PIXSCAN-FLI pour réaliser des études précliniques 48
- 2.1. Présentation du prototype PIXSCAN-FLI . . . 49
  - 2.1.1. Enceinte blindée . . . 50
  - 2.1.2. Bloc source et porte-filtres . . . 51

2.1.3. Bloc animal et station d'anesthésie 53
2.1.4. Bloc détecteur et caméra à pixels hybrides 54
2.1.5. piXface : une interface d'acquisition 58
2.1.6. Reconstruction des images 59
2.2. Protocole de scan pour le petit animal 62
2.2.1. Introduction à l'éthique en expérimentation animale 63
2.2.2. Choix d'un agent de contraste 64
2.2.3. Paramètres de scan 65
2.2.4. Dose reçue par l'animal 67
2.2.5. Prise en compte des mouvements respiratoires 68
2.2.6. Résumé de l'utilisation de ce protocole d'acquisition 70
2.3. Analyse des scans : problématique de la segmentation de tumeurs . . . 70
2.3.1. Introduction au *Deep Learning* (DL) 73
2.3.2. Construction de la base de données 75
2.3.3. Construction du modèle de Deep Learning 77
2.3.4. Résultats 81
2.3.5. Limites 85

3. Chapitre 3. Études longitudinales pour le suivi des carcinomes hépatocellulaires chez la souris. 87
3.1. Introduction à la problématique biologique 88
3.1.1. Carcinome hépatocellulaire 88
3.1.2. Modèle murin *Alb-R26*^{Met} 89
3.1.3. Suivi non invasif des tumeurs 89
3.1.4. Problématiques 90
3.2. Mise en place de protocoles pour l'analyse des tumeurs 91
3.2.1. Dissociation cellulaire 91
3.2.2. Dissociation des noyaux 91
3.2.3. Introduction des études FACS et sc-RNAseq 92
3.3. Caractérisation des tumeurs prénéoplasiques 94
3.3.1. Protocole de suivi des tumeurs 94
3.3.2. Résultats 95
3.4. Évaluation des réponses au traitement 99
3.4.1. Introduction aux traitements épigénétiques 99
3.4.2. Comparaison de deux traitements et apport de l'immunothérapie 100
3.4.3. Combinaison d'un agent épigénétique à un inhibiteur RTK . . . 110

4. Chapitre 4. Caractérisation du détecteur XPAD3.2-C/AsGa et imagerie au K-edge 116
4.1. Caractéristiques du détecteur AsGa 116
4.1.1. Pixels hybrides et définition de l'électronique 117
4.1.2. Protocole de calibration du détecteur 120
4.1.3. Caractérisation du détecteur 125
4.1.4. Comparaison à l'état de l'art 129

4.2. Introduction à la tomographie spectrale 130
4.2.1. Formalisme spectral 130
4.2.2. Imagerie au K-edge par soustraction 133
4.2.3. Description de l'algorithme ProMeSCT 135
4.2.4. Apport pour l'in-vivo 136
4.3. Preuves de concept avec le détecteur AsGa 137

Conclusion **143**

Bibliographie **145**

ANNEXES **155**
A. Protocole de dissociation cellulaire des tumeurs du foie 155
B. Protocole de dissociation des noyaux 157

Table des figures

1.1. Spectre électromagnétique [Philip Ronon, Gringer]. 27
1.2. Atténuation d'un faisceau de rayons X. 27
1.3. Coefficients d'atténuation linéiques de différents matériaux en fonction de l'énergie des rayons X. 28
1.4. Prédominance des types d'interaction en fonction du numéro atomique Z du milieu et de l'énergie E du rayon X. En imagerie médicale, le spectre d'énergie des rayons X couvre des énergies de 10 à 150 keV, et donc uniquement les effets Compton et photoélectriques ont lieu [KNOLL 2000]. 29
1.5. Illustration de l'effet photoélectrique. En vert le photon incident et en rouge le photo-électron éjecté de l'atome cible. 29
1.6. Coefficient d'atténuation linéique photoélectrique en fonction de l'énergie des photons pour l'Ioméron (agent de contraste à base d'iode utilisé en imagerie) et le plomb. On peut voir les différentes cassures relatives aux *i*-edges des différentes couches électroniques : plus la couche électronique est proche du noyau et plus l'énergie de i-edge est élevée. . . 31
1.7. Illustration de l'effet Compton. En vert le photon incident, en orange le photon diffusé avec un angle θ et en rouge l'électron éjecté. 31
1.8. Illustration de l'effet Rayleigh. En vert le photon incident et en orange le photon diffusé, de manière cohérente sans perte d'énergie. 32
1.9. Schéma du fonctionnement d'un tube à rayons X [*Tube à rayons X* 2018]. 33
1.10. Illustration du rayonnement de fluorescence. En rouge l'électron qui change de couche électronique pour stabiliser l'atome et en bleu le rayon X de fluorescence produit d'énergie E_K - E_M. 33
1.11. (a) Spectre d'émission d'un tube à rayons X pour une cible en tungstène et (b) impact d'un filtre d'Aluminium placé à la sortie du tube à rayons X. 34
1.12. Schéma de détecteurs à conversion (a) indirecte et (b) directe [SO et al. 2021]. 36
1.13. Illustration d'un tomodensitomètre clinique. 38
1.14. Principe de projection parallèle où $p_\theta(u)$ est la projection de $f(x,y)$ le long de la ligne de projection représentée en rouge. 39
1.15. Sinogramme représentant l'information de chaque projection des objets vus sous différents angles [Mathieu DUPONT 2014]. 40
1.16. Illustration de la rétroprojection en faisceau en éventail. 43
1.17. Illustration des différents artefacts pouvant être présents sur les images TDM. 46

2.1. Photographies du prototype PIXSCAN I [Rana KHOURY 2008]. 50

2.2. Photographie prise au CPPM de l'enceinte blindée du prototype PIXSCAN-FLI. 50
2.3. Photographie du système d'imagerie du prototype PIXSCAN-FLI composé de trois blocs. 51
2.4. Photographie de la roue à filtres placée devant la source de rayons X. . 52
2.5. Spectre d'énergie d'une source à anode de tungstène simulés avec et sans filtre. Les spectres sont normalisés par leur intégrale. Les cassures présentes dans les spectres correspondent aux énergies de liaison de la couche K des matériaux de filtration (*K-edge*). 53
2.6. Bloc animal : les différents axes des moteurs sont illustrés ainsi que le positionnement de l'animal sur la platine de rotation à l'aide d'une griffe de dent intégrée au masque d'anesthésie alimenté par les tuyaux permettant de délivrer un flux d'isoflurane sur le nez de l'animale. Le masque est supporté par un tuteur vertical en fibre de carbone, lui-même fixé sur la platine. 54
2.7. Station d'anesthésie Minerve. 54
2.8. Photographies (a) de la platine de rotation munie d'un tuteur vertical en fibre de carbone supportant le masque d'anesthésie et (b) d'une souris anesthésiée positionnée sur la platine de rotation. 55
2.9. Photographie d'une barrette constituée d'un capteur en silicium pixellisé et hybridé à 7 chips XPAD3.2-S [KRONLAND-MARTINET 2015]. 56
2.10. Photographie des 8 barrettes assemblées en tuiles avec une inclinaison de 7°. 56
2.11. Illustration (a) d'un fond blanc et (b) d'une radiographie de souris acquise avec la caméra S540. La taille de la caméra nous permet pratiquement d'obtenir une imagerie corps entier de la souris. Il s'agit d'un mapping à plat de la caméra où chaque pixel de l'image est un pixel de la caméra. L'image n'est donc pas corrigée ni de l'inclinaison des barrettes ni de leur recouvrement. 57
2.12. Courbes d'efficacité de détection par effet photoélectrique pour différents matériaux d'épaisseurs définies en fonction de l'énergie des rayons X. 57
2.13. Photographie du fantôme à bille utilisé pour l'étalonnage de la géométrie du système. 60
2.14. Trajectoires elliptiques de la bille positionnée à 3 hauteurs différentes. 60
2.15. Residuels horizontaux (à gauche) et verticaux (à droite). 61
2.16. Illustration des différentes coupes anatomiques. [*Système de référence en anatomie* 2023] 62
2.17. Coupes frontales d'un scanner de souris (a) avant injection, (b) 24h après et (c) 3 semaines après injection de l'Exitron nano 12000 [PORTAL 2018]. 65

2.18. Coupes transverses de souris représentant le flou au niveau des structures osseuses. (a) Illustre une coupe sans flou lié au mouvement respiratoire, tandis que sur la coupe (b), on peut voir le dédoublement de la vertèbre engendré par le mouvement (qui n'apparaît pas sur le tuteur en fibre de carbone). 66
2.19. Photographie du dosimètre Diados de PTW et de la sonde utilisés pour mesurer la dose de rayonnement ionisant reçue par l'animal lors d'un scan. 68
2.20. Illustration de la zone utilisée pour l'analyse du cycle respiratoire de la souris. En orange, la barrette de détecteur sélectionnée et en bleu, la zone restreinte sur laquelle l'analyse est effectuée. 69
2.21. Graphique de la moyenne des coups comptés par pixels dans la zone sélectionnée autour de la cage thoracique en fonction du temps. 70
2.22. Exemple illustrant la stratégie de segmentation manuelle à l'aide du logiciel ITK-SNAP (a) avant segmentation et (b) une fois la segmentation des différentes tumeurs réalisée. 71
2.23. Représentation de l'hétérogénéité des tumeurs analysées. 72
2.24. Evolution du nombre de publications concernant l'utilisation de l'IA en imagerie médicale par années. 73
2.25. Fonctionnement schématique d'un neurone formel. Une somme pondérée par des poids synaptiques est donnée en entrées d'un neurone puis comparée à un seuil à l'aide d'une fonction d'activation (ou fonction de transfert) permettant de générer le signal de sortie du neurone (adapté de [POLI 2007]). 74
2.26. Schéma récapitulatif des différentes étapes d'un projet d'intelligence artificielle. 75
2.27. Deux exemples de slices avec les masques associés représentant la segmentation des tumeurs. 76
2.28. Histogrammes des tailles de tumeurs composant notre base de données (a) pour chaque volume et (b) pour chaque slice. 77
2.29. Architecture d'un réseau U-Net. Chaque étage représente une couche de neurones constituée de filtres de convolution. En haut de chaque couche, le nombre de paramètres du filtres. Les flèches rouges entre chaque couche de la partie contractante correspond à une couche *pooling* pour diminuer la taille de l'image et au dessus des flèches grises, représentant la concaténation de l'image obtenue dans la phase contractante avec celle de la phase expansive, est noté la taille de l'image [RONNEBERGER et al. 2015], [ZHANG et al. 2020]. 78
2.30. Architecture du réseau U-Net utilisé avec les différents paramètres (adapté de [ZHANG et al. 2020]). 80
2.31. Évolutions (a) du *score dice* et (b) de la *loss function* au cours des différentes *epochs*. 82
2.32. *Score dice* en fonction de la catégorie de tumeurs pour la base de données de test. 83

2.33. Exemples de résultats obtenus avec le modèle entraîné pour différentes tailles de tumeurs. A gauche, l'image test, au centre la *ground truth* et à droite la segmentation prédite par le réseau. 84
2.34. Stratégie de formation des sous-volumes pour le modèle 3D avec un *overlapping* de 50 %. 84
2.35. *Score dice* des données test pour le modèle 3D. La moyenne est de 0.66. 85

3.1. Schéma du croisement entre les souris pour l'obtention du modèle *Alb-R26^{Met}* [FAN, RICHELME et al. 2015]. 89
3.2. Graphique représentant la fréquence et le nombre de tumeurs par souris en fonction de leur âge. 90
3.3. Schéma de l'évolution du CHC et des différentes étapes que nous avons étudiées. En (1) l'étude des tumeurs prénéoplasiques aux stades initiaux de la tumorigénèse ; en (2) l'étude de l'impact des traitements sur l'évolution tumorale. 91
3.4. Schéma présentant le fonctionnement d'un FACS au moment de la lecture des cellules [*Abbexa - Antibodies, Proteins, ELISA kits* s. d.]. . . . 93
3.5. Schéma présentant le processus de séquençage d'ARN [*10x Genomics* s. d.]. 93
3.6. Schéma du protocole du suivi des tumeurs prénéoplasiques. 95
3.7. Graphiques présentants (a, b, c) les pourcentages de populations de sous-types de cellules immunitaires spécifiques en fonction du nombre total de cellules immunitaires (CD45+) et (d) l'intensité de la protéine PTK7 parmi les monocytes (Ly6C). 96
3.8. Représentation t-SNE de l'analyse par scRNAseq de lésions prénéoplasiques. Chaque cluster a été identifié en prenant en compte les différents gènes exprimés. 97
3.9. UMAP des cellules des 8 lésions (4 évolutives et 4 stables) : (a) avec les différents clusters et en (b) en fonction du comportement des lésions : évolutives ou stables. Ces UMAP ont été obtenues avec le logiciel ShIVA [AUSSEL et al. 2022]. 98
3.10. Schéma des mécanismes épigénétiques mis en jeu avec la méthylation de l'ADN et la modification des histones. 101
3.11. Schéma du fonctionnement des points de contrôles responsables de la modulation de l'activation des cellules immunitaires [VUAGNAT et al. 2018]. 102
3.12. Schéma du protocole de l'étude in vivo réalisée. Une première expérience avec deux cohortes de souris, chacune traitée avec un traitement différent (Décitabine ou inibitheurs MEK+BCL-XL), et une seconde expérience avec deux cohortes, chacune traitée avec un des deux mêmes traitements auxquels on a ajouté des injections d'immunothérapie au bout de 7 jours. Les souris ont été imagées tous les 10 jours et une dissociation cellulaire pour l'analyse par cytométrie en flux a été réalisée à la fin. 104

3.13. Graphique représentant la réduction de volume $V_{final}/V_{initial}$ pour chacune des cohortes à la fin du traitement. Les statistiques ont été calculées avec des tests de Mann-Whitney et les étoiles sont présentées tel que : * : p-value < 0.05 ; ** : p-value < 0.01 et *** : p-value < 0.001. 104
3.14. Diagrammes de Sankey représentant l'évolution des tumeurs des différentes cohortes au cours du temps. En vert, les tumeurs ayant répondu au traitement (régressives), en jaunes les tumeurs stables et en rouge les tumeurs n'ayant pas répondu (évolutives). Le premier état (à gauche) correspond à l'état des tumeurs au jour 0 avec donc un état d'évolution inconnu (grisé) et à droite au jour 20 de l'étude. 105
3.15. UMAP représentant les cellules analysées par cytométrie en flux dans différents sous-groupes de tumeurs en fonction de leur comportement ou du traitement. En rouge les clusters très exprimés et en bleu les clusters sous exprimés. 107
3.16. Graphique représentant le score obtenu par le modèle en fonction du nombre de paramètres pris en compte. 108
3.17. Heatmap représentant la viabilité cellulaire calculée sur 4 lignées cellulaires humaines (en abscisses). La viabilité a été mesurée pour les traitements seuls ou combinés et pour différentes concentrations (en ordonnées). Plus la viabilité est faible (et tend vers le rouge) et plus le traitement est efficace. 111
3.18. Schéma du protocole de l'étude in vivo pour l'évaluation du traitement RomiCabo. 112
3.19. Résultats de l'étude in vivo sur les tumeurs prénéoplasiques. 112
3.20. Histogramme représentant le pourcentage de tumeurs évolutives (en rouge), stables (en jaune) et régressives (en vert) sans traitement et avec la combinaison de traitement RomiCabo sur les tumeurs avancées. . . 113
3.21. Exemples de tumeurs régressives et évolutives pour les deux catégories de tumeurs. 113
3.22. Diagramme de Sankey représentant l'évolution des tumeurs au cours du temps. A gauche, l'état des tumeurs, après la première session de traitement, au milieu après la pause, et à droite, à la fin du protocole. . 114

4.1. Schéma d'un pixel hybride. 117
4.2. Schéma du circuit électronique. 118
4.3. Courbe de linéarité de la chaîne analogique. 118
4.4. Taux de comptage pour un pixel du détecteur XPAD3.2 AsGa lors d'un scan DACL derrière un filtre d'argent. On note le saut au passage du DACL entre 16 et 17, puis entre 31 et 32 et entre 47 et 48 (au niveau des flèches) correspondant au basculement du 5ème puis 6ème bits et 5ème et 6ème bits ensemble, respectivement. 120

4.5. Coefficient d'atténuation photoélectrique des matériaux en fonction de l'énergie. Pour le baryum, nous pouvons noter le saut (K-edge) à l'énergie de 37.4 keV correspondant à l'énergie de liaison des électrons sur la couche K de baryum. 122
4.6. Courbes représentant le scan DACL d'un pixel réalisé derrière un filtre d'iode composé d'Ioméron 350 (a) avant et (b) après la minimisation permettant de détecter la cassure correspondant à l'énergie du K-edge de l'iode (33.2 keV). 123
4.7. Graphique représentant (a) les valeurs de DACL de plusieurs pixels voisins sur le chip et (b) l'hétérogénéité de réponse des différents pixels. . 124
4.8. Histogramme du nombre de coups pour une image de fond blanc obtenue pour la calibration au K-edge de l'iode. 124
4.9. Scan DACL d'un pixel pour lequel le fit trouvé n'est pas correct car il ne correspond pas au K-edge mais à la fin du spectre de source. 125
4.10. Résultats de la calibration au K-edge de l'iode du détecteur XPAD3.2-C/AsGa avec (a) la cartographie des pixels non calibrés (en jaune) et (b) une image de fond blanc obtenue après estimation du comptage des pixels masqués par interpolation bilinéaire des comptages des pixels voisins. 126
4.11. Histogramme des différences de valeurs de DACL entre les calibrations à l'iode et au baryum. 127
4.12. Graphique de la différence de valeurs de DACL en fonction de la différence d'énergie des K-edges permettant d'estimer la valeur du pas de DACL. 128
4.13. Courbe de calcul du pas de ITH. 128
4.14. Schéma représentant les différentes méthodes d'acquisition pour la tomographie spectrale [So et al. 2021] : (A) CT multi-énergies, (B) *kV-switching*, (C) Une seule source modifiée à chaque rotation, (D) Détecteur double couche, (E) Filtre de division de spectre de source et (F) Détecteur à comptage de photons. 132
4.15. Représentation schématique des deux fenêtres d'énergie utilisées pour la soustraction au K-edge du baryum. 133
4.16. Résultats de la reconstruction et de la décomposition en base de matériaux correspondant à l'iode, l'argent et l'eau (à gauche au milieu et à droite respectivement) avec l'algorithme *Forward-Backward* (ligne du haut), FISTA (ligne du milieu) et ProMeSCT (ligne du bas) [Tairi et al. 2021]. 136
4.17. Illustration du fantôme utilisé pour les expériences. 137
4.18. Reconstruction tomographie du fantôme contenant deux solutions d'iode (à 40 et 80 mg/mL) et une solution de baryum. 138
4.19. Histogrammes des taux de comptages dans les fonds blancs pour les différentes calibrations. 139

4.20. Résultats des tomographies spectrales obtenues (a) par soustraction au K-edge de l'iode (à gauche) et du baryum (à droite) et (b) avec l'algorithme ProMeSCT pour l'iode (à gauche) et du baryum (à droite). Les images représentent une moyenne de plusieurs coupes tomographiques pour une meilleure visualisation des résultats. 140
4.21. Fantôme composé d'une solution de baryum, une solution d'iode et une feuille d'or enroulée sur elle-même. 140
4.22. Résultats des tomographies spectrales obtenus (a) par soustraction au K-edge de l'iode (à gauche), du baryum (au centre) et de l'or (à droite) ou (b) avec l'algorithme ProMeSCT. Les images représentent une moyenne de plusieurs coupes tomographiques pour une meilleure visualisation des résultats. 142

Liste des tableaux

2.1. Tableau récapitulatif des caractéristiques du tube à rayons X installé dans le prototype PIXSCAN-FLI. 52
2.2. Tableau récapitulatif des caractéristiques des deux détecteurs utilisés. 58
2.3. Valeurs caractéristiques d'HU pour certains organes. 63
2.4. Tableau récapitulatif des caractéristiques des différents agents de contraste hépato-spécifiques [LI et al. 2014],[BOLL et al. 2013] et [MANNHEIM et al. 2016]. 64
2.5. Tableau récapitulatif des différents paramètres de scan utilisés pour le suivi longitudinal des souris. 66
2.6. Tableau récapitulatif du nombre de souris ayant suivies le protocole. . 71
2.7. Tableau récapitulatif des différents paramètres des réseaux U-Net utilisés pour la tâche de segmentation des tumeurs. 80
2.8. Tableau récapitulatif des résultats du modèle 2D sur la base de test. . . 82

3.1. Tableau présentant des exemples de traitements épigénétiques inhibiteurs de DNMT utilisés en clinique. 100
3.2. Tableau présentant des exemples de traitements épigénétiques inhibiteurs de HDAC utilisés en clinique. 101
3.3. Tableau représentant les différentes évaluations d'un *Random Forrest*. 106
3.4. Tableau présentant les différentes métriques d'évaluation de la forêt d'arbres décisionnels entraînée pour prédire la réponse au traitement. 108
3.5. Tableau présentant les résultats obtenus avec un *Random Forest* entraîné et testé sur des données patient. 109

4.1. Tableau récapitulatif des caractéristiques des chips XPAD3-S et XPAD3.2-C [BUTON et al. 2014] et [CHANTEPIE 2008]. 119
4.2. Tableau récapitulatif des différentes calibrations réalisées. 127
4.3. Tableau récapitulatif des pas de DACL et ITH calculés. 129
4.4. Tableau descriptif des caractéristiques des différents détecteurs à pixels hybrides [BALLABRIGA et al. 2021]. 129

Liste des acronymes

AsGa
arséniure de gallium. 36

CHC
carcinome hépatocellulaire. 88

DAC
convertisseurs numériques-analogiques (ou *Digital to Analog Converter*). 119

DL
apprentissage profond (ou *Deep Larning*). 49

DNMT
ADN méthyltransférases (ou *DNA Methyltransferases*). 99

HDAC
histones désacétylases. 100

ML
apprentissage machine (ou *Machine Learning*). 106

SNR
rapport signal sur bruit (ou *Signal to Noise Ratio*). 43

TDM
tomodensitométrie. 26

Introduction

L'imagerie médicale s'est développée dans les années 1910 lorsque Marie Curie a mis en place des voitures radiologiques pendant la Première Guerre mondiale. L'objectif étant ainsi de pouvoir diagnostiquer les soldats blessés notamment par les éclats d'obus. La mise en place de ces voitures radiologiques a été possible grâce à la découverte des rayons X par Wilhelm Röntgen en 1895, ayant par la suite réalisé la première radiographie de la main de sa femme. Très vite un vif intérêt à été porté à la radiographie des poumons pour le dépistage de la tuberculose. S'en est suivi de nouvelles méthodes d'imagerie avec le scanner, l'échographie, la tomographie par émissions de positrons (TEP), ou encore l'imagerie par résonnance magnétique (IRM). Tous ces systèmes d'imagerie ont un but en commun : permettre un meilleur diagnostique du patient et ainsi améliorer le traitement et la prise en charge des maladies. Ces modalités d'imagerie ont par la suite été adaptées pour l'imagerie préclinique sur le petit animal. Les expérimentations animales étant devenues indispensable pour les biologistes afin de mieux comprendre les processus physiologiques et pathologiques, ces outils d'imageries permettent ainsi d'accéder à des informations anatomiques et fonctionnelles sans avoir à sacrifier l'animal.

L'innovation médicale est en perpétuelle évolution afin de réduire le temps d'examen, la dose reçue par le patient ou encore d'augmenter la résolution spatiale et en contraste. Parmi ces modalités d'imagerie, le scanner à rayons X, ou tomodensitométrie, permet d'obtenir une image en trois dimensions de la densité d'un objet. Pour cette modalité, qui est la plus utilisée et donc importante en terme de dose sur la population, la tendance est de pouvoir réduire la dose administrée au patient tout en gardant une qualité d'image satisfaisante.

Dans les années 90, des nouveaux détecteurs dits à pixels hybrides ont été développés pour les expériences de physique des particules. Par la suite, un transfert de technologie a permis d'adapter ces détecteurs pour l'imagerie biomédicale. Ces détecteurs ont la particularité de fonctionner en comptage de rayons X et peuvent mesurer leur énergie, ce qui les différencie des détecteurs plus conventionnels qui mesurent l'intensité du courant généré par toutes rayons X du faisceau arrivant sur le détecteur. Ils offrent ainsi la possibilité de s'affranchir du bruit électronique en appliquant un seuil en énergie au-dessus du bruit, ce qui améliore le contraste et la résolution spatiale tout en limitant la dose. De plus, ils ouvrent la voie à la tomographie spectrale grâce à l'information obtenue sur l'énergie des photons détectés, comme avec l'imagerie au K-edge, qui est une méthode d'imagerie spectrale réalisée par soustraction d'images reconstruites dans des fenêtres d'énergie situées de part et d'autre de l'énergie du K-edge du matériau ciblé. Ces imageries peuvent donc être réalisées grâce à l'application de seuils de détection en énergie appliqués à chaque

pixel du détecteur.

Dans ce contexte, au Centre de Physique des Particules de Marseille (CPPM), l'équipe de recherche imXgam a mis au point un prototype de micro tomodensitomètre à comptage de photons appelé PIXSCAN-FLI. Basée sur un transfert technologique des détecteurs à pixels hybrides utilisés dans le détecteur ATLAS pour la trajectographie de particules chargées, une caméra à pixels hybrides est installée dans le PIXSCAN-FLI. Différentes versions du circuit imprimé ont abouti aux chip XPAD3.2-S et -C avec des pixels de $130 \times 130\ \mu m^2$. Hybridé à un capteur en silicium, le chip XPAD3.2-S permet ainsi l'imagerie du petit animal tout en limitant la dose appliquée. Récemment, le chip XPAD3.2-C a été quant à lui hybridé à un capteur d'arséniure de gallium, qui a l'avantage sur le silicium d'avoir une meilleure efficacité de détection en dessus de 25 keV en raison de sa densité (son numéro atomique effectif) plus élevée.

En parallèle, à l'Institut de Biologie du Développement de Marseille (IBDM), l'équipe de Flavio Maina étudie le carcinome hépatocellulaire, cancer du foie le plus fréquent et 3ème cancer le plus mortel au monde. Un modèle murin *Alb-R26*^{Met} développé dans l'équipe permet d'étudier des tumeurs spontanées aux caractéristiques similaires à celles d'un sous-groupe de patients. La nécessité d'un outil permettant le suivi au cours du temps des souris de manière non invasive a mené nos deux équipes à s'associer afin d'utiliser le prototype PIXSCAN-FLI pour la recherche sur le cancer du foie à travers le projet DePIcT dans lequel s'inscrit ma thèse. Quatre grands axes caractérisent ce projet et donc ce travail de thèse. i) Réaliser des études longitudinales afin de suivre l'évolution des tumeurs du foie chez la souris lorsqu'un traitement est appliqué ou non. Le volume tumoral ainsi que le remaniement du micro environnement tumoral seront étudiés afin de mieux appréhender l'action du système immunitaire. ii) Développer la tomographie spectrale, notamment avec le nouveau détecteur constitué de pixels d'arséniure de gallium afin de travailler à plus haute énergie. La tomographie spectrale permettant ainsi de séparer des composants ayant des coefficients d'atténuations très proches. iii) Mettre en place des outils d'intelligence artificielle afin d'améliorer le processus d'analyse des données. Notamment, l'identification et la segmentation des tumeurs du foie dans les volumes reconstruits. iv) Enfin, promouvoir l'utilisation du prototype PIXSCAN-FLI en organisant notamment son déménagement au Centre Européen de Recherche en Imagerie MÉDicale (CERIMED) sur le campus santé de la Timone à Marseille.

Ces différents axes seront développés dans ce manuscrit au travers de quatre chapitres.

Le premier chapitre fera un état de l'art de la tomodensitométrie. De la production des rayons X à leur détection, les différents principes physiques mis en jeux seront détaillés. La reconstruction tomographique permettant l'obtention du volume 3D sera décrite, ainsi que les différentes caractéristiques des images en tomodensitométrie.

Le chapitre 2 décrira le prototype de micro tomodensitomètre à comptage de photons PIXSCAN-FLI et son utilisation pour le suivi longitudinal chez le petit animal. Des études sur la faisabilité de la prise en compte du mouvement respiratoire ainsi que de la segmentation automatique des tumeurs par des approches d'intelligence artificielle seront aussi décrites à la fin de ce chapitre.

Le troisième chapitre décrira quant à lui les différentes expériences réalisées sur le modèle murin *Alb-R26*^{Met} afin de mieux comprendre l'évolution des tumeurs au stade précoce de l'évolution et les différents mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeux. De plus, la réponse des tumeurs aux différents traitements sera évaluée afin de mieux appréhender le remaniement du système immunitaire. Les problématiques biologiques qui nous intéressent et le modèle murin développé seront tout d'abord détaillés avant de décrire les résultats des différentes expériences in vivo menées.

Enfin, le chapitre 4 détaillera la caractérisation d'un nouveau détecteur à comptage de photons constitué d'un circuit intégré XPAD3.2-C hybridé avec des pixels d'arséniure de gallium (AsGa). Par la suite, et après une introduction à l'imagerie spectrale, nous présenterons les différentes preuves de concept obtenues avec ce détecteur et l'apport que ces données spectrales pourraient avoir pour l'imagerie in vivo.

Pour finir, une conclusion sur les travaux menés au cours de ma thèse ainsi que les perspectives viendront clôturer ce manuscrit.

1. Chapitre 1. Des rayonnements X à la tomodensitométrie

Sommaire

1.1. Principes physiques de la tomodensitométrie 26
1.1.1. Interaction des rayons X avec la matière 26
1.1.1.1. Atténuation des rayons X 26
1.1.1.2. Effet photoélectrique 29
1.1.1.3. Effet Compton 30
1.1.1.4. Effet Rayleigh 32
1.1.2. Production de rayons X 32
1.1.3. Détection des rayons X 35
1.1.3.1. Détecteurs à conversion indirecte ou directe 35
1.1.3.2. Détecteurs à intégration de charges ou à comptage de photons 36
1.1.3.3. Biais de détection 37
1.1.4. Principe de la TDM 37
1.2. Reconstruction tomographique 38
1.2.1. Ligne de projection : interprétation par la Transformée de Radon 38
1.2.2. La rétroprojection : sommer les projections 39
1.2.3. Théorème de la coupe centrale 40
1.2.4. Rétroprojection filtrée 41
1.2.4.1. En faisceaux parallèles 41
1.2.4.2. En faisceaux en éventail 42
1.2.4.3. En faisceau conique 43
1.3. Caractéristiques des images en TDM 43
1.3.1. Bruit et artefacts 43
1.3.2. Résolution spatiale 47

Dans ce chapitre, nous allons définir les différents principes physiques utilisés en tomodensitométrie, en commençant tout d'abord par les interactions des rayons X avec la matière, leur production puis leur détection. Ensuite nous verrons comment la reconstruction tomographique nous permet d'obtenir le volume 3D de l'objet imagé et enfin nous décrirons les différentes caractéristiques des images en tomodensitométrie.

1.1. Principes physiques de la tomodensitométrie

La tomodensitométrie (TDM) ou CT-scan (avec CT pour *Computed Tomography*) est une technique d'imagerie médicale qui consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus. L'acquisition des données se réalise de manière tomographique, *i.e.* par projections. Enfin, une reconstruction de ces différentes projections permet par la suite d'obtenir des images 2D ou 3D des structures anatomiques.

1.1.1. Interaction des rayons X avec la matière

Le principe de la TDM repose donc sur l'atténuation différenciée d'un faisceau de rayons X par les tissus. Les rayons X interagissent différemment en fonction de la matière traversée, ce principe sera détaillé dans la section suivante.

1.1.1.1. Atténuation des rayons X

Les rayons X ont été découverts en 1895 par le physicien Wilhelm Röntgen, qui donna à ce rayonnement le nom de l'inconnue en mathématique : X. Il s'agit d'un rayonnement électromagnétique constitué de photons à haute fréquence dont l'énergie varie entre quelques centaines d'électronvolts (eV) et plusieurs centaines de milliers d'eV (Figure 1.1). Le spectre électromagnétique [GARING s. d.] est la représentation du rayonnement électromagnétique en fonction de sa longueur d'onde λ, de sa fréquence ν ou de l'énergie E des photons qui le constituent. La relation entre ces différentes entités est donnée par :

$$\mathrm{E} = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \tag{1.1}$$

avec $h = 6.63\times10^{-34}$ J·s la constante de Planck et $c = 3.00\times10^{8}$ m·s^{-2} la vitesse de la lumière dans le vide.

Un faisceau de rayons X a la particularité de pouvoir traverser la matière tout en y déposant de l'énergie. On parle alors d'atténuation. Lorsqu'un faisceau de rayons X d'intensité I est envoyé à travers la matière, les rayons X qui le constituent vont interagir individuellement, ou pas, et donc le nombre de rayons X en sortie de la matière sera diminué (Figure 1.2). Cette diminution du nombre de rayons X correspond à une atténuation de l'intensité du faisceau de rayons X et dépend de la densité et du numéro atomique effectif de la matière traversée. Elle est donnée par la loi d'atténuation de Beer-Lambert :

$$\mathrm{I} = \mathrm{I}_0 \exp\left(-\mu_{\mathrm{E}_0}\mathrm{x}\right) \tag{1.2}$$

avec I_0 l'intensité d'un faisceau monochromatique de photons d'énergie E_0 et x l'épaisseur du milieu homogène traversé de coefficient d'atténuation linéique $\mu(\mathrm{E})$. Le coefficient d'atténuation linéique correspond à la probabilité d'interaction du rayonnement

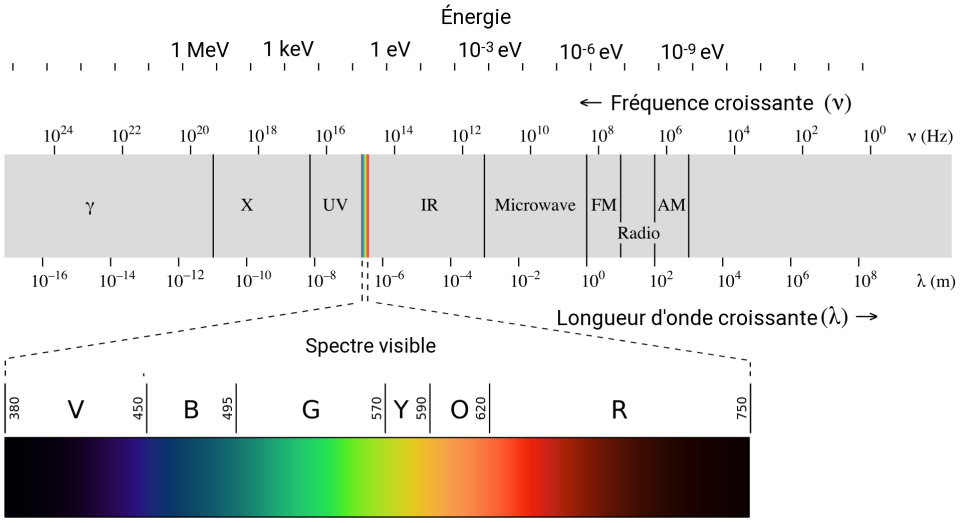


FIGURE 1.1. – Spectre électromagnétique [Philip Ronon, Gringer].

dans le milieu par unité de distance parcourue.

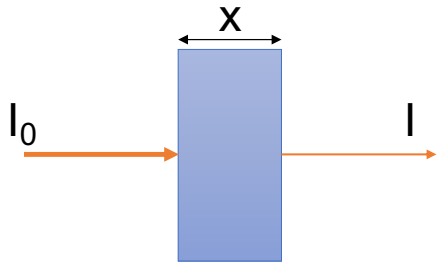


FIGURE 1.2. – Atténuation d'un faisceau de rayons X.

Nous pouvons voir que le coefficient d'atténuation linéique dépend du milieu mais aussi de l'énergie des rayons X comme le montre la Figure 1.3. Plus l'énergie du photon est élevée et plus l'atténuation est faible. La décroissance du coefficient d'atténuation se comporte approximativement comme $1/E^{\alpha}$ avec $\alpha \in \{3,4\}$ selon l'énergie.

Par ailleurs, dans le cas d'un milieu non homogène, comme par exemple des tissus vivants, l'atténuation du faisceau correspond alors à la somme des probabilités d'interaction des rayons X tout au long de leur parcours $\mathscr{L}$:

$$I = I_0 \exp\left(-\int_{\mathscr{L}} \mu_E(x)\,dx\right) \tag{1.3}$$

De plus, en tomodensitométrie, le faisceau de rayons X généré par un tube à rayons X est polychromatique (la production de ce faisceau sera détaillée à la Section 1.1.2). L'intensité I_0 du faisceau est alors donnée par la somme des intensités $I_0(E)$ composant le spectre d'énergie du faisceau. On obtient alors la loi d'atténuation suivante :

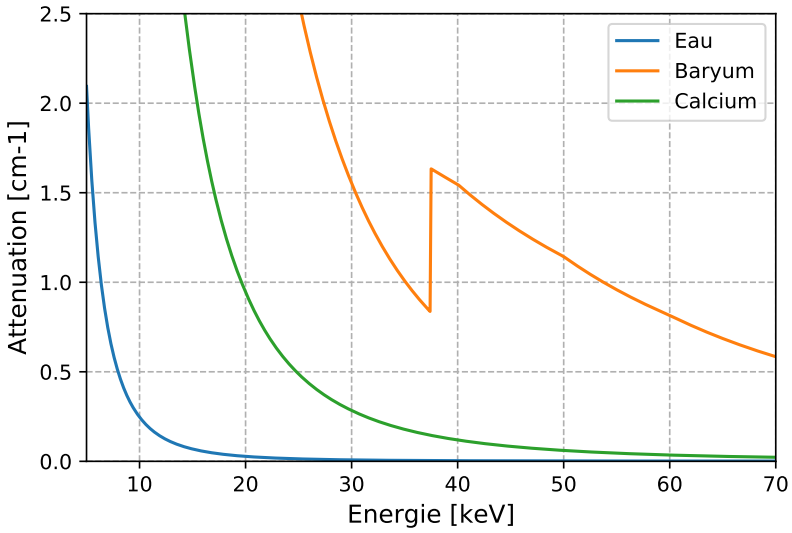


FIGURE 1.3. – Coefficients d'atténuation linéiques de différents matériaux en fonction de l'énergie des rayons X.

$$\mathrm{I} = \int_0^{E_{max}} \mathrm{I}_0(\mathrm{E}) \exp\left(-\int_{\mathscr{L}} \mu(\mathrm{E,x})\, dx\right) \mathrm{dE} \tag{1.4}$$

Le coefficient d'atténuation linéique utilisé dans ces équations est exprimé en cm^{-1} mais nous pouvons aussi parler de coefficient d'atténuation massique, μ/ρ, exprimé en cm^2/g, avec ρ la densité du milieu en $\mathrm{g/cm}^3$.

Les rayons X sont absorbés lors de leurs interactions avec les électrons atomiques du milieu traversé. Ils peuvent interagir avec le milieu soit par effet photoélectrique (ionisation d'un électron d'une couche atomique interne), soit par diffusion Compton (diffusion inélastique par un électron d'une couche atomique externe) ou par diffusion de Rayleigh (diffusion cohérente par un électron d'une couche atomique externe), soit par création de paire (matérialisation d'une paire électron-positon sur un noyau de recul). La prédominance des différentes interactions qui peuvent avoir lieu avec les électrons atomiques dépend de l'énergie des photons et des caractéristiques de la matière traversée, comme illustré sur la Figure 1.4. La création de paires n'entre pas en jeu avec les énergies et matériaux utilisés en TDM. L'effet photoélectrique ainsi que la diffusion Compton et la diffusion de Rayleigh sont décrits dans les sections suivantes. La diffusion Rayleigh a cependant peu d'importance dans la formation de l'image radiographique.

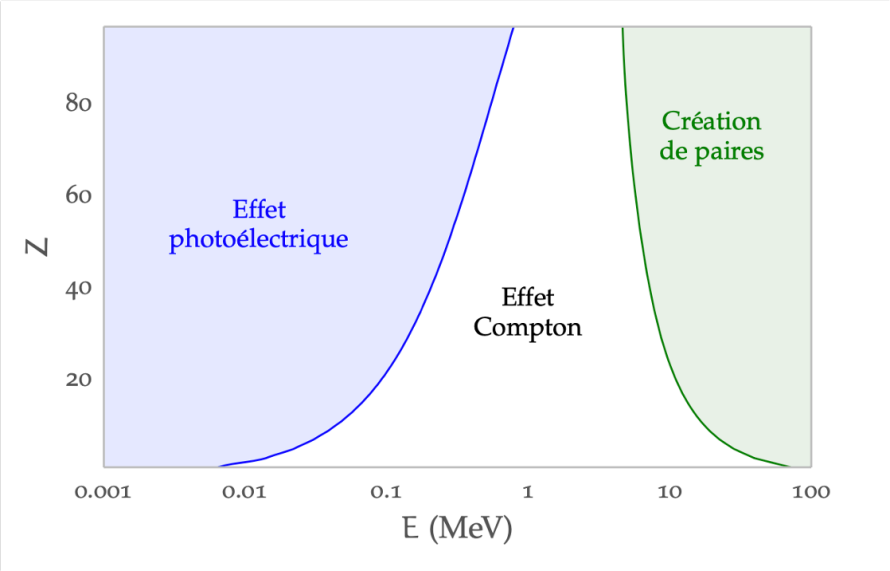


FIGURE 1.4. – Prédominance des types d'interaction en fonction du numéro atomique Z du milieu et de l'énergie E du rayon X. En imagerie médicale, le spectre d'énergie des rayons X couvre des énergies de 10 à 150 keV, et donc uniquement les effets Compton et photoélectriques ont lieu [KNOLL 2000].

1.1.1.2. Effet photoélectrique

L'effet photoélectrique correspond à l'interaction d'un photon incident d'énergie E_0 avec un électron d'une des couches internes de l'atome cible d'énergie de liaison E_i. Si $E_0 > E_i$, alors la totalité de l'énergie du photon est transférée à l'électron qui est alors éjecté du cortège électronique de l'atome cible (Figure 1.5). Le photo-électron ionisé possède alors une énergie cinétique égale à l'énergie E_0 moins son énergie de liaison E_i.

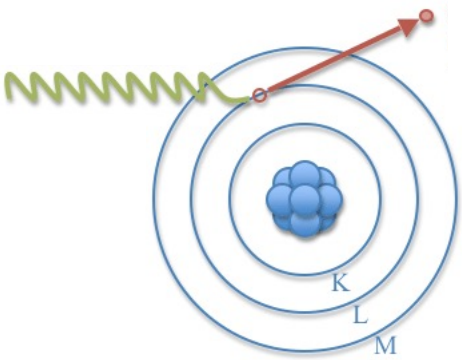


FIGURE 1.5. – Illustration de l'effet photoélectrique. En vert le photon incident et en rouge le photo-électron éjecté de l'atome cible.

Pour combler la lacune créée par l'ionisation d'un électron, l'atome va par la suite réarranger son cortège électronique pour revenir à un état stable, engendrant l'émission d'électrons Auger ou de photons de fluorescence.

La section efficace $\sigma_{ph}(\mathrm{E})$, correspondant à la probabilité d'interaction d'un rayon X avec un atome, dépend du numéro atomique Z effectif du milieu et de l'énergie du rayon X.
L'approximation est donnée par l'équation [DAVISSON 1965], [EVANS 1955] :

$$\sigma_{ph}(\mathrm{E}) \propto \frac{Z^n}{\mathrm{E}_0^{3.5}} \tag{1.5}$$

avec n un coefficient qui varie de 4 à 5 en fonction de l'énergie du photon. Le coefficient d'atténuation massique est proportionnel à la section efficace avec comme facteur de proportionnalité le rapport entre le nombre d'Avogadro et le nombre de masse du milieu.

Cette dépendance en fonction de l'énergie est représentée sur la Figure 1.6 sur laquelle nous pouvons observer des cassures dans les courbes de coefficients d'atténuation, qui correspondent aux énergies de liaison des différentes couches électroniques (K, L, M, de la plus proche à la plus éloignée du noyau). Les énergies de liaison sont donc dépendantes du numéro atomique Z de l'élément ainsi que de la couche électronique rencontrée. Afin d'éjecter un électron, le photon incident doit avoir une énergie supérieure à l'énergie de liaison de l'électron. Or, lorsque le photon possède une énergie supérieure à l'énergie de liaison d'une couche électronique, cela ouvre une nouvelle voie d'ionisation avec une densité électronique plus élevée (car la densité surfacique des électrons d'une couche électronique est plus faible que sur la couche qui lui est inférieure). Cela explique l'augmentation brutale du coefficient d'atténuation photoélectrique. Ces cassures pour chaque couche électronique sont appelées i-edge (avec i le nom de la couche électronique : K, L, M,...) et sont caractéristiques de l'atome cible. Elles pourront être utilisées comme signature de l'élément cible pour l'imagerie au K-edge que nous développerons au Chapitre 4.

1.1.1.3. Effet Compton

Contrairement à l'effet photoélectrique, lors d'un effet Compton le photon incident transmet seulement une partie de son énergie à un électron d'une couche périphérique, le reste étant donné à un nouveau photon diffusé avec un angle θ par rapport à la trajectoire du photon incident (Figure 1.7).

Ce photon est diffusé avec un angle θ compris entre 0 et 180°, qui dépend de l'énergie du photon incident E_0 et de l'énergie du photon diffusé E :

$$\cos\theta = 1 - \mathrm{m}_e\mathrm{c}^2\left(\frac{1}{\mathrm{E}} - \frac{1}{\mathrm{E}_0}\right) \tag{1.6}$$

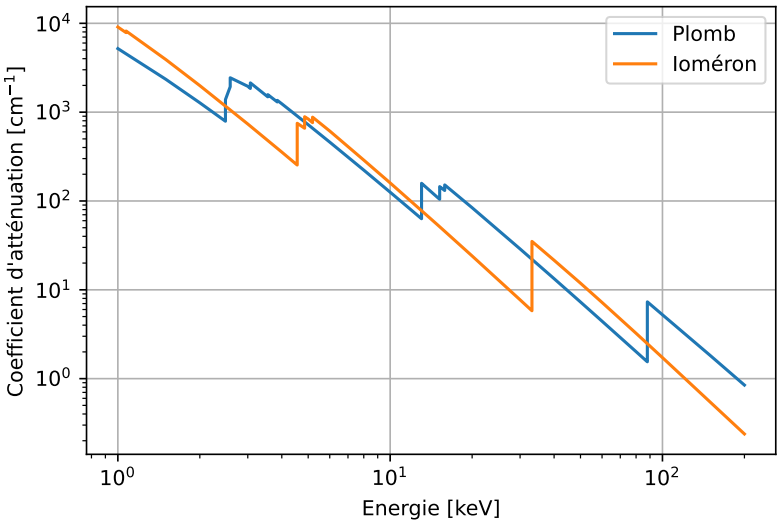


FIGURE 1.6. – Coefficient d'atténuation linéique photoélectrique en fonction de l'énergie des photons pour l'Ioméron (agent de contraste à base d'iode utilisé en imagerie) et le plomb. On peut voir les différentes cassures relatives aux *i*-edges des différentes couches électroniques : plus la couche électronique est proche du noyau et plus l'énergie de i-edge est élevée.

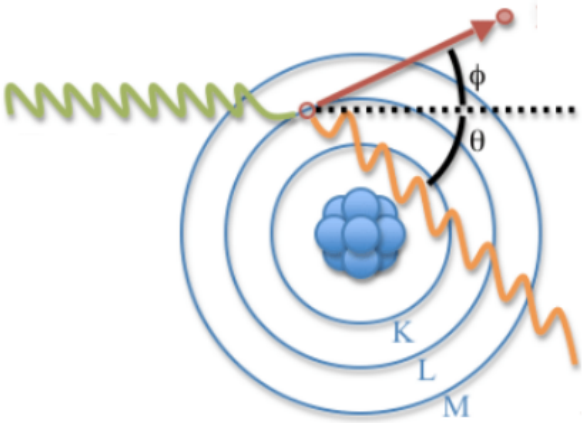


FIGURE 1.7. – Illustration de l'effet Compton. En vert le photon incident, en orange le photon diffusé avec un angle θ et en rouge l'électron éjecté.

avec $m_e c^2$ = 511 keV l'énergie de masse au repos de l'électron.

La section efficace de l'effet Compton dépend de la densité électronique du milieu traversé et est prédominante pour des énergies de photons allant de 100 keV à 10 MeV pour des atomes cibles de faible numéro atomique (Z <20) [KLEIN et al. 1929].

Dans le contexte de la tomodensitométrie, la présence de ces photons diffusés

Compton dégrade l'image car, comme nous le verrons dans la Section 2.1.6, nous considérons que la trajectoire des rayons X est rectiligne entre leurs points d'émission et leurs détections pour établir les équations de reconstruction 3D.

1.1.1.4. Effet Rayleigh

La diffusion Rayleigh (ou diffusion élastique ou cohérente) correspond à l'interaction d'un photon incident de faible énergie avec un électron non lié à l'atome (Figure 1.8). Le photon est entièrement absorbé par l'atome puis ré-émis avec la même énergie mais dans une direction différente de celle du photon incident. Cette interaction est non-ionisante car il n'y a pas de transfert d'énergie. En revanche, elle détériore la qualité des images puisque, comme pour l'effet Compton, la diffusion du photon génère un flou sur les images reconstruites.

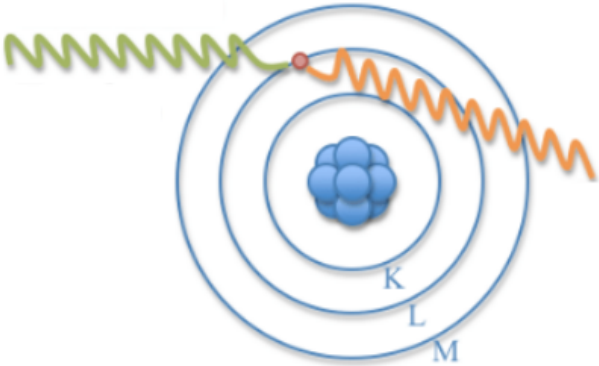


FIGURE 1.8. – Illustration de l'effet Rayleigh. En vert le photon incident et en orange le photon diffusé, de manière cohérente sans perte d'énergie.

1.1.2. Production de rayons X

Après avoir vu comment les rayons X interagissent avec la matière, nous allons maintenant nous intéresser à la production de rayons X pour l'imagerie médicale.

En radiologie, les rayons X sont produits par des tubes à rayons X. Dans un tube à rayons X, des électrons sont accélérés sous vide par une différence de potentiel appliquée entre une cathode (un filament) et une anode cible (Figure 1.9).
Les électrons produits par la cathode sont accélérés en direction de la cible dans laquelle ils seront ralentis. Deux mécanismes permettent le ralentissement des électrons et ainsi la production des rayons X :

— le rayonnement de freinage ou *Bremsstrahlung* : les interactions coulombiennes entre les électrons accélérés et les atomes de la cible déflectent les électrons, ce qui entraîne l'émission d'un rayonnement X induisant une perte d'énergie des électrons.

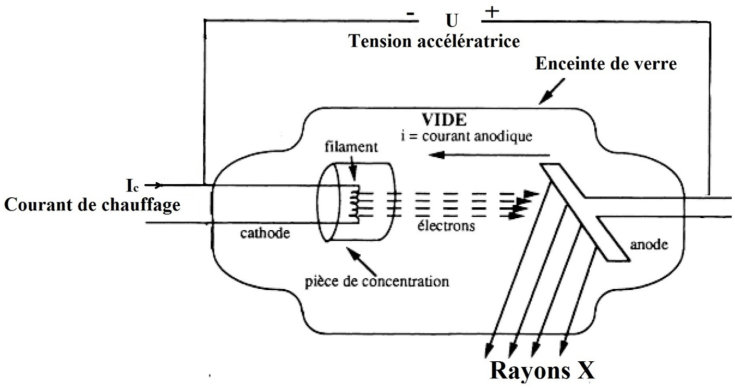


FIGURE 1.9. – Schéma du fonctionnement d'un tube à rayons X [*Tube à rayons X* 2018].

— la fluorescence : suite aux collisions entre les électrons et les atomes de la cible ou à l'interaction photoélectrique de rayons X produits par rayonnement de freinage dans la cible, les atomes de la cible sont ionisés. Leurs couches électroniques vont donc se réarranger pour qu'ils reviennent à un état stable en émettant des rayons X d'énergies égales à la différence d'énergie de liaison entre les deux couches impliquées dans ces transitions électroniques, comme illustrée sur la Figure 1.10.

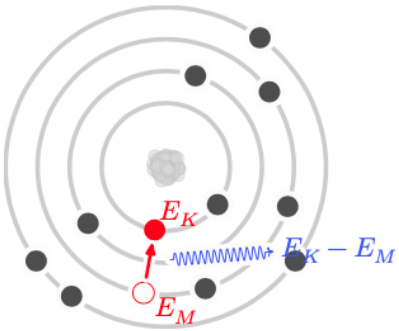
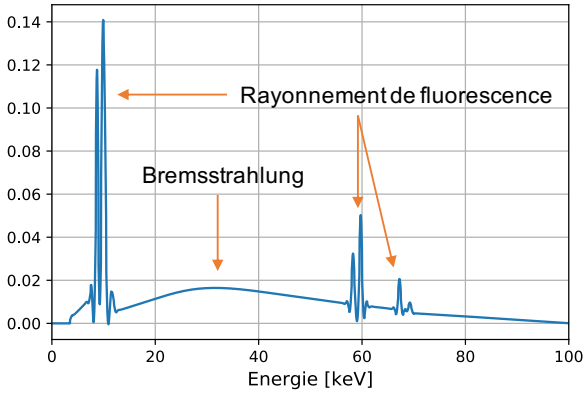
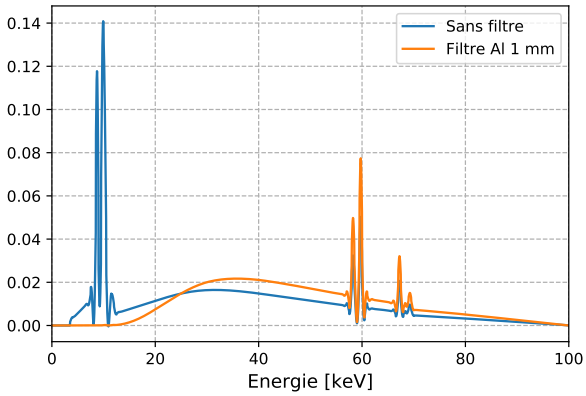


FIGURE 1.10. – Illustration du rayonnement de fluorescence. En rouge l'électron qui change de couche électronique pour stabiliser l'atome et en bleu le rayon X de fluorescence produit d'énergie E_K - E_M.

Le spectre d'énergie par rayonnement de freinage est continu entre 0 keV et l'énergie délivrée aux électrons par la tension appliquée entre l'anode et la cathode du tube à vide (pour mémoire, 1 eV correspond à l'énergie d'un électron accéléré par une tension de 1 V). Le spectre de rayons X correspondant à la fluorescence est donc constitué de raies d'émission caractéristiques correspondant aux différences d'énergies des couches électroniques de l'atome cible. La Figure 1.11 illustre ces différentes raies pour une cible en tungstène ainsi que la contribution du rayonnement de freinage dans le spectre de source.



(a) Spectre d'émission normalisé d'un tube à rayons X pour une cible en tungstène



(b) Spectre d'émission normalisé d'un tube à rayons X pour une cible en tungstène (en bleu) et lorsque l'on ajoute un filtre d'1 mm d'aluminium (en orange)

FIGURE 1.11. – (a) Spectre d'émission d'un tube à rayons X pour une cible en tungstène et (b) impact d'un filtre d'Aluminium placé à la sortie du tube à rayons X.

Le matériau de la cible est donc un paramètre important à prendre en compte puisqu'il implique la présence de raies dans le spectre et donc un nombre de photons plus important à certaines énergies. En TDM, il s'agit souvent d'une anode en tungstène (Z = 74), qui possède des raies de fluorescence de faibles énergies (aux alentours de 10 keV) ainsi que des raies de fluorescence à 58.2 et 67.2 keV.

Finalement, le spectre d'énergie des rayons X sortant du tube à rayons X correspond à la superposition du rayonnement de freinage et de la fluorescence X de la cible. La production de rayons X avec ces tubes à rayons X a un rendement très faible de l'ordre de 1 % seulement, les 99 % restant étant transformés en chaleur. Un système de refroidissement doit donc généralement être mis en place pour refroidir l'anode

du tube à rayons X.

Le flux de rayons X est quant à lui défini par l'intensité du courant appliqué à la cathode. Plus l'intensité est élevée et plus le flux d'électrons produit est important, ce qui augmente donc le flux de rayons X émis par le tube.

La plage des basses énergies du spectre peut elle être modulée par l'application de filtres métalliques. Ils vont permettre d'absorber les rayons de faible énergie (inférieure à 10 keV) appelés rayons X mous, qui seraient sinon immédiatement absorbés par les tissus mous et donc contribueraient à une irradiation supplémentaire et inutile des tissus puisqu'ils ne sont pas utiles à la reconstruction de l'image (Figure 1.11b). Les filtres vont donc permettre d'augmenter l'énergie moyenne des photons au détriment de l'intensité du faisceau qui est ainsi diminuée. On parle de durcissement de faisceau.

1.1.3. Détection des rayons X

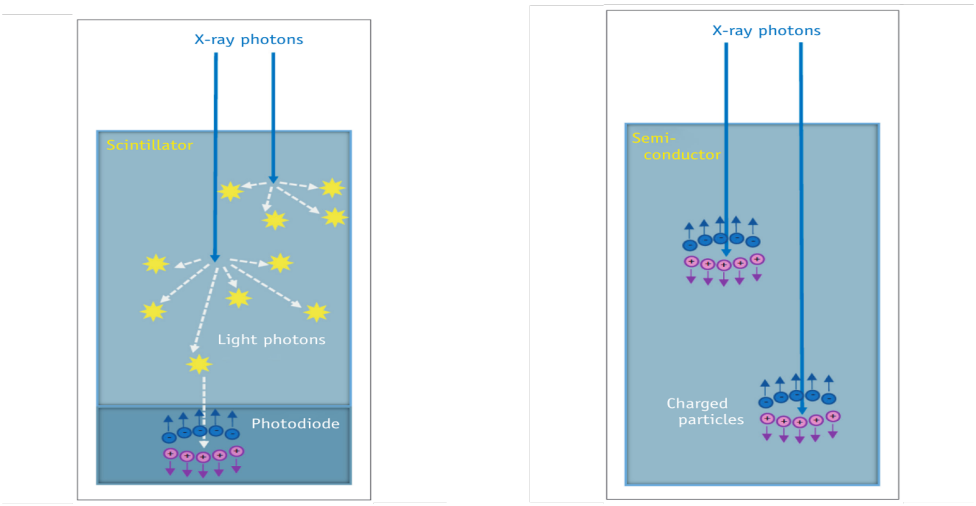
Après avoir expliqué comment les rayons X interagissent avec la matière et comment ils sont produits en imagerie médicale, nous allons maintenant nous intéresser à leur détection. Comme nous l'avons expliqué, le principe de la TDM est de mesurer les photons qui ont pu traverser la matière sans être absorbés lors d'une interaction photoélectrique ou Compton. Pour cela, il existe différentes catégories de détecteurs permettant de détecter les rayons X, à conversion directe ou indirecte et à intégration de charges ou à comptage de photons. Dans tous les cas, les photons doivent tout d'abord interagir avec un milieu sensible et y déposer leur énergie. Les différences entre ces catégories de détecteurs résultent en la manière dont cette énergie est convertie en un signal électrique et la manière dont ce signal est traité.

1.1.3.1. Détecteurs à conversion indirecte ou directe

Afin de convertir l'énergie en signal, les détecteurs utilisés dans la plupart des tomodensitomètres cliniques sont composés d'un scintillateur et d'un photodétecteur (Figure 1.12a). Les rayons X incidents interagissent avec le scintillateur et y déposent leurs énergies, générant ainsi des photoélectrons dont le dépôt d'énergie va créer des paires électron-trou dans le cristal. La recombinaison des paires électron-trou engendre alors l'émission de photons de scintillation visibles qui sont collectés par un photodétecteur pour transformer ce signal lumineux en un signal électrique qui sera par la suite analysé. Ce type de conversion du signal est une conversion indirecte puisque ce sont les photons lumineux qui sont collectés et non pas directement les photoélectrons.

Au contraire des détecteurs à conversion indirecte, les détecteurs à conversion directe sont composés d'un semi-conducteur (Figure 1.12b). Les rayons X incidents vont générer des photoélectrons en interagissant dans le semi-conducteur dont le dépôt d'énergie va créer des paires électron-trou en quantité proportionnelle à l'énergie déposée. L'application d'une différence de potentiel entre les faces du semi-conducteur va permettre aux charges libres de se déplacer pour être collectées par l'électronique de lecture. L'énergie nécessaire pour créer une paire électron-trou dépend du semi-

conducteur utilisé. Pour le silicium, elle est de 3.62 eV, tandis que pour l'arséniure de gallium (AsGa), elle monte à 4.2 eV.



(a) Détecteur à conversion indirecte composé d'un scintillateur et d'un photodétecteur (ici des photodiodes)

(b) Détecteur à conversion directe composé d'un semi-conducteur

FIGURE 1.12. – Schéma de détecteurs à conversion (a) indirecte et (b) directe [SO et al. 2021].

1.1.3.2. Détecteurs à intégration de charges ou à comptage de photons

Une fois l'énergie du photon incident convertie en un signal électrique, son traitement peut s'effectuer de deux manières. La première est d'intégrer le signal obtenu sur une plage de temps définie. La charge électrique est stockée dans chaque pixel pour être lue en fin d'intégration. Cette méthode donne une plus grande importance aux rayons de hautes énergies qui sont intégrés dans le temps et intègre également le bruit électronique intrinsèque du détecteur (bruit de courant noir émis en l'absence de photons), ce qui dégrade le rapport signal sur bruit à faible intensité du faisceau.

Les détecteurs à comptage de photons vont quant à eux détecter individuellement chaque photon arrivant sur le détecteur. L'énergie des photons détectés est alors comparée à un seuil de discrimination en énergie. Si elle est supérieure à ce seuil, la détection du photon est comptabilisée en incrémentant un compteur de photons. Ceci permet d'éliminer totalement le bruit électronique en réglant le seuil de discrimination au-dessus du bruit de courant noir. Par ailleurs, l'utilisation d'un ou plusieurs seuils d'énergie réglables permet le développement de l'imagerie spectrale que l'on détaillera au Chapitre 4.

1.1.3.3. Biais de détection

Lors de la détection des rayons X avec des détecteurs à comptage de photons, certains biais peuvent se produire, ce qui entraîne une mauvaise lecture du signal.

Le partage de charges
Lors de l'interaction d'un rayon X avec le capteur pixellisé, un nuage de paires électron-trou est créé. Puis, sous l'influence d'un champ électrique, les charges se déplacent vers l'électronique de lecture du pixel. Lorsque l'interaction du rayon X est proche de la frontière entre deux pixels, le nuage de charges est partagé entre les deux pixels, ce qui dégrade la résolution spatiale du détecteur. Ce partage de charge peut engendrer un double comptage de rayons X si le seuil de discrimination est suffisamment bas par rapport à l'énergie du rayon X détecté. Au contraire, si le seuil est plus haut, une perte de comptage peut résulter du partage de charges lorsque les charges collectées sont toutes deux inférieures au seuil de discrimination, ce qui réduit en quelque sorte la surface de détection active du pixel. Notons que cet effet est d'autant plus présent que les pixels sont petits. Par ailleurs, le partage de charge dépend aussi de l'épaisseur du capteur semi-conducteur (et donc de la distance parcourue par le nuage de charges) et de la tension appliquée au semi-conducteur pour faire migrer les charges.

L'effet d'empilement (ou *pile-up*)
L'effet d'empilement (ou *pile-up*) des charges se produit lorsque le flux de photons est élevé. Dans ce cas, deux rayons X peuvent arriver presqu'en même temps sur un pixel sans que l'électronique de lecture n'ait le temps de les discerner lors de l'analyse. Ils vont donc être vus comme un seul photon de grande énergie. Cela a pour conséquence de compter un photon avec une énergie plus grande que son énergie, faussant la mesure doublement, sur le nombre de photons incidents et sur l'énergie portée.

1.1.4. Principe de la TDM

Maintenant que nous avons présenté les différentes interactions que peuvent avoir les rayons X avec la matière ainsi que les différents éléments (tube à rayons X et détecteurs) du tomodensitomètre, nous allons présenter le principe de la tomographie par rayons X ou TDM.

En clinique, le tomodensitomètre se compose d'un tube à rayons X et d'un détecteur placés face à face sur une mécanique rotative (Figure 1.13). Le tube à rayons X et le détecteur de rayons X vont ainsi pouvoir tourner autour du patient (qui reste fixe) pour réaliser des projections (des radiographies) à différents angles répartis régulièrement tout autour du patient. Un filtre est placé à la sortie du tube à rayons X pour durcir le spectre comme nous l'avons vu à la Section 1.1.2 et à l'avant du détecteur, une grille de collimation permet d'éliminer les photons diffusés.

En préclinique, afin de faciliter la mise en place des prototypes, il est fréquent de retrouver une configuration inverse, avec une source de rayons X et un détecteur fixes

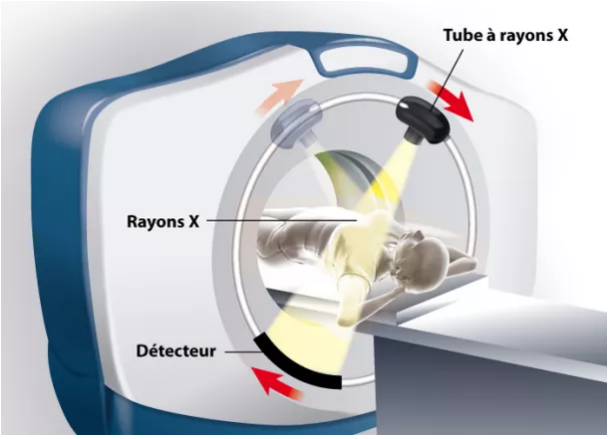


FIGURE 1.13. – Illustration d'un tomodensitomètre clinique.

et un porte objet/animal situé entre les deux permettant de faire tourner l'objet imagé sur lui-même.

Dans les deux cas, l'idée principale est de réaliser des radiographies, que l'on appellera projections, tout autour de l'objet à imager afin de pouvoir ensuite reconstruire le volume en 3D de l'objet à partir de ces différentes projections acquises à différents angles.

1.2. Reconstruction tomographique

Dans la section précédente, nous avons introduit les différents principes physiques permettant d'acquérir les projections avec un tomodensitmètre sous différents angles. Nous allons maintenant voir comment la reconstruction tomographique permet d'obtenir une reconstruction de l'objet en 3D à partir des projections coniques de l'objet.

Deux catégories d'algorithmes de reconstruction permettent de répondre à cette problématique : les algorithmes de reconstruction analytique et les algorithmes de reconstruction itérative. Dans cette partie, nous décrirons l'algorithme analytique FDK utilisant l'algorithme développé par Feldkamp, Davis et Kress [FELDKAMP et al. 1984]. Cet algorithme de reconstruction est une approximation conique de la méthode de rétroprojection filtrée des projections en éventail à une dimension.

1.2.1. Ligne de projection : interprétation par la Transformée de Radon

Soit un objet imagé représenté par une fonction $f(x,y)$ comme représenté sur la Figure 1.14. La Transformée de Radon défini par Johann Radon en 1917 permet de décrire les projections de l'objet comme étant l'intégrale de $f(x,y)$ le long de la ligne

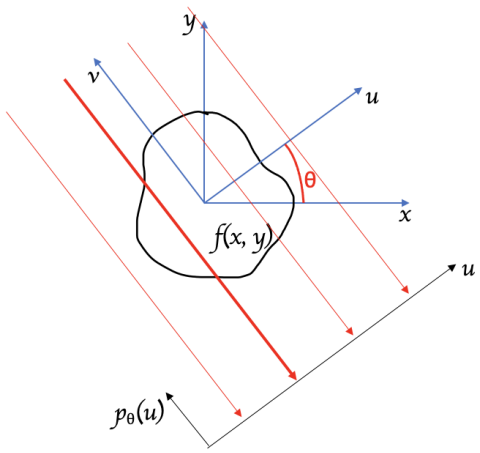


FIGURE 1.14. – Principe de projection parallèle où $p_\theta(u)$ est la projection de $f(x,y)$ le long de la ligne de projection représentée en rouge.

de projection :

$$p_\theta(u) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(u\cos\theta - v\sin\theta, u\sin\theta + v\cos\theta)dv \tag{1.7}$$

avec θ l'angle de rotation entre les repères (x,y) et (u,v) tels que

$$\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos\theta & -\sin\theta \\ \sin\theta & \cos\theta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} u \\ v \end{pmatrix}$$

En récrivant l'équation 1.7 à l'aide de la distribution de Dirac δ dans le repère (x,y) on obtient alors :

$$p_\theta(u) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x,y)\delta(x\cos\theta + y\sin\theta - u)dxdy \tag{1.8}$$

L'ensemble des projections pour les différents angles θ forme ainsi le sinogramme de l'objet imagé, comme illustré sur la Figure 1.15.

1.2.2. La rétroprojection : sommer les projections

Grâce à l'ensemble des projections, nous pouvons construire le sinogramme de l'objet comme illustré sur la Figure 1.15. Afin de pouvoir estimer $f(x,y)$ (qui est la fonction que nous voulons reconstruire), nous devons définir l'opérateur de rétro-projection permettant de sommer pour chaque point l'ensemble des contributions

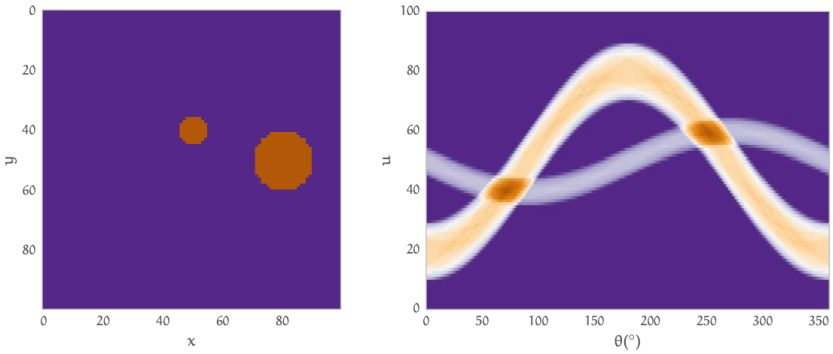


FIGURE 1.15. – Sinogramme représentant l'information de chaque projection des objets vus sous différents angles [Mathieu DUPONT 2014].

provenant des différentes projections aux différents angles θ. Ainsi, pour un point de coordonnées (x,y), sa valeur rétroprojetée est donnée par :

$$\mathrm{B[p](x,y)} : \int_0^{\pi} \mathrm{p}_\theta(\mathrm{u})\, d\theta \tag{1.9}$$

Cet opérateur de rétroprojection B[p] correspond alors à la Transformée duale de la Transformée de Radon (différente de la Transformée inverse).

1.2.3. Théorème de la coupe centrale

Le théorème de la coupe centrale permet de montrer que la Transformée de Fourier monodimensionelle (TF_1D) de la projection $\mathrm{p}_\theta(\mathrm{u})$ pour un angle donné θ est égale à la transformée de Fourier bidimensionnelle (TF_2D) de la fonction $f(\mathrm{x,y})$ à reconstruire le long de l'axe des fréquences ν_u perpendiculaire à l'axe de projection :

$$\begin{aligned}
\mathrm{P}_\theta(\nu_\mathrm{u}) &= \mathrm{TF}_{1D}[\mathrm{p}_\theta](\nu_\mathrm{u}) \\
&= \int_{-\infty}^{+\infty} \mathrm{p}_\theta(\mathrm{u}) e^{-2i\pi\nu_u \mathrm{u}} d\mathrm{u}
\end{aligned}$$

avec p_θ définit à l'équation 1.7 :

$$= \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} f(\mathrm{u}\cos\theta - \mathrm{v}\sin\theta, \mathrm{u}\sin\theta + \mathrm{v}\cos\theta) e^{-2i\pi\nu_u \mathrm{u}} d\mathrm{u}d\mathrm{v}$$

soit après changement de base avec $\mathrm{u} = \mathrm{x}\cos\theta + \mathrm{y}\sin\theta$:

$$\begin{aligned}
&= \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} f(\mathrm{x,y}) e^{-2i\pi\nu_u(\mathrm{x}\cos\theta + \mathrm{y}\sin\theta)} d\mathrm{x}d\mathrm{y} \\
&= \mathrm{TF}_{2D}[f(\mathrm{x,y})](\nu_\mathrm{u}\cos\theta, \nu_u\sin\theta)
\end{aligned}$$

1.2.4. Rétroprojection filtrée

1.2.4.1. En faisceaux parallèles

En considérant alors que f(x,y) est la Transformée de Fourier inverse de $F(\nu_x, \nu_y)$ =TF_{2D}[f] :

$$f(\mathrm{x,y}) = \mathrm{TF}_{2D}^{-1}[\mathrm{F}(\nu_x, \nu_y)] = \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} \mathrm{F}(\nu_x, \nu_y) e^{2i\pi(\nu_x \mathrm{x} + \nu_y \mathrm{y})} d\nu_x d\nu_y \tag{1.10}$$

En passant, en en utilisant les coordonnées polaires : $\nu_x = \nu_u \cos\theta$, $\nu_y = \nu_u \sin\theta$, $d\nu_x d\nu_y = \nu d\nu d\theta$ et avec u=x$\cos\theta$ + y$\sin\theta$

$$\begin{aligned} f(\mathrm{x,y}) &= \int_0^{+\infty}\int_0^{2\pi} \mathrm{F}(\nu_u \cos\theta, \nu_u \sin\theta) e^{2i\pi\nu_u(\cos\theta \mathrm{x} + \sin\theta \mathrm{y})} \nu_u d\nu_u d\theta \\ &= \int_0^{+\infty}\int_0^{2\pi} \mathrm{P}_\theta(\nu_u) e^{2i\pi\nu_u \mathrm{u}} \nu_u d\nu_u d\theta \end{aligned} \tag{1.11}$$

Le théorème de la coupe centrale que nous avons démontré plus haut nous permet de réécrire f(x,y) avec l'équation 1.11. Par symétrie, nous pouvons montrer que $\mathrm{P}_\theta(\nu_u + \pi) = \mathrm{P}_\theta(-\nu_u)$. En effet :

$$\begin{aligned} \mathrm{p}_\theta(\mathrm{u}) &= \mathrm{p}_{\theta+\pi}(-\mathrm{u}) \\ \mathrm{P}_{\theta+\pi}(\nu_u) &= \int_{-\infty}^{+\infty} \mathrm{p}_{\theta+\pi}(\mathrm{u}) e^{-2i\pi\nu_u \mathrm{u}} d\mathrm{u} = \int_{-\infty}^{+\infty} p_\theta(-\mathrm{u}) e^{-2i\pi\nu_u \mathrm{u}} d\mathrm{u} \\ &= \int_{-\infty}^{+\infty} \mathrm{p}_\theta(\mathrm{u}) e^{-2i\pi(-\nu_u)\mathrm{u}} d\mathrm{u} = \mathrm{P}_\theta(-\nu_u) \end{aligned}$$

En repartant de l'équation 1.11, nous pouvons désormais décomposer l'intégrale selon θ :

$$f(\mathrm{x,y}) = \int_0^{+\infty} \left[\int_0^{\pi} \mathrm{P}_\theta(\nu_u) e^{2i\pi\nu_u \mathrm{u}} d\theta + \int_\pi^{2\pi} P_\theta(\nu_u) e^{2i\pi\nu_u \mathrm{u}} d\theta \right] \nu_u d\nu_u \tag{1.12}$$

En posant $\theta = \theta' + \pi$:

$$\mathrm{u}_\theta = \mathrm{x}\cos\theta + \mathrm{y}\sin\theta \ = \mathrm{x}\cos(\theta' + \pi) + \mathrm{y}\sin(\theta' + \pi) = -\mathrm{x}\cos(\theta') - \mathrm{y}\sin(\theta') = \mathrm{u}'_\theta = -\mathrm{u}$$

$$\int_\pi^{2\pi} \mathrm{P}_\theta(\nu_u) e^{2i\pi\nu_u \mathrm{u}} d\theta = \int_0^{\pi} \mathrm{P}_{\theta'+\pi}(\nu_u) e^{2i\pi\nu_u(-\mathrm{u})} d\theta' = \int_0^{\pi} \mathrm{P}_{\theta'}(-\nu_u) e^{-2i\pi\nu_u \mathrm{u}} d\theta'$$

On peut donc réécrire l'équation 1.12 :

$$\begin{aligned} f(\mathrm{x,y}) &= \int_0^{+\infty} \left[\int_0^{\pi} \mathrm{P}_\theta(\nu_u) e^{2i\pi\nu_u \mathrm{u}} d\theta + \int_0^{\pi} \mathrm{P}_\theta(-\nu_u) e^{-2i\pi\nu_u \mathrm{u}} d\theta \right] \nu_u d\nu_u \\ &= \int_0^{\pi} \left[\int_0^{+\infty} \mathrm{P}_\theta(\nu_u) e^{2i\pi\nu_u \mathrm{u}} \nu_u d\nu_u + \int_{-\infty}^{0} P_\theta(\nu_u) e^{2i\pi\nu_u \mathrm{u}} (-\nu_u) d\nu_u \right] d\theta \\ &= \int_0^{\pi} \left[\int_{-\infty}^{+\infty} \mathrm{P}_\theta(\nu_u) e^{2i\pi\nu_u \mathrm{u}} |\nu_u| \, d\nu_u \right] d\theta \end{aligned} \tag{1.13}$$

Avec l'opérateur de rétroprojection défini à la Section 1.2.2, on peut définir $f(\mathrm{x,y})$ comme étant :

$$f(\mathrm{x,y}) = \mathrm{B}[\mathrm{TF}_{1D}^{-1}[|\nu_u| \mathrm{P}_\theta]](\mathrm{x,y}) \tag{1.14}$$

L'objet $f(\mathrm{x,y})$ à reconstruire correspond donc à la rétroprojection des projections filtrées (équation 1.9). Le filtre est un filtre rampe dont le gabarit fréquentiel est défini par la valeur absolue de la fréquence $|\nu_u|$. Ce filtre n'est pas borné donc il amplifie les hautes fréquences au-delà de la fréquence de Nyquist imposée par le pas d'échantillonnage des pixels de détection et donc le bruit sur les images. Afin de limiter cet effet, une fenêtre passe-bas d'apodisation pour couper les hautes fréquences et atténuer les oscillations de Gibbs résultant de l'utilisation de l'algorithme de Transformée de Fourier rapide (ou FFT pour *Fast Fourier Transform*) est utilisé.

1.2.4.2. En faisceaux en éventail

Dans les sources de rayons X utilisées dans le domaine médicale, les faisceaux sont divergents et non parallèles car il faudrait une source à l'infini ou des moyens de collimation permettant de se rapprocher d'un faisceau parallèle. Nous allons donc maintenant décrire la rétroprojection filtrée pour une géométrie en éventail (Figure 1.16a).

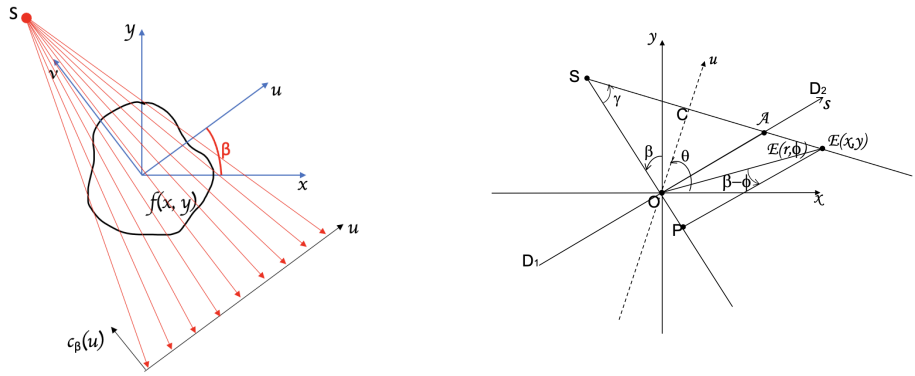
Soit S la source de rayons X, $(\mathrm{D_1D_2})$ la droite représentant le pixel de détection paramétré par la distance OA, tournés par rapport au système d'axe O_{xy} d'un angle β (Figure 1.16b) ; alors chaque rayon de projection décrit un angle γ par rapport au rayon de projection du cas parallèle. Le passage entre les données parallèles et coniques est alors donné par :

$$u = s\cos\theta \qquad \theta = \beta + \gamma$$

En coordonnées polaires (r, ϕ), la reconstruction tomographique de f est donnée par :

$$f(\mathrm{r}, \phi) = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} \frac{1}{\mathrm{U}^2} \left(\left[\frac{\mathrm{D}}{\mathrm{D}^2 + \mathrm{s}^2} \times \mathrm{C}_\beta \right] * \mathrm{h} \right)(\mathrm{s}) d\beta \tag{1.15}$$

avec $\mathrm{U} = \frac{\mathrm{D} + \mathrm{r}\sin(\beta - \phi)}{\mathrm{D}}$ et D la distance du point source à l'origine.



(a) Principe de projection en éventail où $c_\beta(u)$ est la projection de f(x,y) le long des lignes de projections représentées en rouge.

(b) Schéma des paramètres utilisés pour la reconstruction.

FIGURE 1.16. – Illustration de la rétroprojection en faisceau en éventail.

1.2.4.3. En faisceau conique

La géométrie conique 3D peut être reconstruite par la méthode FDK [FELDKAMP et al. 1984] en traitant chaque plan du cône de détection séparément, ce qui correspond à une reconstruction en éventail de chaque plan, après une pondération par un facteur dépendant de la géométrie. La reconstruction est exacte lorsqu'il s'agit du plan transverse comprenant la source, mais perd en qualité lorsque l'on s'éloigne du plan médian, créant alors des artefacts sur l'image.

1.3. Caractéristiques des images en TDM

Après avoir décrit comment la reconstruction du volume 3D était réalisée à partir des différentes projections, nous allons maintenant nous intéresser aux caractéristiques des images en TDM, les différents artefacts que nous pouvons avoir ou encore la résolution spatiale des images.

1.3.1. Bruit et artefacts

Suite à la reconstruction, la qualité du volume obtenu dépend de divers paramètres physiques intrinsèques au système et au protocole d'imagerie (détecteur, source de rayons X, nombre de projections réalisées autour de l'objet, durée de pose, etc.). Cela va donc engendrer du bruit sur les images et certains artefacts.

Tout d'abord, le bruit de l'image nous permet de mesurer la qualité de l'image en mesurant la puissance du signal rapportée à la puissance du bruit, on parle de rapport signal sur bruit (ou *Signal to Noise Ratio*) (SNR). Le bruit correspond à la variation du signal dans un milieu homogène. Le signal correspond quant à lui une approximation

du coefficient d'atténuation linéique reconstruit pour chaque voxel, puisque suite à la reconstruction nous obtenons une carte des coefficients d'atténuation linéique à partir de l'équation 1.4. En effet, les projections sont estimées par le logarithme de (I/I_0), qui est l'intégrale de ligne des coefficients d'atténuation linéiques le long de la trajectoire des rayons X, donc il s'agit bien d'une projection des coefficients d'atténuation linéiques. De plus, dans le cas d'une source polychromatique, cette carte des coefficients d'atténuation est biaisée par le fait que les photons de plus faibles énergies sont stoppés sur leur parcours. Le spectre de rayons X qui arrive sur les détecteurs ne contient que des photons de haute énergie, ce qui entraine des erreurs de mesure des détecteurs. Les valeurs reconstruites peuvent donc être dispersées à cause de différents paramètres physiques :

— bruit de Poisson : pour un détecteur à comptage de photons, le comptage de rayons X par un pixel suit une loi de Poisson. Pour un même faisceau, un même temps d'exposition (durée de pose), le comptage aura alors une dispersion $\sigma = \sqrt{N}$, avec N le nombre de coups comptés ;
— bruit électronique : pour les détecteur à intégration de charges, le bruit électronique ajoute des statistiques de comptage qui faussent le résultat ;
— bruit de reconstruction : il est induit par les approximations de la reconstruction tomographique.

Certains paramètres d'acquisition peuvent être ajustés afin de réduire le bruit. Le rapport signal sur bruit étant égal à la moyenne du nombre de coup compté divisé par l'écart-type, on a pour un détecteur à comptage de photons :

$$\mathrm{SNR} = \frac{N}{\sqrt{N}} = \sqrt{N} \tag{1.16}$$

La qualité d'une image étant meilleure quand le SNR est élevé, plus le nombre de photons détectés est grand et meilleure sera la qualité de l'image. Augmenter le temps d'exposition, le courant de la source ou utiliser des filtres appropriés pour augmenter le taux de comptage aura une influence sur la qualité des images.

Par ailleurs, le bruit de reconstruction est directement lié au nombre de projections et à leur échantillonnage. Un faible nombre de projections entraîne un plus grand bruit de reconstruction. Le nombre de projections P devient optimal en prenant $P = \frac{\pi}{2}N$, avec N la largeur du détecteur en nombre de pixel [PEYRIN et al. 1996].

Différents artefacts peuvent aussi être présents sur les images reconstruites. Il s'agit d'anomalies sur les images qui ne représentent pas la réalité et faussent la valeur du pixel. Il en existe différentes catégories [BARRETT et al. 2004] :

1. Artefacts dus à la physique :
   — durcissement de faisceau (ou *beam hardening*) (Figure 1.17a) : ce phénomène est dû au faisceau polychromatique utilisé en TDM. Lors du parcours des photons à travers la matière (et notamment à travers un objet ayant un coefficient d'atténuation élevé) l'énergie moyenne des rayons X augmente

puisque les rayons X de faible énergie sont atténués plus rapidement que les rayons X de haute énergie sur le parcours. Par conséquent, l'énergie moyenne des photons détectés qui sont passés par le centre de l'objet augmente par rapport à celle des photons détectés qui ne sont pas passés par le centre, mais uniquement en périphérie de l'objet, puisque la quantité de matière traversée est moindre. Il en résulte une augmentation de l'intensité du signal reconstruit sur les bords de l'objet par rapport à son centre puisque le coefficient d'atténuation diminue avec l'énergie des rayons X. De plus, si des objets absorbants sont proches, on peut observer une traînée reconstruite entre eux. Pour limiter l'apparition de cet artefact, l'utilisation de filtres permet de durcir le faisceau en amont de l'objet et donc de limiter l'impact du durcissement de faisceau à l'intérieur de l'objet.

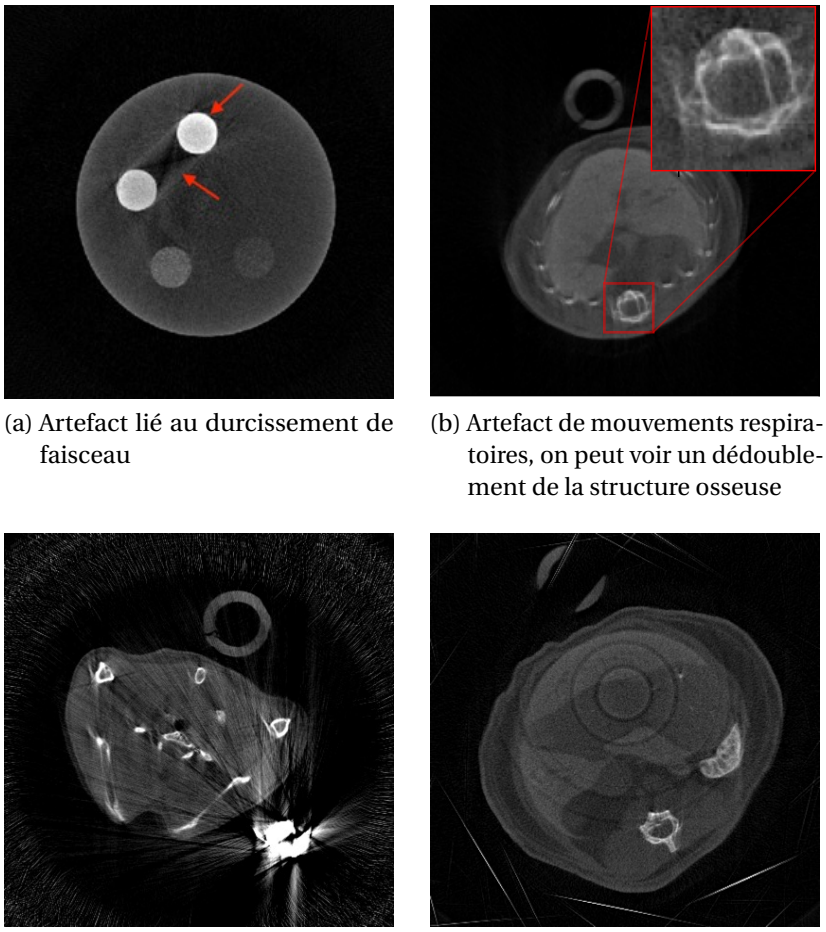
— effet de volume partiel : cet artefact se produit en présence de structures très atténuantes dont la taille est inférieure à la résolution spatiale de l'image reconstruite. La valeur reconstruite dans un voxel de l'objet est alors inférieure à l'atténuation de l'objet. Afin de limiter cet effet, on peut modifier le facteur de grandissement de manière à ce que la taille de l'objet soit supérieure à la résolution spatiale de l'image reconstruite.

— *photon starvation* ou artefact d'appauvrissement du flux de photons : cet artefact a lieu derrière des objets très absorbants qui atténuent quasiment tous les rayons X. Cela engendre des artefacts en forme de stries sur l'image.

2. Artefacts causés par l'objet/les patients :
   — artefacts de mouvement : lorsqu'il y a un mouvement de l'objet ou du patient pendant l'acquisition, il en résulte des zones d'ombres ou de surbrillance. On peut aussi voir des dédoublements au niveau de certaines structures comme illustré en Figure 1.17b dans le cas de scans de petit animal. Ces mouvements sont dus à la respiration ou au rythme cardiaque du patient. Ils peuvent être limités par une meilleure synchronisation de l'acquisition avec les différents mouvements physiologiques (une approche sera détaillée dans la Section 2.2.5).
   — artefacts métalliques : des parties métalliques peuvent également entraîner des stries dans l'image (Figure 1.17c). Ces parties métalliques sont apportées par le patient, il peut s'agir de prothèse dentaire par exemple ou dans le cas de l'imagerie préclinique les souris portent souvent à l'oreille une petite boucle métallique portant leur identification. Ces objets métalliques, de part leur densité importante, sont à l'origine d'une atténuation totale, à laquelle va s'ajouter des artefacts de durcissement de faisceau ou de volume partiel suivant leur taille.
3. Artefacts causés par le détecteur :
   — artefacts circulaires : lorsque des pixels sont défaillants ou mal calibrés dans le détecteur, cela engendre une erreur de comptage qui se répercute au même endroit dans toutes les projections. Lorsque le volume est reconstruit, cette erreur propagée sur tout le volume crée des artefacts en forme d'anneaux sur l'image (Figure 1.17d). Pour limiter ces artefacts il faut masquer les pixels que

l'on sait mal calibrés ou défaillants afin de ne pas prendre en compte leurs valeurs de taux de comptage lors de la reconstruction.

4. Artefact dû au faisceau conique (*cone beam artefact*) : cet artefact est lié à la méthode de reconstruction FDK. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, cette méthode prend en compte des faisceaux en éventail rapportés sur des plans inclinés par une règle de Thalès. Or, dans le cas de la TDM, le faisceau est conique donc la méthode de reconstruction ne permet pas de reconstruire exactement l'objet en dehors du plan médian. Cela se caractérise par des déformations géométriques sur le volume reconstruit à ses extrémités les plus lointaines du plan médian.



(a) Artefact lié au durcissement de faisceau

(b) Artefact de mouvements respiratoires, on peut voir un dédoublement de la structure osseuse

(c) Artefact métallique dû à la présence d'une boucle en métal sur l'oreille d'une souris

(d) Artefacts circulaires

FIGURE 1.17. – Illustration des différents artefacts pouvant être présents sur les images TDM.

1.3.2. Résolution spatiale

En TDM, la résolution spatiale est un point important pour connaître les limites de la détection et du diagnostic. La résolution spatiale est définie comme étant la plus petite distance à partir de laquelle on peut distinguer deux objets. Elle est caractérisée par la taille des pixels du détecteur mais aussi par la magnification (facteur de grandissement) de l'objet imagé (*i.e.* le zoom appliqué, défini par le rapport entre les distances source-objet et source-détecteur). Enfin, une limitation de la résolution spatiale est imposée par la taille du foyer de la source.

Dans ce chapitre, nous avons introduit les différents paramètres physiques nécessaires à la tomodensitométrie. Les principes physiques des interactions des rayons X dans la matière nous ont ainsi permis de détailler comment ces rayons X étaient produits et détectés en tomodensitométrie. Ensuite, nous avons pu voir comment le volume était reconstruit à partir des différentes projections acquises. Enfin, quelques aspects critiques ont pu être apportés pour commenter les qualités des images et les potentiels artefacts pouvant apparaître. Toute cette introduction à la tomodensitométrie nous permet par la suite de décrire le prototype de micro tomodensitométrie PIXSCAN-FLI qui a été développé au CPPM.

2. Chapitre 2. Application au petit animal : le prototype PIXSCAN-FLI pour réaliser des études précliniques

Sommaire

2.1. Présentation du prototype PIXSCAN-FLI 49
2.1.1. Enceinte blindée 50
2.1.2. Bloc source et porte-filtres 51
2.1.3. Bloc animal et station d'anesthésie 53
2.1.4. Bloc détecteur et caméra à pixels hybrides 54
2.1.5. piXface : une interface d'acquisition 58
2.1.6. Reconstruction des images 59
2.1.6.1. Prise en compte des géométries du détecteur et du PIXSCAN-FLI 59
2.1.6.2. Application de l'algorithme FDK 61
2.1.6.3. Conversion en Unités Hounsfield 62
2.2. Protocole de scan pour le petit animal 62
2.2.1. Introduction à l'éthique en expérimentation animale 63
2.2.2. Choix d'un agent de contraste 64
2.2.3. Paramètres de scan 65
2.2.4. Dose reçue par l'animal 67
2.2.5. Prise en compte des mouvements respiratoires 68
2.2.5.1. Contexte 68
2.2.5.2. Protocole utilisé et résultats 69
2.2.6. Résumé de l'utilisation de ce protocole d'acquisition 70
2.3. Analyse des scans : problématique de la segmentation de tumeurs . . . 70
2.3.1. Introduction au *Deep Learning* (DL) 73
2.3.2. Construction de la base de données 75
2.3.3. Construction du modèle de Deep Learning 77
2.3.3.1. Réseau de neurones convolutifs : architecture U-Net . . 77
2.3.3.2. Hyperparamètres du réseau 79
2.3.3.3. Évaluation du modèle 80

2.3.4. Résultats 81
2.3.4.1. En 2D 81
2.3.4.2. En 3D 83
2.3.5. Limites 85

Dans ce chapitre nous décrirons dans un premier temps PIXSCAN-FLI, un prototype de micro-tomodensitométrie à comptage de photons développé par l'équipe de recherche imXgam du CPPM. Nous en détaillerons les différents composants puis son utilisation pour des applications directes sur le petit animal. Enfin, nous décrirons comment l'analyse des images peut être améliorée et facilitée par une approche par apprentissage profond (ou *Deep Larning*) (DL).

2.1. Présentation du prototype PIXSCAN-FLI

Le prototype PIXSCAN-FLI est un scanner préclinique, qui a été développé au CPPM par l'équipe de recherche imXgam. Le projet PIXSCAN a été élaboré en vue d'évaluer l'application à la tomographie par rayons X de la technologie des pixels hybrides (pour plus de détails, cf. Section 2.1.4), qui a été initialement développée pour la construction de trajectographes pour les expériences de physique des particules. Le projet PIXSCAN a connu différentes générations d'imageurs avec les prototypes PIXSCAN I et II, qui ont permis de mettre au point le système d'imagerie par comptage de rayons X, pour finalement aboutir à la construction du prototype PIXSCAN-FLI pour le Centre Européen de la Recherche en Imagerie Médicale (CERIMED), qui se trouve sur le campus Timone d'Aix-Marseille Université (AMU).

Au début des années 2000, le premier micro-tomodensitomètre (TDM) dédié au petit animal développé par le CPPM était le prototype PIXSCAN I (Figure 2.1). Il était constitué d'une caméra basée sur le circuit intégré (ou *chip*) XPAD2 hybridé avec un capteur de silicium constitué de pixels de $330 \times 330\ \mu m^2$. Comme la grande taille de ces pixels limitait la résolution spatiale pour l'application au petit animal, une troisième génération XPAD3 du circuit intégré a été conçue à partir du milieu des années 2000 avec des pixels de $130 \times 130\ \mu m^2$ au lieu de pixels de $330 \times 330\ \mu m^2$ [PANGAUD, Stephanie BASOLO et al. 2007][PANGAUD, S. BASOLO et al. 2007].

Finalement, au vu des bons résultats obtenus avec les prototypes PIXSCAN I [DELPIERRE et al. 2007] et II [CASSOL, DUPONT et al. 2016], le projet PIXSCAN-FLI a été financé en 2015 par le Programme d'Investissement d'Avenir (PIA) France Life Imaging (FLI) pour la construction d'un micro-tomodensitomètre doté d'une caméra S540 (pour plus de détails, cf. Section 2.1.4) fabriqué par la startup du CPPM imXPAD créée en 2010.

FIGURE 2.1. – Photographies du prototype PIXSCAN I [Rana KHOURY 2008].

2.1.1. Enceinte blindée

Le prototype PIXSCAN-FLI est constitué d'une enceinte blindée de 7 mm de plomb (Figure 2.2). Ce blindage a pour fonction de protéger l'extérieur des rayons X générés à l'intérieur de l'enceinte de telle sorte que la limite de débit de dose imposée par la réglementation et en vigueur pour le travail en zone surveillée (débit de dose efficace corps-entier inférieur à 7,5 μSv/h) soit toujours respectée. Le prototype a pour dimensions L 1500 × P 900 × H 1050 mm^3 et pèse 1 tonne.

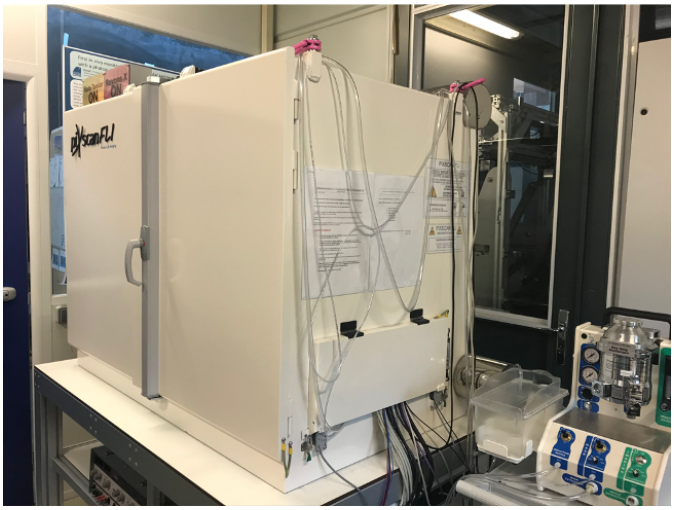


FIGURE 2.2. – Photographie prise au CPPM de l'enceinte blindée du prototype PIXSCAN-FLI.

L'enceinte est composée de deux portes s'ouvrant à la française sur la face avant afin de permettre l'accès au système d'imagerie. Celui-ci est constitué de trois blocs (Figure 2.3) - le bloc source, le bloc animal et le bloc détecteur - qui seront détaillés dans les sections suivantes. Une trappe formant une chicane sur la face latérale droite permet quant à elle le passage des câbles électriques ainsi que des câbles de la station

d'anesthésie, présentée en Section 2.1.3.

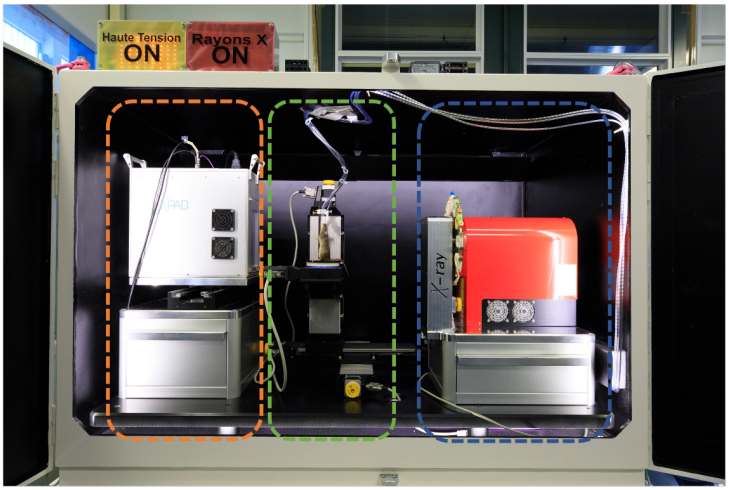


FIGURE 2.3. – Photographie du système d'imagerie du prototype PIXSCAN-FLI composé de trois blocs.

Au-dessus de l'enceinte blindée, deux signalisations lumineuses réglementaires avertissent de la mise sous haute tension de l'appareil (Haute Tension ON) et de la génération de rayons X (Rayons X ON).

2.1.2. Bloc source et porte-filtres

Le tube à rayons X installée dans le prototype PIXSCAN-FLI est une source à anode de tungstène commercialisée par Hamamatsu Photonics. Elle permet de générer un faisceau de rayons X de 150 kVp avec une intensité de 500 μA. Les différentes caractéristiques de la source de rayons X sont résumées dans le Tableau 2.1.

Le faisceau émis par la source est conique et peut avoir trois tailles de point focal différentes. La diminution de la taille du point focal implique une diminution de la puissance de la source, c'est-à-dire du nombre de photons émis, mais elle permet aussi une meilleure résolution spatiale. Dans un contexte d'imagerie du petit animal, nous avons choisi pour la suite de travailler avec le point focal le plus large de 50 μm afin d'obtenir une statistique la meilleure possible tout en garantissant une résolution spatiale suffisante pour des études in vivo chez la souris.

Pour assurer la sécurité, la source de rayons X est contrôlée par une boucle *interlock* qui empêche le tir de rayons X tant que les portes ne sont pas fermées et verrouillées. Par ailleurs, un obturateur (ou *shutter*) en plomb se trouve devant la source et peut être commandé pour laisser passer ou pas le flux de rayons X.

Enfin, afin d'assurer la longévité de la source et de préserver le filament, une étape de préchauffage du filament, appelée *warm-up*, a été implémentée et doit être lancée après une longue période de non-utilisation. Elle consiste en la mise sous tension progressive de la source, en balayant toutes les énergies par palier. Le *warm-up* dure environ 15 min lorsque la dernière utilisation date de moins d'un mois et augmente

Fournisseur	Hamamatsu Photonics		
Modèle	L12161-07		
Cible	Tungstène (W)		
Tension	40 à 150 kVp		
Intensité	10 à 500 μA		
Taille du point focal [μm]	small focus	medium	large
	7	20	50
Fenêtre de béryllium	200 μm		
Angle d'émission	43°		

TABLEAU 2.1. – Tableau récapitulatif des caractéristiques du tube à rayons X installé dans le prototype PIXSCAN-FLI.

avec le temps écoulé depuis la dernière utilisation.

Un deuxième composant du bloc source est une roue à filtres (Figure 2.4). Cette roue, qui est composée de 12 emplacements, permet de positionner des porte-filtres devant la source pour durcir le spectre d'énergie des rayons utilisés pour nos acquisitions avec des filtres solides ou liquides (comme par exemple une solution d'iode).

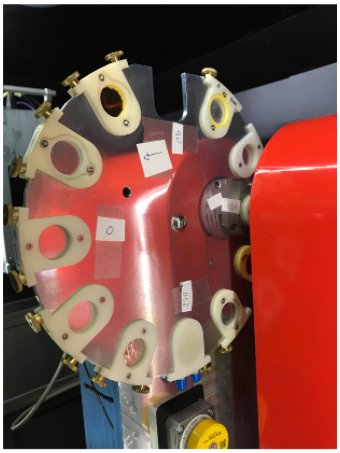


FIGURE 2.4. – Photographie de la roue à filtres placée devant la source de rayons X.

Le spectre d'énergie d'une source à anode de tungstène ainsi que l'impact de différents filtres sur ce spectre sont représentés sur la Figure 2.5.

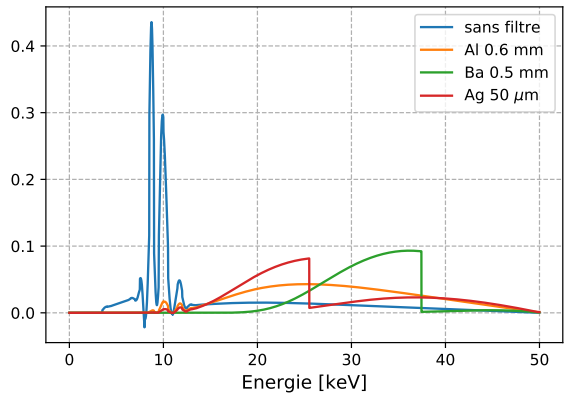


FIGURE 2.5. – Spectre d'énergie d'une source à anode de tungstène simulés avec et sans filtre. Les spectres sont normalisés par leur intégrale. Les cassures présentes dans les spectres correspondent aux énergies de liaison de la couche K des matériaux de filtration (*K-edge*).

2.1.3. Bloc animal et station d'anesthésie

Le bloc animal est constitué d'une plate-forme rotative guidée par trois moteurs permettant des translations latérale, verticale et horizontale selon les axes x, y et z, respectivement, comme illustré sur la Figure 2.6. La précision de ces moteurs, qui permettent de positionner correctement l'animal par rapport au détecteur et de choisir le grandissement, est de l'ordre de 10 μm.

Le moteur pas à pas rotatif assure une rotation de l'objet imagé sur 360° afin de prendre des images sous des angles différents pour permettre sa reconstruction tomographique. Il peut atteindre une vitesse angulaire de 20 ° et sa résolution de pas de 0.2 millième de degré permet d'acquérir un grand nombre de projections par tour.

Afin de réaliser des scans du petit animal, une station d'anesthésie gazeuse à l'isoflurane Minerve (Figure 2.7) complète l'équipement du prototype PIXSCAN-FLI. Cette station d'anesthésie peut alimenter en même temps une cage à induction ainsi que deux masques, avec un réglage indépendant du débit d'oxygène et de la concentration en isoflurane. Le masque est attaché à un tuteur vertical afin de maintenir l'animal en position verticale pendant les acquisitions. Deux tuyaux alimentés par la station d'anesthésie sont reliés au masque, l'un qui envoie de l'isoflurane et l'autre le récupère pour être éliminé dans une cartouche absorbante.

Lors d'un scan, la souris est tout d'abord anesthésiée dans la cage à induction avec 3 % d'isoflurane et 1.2 L/min d'O_2 pendant environ 2 minutes. Elle est ensuite placée sur la griffe dent avec le masque (Figure 2.8), qui permet de maintenir une anesthésie à 1.5 % d'isoflurane et 0.4 L/min d'O_2 en moyenne. Lorsque nous observons une respiration trop rapide ou saccadée, la concentration d'isoflurane envoyée dans le masque est réduite. Le débit et la concentration sont adaptés en fonction des mouvements respiratoires de chaque souris.

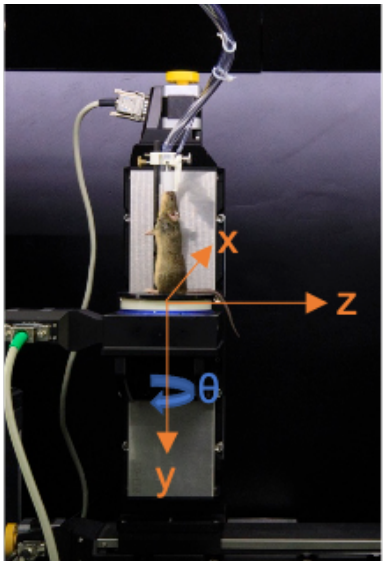


FIGURE 2.6. – Bloc animal : les différents axes des moteurs sont illustrés ainsi que le positionnement de l'animal sur la platine de rotation à l'aide d'une griffe de dent intégrée au masque d'anesthésie alimenté par les tuyaux permettant de délivrer un flux d'isoflurane sur le nez de l'animale. Le masque est supporté par un tuteur vertical en fibre de carbone, lui-même fixé sur la platine.

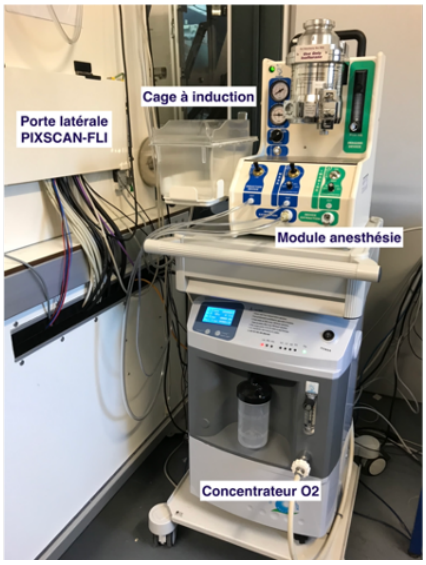
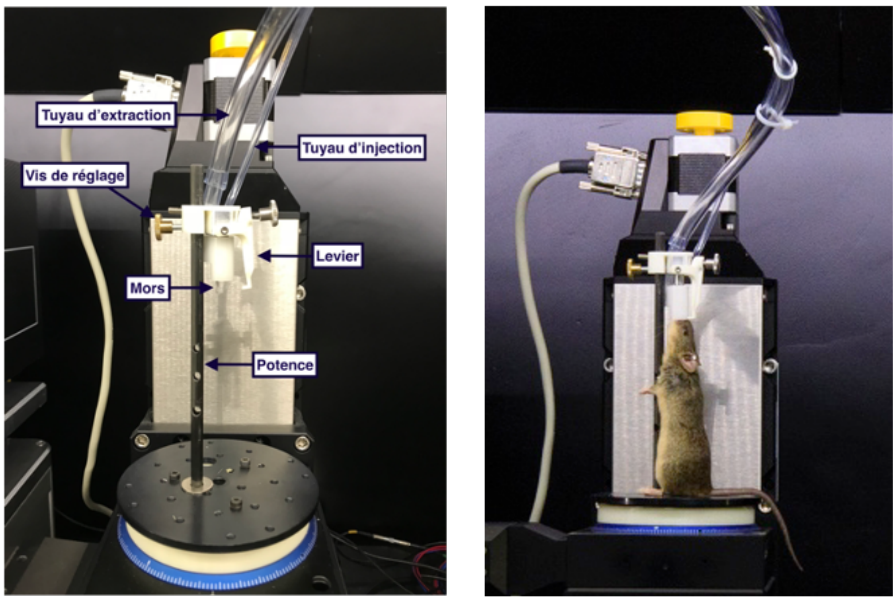


FIGURE 2.7. – Station d'anesthésie Minerve.

2.1.4. Bloc détecteur et caméra à pixels hybrides

La caméra à rayons X du prototype PIXSCAN-FLI est montée sur un support motorisé permettant de positionner le détecteur souhaité en face de la source de rayons X. La caméra S540 de la startup imXPAD est constituée de pixels hybrides utilisant le



(a) (b)

FIGURE 2.8. – Photographies (a) de la platine de rotation munie d'un tuteur vertical en fibre de carbone supportant le masque d'anesthésie et (b) d'une souris anesthésiée positionnée sur la platine de rotation.

circuit intégré (ou*chip*) XPAD3.2-S développé au CPPM [CHANTEPIE 2008], [PANGAUD, Stephanie BASOLO et al. 2007], [BUTON et al. 2014]. La caméra est composée de 8 barrettes de 7 *chips*. Chaque *chip* comprend 80 colonnes de 120 pixels de 130 × 130 μm^2, chacun connecté par une microbille à une diode de même dimension gravée sur un capteur en silicium de 500 μm d'épaisseur. Chaque barrette de silicium comprend par conséquent un peu moins de 70 000 (exactement 120 × 80 × 7 = 67 200) pixels et mesure environ 7 cm de long par 1 cm de large (Figure 2.9).

Les chips étant lus par le bas de colonne, les barrettes sont assemblées en tuiles inclinées de 7° pour permettre un recouvrement d'une dizaine de pixels maximum entre elles (Figure 2.10). Cela permet ainsi d'éviter les zones mortes et de faire une imagerie corps entier d'une souris comme montré sur la Figure 2.11. En effet, la taille effective de la caméra, qui comporte un peu plus de 500 000 pixels, est de 7.5 × 12 cm^2. Nous pouvons observer sur la Figure 2.11 des zones sombres horizontales, qui correspondent aux chevauchements des pixels d'une barrette sur l'autre (pixels masqués), ainsi que des zones blanches verticales, correspondant aux pixels situés en bord de *chip*. Ces pixels sont deux fois et demi plus larges que les autres pixels et ont donc un taux de comptage environ 2.5 fois plus élevé. C'est ce détecteur qui sera utilisé pour le suivi longitudinal des carcinomes hépatocellulaires, dont les études seront présentées dans le Chapitre 3.

Un second détecteur composé de pixels d'arséniure de gallium (AsGa) de 1 mm d'épaisseur hybridés sur un *chip* XPAD3.2-C [BUTON et al. 2014] a été acquis auprès

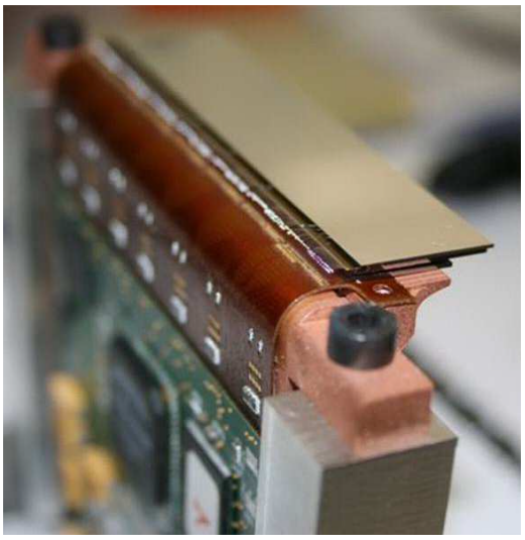


FIGURE 2.9. – Photographie d'une barrette constituée d'un capteur en silicium pixellisé et hybridé à 7 chips XPAD3.2-S [KRONLAND-MARTINET 2015].

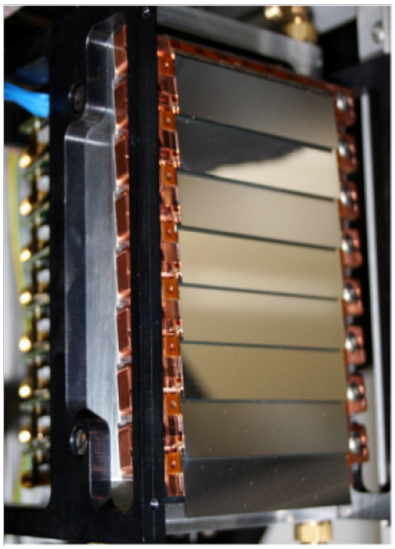
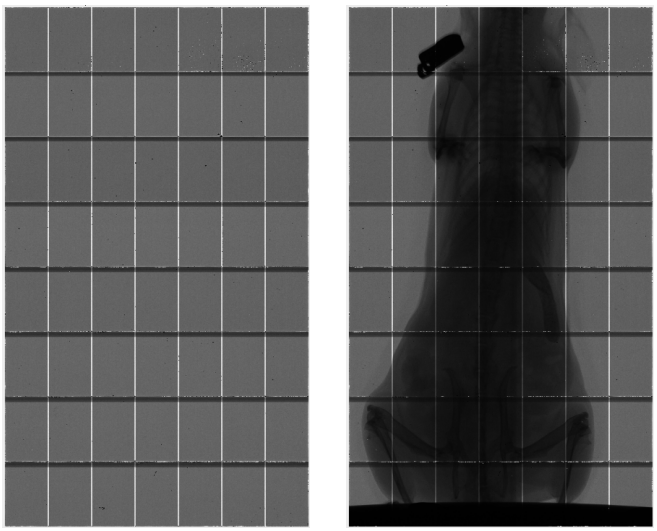


FIGURE 2.10. – Photographie des 8 barrettes assemblées en tuiles avec une inclinaison de 7°.

de Cegitek Innovation (qui a repris les activités de la startup imXPAD). Ce dernier n'est composé que d'un seul *chip* de 120 × 80 pixels, mais l'efficacité de détection de l'arséniure de gallium plus élevée du fait de son numéro atomique effectif plus élevé que celui du silicium (Figure 2.12), nous a permis de mener des expériences pour la tomographie spectrale à haute énergie. La caractérisation de ce détecteur et les premières preuves de concept seront détaillées dans le Chapitre 4.

Les détecteurs à pixels hybrides, dont la particularité est d'être composés de capteurs pixellisés (diodes) possédant chacun sa propre électronique de lecture connectée



(a) (b)

FIGURE 2.11. – Illustration (a) d'un fond blanc et (b) d'une radiographie de souris acquise avec la caméra S540. La taille de la caméra nous permet pratiquement d'obtenir une imagerie corps entier de la souris. Il s'agit d'un mapping à plat de la caméra où chaque pixel de l'image est un pixel de la caméra. L'image n'est donc pas corrigée ni de l'inclinaison des barrettes ni de leur recouvrement.

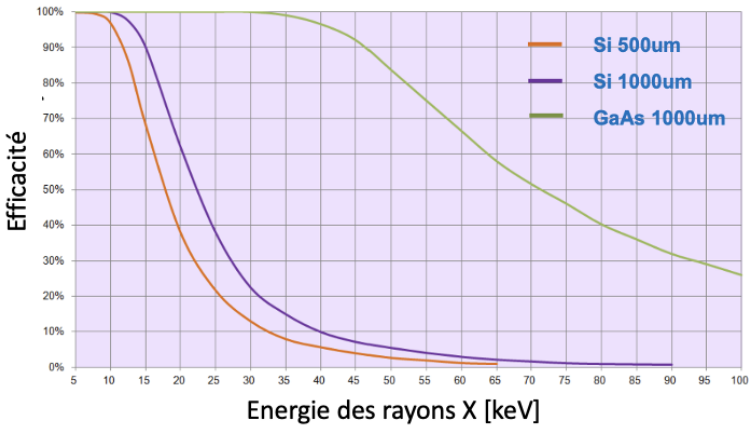


FIGURE 2.12. – Courbes d'efficacité de détection par effet photoélectrique pour différents matériaux d'épaisseurs définies en fonction de l'énergie des rayons X.

par une micro-bille. Celle-ci comprend un seuil de discrimination réglable en énergie, qui permet de réaliser des images en comptant les rayons X dont l'énergie est supérieure au seuil. Ce mode de comptage de photons nous permet de supprimer totalement le bruit de courant noir dans les images, au contraire du mode par intégra-

tion de charges, et donc d'améliorer le contraste [DANIELSSON et al. 2021], [GOMES et al. 2023]. En mode par intégration de charges, ce bruit de courant noir est intégré par l'électronique, ce qui a pour conséquence de diminuer le rapport signal/bruit, en particulier lorsque le flux de photons est faible. Par ailleurs, les rayons X de faibles énergies, qui proviennent souvent de diffusions dans l'objet, constituent une source de bruit que l'on essaye de réduire avec des grilles anti-scatter placées en face avant des détecteurs à intégrations de charges. En mode de comptage de photons, ce bruit peut être facilement éliminé en augmentant le seuil.

Un résumé des caractéristiques des deux détecteurs à pixels hybrides de Si et d'AsGa se trouve dans le Tableau 2.2.

	Détecteur Silicium	Détecteur AsGa
Épaisseur du *sensor*	500 μm	1000 μm
Électronique	XPAD3.2-S	XPAD3.2-C
Taille pixels	130×130 μm^2	130×130 μm^2
Nombre de pixel par *chip*	120×80	120×80
Taille détecteur	8 barrettes de 7 *chips*	1 *chip*
Surface de détection	124.8×72.8 mm^2	15.6×10.4 mm^2
Efficacité > 30 % (Figure 2.12)	jusqu'à 22 keV	jusqu'à 93 keV

TABLEAU 2.2. – Tableau récapitulatif des caractéristiques des deux détecteurs utilisés.

2.1.5. piXface : une interface d'acquisition

Afin de communiquer avec le prototype PIXSCAN-FLI et ses différents composants, une interface appelée *piXface* a été développée [Mathieu DUPONT 2014]. Cette interface permet de contrôler la source de rayons X, la roue à filtres, les moteurs et le détecteur. Un outil de visualisation des images acquises par la caméra est aussi à disposition pour visualiser en temps réel les images. La planification des tomographies est aussi possible avec différents modes :

— image par image : le moteur s'arrête à chaque angle pour prendre une image, puis tourne à l'angle suivant
— acquisition continue : le moteur tourne continûment, les images sont acquises pendant la rotation

Ce dernier mode permet de diminuer grandement le temps mort entre deux images consécutives, qui est nécessaire au moteur rotatif pour changer d'angle. En optimisant

le temps mort, nous réduisons le temps d'exposition aux rayons X et donc la dose reçue. Par ailleurs, la durée totale d'acquisition est également réduite. Enfin, à l'issue de l'acquisition, l'interface nous permet d'enregistrer les images acquises en format DICOM (*Digital Imaging Communication in Medecine*), pour pouvoir procéder à la reconstruction tomographique par la suite. Ce format est un standard international utilisé en imagerie médicale, qui permet d'enregistrer non seulement les images mais aussi des informations contenues dans des *tags*, comme le type d'examen réalisé, le nom du patient, des informations sur la source ou tout autre paramètre de l'acquisition jugé utile.

2.1.6. Reconstruction des images

2.1.6.1. Prise en compte des géométries du détecteur et du PIXSCAN-FLI

Afin de pouvoir reconstruire en 3 dimensions les images acquises, nous appliquons l'algorithme de Feldkamp, David et Kress (FDK) [FELDKAMP et al. 1984] qui a été introduit en Section 2.1.6. Pour pouvoir l'appliquer, l'algorithme doit prendre en entrée des projections coniques de l'objet. Or, comme nous l'avons vu à la section précédente, la caméra S540 est composée de plusieurs barrettes tuilées avec un recouvrement, ce qui nécessite un pré-traitement des données pour obtenir une projection conique sur un plan de détection parallèle à l'axe de rotation de l'objet. Pour cela, une interpolation des valeurs comptées par les pixels sur un maillage régulier dans un plan vertical est réalisée pour compenser l'inclinaison des barrettes et retirer les pixels qui sont masqués par le recouvrement. Pour obtenir une interpolation précise, les positions de chaque barrette ont été mesurées avec un appareil de métrologie lors de l'assemblage de la caméra.

Par ailleurs, la géométrie globale du système doit être connue afin que la reconstruction des images se réalise avec le bon grandissement et la meilleure qualité possible.

Pour cela, les positions relatives de l'objet, de la source de rayons X et de la caméra doivent être connues avec précision. Le repère global est choisi comme attaché à l'objet. La configuration géométrique complète du système est alors décrite par 9 paramètres :

— 3 translations pour centrer le repère attaché à la source de rayons X sur le repère global (ceci inclut la distance entre la source et l'objet),
— 3 translations pour centrer le repère attaché à la caméra sur le repère global (ceci inclut la distance entre l'objet et le détecteur)
— 3 rotations pour aligner les axes du repère objet avec ceux du repère caméra pour chaque radiographie. Les angles de rotation de la plateforme objet sont contrôlés par le système et connus pour chaque radiographie, il ne reste donc que 2 angles inconnus a priori.

Pour pouvoir estimer ces paramètres, un protocole d'étalonnage géométrique a été mis en place [KHOURY et al. 2009], [MORELE 2013]. Il consiste à scanner une bille métallique tournant autour de l'axe de rotation, grâce au fantôme montré en

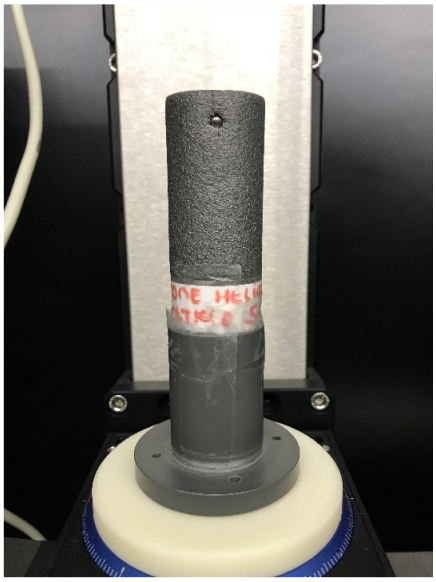


FIGURE 2.13. – Photographie du fantôme à bille utilisé pour l'étalonnage de la géométrie du système.

Figure 2.13. Trois acquisitions de 360 projections du fantôme à bille sont réalisées en positionnant la bille à des hauteurs différentes du champ de vue de la caméra. En identifiant le centre de la bille sur chacune des projections, on peut reconstituer la trajectoire de la bille pour chaque acquisition et ainsi visualiser sa trajectoire, qui est elliptique (Figure 2.14). On note qu'en raison du faisceau conique, les trajectoires des billes placées en haut et en bas du champ de vue sont moins aplaties que lorsque la bille est positionnée au centre du champ de vue axial.

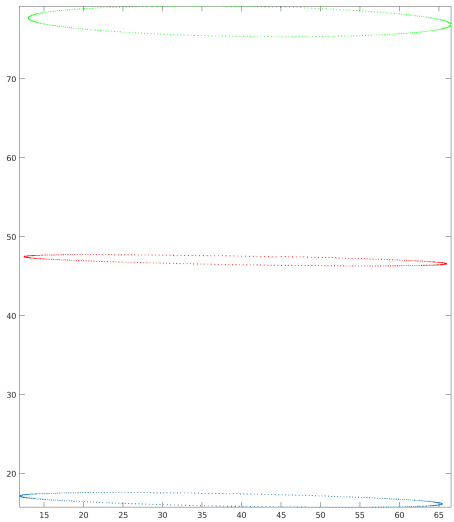


FIGURE 2.14. – Trajectoires elliptiques de la bille positionnée à 3 hauteurs différentes.

Connaissant la trajectoire théorique de la bille, nous pouvons estimer les paramètres

géométriques du système en appliquant une minimisation de moindres carrés entre la trajectoire théorique de la bille et celle observée sur les projections, qui est fonction des différents paramètres. La convergence est alors atteinte lorsque la somme quadratique des résiduels, entre les positions théoriques et mesurées de la bille sur le plan de projection vertical est minimale.

La précision de la méthode est donnée par la distribution des résiduels horizontaux (40 μm) et verticaux (30 μm) montrés en Figure 2.15.

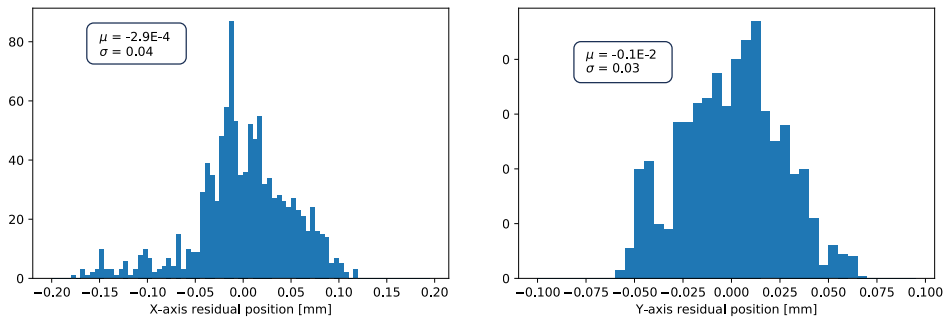


FIGURE 2.15. – Residuels horizontaux (à gauche) et verticaux (à droite).

2.1.6.2. Application de l'algorithme FDK

À partir des projections enregistrée en format DICOM, nous pouvons appliquer un algorithme de reconstruction pour reconstruire l'objet en trois dimensions.

A l'issue des acquisitions, les fichiers de données sont constitués :

— des projections coniques de l'objet vu sous chaque angle ;
— de 100 fonds noirs : réalisés source éteinte pour détecter des pixels défaillants comptant des photons lorsqu'il n'y a pas de faisceau de rayons X ;
— de 100 fonds blancs : réalisés avec les mêmes paramètres d'acquisition mais sans l'objet entre la source et le détecteur.

Afin de nettoyer les données avant la reconstruction et de s'affranchir des mesures faussées par des pixels défaillants, les fonds blancs et noirs sont analysés. Lorsqu'un pixel compte plus de 10 coups sur un des fonds noirs, il est masqué. Par ailleurs, dans le processus de pré-traitement des données avant reconstruction, nous prenons en compte l'effet d'angle solide dû au faisceau conique généré par la source, qui implique que les pixels situés au centre du cône comptent plus que ceux qui sont situés vers le bord du cône. Par la suite, nous masquons les pixels qui ont un taux de comptage supérieur ou inférieur à 3 σ autour de la valeur moyenne comptée par le pixel sur les fonds blancs.

Les valeurs des pixels masqués sont alors remplacées par une interpolation bilinéaire préalablement à la reconstruction.

A l'issue de la reconstruction, nous pouvons visualiser un volume sous différentes coupes (Figure 2.16). Lorsque nous regardons une image en coupe transverse, le terme *slice* sera employé.

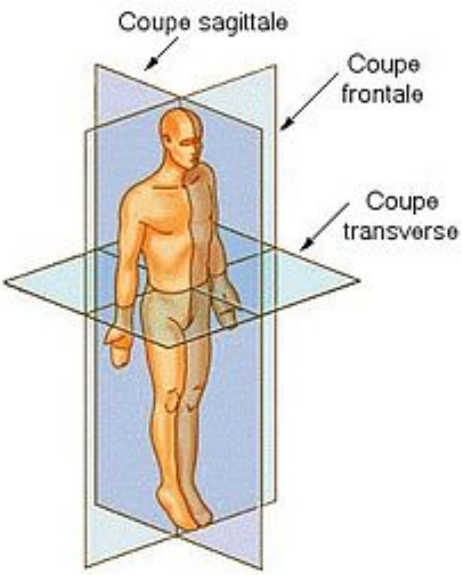


FIGURE 2.16. – Illustration des différentes coupes anatomiques. [*Système de référence en anatomie* 2023]

2.1.6.3. Conversion en Unités Hounsfield

En tomodensitométrie, afin de standardiser les images obtenues, une échelle a été proposée par Godfrey Hounsfield telle que les coefficients d'atténuation linéique obtenus après reconstruction pour chaque pixel sont normalisés par rapport au coefficient d'atténuation linéique de l'eau de façon à ce que l'Unité Hounsfield - c'est le nom donné à cette échelle - de l'eau soit égale à 0.

Pour ce faire, la transformation en Unités Hounsfield (HU), implique que le coefficient d'absorption de chaque voxel μ_X subissent la transformation linéaire suivante :

$$\mathrm{HU} = 1\,000 \times \frac{\mu_X - \mu_{\mathrm{eau}}}{\mu_{\mathrm{eau}}} \tag{2.1}$$

avec μ_{eau} le coefficient d'absorption reconstruit pour l'eau.

Cette échelle permet d'uniformiser les images obtenues, quel que soit le spectre d'énergie des rayons X utilisé, et de les comparer. Des valeurs typiques d'HU pour certains organes sont reportées dans le Tableau 2.3.

2.2. Protocole de scan pour le petit animal

Après avoir décrit et détaillé le prototype PIXSCAN-FLI, nous allons maintenant nous intéresser au protocole d'acquisition tomographique mis en place pour réaliser le suivi longitudinal des souris.

Structure imagée	Valeurs UH associées
Air	-1000
Poumon	-500
Graisse	-100 à -50
Eau	0
Tissus mous	+100 à +300
Os	+700 à +3000

TABLEAU 2.3. – Valeurs caractéristiques d'HU pour certains organes.

2.2.1. Introduction à l'éthique en expérimentation animale

Comme pour tout projet impliquant des études sur l'animal, les expérimentations réalisées au cours de ma thèse ont été déclarées au préalable auprès d'un comité d'éthique dans le dossier APAFIS n° FM8214-2016121417291352v5. Par ailleurs, j'ai suivi au début de ma thèse une formation et obtenu la certification pour être concepteur de projets en expérimentation animale Niveau B et ainsi pouvoir travailler avec les souris.

L'éthique en expérimentation animale est basée sur la règle des 3R : Remplacer, Réduire et Raffiner. C'est en 1959 que deux biologistes britanniques, William Russel et Rex Burch [RUSSELL et al. 1959] ont énoncé ce principe qui régit aujourd'hui toute expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord :

— Le terme remplacer signifie que, dès que possible, l'expérimentation animale doit être remplacée par de la modélisation informatique, ou des organoïdes, etc.
— Le principe ALARA (pour *As Low As Reasonably Achievable*) doit être appliqué afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés sans pour autant compromettre les objectifs. Dans la mesure du possible, la réutilisation ou le placement des animaux en fin d'étude doit être mis en place.
— Enfin, les conditions d'élevage, un hébergement approprié, ainsi que l'anticipation de la douleur de l'animal et l'application d'un point d'arrêt doivent permettre de respecter le dernier terme, à savoir raffiner.

Afin de respecter au mieux ces critères, nous avons mis différentes mesures en place dans nos expériences.

Pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous avons optimisé les cohortes de souris, tout en ayant une statistique suffisante pour avoir des résultats significatifs. Par ailleurs, l'avantage de l'imagerie est de pouvoir suivre l'animal au cours du temps sans avoir à le sacrifier.

La mise en place des protocoles a été réalisée avec des fantômes afin de remplacer

dès que possible l'utilisation des animaux.

Enfin, les souris ont été élevées en animalerie avec un statut EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique) avec un enrichissement de la cage et un change hebdomadaire. Par ailleurs, pour limiter la souffrance et le stress des animaux, les injections rétro-orbitales ont été réalisées sous anesthésie, tout comme les imageries qui sont réalisées sous anesthésie grâce à l'utilisation de la station d'anesthésie Minerve présentée dans la Section 2.1.3. Pour chaque expérience, des points critiques ont été mis en place, prenant en compte la taille de la tumeur (pas plus de 17 mm de diamètre) ou bien le bien-être de l'animal (perte de poids inférieure à 20 %, absence de recroquevillement ou de stress apparent).

2.2.2. Choix d'un agent de contraste

Mon travail de thèse a pour but de mener des études sur le cancer du foie. Or, la tomodensitométrie est une imagerie de contraste, ce qui pose problème au niveau de l'abdomen où les organes ont des coefficients d'absorption très proches. Il est donc très difficile de distinguer le foie ainsi que les tumeurs par contraste des tissus. Pour cette raison, nous utilisons un agent de contraste permettant de réhausser le contraste du foie. Différents agents de contraste hépato-spécifiques existent pour les études précliniques. Les caractéristiques de ces différents agents sont présentées dans le Tableau 2.4.

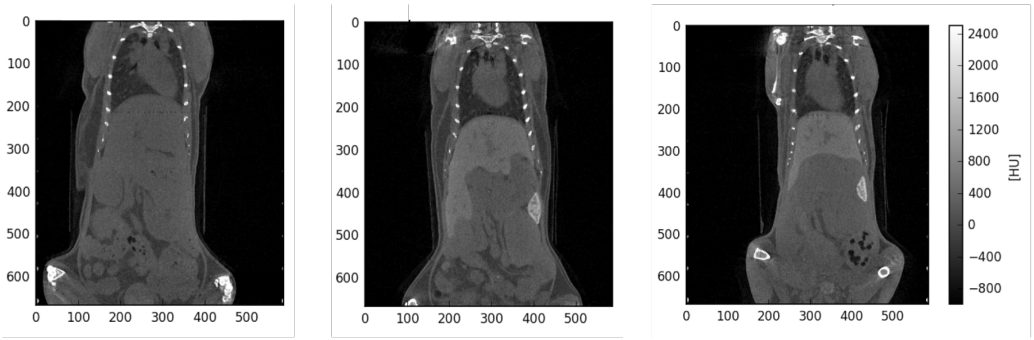
Agent de contraste	Matériau	Volume d'injection [μL/g de souris]	Temps d'élimination	Augmentation du contraste du foie [%]
Fenestra LC	Iode	10 - 16	48 h	20 - 60
Fenestra VC	Iode	10 - 16	48 h	5
Exitron nano 6000	Baryum	4	> 29 jours	70 - 80
Exitron nano 12000	Baryum	4	> 29 jours	100 - 110
VivoVist	Baryum	3	> 29 jours	

TABLEAU 2.4. – Tableau récapitulatif des caractéristiques des différents agents de contraste hépato-spécifiques [LI et al. 2014],[BOLL et al. 2013] et [MANNHEIM et al. 2016].

Au vu des différentes caractéristiques des agents de contraste et de nos besoins pour les études longitudinales, l'Exitron nano 12000 produit par Viscover semble être le meilleur candidat de part sa longévité avant d'être éliminé, sa forte augmentation du contraste et son faible volume d'injection. C'est donc avec cet agent de contraste

composé de nanoparticules de baryum que nous avons effectué l'ensemble des suivis longitudinaux des souris pour les différentes études menées lors de ce projet.

Les nanoparticules de baryum, après circulation dans le sang, vont être ingérées par les cellules de Kupffer, qui sont les macrophages résidents du foie. L'agent de contraste reste ainsi dans les tissus plusieurs semaines. La Figure 2.17 illustre la surbrillance du foie après injection de l'agent de contraste.



(a) (b) (c)

FIGURE 2.17. – Coupes frontales d'un scanner de souris (a) avant injection, (b) 24h après et (c) 3 semaines après injection de l'Exitron nano 12000 [PORTAL 2018].

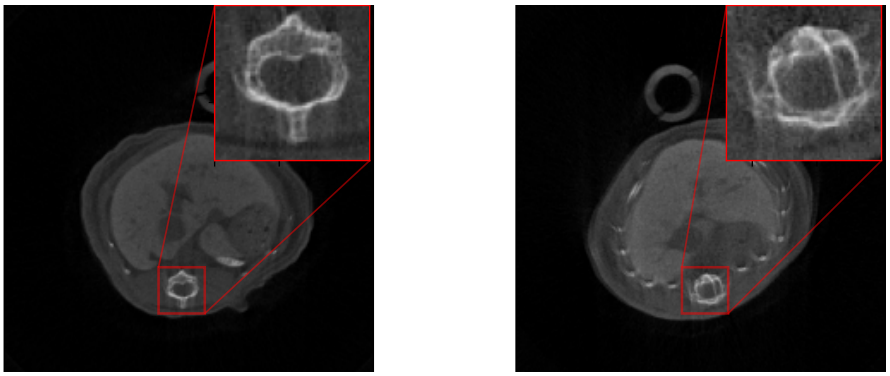
L'injection de l'agent de contraste est effectuée de manière rétro-orbitale, sous anesthésie. Pour ce geste plus complexe que l'imagerie, ce n'est pas l'anesthésie gazeuse présentée dans la Section 2.1.3 que nous utilisons, mais un mélange de kétamine (à 100 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) injecté par voie intra-péritonéale.

2.2.3. Paramètres de scan

Une fois les souris injectées avec le produit de contraste, le protocole d'acquisition est appliqué pour réaliser les différentes imageries. Au cours de ma thèse, trois protocoles ont été utilisés. Le premier (Protocole 1) est le même que celui utilisé pour les précédentes études sur le prototype PIXSCAN-FLI [PORTAL 2018]. Lorsque nous avons mis en place le mode *fast tomography*, le temps mort entre deux images a pu être considérablement réduit et nous a offert la possibilité de réaliser un nouveau protocole (Protocole 2) avec plus d'images en moins de temps.

Le temps mort a dans un second temps dû être ré-augmenté (Protocole 3) en raison d'un problème de rapidité d'envoi des données vers l'ordinateur. Cela a engendré un léger déclin de la résolution des images avec un mouvement plus prononcé et donc un flou qui apparaît notamment au niveau des structures osseuses, ainsi que le dédoublement des vertèbres comme nous pouvons le voir sur la Figure 2.18. Néanmoins, cette baisse de résolution ne nous a pas empêché de détecter et de suivre les tumeurs au cours du temps.

Les différents paramètres de scans sont résumés dans le Tableau 2.5.



(a) Image acquise avec le Protocole 2 (b) Image acquise avec le Protocole 3

FIGURE 2.18. – Coupes transverses de souris représentant le flou au niveau des structures osseuses. (a) Illustre une coupe sans flou lié au mouvement respiratoire, tandis que sur la coupe (b), on peut voir le dédoublement de la vertèbre engendré par le mouvement (qui n'apparaît pas sur le tuteur en fibre de carbone).

	Protocole 1	Protocole 2	Protocole 3
Source	50 kVp, 500 μA		
Filtre	0.6 mm Al		
Nombre d'images	720	1440	1440
Temps d'exposition	575 ms	198 ms	198 ms
Temps mort	50 ms	2 ms	20 ms
Temps total du scan	450 s	294 s	320 s

TABLEAU 2.5. – Tableau récapitulatif des différents paramètres de scan utilisés pour le suivi longitudinal des souris.

Afin de maintenir l'animal endormi, l'anesthésie gazeuse est utilisée pour les imageries. Comme décrit à la Section 2.1.3, la station d'anesthésie nous permet dans un premier temps d'endormir la souris dans la cage à induction pendant environ 1 minute à 3 % d'isoflurane et un débit de 1.2 L/min d'O_2. La souris est centrée sur l'axe de rotation de la plate-forme animale puis munie du masque d'anesthésie dans lequel la concentration est maintenue à 1.5 % d'isoflurane. Cependant, cette valeur ainsi que le débit d'O_2 sont adaptés en fonction de la souris (notamment de son gabarit) afin que la respiration ne soit pas saccadée et que les mouvements respiratoires soient minimisés.

2.2.4. Dose reçue par l'animal

Comme nous l'avons expliqué à la Section 2.2.1, l'éthique en expérimentation animale est nécessaire. La dose reçue par l'animal lors d'un scanner fait partie des critères importants. Pour éviter d'engendrer des effets secondaires dus aux rayonnements tels que la lésion de l'ADN, il est crucial de limiter la dose. L'impact élevée des radiations sur l'ADN et le génome humain est de plus en plus étudié dans le but de limiter au mieux les effets secondaires, notamment lors de la radiothérapie pour laquelle le patient reçoit de fortes doses [MOHAN et al. 2019]. En revanche, l'effet des faibles doses dues au rayonnement naturel ou aux rayons utilisés à des fins diagnostiques, par exemple lors d'un scan par rayons X (CT scan) ne sont pas encore bien connus [PIOTROWSKI et al. 2017]. Nous savons qu'il y a un impact sur le cycle cellulaire et certains de ses régulateurs différent pour les cellules normales ou tumorales [KHAN et al. 2022]. En revanche, des études supplémentaires doivent être menées pour connaître davantage les impacts et le stress sur les cellules lors d'expositions aux faibles doses.

Concernant le petit animal, la dose limite ainsi que les effets des rayonnements n'ont été que très peu étudiés par le passé. Cependant, il a été montré que pour un scan impliquant une dose inférieure à 300 mGy, il n'y a pas d'effet biologique majeur [PARKINS et al. 1985].

Afin de déterminer la dose reçue lors de nos différents protocoles d'acquisition détaillés à la section précédente, un dosimètre Diados de PTW (Figure 2.19) a été placé sur la plateforme rotative et la dose a été mesurée pour les mêmes paramètres d'acquisition qu'avec l'animal. Le dosimètre est composé d'un détecteur à semi-conducteur et permet de mesurer un débit de dose moyen sur 20 secondes. Cette mesure correspond au KERMA (*Kinetic Energy Release per unit Mass*) dans l'air, c'est-à-dire à la quantité d'énergie transférée au milieu par les photons incidents par unité de masse. Pour les énergies de rayons X utilisés en imagerie préclinique, nous avons une égalité entre le KERMA et la dose absorbée.

Nous avons mesuré une dose reçue de 161 mGy par scan pour le Protocole 1, contre 106 mGy avec le Protocole 2 et 115 mGy pour le Protocole 3. Nous pouvons voir que la réduction des temps morts nous a permis de diminuer la dose reçue par l'animal. De plus, ces différentes valeurs restent donc bien en deçà des 300 mGy, ce qui nous permet ainsi de répéter des scans au cours du suivi des souris, tout en limitant les risques radiologiques.

Cependant, nous pouvons tout de même nous interroger sur l'impact, positif ou négatif, des rayons X sur l'efficacité des traitements lors de scans répétés, qu'ils soient pro-régression tumorale ou pas. En effet, peu d'études sont menées concernant la répétition des scans et les effets radiologiques potentiels. De Jong [JONG et al. 2006] a développé un outil permettant de calculer le risque de mortalité dû à la répétition de scans CT sur des patients atteints de mucoviscidose. Les résultats montrent que les patients suivis par tomodensitométrie au cours de l'évolution de la maladie ont un taux de survie légèrement plus faible que les patients non suivis par tomodensitométrie. Cette étude met donc en évidence le fait que les scans CT de suivi à faible

FIGURE 2.19. – Photographie du dosimètre Diados de PTW et de la sonde utilisés pour mesurer la dose de rayonnement ionisant reçue par l'animal lors d'un scan.

dose ont un impact très léger sur les patients, mais que toute étude impliquant un suivi par tomodensitométrie doit être mise en place seulement si les bénéfices sont plus importants que les risques engendrés par les effets secondaires de cette modalité d'imagerie.

2.2.5. Prise en compte des mouvements respiratoires

2.2.5.1. Contexte

Même si les mouvements respiratoires sont minimisés avec l'anesthésie et qu'il est possible de modifier le débit pour obtenir un cycle respiratoire le moins saccadé et prononcé possible, la respiration provoque des artefacts de mouvements sur les images reconstruites. Comme nous l'avons vu, ces artefacts de mouvements se perçoivent notamment au niveau des vertèbres, qui apparaissent alors comme dédoublées. En effet, le mouvement respiratoire de la souris entraîne le mouvement de la cage thoracique et des organes alentours, donc du foie qui est proche du diaphragme.

Une manière de contrer ce problème est de faire du fenêtrage temporel ou gating, *i.e.* de suivre les mouvements physiologiques de la souris.

Différentes méthodes permettent de détecter et de prendre en compte le mouvement respiratoire. Un état de l'art des différentes approches est présenté dans la thèse de Simon Rit [RIT 2008].

Une des approche consiste à sélectionner les projections à reconstruire. Deux stratégies sont possibles. La première est dite prospective et revient à synchroniser l'acquisition des images avec un appareil de monitorage du cycle respiratoire, donc à n'acquérir des projections qu'à des moments précis du cycle respiratoire. La seconde méthode consiste quant à elle à trier les projections après leurs acquisitions.

C'est cette seconde stratégie que nous avons adoptée. Le principe étant de détecter

le cycle respiratoire en se basant sur la différence de niveau de gris au niveau de la cage thoracique de la souris lors de son cycle respiratoire [JOHNSTON et al. 2010]. Les projections sont ensuite sélectionnées en fonction de la phase du cycle respiratoire qu'elles couvrent et le volume est ainsi reconstruit avec des projections correspondant toutes à une même phase respiratoire.

2.2.5.2. Protocole utilisé et résultats

Sachant que nous pouvons descendre à un temps de pose de 50 ms pour une exposition de 50 ms, cela nous permet d'avoir une image toutes les 100 ms. Un cycle respiratoire chez la souris durant entre 300 à 600 ms, nous pouvons ainsi avoir un échantillonnage qui devrait être suffisant pour capturer ce cycle.

Pour vérifier la possibilité de détecter ce cycle, une souris a été imagée avec un temps d'exposition de 50 ms, un temps mort de 50 ms et une source à 80 kVp et 500 μA. L'étude est réalisée en projection, sans rotation. Nous nous sommes intéressés à la zone de la cage thoracique de la souris, cette dernière étant très mobile lors du cycle respiratoire. Ainsi, nous avons délimité une zone correspondant à la hauteur d'une barrette du détecteur, comme nous pouvons le voir sur la Figure 2.20.

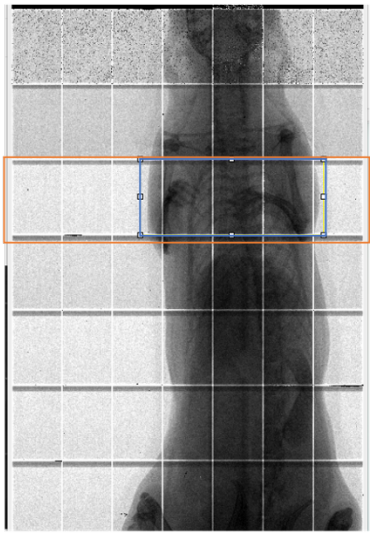


FIGURE 2.20. – Illustration de la zone utilisée pour l'analyse du cycle respiratoire de la souris. En orange, la barrette de détecteur sélectionnée et en bleu, la zone restreinte sur laquelle l'analyse est effectuée.

La moyenne des coups comptés par pixel, est alors calculée dans la zone sélectionnée. La Figure 2.21 illustre la variation de cette moyenne au cours du temps. Nous pouvons ainsi noter que pour cette souris, le cycle respiratoire compris dans l'intervalle Δt indiqué sur la figure est d'environ 500 ms.

En isolant les images correspondant à des phases du cycle respiratoire équivalentes, par exemple en ne prenant pas en compte les extrema pour chaque cycle, nous pouvons nous affranchir d'une partie du bruit provenant du mouvement respiratoire.

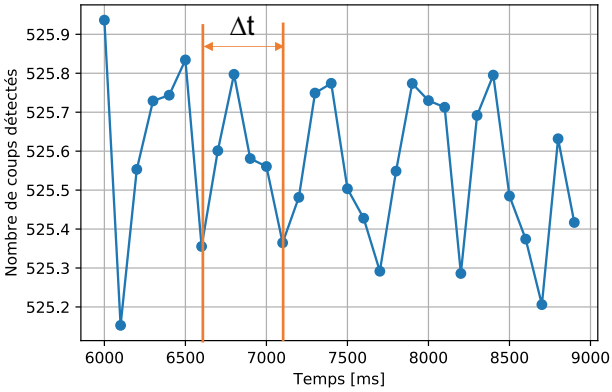


FIGURE 2.21. – Graphique de la moyenne des coups comptés par pixels dans la zone sélectionnée autour de la cage thoracique en fonction du temps.

La reconstruction de l'image est alors effectuée sans les projections pour lesquelles la variation du volume des poumons, *i.e.* le mouvement de la cage thoracique, est trop importante.

J'ai ainsi réalisé une preuve de concept permettant de mettre en évidence le fait que la détection du cycle respiratoire pouvait être réalisée grâce à une acquisition rapide et un temps mort entre deux images très faible. Pour pouvoir réaliser cette détection au cours d'un scan, d'autres études devront être menées afin de déterminer le nombre d'images et leur temps de pose afin d'obtenir suffisamment de projections réparties tout autour de la souris pour rendre possible la reconstruction de l'image. L'idée est de pouvoir par la suite intégrer cette prise en compte du mouvement respiratoire au pipeline de reconstruction et améliorer ainsi la qualité des images.

2.2.6. Résumé de l'utilisation de ce protocole d'acquisition

Au cours de ma thèse, les différents protocoles présentés dans ce Chapitre sont ceux qui ont été utilisés pour le suivi longitudinal des souris, quelle que soit l'étude menée. Les différentes études seront présentées au chapitre suivant et le Tableau 2.6 récapitule le nombre de souris qui ont été suivies au cours des différentes expériences.

2.3. Analyse des scans : problématique de la segmentation de tumeurs

Suite à l'application du protocole d'acquisition et après reconstruction des images à l'aide du software de reconstruction décrit à la Section 2.1.6, l'analyse des volumes reconstruits peut se faire sur les différentes coupes anatomiques.

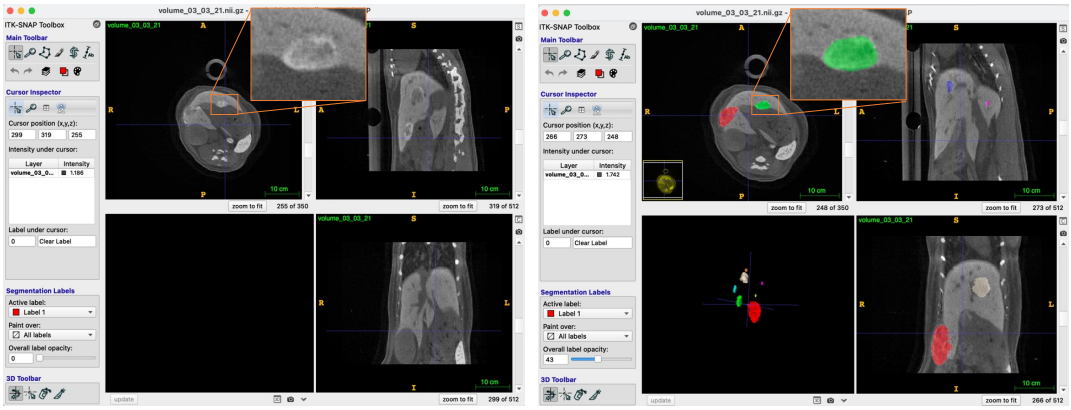
Afin de répondre aux différentes problématiques biologiques, nous nous intéressons à l'évolution quantitative des tumeurs. Pour cela, nous avons besoin de repérer les

Expérience menée	Nombre de souris utilisées	Nombre de scans par souris	Nombre total de scans
Combinaison de traitements avec/sans immunothérapie	33	4	132
RomiCabo	8	9	72
Prénéoplasiques	45	7	315
Tests et contrôles	70	2	140
Total	156	22	659

TABLEAU 2.6. – Tableau récapitulatif du nombre de souris ayant suivies le protocole.

tumeurs et de déterminer leur volume, une segmentation des tumeurs sur les images est donc nécessaire.

Une manière de segmenter les tumeurs est de le faire manuellement en se basant sur une différence de contraste entre la tumeur et le foie. Cette délimitation n'est pas nette et se propage sur plusieurs pixels, ce qui rend le contourage très dépendant de l'utilisateur. La stratégie de contourage utilisée est représentée sur la Figure 2.22. Le logiciel ITK-SNAP [YUSHKEVICH s. d.] nous permet de visualiser les images et ainsi de segmenter, avec plusieurs couleurs, les différentes tumeurs. Une représentation 3D de chaque tumeur est ensuite disponible.



(a) (b)

FIGURE 2.22. – Exemple illustrant la stratégie de segmentation manuelle à l'aide du logiciel ITK-SNAP (a) avant segmentation et (b) une fois la segmentation des différentes tumeurs réalisée.

De plus, la segmentation est rendue encore plus complexe en raison des différents types de tumeurs que l'on peut retrouver dans le cadre des tumeurs du foie. Le Fi-

gure 2.23 illustre cette large hétérogénéité de formes, de textures et de contrastes que l'on peut retrouver.

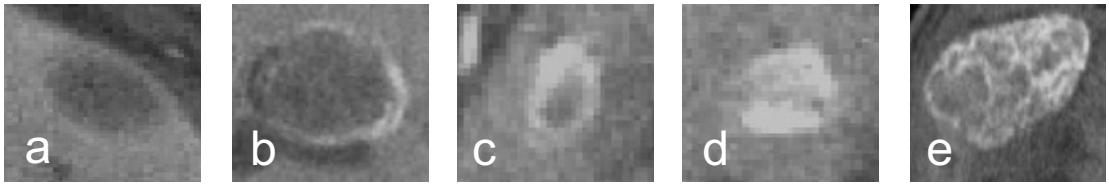


FIGURE 2.23. – Représentation de l'hétérogénéité des tumeurs analysées.

Comme nous pouvons le voir, nous avons des tumeurs qui sont complètement noires (a), ce qui corrèle avec le fait que la tumeur n'ingère pas d'agent de contraste et donc ne voit pas son contraste rehaussé en raison essentiellement d'un ratio de macrophages plus faible dans la tumeur que dans le tissu hépatique. Cependant, nous avons aussi des tumeurs qui sont cerclées d'un anneau blanc plus ou moins épais (b, c) pouvant correspondre à un recrutement de macrophages sur le site tumoral, notamment dans son périmètre. D'autres sont même entièrement infiltrées et donc apparaissent blanches (d). Enfin, nous avons aussi des tumeurs qui paraissent très hétérogènes à l'intérieur (e), suggérant une distribution spatiale des macrophages plutôt hétérogène. Ces différentes tumeurs sont présentes en proportions très fluctuantes selon les cohortes et traitements testés, illustrant une hétérogénéité entre les différentes tumeurs, une caractéristique clé du modèle du cancer du foie que nous utilisons. Sur une étude menée sur 18 souris représentant 46 tumeurs, les proportions estimées de chaque catégorie de tumeurs sont les suivantes : 15 % de tumeurs de type (a), 24 % de type (b), 22 % de type (c), 26 % de type (d) et 13 % de type (e). Ces proportions sont indicatives et sont certainement fonction de multiples paramètres (âge des souris, taille de la tumeur, etc.).

Pour pouvoir comparer plus rigoureusement les résultats obtenus à partir de différentes acquisitions, une segmentation objective s'appuyant sur des critères quantitatifs et ne dépendant pas de l'utilisateur serait plus robuste. Plusieurs possibilités existent telle qu'une segmentation basée sur une détection de contour ([ASLAM et al. 2015]) ou encore l'utilisation de méthodes d'apprentissage qui sont de plus en plus populaires pour les analyses d'images médicales. En effet, comme le montre la Figure 2.24, le nombre de publications que l'on peut trouver sur PubMed en tapant « *tumor segmentation artificial intelligence* » ne fait qu'augmenter ces dernières années. Notons que la notion d'intelligence artificielle englobe les méthodes du traitement de signal et des images et les méthodes d'apprentissage automatique ou d'apprentissage profond, même si une analogie abusive est souvent faite entre intelligence artificielle et méthodes d'apprentissage.

C'est donc cette seconde approche d'intelligence artificielle que j'ai étudiée au cours de ma thèse afin de répondre à cette problématique de segmentation tumorale.

Dans cette Section, une nouvelle approche par apprentissage profond ou DL (*Deep*

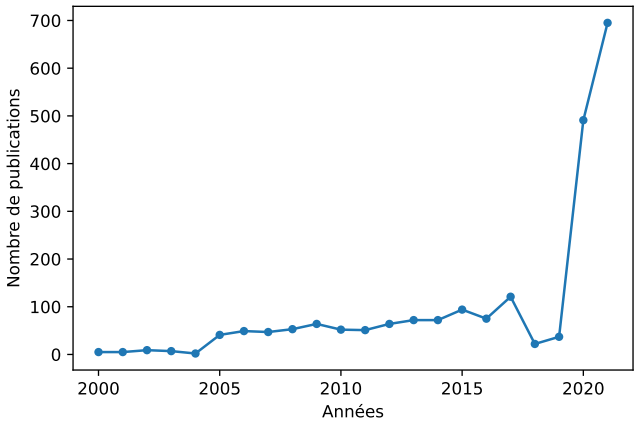


FIGURE 2.24. – Evolution du nombre de publications concernant l'utilisation de l'IA en imagerie médicale par années.

Learning) sera présentée afin de segmenter automatiquement les tumeurs. Toute l'implémentation des algorithmes a été réalisée en langage de programmation Python avec les librairies *Tensorflow* et *Keras*. Afin de gagner en temps de calcul et en efficacité, les codes de DL ont été processés sur carte graphique ou GPU (*Graphics Processing Unit*).

2.3.1. Introduction au *Deep Learning* (DL)

C'est dans les années 50 que le terme d'intelligence artificielle est apparu. Rendue possible grâce à Alan Turing et John Von Neumann, pères fondateurs de l'informatique moderne, c'est John McCarthy qui, en 1956, utilisa le premier le terme d'intelligence artificielle. Celui-ci sera par la suite défini par Marvin Minsky comme étant « la construction de programmes informatiques qui s'adonnent à des tâches qui sont, pour l'instant, accomplies de façon plus satisfaisante par des êtres humains car elles demandent des processus mentaux de haut niveau tels que : l'apprentissage perceptuel, l'organisation de la mémoire et le raisonnement critique ».

L'intelligence artificielle regroupe ainsi l'ensemble des méthodes qui tendent à reproduire le fonctionnement d'un cerveau humain. Parmi elles, les méthodes d'apprentissage reposent sur des réseaux de neurones artificiels, une structure de traitement des données qui cherche à mimer le fonctionnement des réseaux de neurones biologiques du cerveau humain. L'apprentissage automatique ou ML (*Machine Learning*) consiste à donner la capacité aux machines d'apprendre automatiquement un ensemble de règles. L'apprentissage profond ou DL (*Deep Learning*), est une méthode d'apprentissage automatique reposant sur l'utilisation d'un grand nombre de couches de réseaux de neurones artificiels.

Le terme de neurone artificiel est apparu dans les années 1950, lorsque que Warren McCulloch et Walter Pitts ([MCCULLOCH et al. 1943], [MATURANAT et al. 1959]) ont

défini le neurone formel. Ce dernier fonctionne de manière similaire au neurone biologique : une somme d'information en entrée du neurone est comparée à une valeur seuil, et si cette somme est supérieure au seuil, alors le neurone répond en émettant un signal en sortie. Le neurone, à l'aide de la fonction de transfert, va donc transformer ses entrées en sortie en fonction de règles prédéfinies. Une illustration du fonctionnement d'un neurone formel est montrée sur la Figure 2.25.

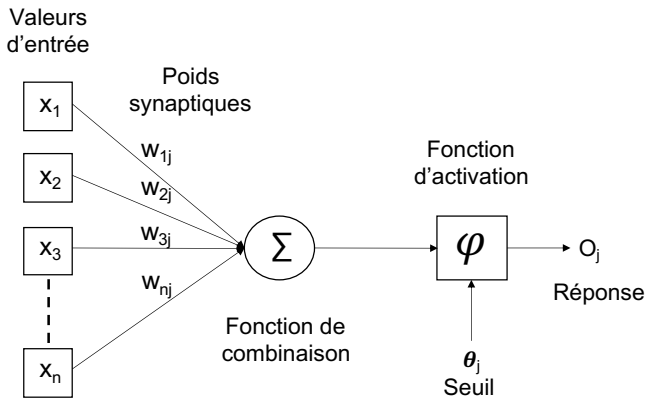


FIGURE 2.25. – Fonctionnement schématique d'un neurone formel. Une somme pondérée par des poids synaptiques est donnée en entrées d'un neurone puis comparée à un seuil à l'aide d'une fonction d'activation (ou fonction de transfert) permettant de générer le signal de sortie du neurone (adapté de [POLI 2007]).

Lorsque que l'on veut associer plusieurs neurones entre eux avec des connexions, l'efficacité de transmission des signaux d'un neurone à l'autre peut être modulée avec des poids synaptiques. Ce principe mime la plasticité synaptique que nous retrouvons dans les réseaux de neurones biologiques. Afin de construire un réseau de neurones, les paramètres importants à définir concernent donc le seuil du neurone, les différents poids synaptiques, et la façon de les ajuster.

En ajoutant plusieurs couches de neurones connectées entre elles, nous pouvons apporter une plus grande complexité à l'établissement des règles. Les algorithmes de DL sont capables de mimer les actions du cerveau humain grâce à ces réseaux de neurones artificiels et une plus grande quantité de données peut ainsi être traitée.

Deux types d'apprentissage existent : les apprentissages supervisés, pour lesquels on donnera une base de données annotées au réseau afin qu'il puisse les apprendre, et les apprentissages non supervisés pour lesquels le réseau devra apprendre de manière indépendante à reconnaître des groupes ou classes entre les données.

Une autre distinction entre les algorithmes d'intelligence artificielle concerne le type de sortie que l'on souhaite obtenir. Dans le cas où l'on souhaite obtenir une valeur continue, il s'agira d'algorithmes de régression. En revanche, si l'on souhaite obtenir une valeur discrète, une classe à laquelle se référer, on parlera de classification.

Dans notre cas, nous souhaitons segmenter une tumeur. Cela consiste à classifier chaque pixel pour leur attribuer une catégorie ("tumeur" ou "pas tumeur"). Les algorithmes de segmentation se baseront donc sur une classification appliquée à chaque pixel.

Les différentes phases d'un projet de DL sont détaillées par la suite et la Figure 2.26 résume ces différentes étapes.

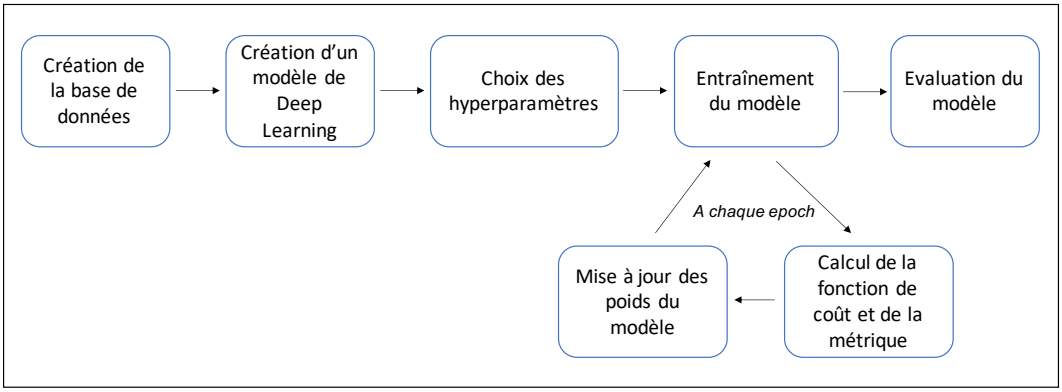


FIGURE 2.26. – Schéma récapitulatif des différentes étapes d'un projet d'intelligence artificielle.

2.3.2. Construction de la base de données

La première étape, qui est une des plus importantes, concerne la constitution d'une base de données suffisamment grande pour réaliser un entraînement. Cette base de données doit être annotée afin de faire, dans notre cas, de l'apprentissage supervisé de segmentation de tumeurs. Loriane Portal [PORTAL 2018], doctorante de l'équipe de recherche imXgam avait déjà acquis plusieurs jeux de données au cours de son doctorat pour l'étude de l'hépatocarcinome dans le modèle murin que nous allons utiliser pour créer notre base de données. Chaque scan avait été segmenté pour le suivi des tumeurs en utilisant une stratégie semi-supervisée : un contourage réalisé autour du site tumoral puis une segmentation par différence de contraste appliquée automatiquement.

Ainsi, ce sont 73 scans avec les segmentations des tumeurs associées (que l'on appellera masque ou *ground truth*) qui ont pu être récupérés. Une illustration d'images avec leurs masques associés est montrée sur la Figure 2.27.

Les données ont ensuite été triées et redimensionnées. Ainsi, les volumes de taille originale $587 \times 587 \times 882$ ont été redimensionnés dans le plan (x, y) en 512×512 et seules les *slices* correspondant aux images au niveau de l'abdomen de la souris ont été conservées. Finalement chaque volume était de dimension finale $512 \times 512 \times 450$.

Nous avons travaillé avec deux stratégies différentes : la première en 2D, donc image par image, et la seconde en 3D, *i.e.* avec tout le volume (Section 2.3.4).

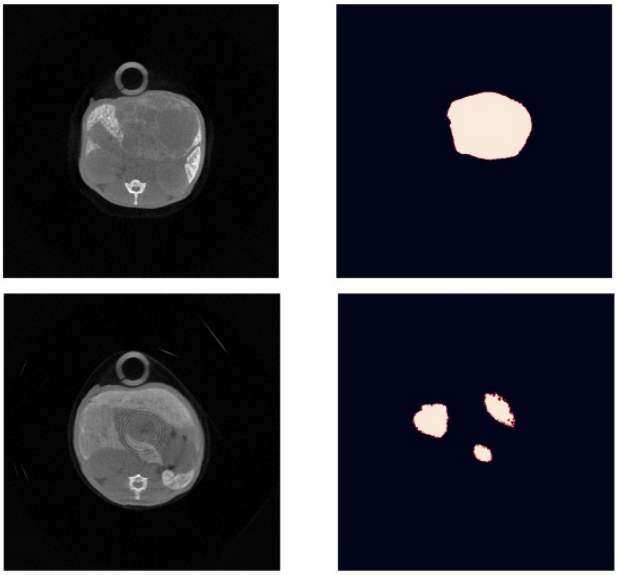


FIGURE 2.27. – Deux exemples de slices avec les masques associés représentant la segmentation des tumeurs.

Pour chaque volume et chaque *slice*, nous avons récupéré toutes les informations concernant les tailles de pixels, le nombre de tumeurs présentes et leurs tailles. Cela nous permettra par la suite de pouvoir sélectionner les *slices* en fonction des tumeurs et de pouvoir stratifier notre base de données pour améliorer l'entraînement. La stratification permet de répartir de manière hétérogène les différentes catégories de tumeurs dans les différentes bases de données (entraînement, validation et test). En effet, s'il y a une sur-représentation d'une catégorie de tumeurs dans les données, la proportion sera conservée dans les bases de données d'entraînement et validation et de test.

La Figure 2.28 représente la diversité de tailles de tumeurs que composent notre base de données. On constate que nous avons une plus grande proportion de petites tumeurs. Le nombre de tumeurs diminue avec la taille.

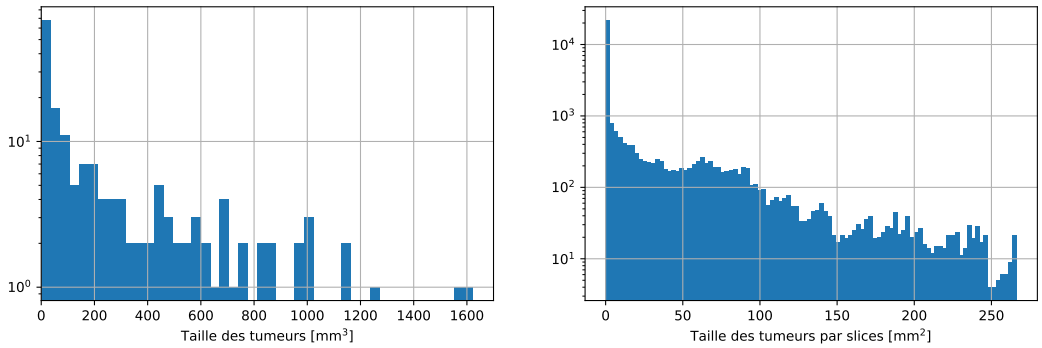
Trois catégories de tailles de tumeurs pour chaque image ont été définies de manière empirique selon les critères suivants :

— petite tumeur : surface de la tumeur < 50 mm^2
— tumeur moyenne : 50 mm^2 $\leq$ surface de la tumeur < 100 mm^2
— grande tumeur : surface de la tumeur ≥ 100 mm^2

Finalement, notre base de données est composée de 73 scans comportant au total 32 850 images. Parmi ces images, un tiers possèdent des tumeurs.

Les volumes ou images (selon la stratégie utilisée) sont normalisés afin d'homogénéiser au maximum les données. L'objectif étant que la moyenne soit nulle et l'écart-type égal à 1, chaque donnée suit la transformation suivante :

$$(\text{donnée} - \text{moyenne}) \ / \ \text{écart-type} \tag{2.2}$$



(a) Répartition des tailles des tumeurs dans chaque volume

(b) Taille des tumeurs pour chaque coupe

FIGURE 2.28. – Histogrammes des tailles de tumeurs composant notre base de données (a) pour chaque volume et (b) pour chaque slice.

Cette base de données est par la suite aléatoirement divisée en groupes afin de constituer une base de données d'entraînement, une base de données de validation et enfin une base de données de test. La base de données de test représente 10 % des données, les 90 % restants étant partagés entre les bases de données d'entraînement (80 %) et de validation (20 %). Ces dernières sont utilisées pour entraîner le réseau et le valider en le mettant à jour tandis que la base de données de test, qui n'est jamais utilisée pour l'entraînement, nous permet de tester le modèle final sur de nouvelles données.

2.3.3. Construction du modèle de Deep Learning

2.3.3.1. Réseau de neurones convolutifs : architecture U-Net

Les réseaux de neurones, et plus particulièrement les réseaux de neurones convolutifs, sont de plus en plus utilisés dans le domaine de l'imagerie médicale afin de classifier des images ou des pixels pour faire de la segmentation [RIZWAN I HAQUE et al. 2020], [HESAMIAN et al. 2019]. Comme décrit en Section 2.3.1, un réseau de neurones est constitué de couches de neurones interconnectées par des liens pondérés par des poids synaptiques et tous les neurones possèdent une fonction d'activation.

Les réseaux convolutifs vont utiliser des filtres de convolution qui permettent de reconnaître des motifs sur l'image. Pour ce faire, l'image est dans un premier temps découpée en plusieurs petites zones qui se chevauchent entre elles. Chaque zone va être traitée individuellement par un neurone pour subir une opération de filtrage. Tous les neurones possèdent les mêmes paramètres et le fait d'avoir ce même traitement légèrement décalé pour chaque zone, revient à effectuer une convolution. Afin d'analyser différentes caractéristiques de l'image, plusieurs noyaux de convolution appliqués sur les différentes petites zones de l'image sont empilés avec des paramètres

différents. Le nombre de noyaux de convolution correspond à la profondeur de la couche de convolution (et donc au nombre de filtres de convolution différents).

En sortie de la couche de convolution, une carte d'activation avec des caractéristiques extraites de l'image est ensuite traitée par d'autres couches de neurones. La couche de *pooling* va dans un premier temps réduire le nombre de paramètres et de calculs à réaliser, tout en conservant les caractéristiques importantes de l'image.

Finalement, en sortie du réseau de neurones convolutifs, un neurone prend en considération chaque information provenant des neurones des couches précédentes pour prédire un résultat. Chaque résultat de chaque neurone en sortie du réseau va alors être utilisé pour mettre à jour le modèle (*i.e.* ses poids synaptiques) et ainsi améliorer la performance du réseau comme illustré sur la Figure 2.26.

Introduite en 2015 [RONNEBERGER et al. 2015], une architecture dite « U-Net », telle qu'illustrée sur la Figure 2.29, est utilisée pour réaliser des tâches de segmentation dans le domaine médical. Il s'agit d'un réseau entièrement convolutif qui est composé de deux parties, une première contractante et une seconde expansive. La première partie permet de compresser les informations spatiales de l'image (réduction de sa taille) tout en augmentant le nombre de caractéristiques afin d'encoder l'information et la seconde partie de décoder cette information. Pour chaque couche, les informations provenant de la couche précédente et de la couche contractée correspondante sont combinées par concaténation.

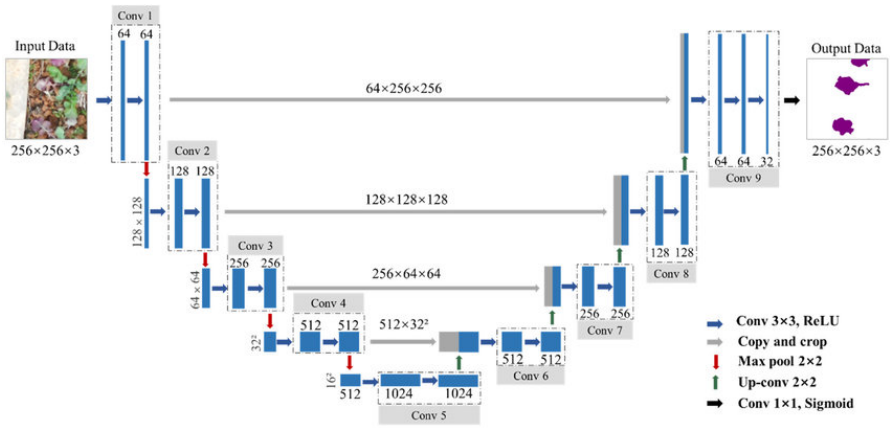


FIGURE 2.29. – Architecture d'un réseau U-Net. Chaque étage représente une couche de neurones constituée de filtres de convolution. En haut de chaque couche, le nombre de paramètres du filtres. Les flèches rouges entre chaque couche de la partie contractante correspond à une couche *pooling* pour diminuer la taille de l'image et au dessus des flèches grises, représentant la concaténation de l'image obtenue dans la phase contractante avec celle de la phase expansive, est noté la taille de l'image [RONNEBERGER et al. 2015], [ZHANG et al. 2020].

Les réseaux U-Net peuvent être utilisés en 2D ou bien en 3D. Les deux approches ont été utilisées et les résultats seront discutés dans la Section 2.3.4. Dans le cas d'un

réseau 2D, une image est donnée en entrée et on récupère en sortie une image de la segmentation associée. Dans le cas 3D, on donne en entrée un volume et on récupère en sortie un volume de segmentation associé au volume d'entrée.

2.3.3.2. Hyperparamètres du réseau

Les performances d'un réseau peuvent être optimisées en ajustant les différents hyperparamètres. Tout d'abord, le nombre de couches de neurones que l'on souhaite mettre dans le réseau doit être défini. Le nombre d'*epochs*, *i.e.* le nombre de fois où le modèle va mettre à jour ses poids après une phase d'entraînement, va permettre de jouer sur le temps d'apprentissage du réseau.
Le réseau de neurones utilisant des filtres de convolution et leur taille, *i.e.* le nombre de pixels sur lesquels la transformation va se faire sont choisis en fonction de la précision des motifs que l'on souhaite identifier. Il s'agit du noyau ou *kernel* des filtres. Un *kernel* plus grand pourra notamment avoir la capacité de sélectionner de plus basses fréquences spatiales qu'un *kernel* plus petit.
Afin que le réseau apprenne à chaque *epoch*, un jeu ou *batch* de données est fourni en entrée. La taille de ce *batch* détermine le nombre de données sur lequel le réseau va apprendre en même temps.
Après cette phase d'entraînement *batch* par *batch*, une validation est effectuée afin de déterminer les nouveaux poids du réseau. Cette validation est réalisée en calculant la fonction de coût ou *loss function*. Cette dernière est choisie en fonction du type de données et de réseau. Pour une tâche de classification (ici pixel par pixel) avec seulement deux classes (tumeur ou non tumeur), c'est la fonction de coût *binary cross-entropy* qui sera utilisée car c'est celle qui évalue le mieux les problèmes de classification. Elle est calculée selon la formule suivante :

$$\text{loss} = -\sum(y_true * log(y_pred)) \tag{2.3}$$

avec *y_true* le masque et y_*pred* la prédiction donnée par le modèle.
Basée sur une descente de gradient pour optimiser la fonction de coût, un optimiseur ou *optimizer* doit aussi être défini. Dans le cas d'une segmentation comme la nôtre, c'est souvent l'*optimizer* « Adam » qui est utilisé.
La rapidité de la descente de gradient de cet *optimizer* est modulée par le taux d'apprentissage ou *learning rate*. Un *learning rate* trop grand ne permettra pas la convergence du réseau, tandis qu'un *learning rate* trop petit le fera converger très lentement. Un compromis doit donc être trouvé, la bonne valeur étant difficile à prédire à l'avance.
En sortie des couches de convolution, le dernier neurone doit ainsi classifier. Il est activé par une *fonction d'activation* non linéaire. La fonction choisie est la fonction linéaire par morceaux « ReLu » (*Rectified Linear Unit*), qui est définie par :

$$f(x) = \begin{cases} 0 & \text{si} \quad x < 0 \\ x & \text{si} \quad x \geq 0 \end{cases} \tag{2.4}$$

Ces différents paramètres ont été testés et optimisés afin d'obtenir le réseau de neurones le plus robuste possible au cours du stage de master 2 de Ouafaa El Barghmi [EL BARGHMI 2022] que j'ai contribué à encadrer.
Les paramètres du réseau que nous avons implémenté sont résumés dans le Tableau 2.7 et illustrés dans la Figure 2.30.

	U-Net 2D	U-Net 3D
Nombre de couches	4	4
Nombre d'epochs	100	100
Taille de batch	32	4
Kernel	3×3	$3 \times 3 \times 3$
Nombre de filtres	8	8
Optimizer	Adam	Adam
Loss function	Binary cross-entropy	Binary cross-entropy
Learning rate	10^{-3}	10^{-3}

TABLEAU 2.7. – Tableau récapitulatif des différents paramètres des réseaux U-Net utilisés pour la tâche de segmentation des tumeurs.

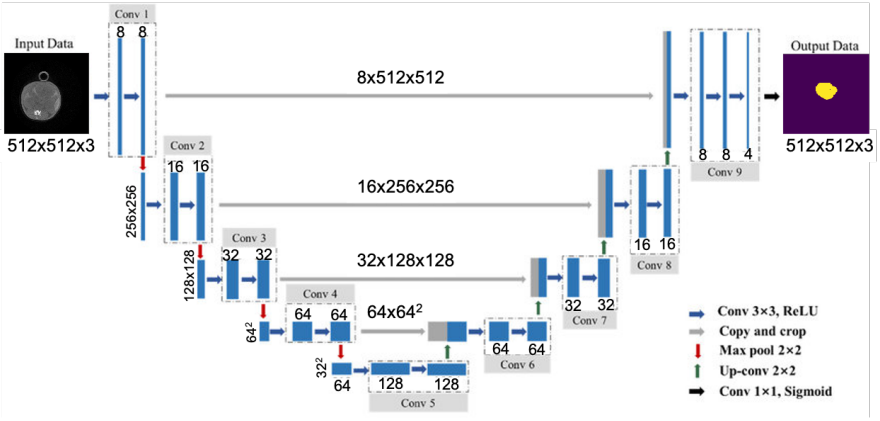


FIGURE 2.30. – Architecture du réseau U-Net utilisé avec les différents paramètres (adapté de [ZHANG et al. 2020]).

2.3.3.3. Évaluation du modèle

Pour évaluer un modèle, des métriques sont calculées. Dans le cas de la segmentation, le *Score Dice* (ou indice de Sørensen-Dice) est souvent utilisé. Il s'agit d'un

indicateur statistique mesurant la similarité entre deux ensembles de pixels, à savoir dans notre cas la *ground truth* et la segmentation prédite par le réseau. Il est calculé selon la formule :

$$\text{dice} = \frac{2|X \cap Y|}{|X| + |Y|} \tag{2.5}$$

où $|X|$ représente le nombre d'éléments compris dans la *ground truth* et $|Y|$ le nombre d'éléments dans la segmentation prédite. Plus le *dice* est élevé, et donc proche de 1, meilleure est la prédiction.

La distance de Hausdorff est une autre métrique qui permet de mesurer l'éloignement de deux sous-ensembles. L'objectif est de la minimiser pour que nos deux sous-ensembles, à savoir la *ground truth* et la prédiction du réseau, soient les plus proches possibles. Une distance nulle correspondant à deux sous-ensembles parfaitement similaires. Elle est donnée par la formule suivante [TAHA et al. 2015] :

$$\text{distance}(A, B) = \max_{X \in A}\{\min_{Y \in B}\{||X, Y||\}\} \tag{2.6}$$

où $||X, Y||$ est la distance euclidienne entre les deux sous-ensembles X (la *ground-truth*) et Y (la prédiction).

2.3.4. Résultats

2.3.4.1. En 2D

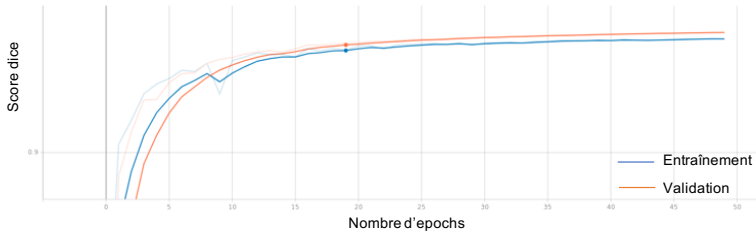
La première stratégie étudiée a été de travailler en 2D, donc image par image. Notre objectif étant de segmenter des tumeurs dans les scans, seules les *slices* avec des tumeurs ont été utilisées. Une première étape, mais qui n'a pas été étudiée au cours de ma thèse, aurait pu consister à détecter uniquement la présence ou non de tumeurs, puis de réaliser une segmentation. Mais pour le travail qui suit, il s'est agi uniquement de l'étape de segmentation sur des images déjà identifiées comme ayant des tumeurs.

Après avoir divisé les images en bases de données d'entraînement, de validation et de test, le nombre d'images par base de données de subdivise de manière suivante :
- entraînement : 8 658 images
- validation : 2 165 images
- test : 1 203 images

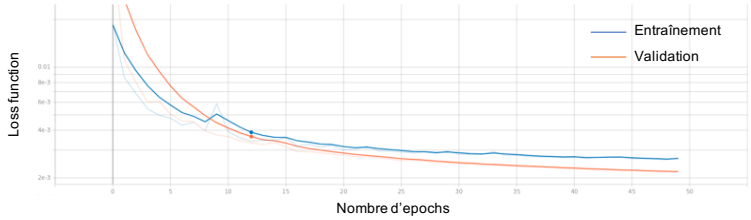
Les images ont été réparties de manière à avoir des proportions de chaque catégorie (petite, moyenne ou grande) de tumeurs équivalentes dans chaque base de données.

Le réseau U-Net entraîné nous permet d'obtenir un *score dice* moyen de 0.97 pour l'entraînement et la validation, ce qui est une très bonne performance, et une *loss function* de 0.002. La Figure 2.31 montre l'évolution de ces métriques au cours des

epochs et nous pouvons voir que le modèle a convergé. De plus, il n'y a pas de sur-apprentissage (*i.e.* le modèle ne généralisera pas) car les courbes d'entraînement et de validation restent proche au cours de l'apprentissage et convergent ensemble.



(a)



(b)

FIGURE 2.31. – Évolutions (a) du *score dice* et (b) de la *loss function* au cours des différentes *epochs*.

A l'issue de l'entraînement, le réseau est testé sur la base de données de test qui n'a jamais été vue auparavant par le modèle. Les performances sur les données de test sont résumées dans le Tableau 2.8.

Dice	Moyen	0.93 ± 0.13
	Petites tumeurs	0.89 ± 0.16
	Moyennes tumeurs	0.98 ± 0.01
	Grandes tumeurs	0.99 ± 0.01
Distance Hausdorff		0.29 ± 0.07 mm

TABLEAU 2.8. – Tableau récapitulatif des résultats du modèle 2D sur la base de test.

Les *scores dice* pour les différentes tailles de tumeurs sont aussi présentés dans la Figure 2.32. Comme nous pouvons le voir, nous avons une très bonne performance pour les segmentations des moyennes et grandes tumeurs. En revanche, la performance est plus faible pour les petites tumeurs avec beaucoup de points aberrants et donc de mauvais scores. Cela est dû au fait que nous demandons au réseau de repérer une tumeur de seulement quelques pixels dans une image de taille 512 × 512 pixels. De plus, le *score dice* reste une métrique très sensible à la taille des ensembles. En

effet, une petite erreur sur un petit ensemble va engendrer une grosse variation de la métrique.

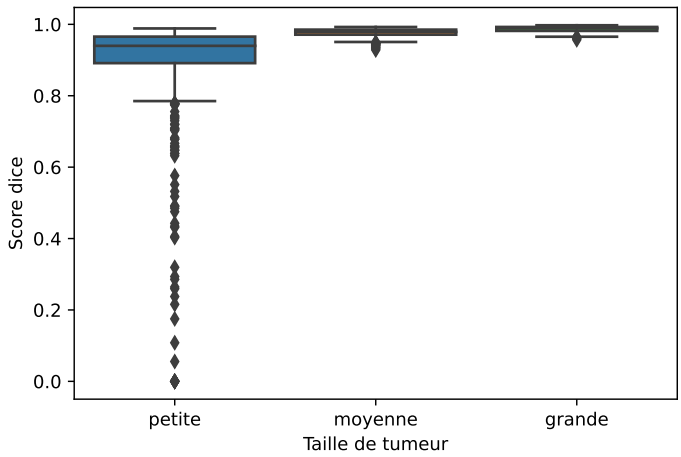


FIGURE 2.32. – *Score dice* en fonction de la catégorie de tumeurs pour la base de données de test.

Des exemples de prédiction sont montrés en Figure 2.33.

Avec ce modèle 2D, nous avons vu que des bonnes performances pour la segmentation étaient atteintes. La limite du réseau se trouve dans la détection des petites tumeurs. Une des causes pourrait être le fait qu'en 2D, nous nous affranchissons d'une partie de l'information spatiale qui est contenue selon l'axe z (en profondeur). C'est pourquoi nous avons essayé une seconde stratégie en créant un réseau 3D nous permettant d'analyser directement des volumes.

2.3.4.2. En 3D

La seconde approche a ainsi été de construire un réseau 3D pour travailler avec des volumes. Pour des raisons de temps de calcul, nous n'avons pas travaillé avec le volume entier. Des sous-volumes de 128 ×128 ×16 avec un chevauchement sur 8 *slices* ont été créés (Figure 2.34). Cette technique nous permet d'obtenir un nombre de sous-volumes plus importants et ainsi d'enrichir notre base de données. Il s'agit ici d'augmentation de données ou *data augmentation* manuelle à partir de nos données d'origine. Les bases de données étaient composées des nombres de volumes suivants :

— entraînement : 277 volumes
— validation : 69 volumes
— test : 39 volumes

Les résultats obtenus sont plus faibles que pour l'approche 2D comme montré sur la Figure 2.35 avec un *score dice* moyen de 0.66. En revanche, nous pouvons voir un pic proche de 0 correspondant à des prédictions ratées par le modèle. En ne prenant pas en compte ces valeurs, nous obtenons un *score dice* de 0.83.

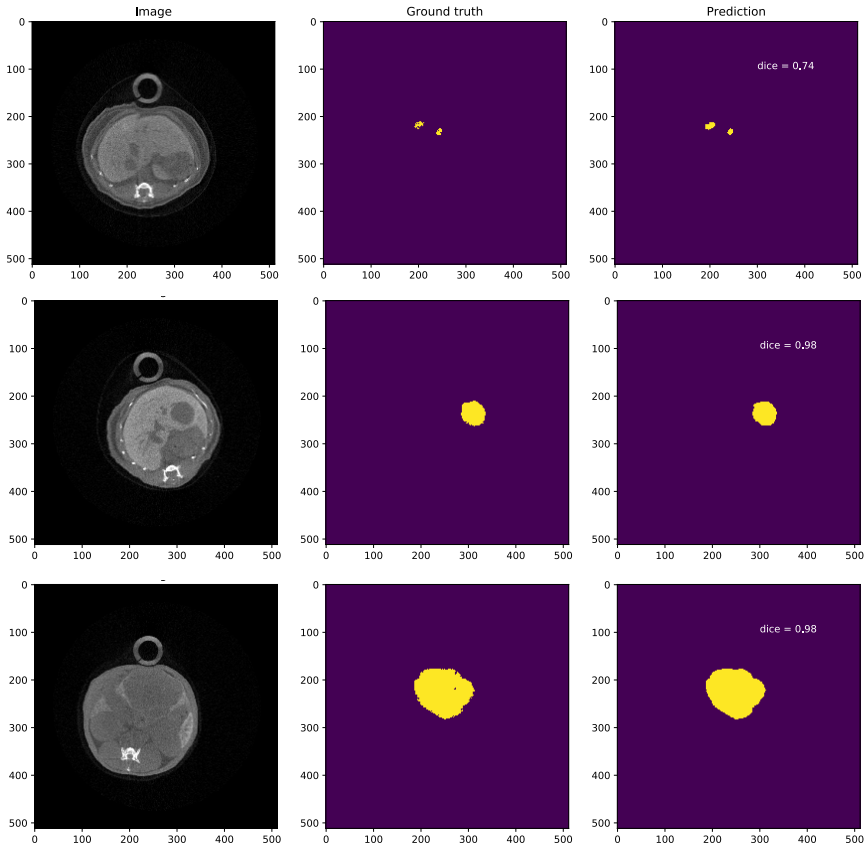


FIGURE 2.33. – Exemples de résultats obtenus avec le modèle entraîné pour différentes tailles de tumeurs. A gauche, l'image test, au centre la *ground truth* et à droite la segmentation prédite par le réseau.

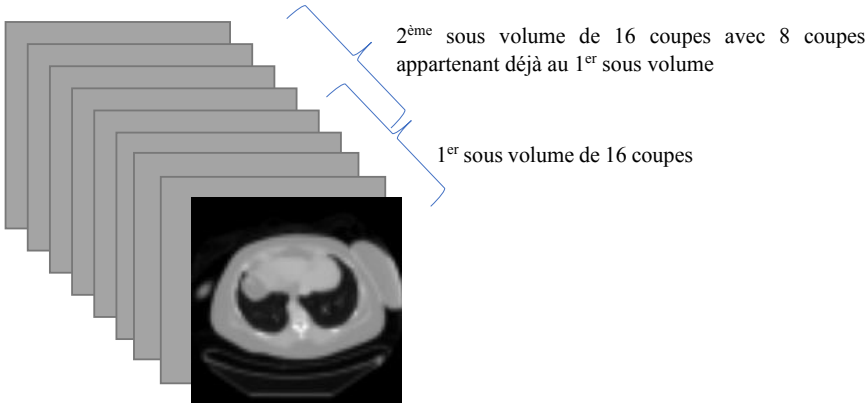


FIGURE 2.34. – Stratégie de formation des sous-volumes pour le modèle 3D avec un *overlapping* de 50 %.

Ces performances plus faibles sont notamment causées par la taille de la base de données d'entraînement, qui est petite. Par ailleurs, même si nous ajoutons une

information spatiale en utilisant des volumes, nous augmentons aussi le nombre de voxels à analyser. Donc finalement, une petite tumeur reste très compliquée à détecter et à segmenter.

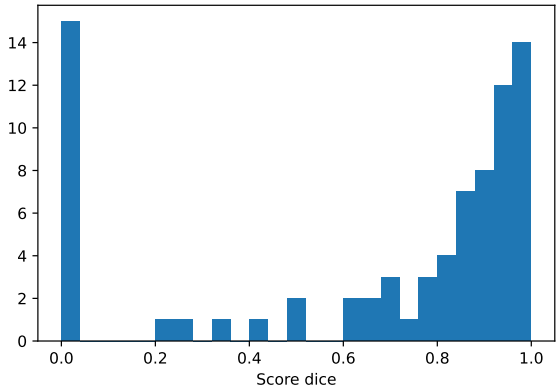


FIGURE 2.35. – *Score dice* des données test pour le modèle 3D. La moyenne est de 0.66.

2.3.5. Limites

Comme nous avons pu le voir avec les approches 2D ou 3D, la segmentation des tumeurs du foie reste un problème compliqué pour un réseau de *Deep Learning*. Des études développées sur des jeux de données tomodensitométriques de patients ont aussi montré que cette détection des tumeurs du foie restait complexe avec des approches par *Deep Learning* [GUL et al. 2022], [ALIRR 2020]. La très grande hétérogénéité en termes de formes, de tailles et de contrastes des tumeurs rend difficile l'apprentissage. Notamment, la segmentation des petites tumeurs est très complexe et fournit des résultats moins solides que ceux obtenus par segmentation des tumeurs ayant une taille moyenne ou grande. Une perspective d'amélioration pourrait être de réaliser la tâche de segmentation en deux temps. La première phase consisterait en la détection partielle de la tumeur afin de délimiter une zone, puis dans un second temps de réaliser la segmentation précise uniquement dans cette zone, permettant ainsi de réduire le nombre de pixels à segmenter.

Par ailleurs, le modèle entraîné a beaucoup de mal à généraliser à des images légèrement différentes, telles que par exemple des images avec des taux de comptages différents ou du bruit supplémentaire. Cela peut être causé par une base de données encore trop petite ou pas assez hétérogène pour entraîner le réseau avec toutes les configurations d'images possibles. Ce manque d'adaptabilité de la part du modèle nous limite dans son utilisation. Une plus grande base de données d'apprentissage composée de différents protocoles d'acquisition pourrait nous aider à généraliser d'avantage le modèle.

Finalement, les modèles développés, et particulièrement celui en 2D, nous permettent d'avoir une première estimation de la segmentation et donc nous procurent une aide à la segmentation très précieuse, même si des améliorations peuvent être ajoutées pour améliorer les performances.

Or, au-delà d'une segmentation automatique, nous avons besoin de connaître les limites réelles entre la tumeur et les cellules immunitaires afin d'être plus précis sur nos analyses. L'approche par imagerie spectrale, qui sera détaillée au Chapitre 4, pourrait nous fournir une approche complémentaire pour cette problématique.

Dans ce chapitre, nous avons présenté le système de micro-tomodensitomètre développé au CPPM avec ses différentes caractéristiques. Le protocole d'acquisition utilisé pour le suivi longitudinal des souris a été détaillé et une preuve de concept permettant de réduire l'impact du mouvement respiratoire a été présentée. Enfin, une nouvelle approche par *Deep Learning* a été proposée afin de répondre à la problématique de segmentation des tumeurs. La très grande hétérogénéité des tumeurs hépatique chez la souris à laquelle nous devons faire face lors de leur segmentation rend très bien compte de la problématique que nous pouvons retrouver chez les patients en raison de l'hétérogénéité des tumeurs hépatiques. Cette caractéristique très précieuse du modèle murin utilisé au cours de ma thèse sera explicitée dans le chapitre suivant et ses avantages en seront détaillés.

3. Chapitre 3. Études longitudinales pour le suivi des carcinomes hépatocellulaires chez la souris.

Sommaire

3.1. Introduction à la problématique biologique 88
3.1.1. Carcinome hépatocellulaire 88
3.1.2. Modèle murin *Alb-R26*^{Met} 89
3.1.3. Suivi non invasif des tumeurs 89
3.1.4. Problématiques 90
3.2. Mise en place de protocoles pour l'analyse des tumeurs 91
3.2.1. Dissociation cellulaire 91
3.2.2. Dissociation des noyaux 91
3.2.3. Introduction des études FACS et sc-RNAseq 92
3.2.3.1. Analyse FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) . . . 92
3.2.3.2. Analyse de scRNAseq 93
3.3. Caractérisation des tumeurs prénéoplasiques 94
3.3.1. Protocole de suivi des tumeurs 94
3.3.2. Résultats 95
3.3.2.1. Analyse des populations de cellules immunitaires par FACS 95
3.3.2.2. Analyse du transcriptome par sc-RNAseq dans les cellules uniques 96
3.3.2.3. Conclusion de l'étude 98
3.4. Évaluation des réponses au traitement 99
3.4.1. Introduction aux traitements épigénétiques 99
3.4.1.1. Méthylation de l'ADN 99
3.4.1.2. Acétylation des histones 100
3.4.2. Comparaison de deux traitements et apport de l'immunothérapie 100
3.4.2.1. Introduction de l'étude 101
3.4.2.2. Protocole de l'étude in-vivo 103
3.4.2.3. Résultats de l'étude in-vivo 103
3.4.2.4. Conclusion de l'étude 110
3.4.3. Combinaison d'un agent épigénétique à un inhibiteur RTK . . . 110
3.4.3.1. Introduction à la problématique 110

3.4.3.2. Protocole de l'étude in vivo 111
3.4.3.3. Résultats de l'étude in vivo 112
3.4.3.4. Conclusion de l'étude 114

Dans ce chapitre, nous allons développer l'utilisation du prototype PIXSCAN-FLI décrit au chapitre précédent. En effet, depuis quelques années, une collaboration s'est développée entre l'équipe de recherche imXgam et l'équipe de recherche de Flavio Maina (« *Targeting Signalling Networks and Microenvironment in Cancer* ») à l'IBDM est née autour de l'utilisation de ce scanner préclinique pour la recherche sur le cancer du foie [CASSOL, PORTAL et al. 2019].

3.1. Introduction à la problématique biologique

Dans cette partie, nous allons introduire la problématique biologique qui nous intéresse dans le cadre de la collaboration avec l'IBDM et de mon projet de thèse, qui fait le lien entre le prototype PIXSCAN-FLI et son application à une étude préclinique.

3.1.1. Carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est un cancer primitif du foie. Il représente 90 % des cas de cancers du foie et est le 3ème type de cancer le plus mortel au monde. Ce cancer, de par son agressivité et sa forte résistance aux traitements, le rend difficile à soigner [VILLANUEVA 2019]. Les thérapies utilisées en première ligne (Sorafenib, Regorafenib, Cabozantinib ou Lenvatinib) n'ont que des effets moindres sur le cancer et ne donnent en moyenne que 10 % de réponse au traitement [BRUIX et al. 2021].

La complexité du CHC se traduit par sa très grande hétérogénéité au niveau des altérations moléculaires : outre les mutations génétiques, les altérations épigénétiques ont été révélées comme ayant un impact direct sur le CHC dans les phases d'initiation mais aussi sur son agressivité et sa résistance aux traitements.

L'épigénétique correspond à l'étude des changements d'expression des gènes. Contrairement aux mutations génétiques, qui modifient la séquence d'ADN, ces mécanismes épigénétiques sont modifiés de manière transmissible et adaptative mais réversible et sans modification de la séquence nucléotidique. Les différents mécanismes pouvant être mis en jeu et les traitements cibles seront décrits en Section 3.4.1.

Dans la maladie du foie, l'épigénétique peut avoir un rôle important car c'est un organe stimulé en permanence et qui doit s'adapter à des changements environnementaux tels que l'alimentation, le métabolisme, les infections ou les agents toxiques. L'épigénôme est ainsi rendu vulnérable et change suite à ces stimuli, ce qui peut représenter des risques menant au CHC.

De nouvelles opportunités thérapeutiques peuvent donc être conçues en agissant sur des modulateurs de changements épigénétiques. La Section 3.4 recensera des études que nous avons menées en ciblant notamment ces mécanismes.

3.1.2. Modèle murin *Alb-R26^{Met}*

Afin d'étudier ce cancer, l'équipe de Flavio Maina a généré un modèle murin permettant le développement spontané de CHC. Il s'agit d'un croisement génétique entre le modèle R26^{stopMet}, portant un transgène chimérique Met souris-humain inséré au locus *Rosa26* et le modèle Alb-Cre. Dans le modèle R26^{stopMet} une légère augmentation des niveaux de Met est obtenue après l'élimination de la cassette stop à l'aide de la recombinase Cre [FAN, RICHELME et al. 2015] (Figure 3.1).

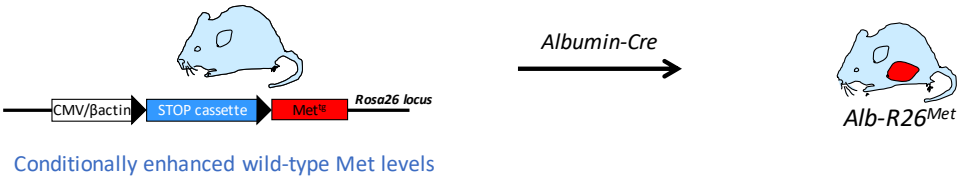


FIGURE 3.1. – Schéma du croisement entre les souris pour l'obtention du modèle *Alb-R26^{Met}* [FAN, RICHELME et al. 2015].

Le niveau d'expression de Met dans le foie est seulement multiplié par 3, et cette légère modification est suffisante pour induire la formation de tumeurs spontanées dans le foie au fil du temps. Les tumeurs dans le modèle *Alb-R26^{Met}* récapitulent celles correspondant au sous-type de patient CHC le plus agressif défini comme « prolifératif-progéniteur », caractérisés par une résistance aux médicaments utilisés en clinique, par une hétérogénéité moléculaire des patients et une hétérogénéité temporelle de l'apparition de la tumeur [FAN, ARECHEDERRA et al. 2017]. Le CHC *Alb-R26^{Met}*, comme ceux des patients « progéniteurs prolifératifs », se caractérise ainsi par un enrichissement des gènes qui sont simultanément surexprimés et hyperméthylés dans les îlots CpG du corps du gène.

Les tumeurs apparaissent à partir de 45 semaines environ chez ce modèle et il faut noter que nous ne gardons que les souris mâles, car il est connu que : a) la fréquence du CHC chez les mâles (patients ou modèles animaux) est plus élevée que chez les femelles ; b) les caractéristiques moléculaires et les mécanismes sous-jacents du CHC chez les mâles sont distincts de ceux du CHC chez les femelles. La Figure 3.2 représente le nombre de tumeurs par souris en fonction de leur âge pour toutes les souris utilisées lors de nos différentes expériences. Dans ce modèle, la fréquence de formation de tumeurs spontanées atteint plus de 80 %.

3.1.3. Suivi non invasif des tumeurs

Le suivi non invasif chez la souris de tumeurs endogènes du foie est impossible sans utiliser des outils d'imagerie. En effet, seule une biopsie peut être réalisée afin d'obtenir des informations sur la tumeur au cours de son évolution. L'imagerie préclinique nous permet donc de pouvoir suivre les souris au cours du temps sans risque majeur pour elles. Les scans et l'utilisation d'un produit de contraste (comme décrit à la

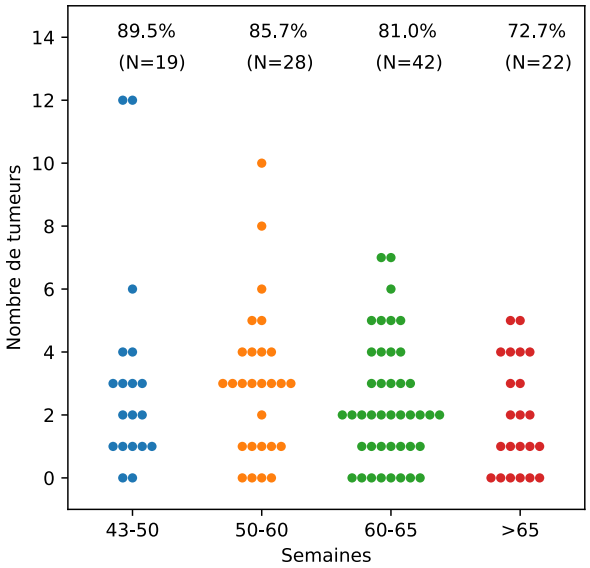


FIGURE 3.2. – Graphique représentant la fréquence et le nombre de tumeurs par souris en fonction de leur âge.

Section 2.2.2) nous permettent de voir si la souris possède des tumeurs et, le cas échéant, de suivre leur évolution au cours du temps en répétant les scans selon des protocoles prédéfinis. Ces informations sont très précieuses et nous ont permis de mener des études conséquentes, qui seront détaillées par la suite.

3.1.4. Problématiques

Lors de mon travail de thèse, deux problématiques principales ont été étudiées concernant le CHC. La première vise à mieux comprendre les mécanismes de formation tumorale au stade précoce de l'évolution. Ainsi, nous avons étudié les tumeurs dites prénéoplasiques, correspondant aux premiers stades de l'évolution tumorale. Nos études d'imagerie ont permis de mettre en évidence qu'une partie de lésions prénéoplasiques ont un comportement évolutif et d'autres un comportement stable pendant la phase d'analyse que nous avons réalisée. Notre étude vise à distinguer les tumeurs stables par opposition aux tumeurs évolutives, avec l'objectif d'identifier les différences moléculaires et cellulaires entre ces deux catégories de tumeurs.

La seconde problématique nous a menée à évaluer la réponse aux traitements. Comme décrit précédemment, les CHC sont très résistants aux thérapies actuelles. L'objectif a ainsi été de tester de nouvelles combinaisons de traitements et d'en évaluer l'efficacité. Par ailleurs, une étude sur l'apport de l'immunothérapie en complément d'un traitement a aussi été réalisée.

Ces différentes problématiques seront présentées et détaillées dans ce chapitre, un

schéma illustrant les différentes phases des études est représenté en Figure 3.3.

FIGURE 3.3. – Schéma de l'évolution du CHC et des différentes étapes que nous avons étudiées. En (1) l'étude des tumeurs prénéoplasiques aux stades initiaux de la tumorigénèse ; en (2) l'étude de l'impact des traitements sur l'évolution tumorale.

3.2. Mise en place de protocoles pour l'analyse des tumeurs

Afin de mener à bien nos études in vivo, outre le protocole d'acquisition que nous avons mis en place et que nous avons décrit en Section 2.2, il était nécessaire d'établir des protocoles de dissociation cellulaire après avoir disséqué les tumeurs. En effet, les objectifs de nos études sont d'une part d'analyser, grâce à l'imagerie, l'évolution du volume tumoral, et d'autre part d'analyser au niveau cellulaire, par cytométrie en flux, le changement du micro-environnement tumoral et le remaniement du système immunitaire, ainsi que les changements moléculaires par analyse transcriptomique.

3.2.1. Dissociation cellulaire

Dans un premier temps, nous avons mis en place un protocole de dissociation cellulaire. Des analyses de nos tumeurs étant réalisées par cytométrie en flux (détaillée en Section 3.2.3), nous avons besoin de dissocier les tumeurs pour avoir des cellules uniques. Pour cela nous utilisons une dissociation mécanique et enzymatique. Le mélange d'enzymes utilisé est composé de collagénase IV et de DNAse I. Les échantillons sont ensuite incubés, centrifugés et filtrés avant d'être resuspendus. Le protocole complet se trouve en Annexe A. Ce protocole nous permet d'obtenir en moyenne 70 % de viabilité (nombre de cellules vivantes par rapport au nombre de cellules totales dissociées). Le nombre de cellules final obtenu est quant à lui très dépendant de la taille originale de la tumeur.

3.2.2. Dissociation des noyaux

Pour les analyses de séquençage ARN (qui seront détaillées à la Section 3.2.3.2), nous avons réalisé les expériences sur cellules uniques et sur noyaux de cellules uniques. En effet, nous souhaitions avoir les meilleures conditions expérimentales pour analyser le profil transcriptomique de nos échantillons. La qualité et le nombre de cellules est

un paramètre très important, surtout pour des tumeurs prénéoplasiques qui sont de très petite taille. Dans ce but, nous avons mis en place un protocole de dissociation des noyaux basé sur celui de Miltenyi Biotec (Annexe B) avec l'appareil *gentleMACS Dissociator*. Nous avons adapté le temps de centrifugation ainsi que la taille du filtre utilisé en fonction de nos échantillons, qui sont plus petits et plus fragiles. Un avantage additionnel de travailler sur les noyaux est de pouvoir analyser des tissus congelés, contrairement aux cellules pour lesquelles nous devons travailler uniquement sur tissus frais.

3.2.3. Introduction des études FACS et sc-RNAseq

Ces différents protocoles nous ont servi après dissection des tumeurs à réaliser des études par FACS (cytométrie en flux) et sc-RNAseq (séquençage ARN sur cellule unique) afin d'analyser les différentes cellules présentes dans le compartiment immunitaire et tumoral des lésions tumorales. Deux types d'analyses ont été réalisées et sont brièvement décrites par la suite.

3.2.3.1. Analyse FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)

Tout d'abord, nous avons réalisé des études de cytométrie en flux (FACS) afin d'obtenir des informations sur le compartiment immunitaire et l'infiltrat présent. Pour cela, à la fin de chacune de nos expériences d'imagerie, nous avons disséqué les souris pour récupérer les tumeurs et dissocier les cellules. Les cellules étaient ensuite marquées avec des anticorps sélectionnés au préalable en fonction des populations de cellules que nous avons souhaité analyser, qui viendront reconnaître comme antigène des protéines présentes sur la membrane des cellules. Chaque anticorps est aussi conjugué à un agent fluorescent émettant dans une longueur d'onde spécifique. Une représentation schématique du fonctionnement d'un FACS est présentée en Figure 3.4.

Le panel des anticorps choisis doit être adapté pour que les différentes couleurs ne se chevauchent pas lors de la lecture des données. Les cellules sont passées individuellement devant un laser émettant différentes longueurs d'onde et la lumière émise par l'agent fluorescent des différents anticorps est alors enregistrée. Avec un logiciel, des tris suivant la taille ou la forme de la cellule sont réalisés afin d'éliminer les débris. Ensuite, une stratégie de *gating* avec un logiciel spécifique (pour nos expériences il s'agit du logiciel FlowJo) permet d'identifier les différentes populations de cellules immunitaires. Le cytomètre utilisé est le *BD LSRFortessa cytometer*.
Finalement, nous obtenons un vecteur multiple représentant les populations de cellules immunitaires pour les cellules analysées.

Les analyses par FACS (après la dissociation) ont été réalisées par Paula Michea de l'équipe de recherche de Jean-Paul Borg au Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM).

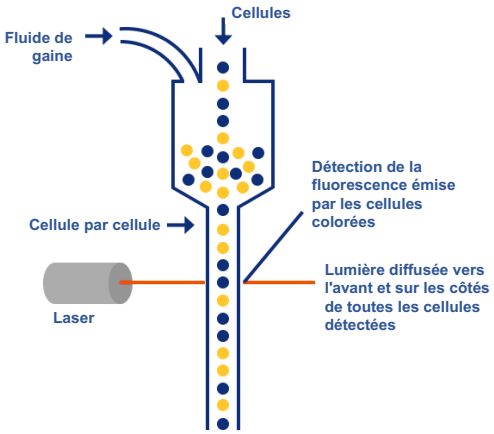


FIGURE 3.4. – Schéma présentant le fonctionnement d'un FACS au moment de la lecture des cellules [*Abbexa - Antibodies, Proteins, ELISA kits* s. d.].

3.2.3.2. Analyse de scRNAseq

Un autre type d'analyse que nous avons réalisé est le séquençage d'ARN. Comme mentionné précedemment, nous l'avons réalisé sur des cellules uniques (sc-RNAseq) et sur des noyaux de cellules uniques (snRNAseq). Le séquençage permet d'identifier et de quantifier l'ARN issu de la transcription du génome. Les cellules doivent au préalable être triées, en général à l'aide d'un FACS. Elles sont ensuite marquées avec des anticorps pour que chaque cellule possède un code barre unique qui permettra son identification lors de la lecture des données. Le séquençage peut se réaliser en multiplexant plusieurs échantillons ensemble. La Figure 3.5 illustre le processus suivi avec l'appareil Chromium de la société 10X Genomics. Finalement, pour chacun des échantillons, et même pour chaque cellule le composant, nous avons l'information de l'expression des différents gènes, c'est-à-dire le transcriptome.
Les séquençages ARN ont été réalisés par la plateforme *Transcriptomics and Genomics Marseille Luminy* (TGML).

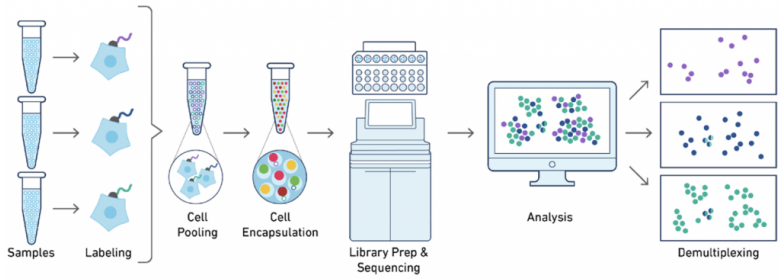


FIGURE 3.5. – Schéma présentant le processus de séquençage d'ARN [*10x Genomics* s. d.].

3.3. Caractérisation des tumeurs prénéoplasiques

Comme nous l'avons décrit précédemment, le CHC est un cancer diagnostiqué très tard chez le patient, ce qui implique une stratégie de traitement très limitée et avec des effets thérapeutiques insatisfaisants. Le modèle murin *Alb-R26*^{Met} développé à l'IBDM permet de récapituler l'hérérogénéité et la résistance aux traitements que nous retrouvons chez les patients. De plus, le prototype PIXSCAN-FLI nous permet quant à lui de réaliser des imageries avec une résolution spatiale permettant la détection de tumeurs d'un milimètre de diamètre. Nous nous sommes alors intéressés à la phase d'initiation des tumeurs à leur développement. Cet état précancéreux est aussi appelé état prénéoplasique. Une lésion prénéoplasique correspond à un « *ensemble d'altérations tissulaires qui en elles-mêmes ne sont pas malignes mais peuvent dans leur évolution et selon une probabilité variable, être associées à un cancer ou en être le prélude et qui constituent par conséquent donc un facteur de risque plus ou moins déterminant.* » (Définition de l'Académie nationale de médecine). Il est dont important de mieux connaître ce stade précoce dans l'évolution tumorale pour essayer de trouver des indicateurs ou des marqueurs significatifs de l'évolution tumorale maligne ou de la stabilité de ces altérations tissulaires.

C'est dans ce contexte que nous avons mis en place une étude sur les tumeurs prénéoplasiques avec le modèle murin *Alb-R26*^{Met}. L'objectif est de suivre des tumeurs prénéoplasiques au cours du temps et de comprendre quelles sont les différences entre une tumeur qui reste stable et une tumeur qui va évoluer avec le temps. L'idée est d'identifier des caractéristiques cellulaires et moléculaires permettant de catactériser ces deux catégories. Afin d'avoir un repère lors de la détection des tumeurs qualifiées de prénéoplasiques à l'imagerie, nous nous sommes basés sur les critères énoncés par l'Internation Working Party (IWP) [« Terminology of nodular hepatocellular lesions » 1995] définissant qu'une tumeur est considérée comme précancéreuse chez le patient si c'est un nodule de diamètre compris entre 1 et 10 mm. Par translation chez la souris, nous avons considéré une tumeur prénéoplasique comme étant une tumeur de diamètre inférieur à 4 mm et n'exprimant aucun marqueur (protéine significative de présence d'un CHC telle que l'alpha-foetoprotéine) du CHC.

3.3.1. Protocole de suivi des tumeurs

La construction de notre étude s'est donc centrée sur les tumeurs prénéoplasiques. Pour cela, une première imagerie d'une cohorte est réalisée avec le prototype PIXSCAN-FLI afin d'identifier les tumeurs. Les souris possédant des tumeurs prénéoplasiques (diamètres < 4-5 mm) sont alors suivies au cours du temps. Tous les 15 jours les souris sont de nouveaux imagées et le statut de la tumeur est évalué et classé tel que :

— évolution tumorale (volume$_{imagerie_i}$ / volume$_{imagerie_i-1}$) < 1.15 : tumeur quiescente (ou stable),

— évolution tumorale (volume$_{imagerie_i}$ / volume$_{imagerie_i-1}$) > 1.15 : tumeur évolutive.

Après 3 ou 4 imageries, lorsque le statut de la tumeur est bien défini, les tumeurs sont dissociées pour réaliser d'une part des analyses FACS et d'autre part des scRNAseq ou snRNAseq (Section 3.2.3). La Figure 3.6 résume le protocole suivi pour les tumeurs prénéoplasiques.

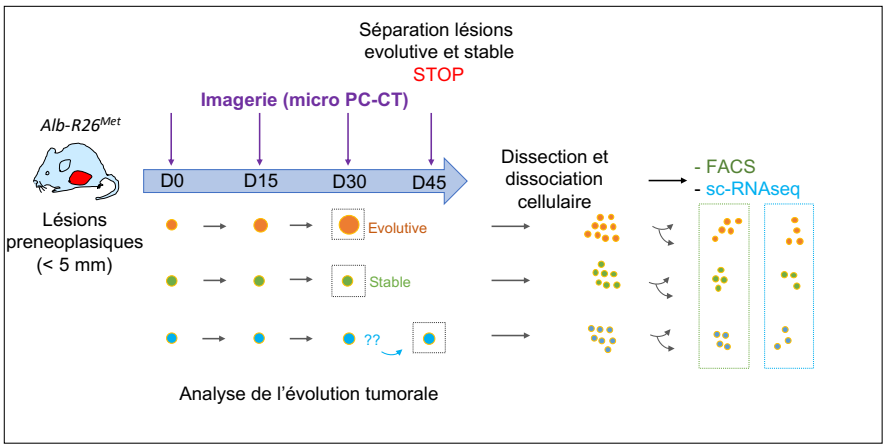
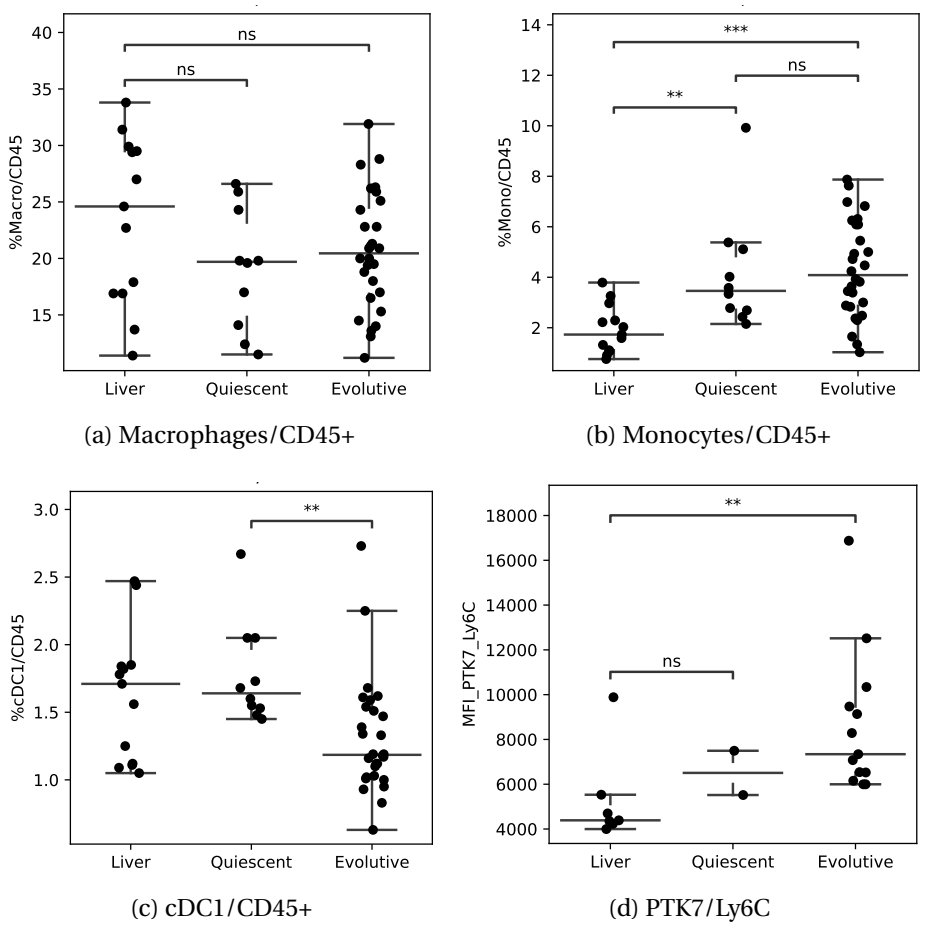


FIGURE 3.6. – Schéma du protocole du suivi des tumeurs prénéoplasiques.

3.3.2. Résultats

3.3.2.1. Analyse des populations de cellules immunitaires par FACS

Les analyses par FACS effectuées avec un panel d'anticorps optimisé pour détecter différents sous-types de cellules immunitaires nous ont permis, dans un premier temps, de comparer les populations de cellules immunitaires. La Figure 3.7 illustre les résultats pour les populations de cellules les plus marquantes. La proportion de macrophages (Figure 3.7a) reste inchangée, que ce soit dans les tumeurs évolutives ou stables ou dans le foie contrôle. En revanche, nous pouvons voir une augmentation des monocytes (Figure 3.7b) dans les lésions (stables ou évolutives) comparées au foie contrôle. Il y a donc un recrutement de cette population sur le site tumoral. Un résultat très intéressant est la diminution des cellules dendritiques cDC1 (Figure 3.7c) dans les lésions évolutives. Ces cellules sont présentatrices de l'antigène auprès du système immunitaire. Une diminution de cette population peut donc illustrer une diminution de l'action du système immunitaire envers ces lésions. Par ailleurs, la protéine PTK7, qui est un récepteur de la tyrosine-kinase localisé sur la membrane cellulaire, est présente majoritairement dans les cellules tumorales des lésions évolutives (Figure 3.7d). Comme la protéine PTK7 est connue pour être un marqueur de prédiction pour certains types de cancer (même si ce n'est pas encore montré dans le contexte CHC), ce résultat nous permet d'imaginer qu'elle pourrait être considérée comme un potentiel marqueur diagnostique du CHC.



(a) Macrophages/CD45+

(b) Monocytes/CD45+

(c) cDC1/CD45+

(d) PTK7/Ly6C

FIGURE 3.7. – Graphiques présentants (a, b, c) les pourcentages de populations de sous-types de cellules immunitaires spécifiques en fonction du nombre total de cellules immunitaires (CD45+) et (d) l'intensité de la protéine PTK7 parmi les monocytes (Ly6C).

3.3.2.2. Analyse du transcriptome par sc-RNAseq dans les cellules uniques

Pour cette étude, nous avons aussi réalisé des analyses de séquençages ARN sur cellules ou noyaux de cellules uniques. Une première expérience pilote pour s'assurer de la faisabilité de cette analyse sur nos échantillons a été menée sur 6 lésions (3 évolutives et 3 stables). Le protocole suivi nous a permis de tirer certains résultats importants. Sur la Figure 3.8, la t-SNE (*t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*) est une méthode de réduction de dimensions, qui permet de représenter en 2D l'ensemble des cellules composant ces 6 lésions. En analysant les gènes qui sont exprimés pour chacun des clusters, nous avons pu identifier différents types cellulaires présents dans ces lésions prénéoplasiques. Dans le cluster n° 2 correspondant aux hépatoblastes et hépatocytes, nous avons noté que certains marqueurs typiques du CHC

comme GPC3 (Glypican-3), GS (Glutamyne Synthetase) ou HSP70 (Heat Shock Protein 70) [DI TOMMASO et al. 2009] n'étaient pas présents. Cela signifie donc que ces lésions correspondent bien à des tumeurs prénéoplasiques n'ayant pas encore les marqueurs du CHC. Par ailleurs, en utilisant l'ensemble des gènes présents dans ce même cluster et en l'intégrant sur des données patients atteints de CHC avancés (issues de la cohorte TCGA), nous avons été en mesure de ségréger les patients ayant un CHC des autres patients contrôles. Cela montre qu'un sous-groupe de gènes différentiellement exprimés au stade CHC avancé est déjà altéré au stade prénéoplasique modélisé par le système *Alb-R26*^{Met}. Il est dès lors tentant de spéculer que certains de ces gènes pourraient constituer des cibles potentielles et/ou être utilisés comme des biomarqueurs.

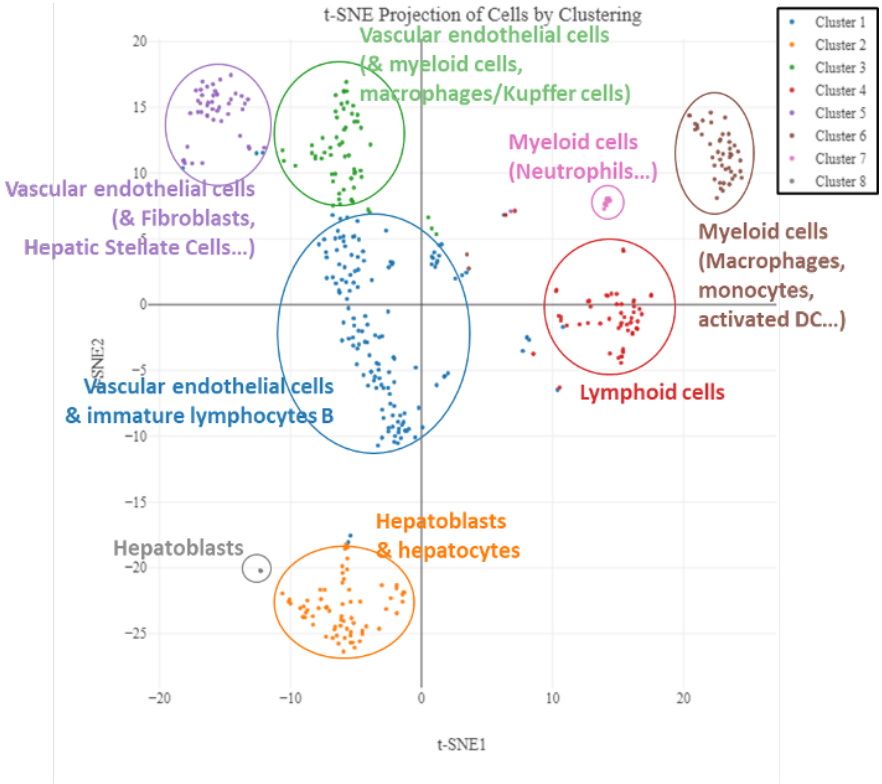
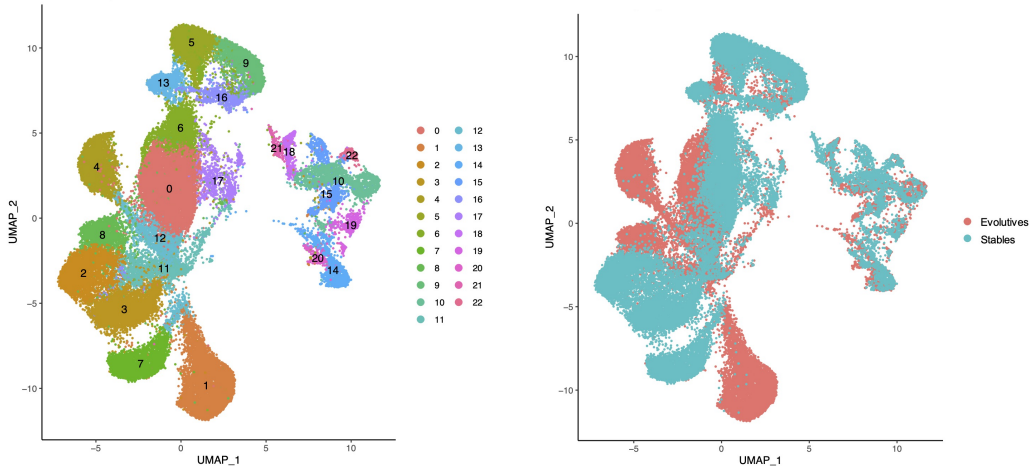


FIGURE 3.8. – Représentation t-SNE de l'analyse par scRNAseq de lésions prénéoplasiques. Chaque cluster a été identifié en prenant en compte les différents gènes exprimés.

Dans une seconde expérience, nous avons utilisé le séquençage ARN sur des noyaux uniques (snRNAseq). L'analyse de 8 nouveaux échantillons (4 lésions stables et 4 lésions évolutives) identifiés par marquage avec des oligonucléotides nous a permis d'obtenir les transcriptomes des lésions stables et évolutives et de les comparer entre eux. Les résultats sont montrés en Figure 3.9a avec le clustering obtenu suite à la réduction de dimensions et la représentation par UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction*) des 8 lésions mélangées. La représentation par UMAP permet de réduire le vecteur multidimensionnel des différentes popula-

tions immunitaires à seulement deux dimensions afin que la visualisation graphique soit possible. Un nombre important de clusters a été identifié, mais lorsque l'on s'intéresse aux différences entre nos deux groupes de lésions (stables et évolutives), nous pouvons observer des clusters qui ne sont exprimés que dans l'un des deux groupes (Figure 3.9b). Par exemple les clusters n° 1, 4 et 8 sont entièrement constitués de lésions évolutives, tandis que les clusters n° 2, 3 et 7 sont entièrement constitués de lésions stables. Des différences d'expression de gènes sont donc observées entre les différents comportements des lésions. Des analyses additionnelles sont notamment en cours pour identifier les populations de cellules composants ces clusters.



(a) Séparation des différents clusters dans la représentation 2D UMAP.

(b) Séparation par groupe en fonction des tumeurs : en rouge les tumeurs évolutives et en bleu les tumeurs stables.

FIGURE 3.9. – UMAP des cellules des 8 lésions (4 évolutives et 4 stables) : (a) avec les différents clusters et en (b) en fonction du comportement des lésions : évolutives ou stables. Ces UMAP ont été obtenues avec le logiciel ShIVA [AUSSEL et al. 2022].

3.3.2.3. Conclusion de l'étude

Cette étude sur les lésions prénéoplasiques nous a permis de trouver des différences notables entre celles qui ont un comportement stable versus celles qui évoluent dans le temps. Des différences cellulaires en termes de populations de cellules immunitaires laissent penser que les tumeurs ont un recrutement différent en fonction de leur évolution et donc mettent plus ou moins en jeu des cellules du système immunitaire. Par ailleurs, comme nous l'avons observé dans le modèle *Alb-R26*^{Met}, l'analyse du transcriptome a mis en évidence la présence de potentiels marqueurs diagnostiques qui sont exprimés à des stades tardifs mais sont aussi présents dans les cellules transformées au stade précoce du programme tumoral. Nos analyses transcriptomiques montrent aussi des différences au niveau de l'expression de certains gènes dans les

lésions stables versus évolutives. Néanmoins, une analyse bio-informatique plus approfondie doit être menée sur ces derniers résultats snRNAseq. Ces études pourront nous suggérer de potentielles nouvelles solutions de traitement, notamment pour cibler les lésions aux stades précoces et ou de potentiels nouveaux biomarqueurs diagnostiques pour prédire le comportement des lésions prénéoplasiques.

3.4. Évaluation des réponses au traitement

Après avoir étudié l'initiation des tumeurs et caractérisé les différences entre les tumeurs stables et évolutives, nous allons maintenant étudier la réponse aux traitements des tumeurs aux stades précoces et avancés. Nous l'avons vu, le CHC est très résistant aux thérapies actuelles et sa très grande hétérogénéité complexifie la recherche de traitements efficaces comme nous allons le montrer dans les sections suivantes.

3.4.1. Introduction aux traitements épigénétiques

Les traitements épigénétiques sont apparus dans les années 80 [HSIAO et al. 1985]. Les cellules devenant de plus en plus résistantes aux traitements anti-cancéreux, l'approche épigénétique offre la possibilité de cibler les cellules tumorales en agissant sur l'expression des gènes et notamment par modification de leur méthylation.

Entre autres, deux mécanismes épigénétiques principaux peuvent être ciblés lors de traitements : la modification de la méthylation de l'ADN ou le changement de l'état de l'état de méthylation par rapport à l'état d'acétylation des histones (Figure 3.10).

3.4.1.1. Méthylation de l'ADN

Dans les années 70, il a été mis en avant [HOLLIDAY 2006] que la méthylation du carbone 5 des cytosines au niveau des îlots de CpG d'un gène silencieux serait un marqueur épigénétique important pouvant provoquer des changements dans la structure de la chromatine (structure dans laquelle l'ADN est compactée).

De plus, dans les années 80, McGhee et Ginder [MCGHEE et al. 1979] ont émis l'hypothèse que la méthylation jouerait un rôle dans la régulation de l'expression des gènes.

La méthylation de l'ADN est en fait un processus épigénétique dans lequel certaines bases nucléotidiques peuvent être modifiées par l'addition d'un groupe méthyle. Si cette méthylation a lieu proche du promoteur d'un gène (*i.e.*, un segment d'ADN qui contrôle l'expression du gène où l'enzyme se fixe pour commencer la transcription du gène), cela engendre une plus faible, voire aucune transcription de ce gène [SUZUKI et al. 2008]. Les enzymes responsables de la méthylation sont les ADN méthyltransférases (ou *DNA Methyltransferases*) (DNMT). Il en existe quatre types. En plus de la régulation du niveau d'expression des gènes, la méthylation joue un rôle dans la synchronisation de la réplication du chromosome et la réparation des mésappariements dans l'ADN.

Une catégorie de traitement épigénétique (inhibiteurs de DNMT) consiste à venir inhiber les DNMT afin d'hypométhyler les promoteurs des gènes et ainsi réactiver les gènes suppresseurs de tumeurs. Le Tableau 3.1 recense quelques inhibiteurs DNMT utilisés en clinique.

Traitement	**Cible thérapeutique**
Décitabine	Leucémies, syndromes myélodysplasiques, lymphomes diffus
Azacitidine	Leucémie aiguë
Flucytosine	Méningite

TABLEAU 3.1. – Tableau présentant des exemples de traitements épigénétiques inhibiteurs de DNMT utilisés en clinique.

3.4.1.2. Acétylation des histones

Le second mécanisme épigénétique concerne l'acétylation des histones. Les histones sont des protéines chargées positivement autour desquelles l'ADN (qui est chargé négativement) vient s'enrouler. Le complexe ADN-histones est appelé chromatine.

L'acétylation des histones correspond à la suppression de la charge positive de la protéine d'histone. Ce phénomène modifie l'architecture de la chromatine (*i.e.*, de l'ADN sous forme compactée) et régule l'expression des gènes en ouvrant ou en fermant la structure de la chromatine. En effet, il existe l'histone acétyltransferase, une enzyme qui peut ajouter des groupes acétyles à l'histone, ce qui la rend moins positive. L'affinité avec l'ADN est alors moindre, ce qui ouvre la chromatine compacte et favorise l'expression des gènes. En revanche, les histones désacétylases (HDAC) ont le rôle inverse. Ces enzymes retirent le groupe acétyle, réprimant ainsi la transcription de l'ADN.

Une autre catégorie de traitements épigénétiques (inhibiteurs de HDAC) consiste donc à venir inhiber les HDAC pour que l'ADN soit accessible et que l'expression des gènes soit possible. Il en existe différentes catégories. Le Tableau 3.2 recense quelques inhibiteurs de HDAC utilisés en clinique.

3.4.2. Comparaison de deux traitements et apport de l'immunothérapie

Dans cette section, nous allons présenter les résultats d'une étude visant à comparer deux traitements aux mécanismes différents ainsi que l'ajout de l'immunothérapie à ces traitements.

Traitement	Cible thérapeutique
Vorinostat	Leucémie, lymphome cutané
Romidepsin	Lymphome cutané
Belinostat	Lymphome périphérique
Panobinostat	Myélome

TABLEAU 3.2. – Tableau présentant des exemples de traitements épigénétiques inhibiteurs de HDAC utilisés en clinique.

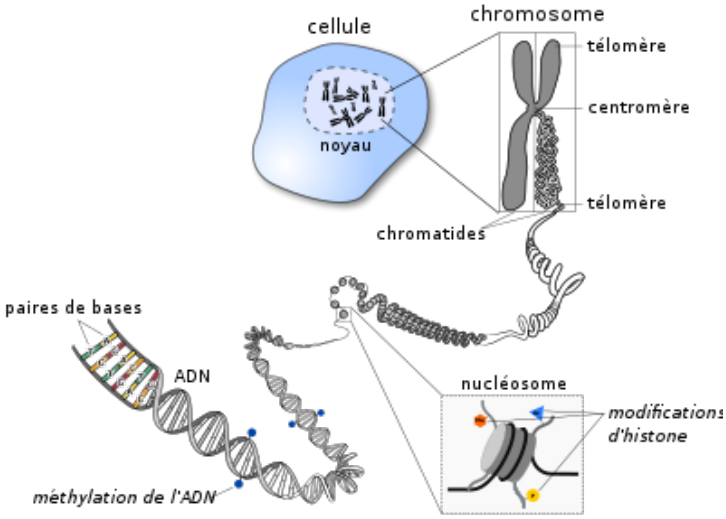


FIGURE 3.10. – Schéma des mécanismes épigénétiques mis en jeu avec la méthylation de l'ADN et la modification des histones.

3.4.2.1. Introduction de l'étude

Récemment, les immunothérapies associées à un inhibiteur de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), un facteur de croissance, ont été introduites comme traitement de première ligne pour le CHC, même si les bénéfices du traitement sont limités à un sous-groupe de patients en raison de la très grande hétérogénéité de réponse au traitement. Par ailleurs, des essais cliniques récents [NIEWADA et al. 2023] ont montré que l'association d'immunothérapie avec des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase ou RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*) permettait d'augmenter le pourcentage de réponse. Ces derniers résultats soulignent l'importance de comprendre comment les agents anticancéreux peuvent avoir un impact sur le microenvironnement immunitaire de la tumeur tout en ciblant les cellules cancéreuses et ainsi favoriser ou pas l'action d'immunothérapies spécifiques.

Dans ce contexte, nous avons conçu une expérience avec notre modèle murin *Alb-R26*^{Met}. L'objectif est de tester deux traitements anti-cancéreux avec des cibles

thérapeutiques différentes, en les combinant ou pas avec de l'immunothérapie. Les traitements utilisés sont les suivants :

— un traitement épigénétique, inhibiteur de DNMT : la Décitabine,
— une combinaison d'inhibiteurs de BCL-XL (ABT-737) et de MEK (Trametinib),
— une immunothérapie composée d'un anti-PD-L1 et d'un anti-CTLA-4.

L'immunothérapie utilisée correspond à des inhibiteurs de points de contrôle du système immunitaire. Ces points de contrôle sont des récepteurs qui permettent de moduler l'activation des cellules immunitaires. Par exemple, lorsqu'un lymphocyte (globule blanc de petite taille se trouvant principalement dans les ganglions lymphatiques et la rate) de type T reconnaît son antigène spécifique, il ne pourra être activé que si les différents signaux des points de contrôle sont en faveur d'une activation. Ce mécanisme est primordial pour les réactions auto-immunes et donc pour contrôler l'activation du système immunitaire envers ses propres cellules. En revanche, certaines cellules tumorales sont aussi dotées de ces points de contrôle qui viennent ainsi moduler l'activation des cellules immunitaires à leur encontre en inhibant leur action, notamment celle des lymphocytes T, empêchant de la sorte la réaction immunitaire, c'est-à-dire le processus de destruction des cellules cancéreuses. Une piste suivie par l'immunothérapie est de venir inhiber ces points de contrôle afin de réactiver le système immunitaire bloqué par les tumeurs. Deux principaux points de contrôle sont visés avec l'immunothérapie : le lien PD1/PD-L1 et le lien CTLA4/CD80 comme illustré sur la Figure 3.11.

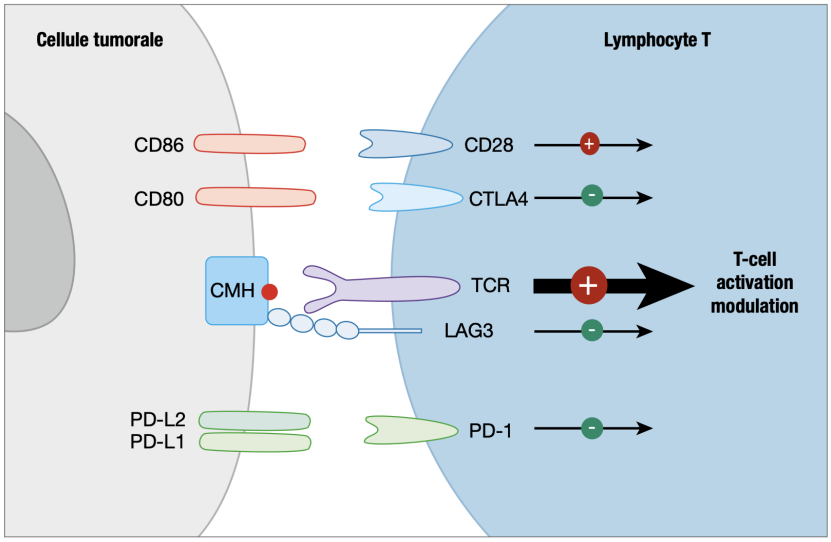


FIGURE 3.11. – Schéma du fonctionnement des points de contrôles responsables de la modulation de l'activation des cellules immunitaires [VUAGNAT et al. 2018].

En utilisant ces traitements, les tumeurs ne pourront plus inhiber l'action des lymphocytes de type T et le système immunitaire pourra donc se mettre en marche pour activer ses mécanismes de défense. Nous avons spécifiquement utilisé conjointe-

ment ces deux immunothérapies, car elles sont déjà utilisées en clinique pour le traitement du CHC.

3.4.2.2. Protocole de l'étude in-vivo

Dans un premier temps, cette étude a été menée de manière à étudier les différences entre les deux traitements afin d'observer les remaniements du système immunitaire induits par les traitements. Puis, dans un second temps, nous avons appliqué les mêmes traitements mais en ajoutant des injections d'immunothérapie au bout de 7 jours. Quatre cohortes ont ainsi été analysées :

— 5 souris traitées avec la Décitabine ;
— 5 souris traitées avec la combinaison d'inhibiteurs MEK+BCL-XL ;
— 9 souris traitées avec la Décitabine et l'immunothérapie ;
— 9 souris traitées avec la combinaison d'inhibiteurs MEK+BCL-XL et l'immunothérapie.

Les souris ont été injectées tous les jours avec la combinaison des inhibiteurs MEK+BCL-XL (Trametinib à 1 mg/kg et ABT-737 à 30 mg/kg) et tous les 4 jours pour la Décitabine (5 mg/kg) par voie intrapéritonéale. L'immunothérapie (anti-PD-L1 et anti-CTLA4 tous deux à 7.5 mg/kg) ajoutée au bout de 7 jours a été injectée tous les 4 jours par voie intrapéritonéale. Au début des injections, au jour 10, et à la fin, au jour 20, les souris ont été imagées avec le prototype PIXSCAN-FLI afin d'évaluer l'évolution tumorale en cours de traitement. À la fin des 20 jours de traitement, les souris ont été sacrifiées et disséquées et nous avons suivi le protocole de dissociation cellulaire décrit à la Section 3.2 dans le but d'effectuer l'analyse par cytométrie en flux.

La Figure 3.12 résume le protocole utilisé.

3.4.2.3. Résultats de l'étude in-vivo

Résultats de l'imagerie

Le suivi longitudinal des souris pendant le traitement nous a permis de mesurer le volume des tumeurs et de calculer l'évolution tumorale pour chacune des cohortes. La Figure 3.13 montre les réductions de volume V_{final}/V_{inital}. Nous observons une hétérogénéité des réponses entre les différents traitements, mais aussi au sein même d'une cohorte pour un même traitement. Le traitement MEK+BCL-XL semble être le plus efficace puisqu'il permet une régression de 100 % des tumeurs.

Les diagrammes de Sankey sur la Figure 3.14 permettent de se rendre compte de l'évolution de la réponse aux traitements au cours du temps. L'apport de l'immunothérapie peut être discuté pour son efficacité très différente en fonction du traitement auquel elle a été associée. Par exemple, pour la cohorte traitée avec la Décitabine, nous observons que l'ajout de l'immunothérapie permet d'obtenir une plus grande proportion de tumeurs qui répondent au traitement et donc régressent. En revanche, pour les inhibiteurs MEK+BCL-XL, ce traitement étant déjà très efficace en monothérapie,

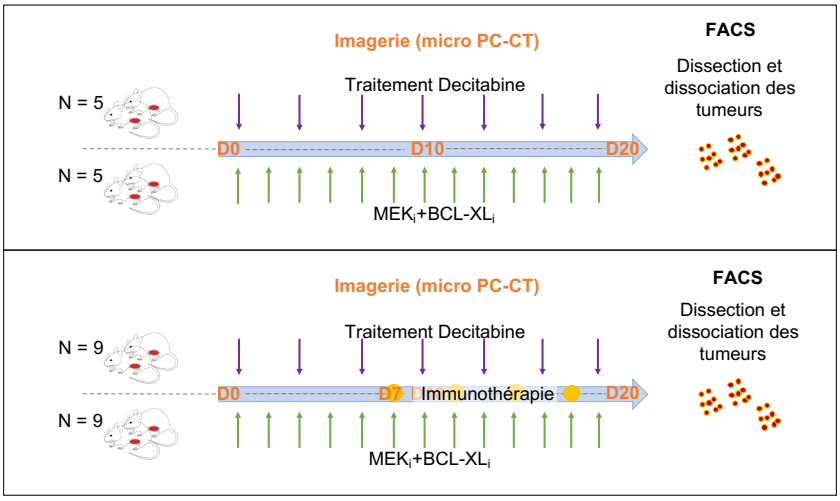


FIGURE 3.12. – Schéma du protocole de l'étude in vivo réalisée. Une première expérience avec deux cohortes de souris, chacune traitée avec un traitement différent (Décitabine ou inibitheurs MEK+BCL-XL), et une seconde expérience avec deux cohortes, chacune traitée avec un des deux mêmes traitements auxquels on a ajouté des injections d'immunothérapie au bout de 7 jours. Les souris ont été imagées tous les 10 jours et une dissociation cellulaire pour l'analyse par cytométrie en flux a été réalisée à la fin.

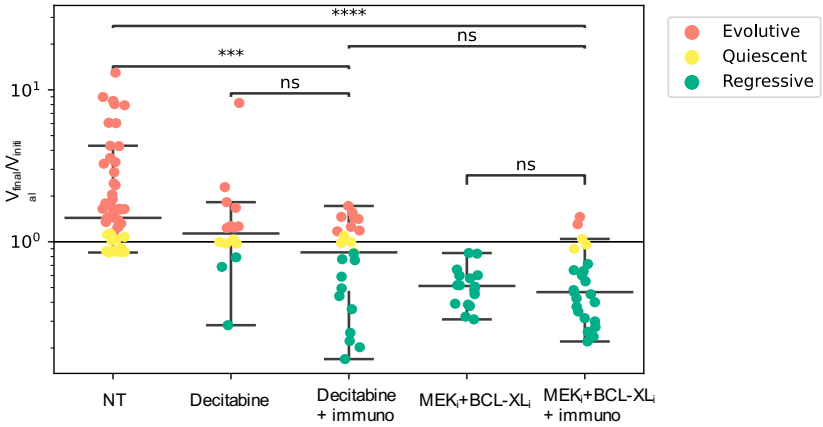
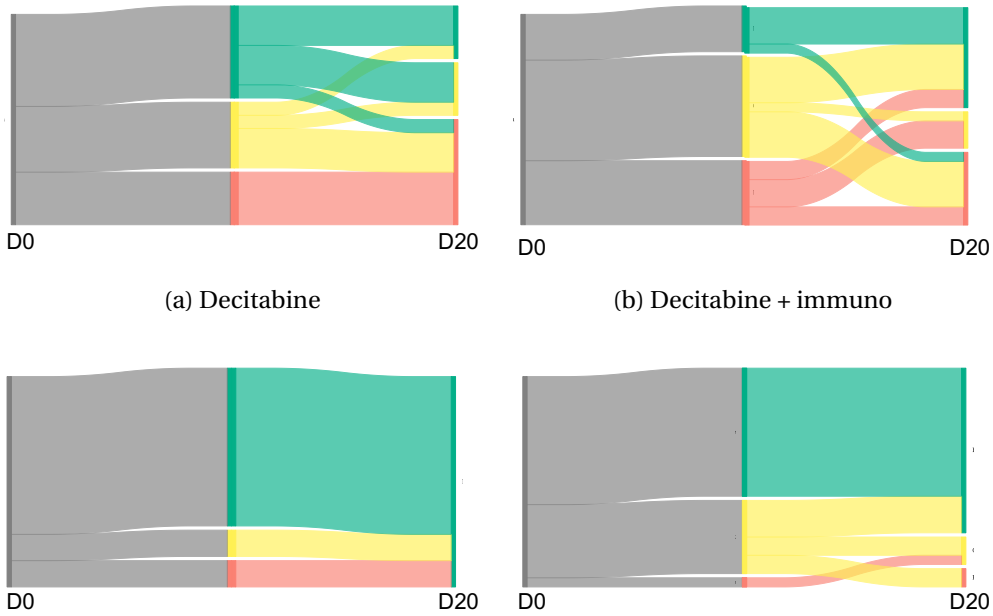


FIGURE 3.13. – Graphique représentant la réduction de volume $V_{final}/V_{initial}$ pour chacune des cohortes à la fin du traitement. Les statistiques ont été calculées avec des tests de Mann-Whitney et les étoiles sont présentées tel que : * : p-value < 0.05 ; ** : p-value < 0.01 et *** : p-value < 0.001.

l'ajout de l'immunothérapie entraîne une diminution de l'efficacité des traitements. Des tumeurs ne répondent pas et persistent avec la combinaison traitement oncologiques + immunothérapies alors que nous n'observons pas ce cas de figure pour la monothérapie.



(a) Decitabine

(b) Decitabine + immuno

(c) MEK+BCL-XL

(d) BCL+MEK + immuno

FIGURE 3.14. – Diagrammes de Sankey représentant l'évolution des tumeurs des différentes cohortes au cours du temps. En vert, les tumeurs ayant répondu au traitement (régressives), en jaunes les tumeurs stables et en rouge les tumeurs n'ayant pas répondu (évolutives). Le premier état (à gauche) correspond à l'état des tumeurs au jour 0 avec donc un état d'évolution inconnu (grisé) et à droite au jour 20 de l'étude.

Résultats de l'analyse par cytométrie en flux

A l'issue des différents traitements, les souris ont été sacrifiées afin de disséquer les tumeurs et, suite à la dissociation cellulaire, réaliser des analyses de cytométrie en flux pour comparer le remaniement immunitaire induit suivant les traitements appliqués. La Figure 3.15 illustre avec des UMAP les différentes proportions de populations immunitaires observées. Les clusters sont ensuite créés en fonction de l'expression de chaque marqueur. Connaissant la catégorie de cellules en fonction de l'expression des anticorps utilisés, nous sommes capables d'identifier les différents clusters et de leur attribuer une population de cellules immunitaires.

Sur la Figure 3.15b, l'analyse en fonction de la réponse des tumeurs (répondantes, stables ou non répondantes) montre une activation de certaines populations. Les tumeurs évolutives n'ayant pas répondu présentent une activation des cDC2 (cellules dendritiques) et des LT (lymphocytes T) tandis que les tumeurs régressives présentent une activation des neutrophiles (globules blancs de types granulocytes) et des monocytes (globules blancs mononucléés). De plus, les tumeurs stables ne présentent aucune région « chaude » dans la UMAP, ce qui pourrait indiquer que les cellules

tumorales soient dormantes et/ou invisibles pour le système immunitaire malgré les différents traitements appliqués.

Par ailleurs, sur la Figure 3.15c, lorsque nous analysons les tumeurs en fonction du traitement reçu, nous pouvons voir que l'ajout de l'immunothérapie avec la Décitabine permet d'enrichir les tumeurs en cDC1 et cDC2 par rapport au traitement unique, tandis que l'immunothérapie combinée avec les inhibiteurs MEK+BCL-XL permet d'enrichir les tumeurs en neutrophiles, monocytes, cDC2 et macrophages.

Modèle de prédiction de la réponse au traitement

Suite à ces différentes analyses, nous avons souhaité voir si des informations sur les populations de cellules immunitaires pouvaient renseigner ou prédire la réponse au traitement des tumeurs. Pour cela, nous avons testé des méthodes d'apprentissage machine (ou *Machine Learning*) (ML). Comme nous l'avons évoqué en Section 2.3.1, le ML fait partie des outils d'intelligence artificielle permettant d'apprendre automatiquement une tâche définie. Plus particulièrement, les arbres décisionnels permettent de résoudre des problèmes de classification et de régression. Ils sont composés de de plusieurs noeuds. Chaque noeud possède une condition qui amène à plusieurs réponses qui dirigent ensuite vers un autre noeud et ainsi jusqu'au noeud terminal qui donne la réponse finale. Ces arbres décisionnels sont très intéressant dans le cas de données peu comprises et obscures afin d'extraire des informations importantes permettant de déterminer la classe de l'objet à classifier. Dans notre cas, nous voulons prédire la réponse au traitement des différentes tumeurs en se basant sur les informations des populations de cellules immunitaires. Nous avons beaucoup de populations immunitaires, c'est pour cela que des arbres décisionnels seront utilisés. Plus précisément, les *Random Forrest* se basent sur l'assemblage d'arbres de décisions indépendants. Afin d'évaluer un *Random Forrest*, différents critères sont calculés :

— le score de précision (ou *Accuracy score*) : $\frac{\text{VP+VN}}{\text{N}}$

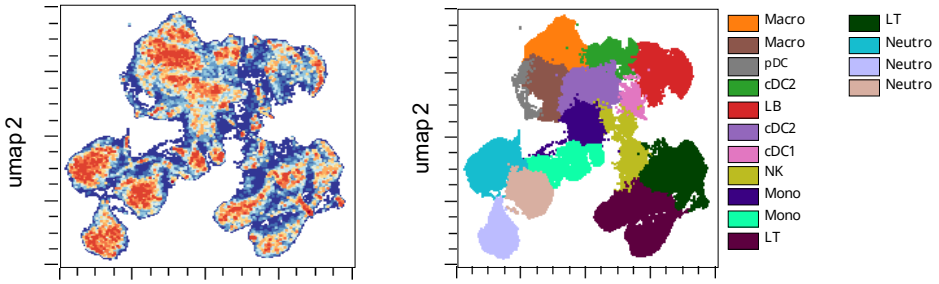
— le score F1 : $2 \times \frac{precision \times recall}{precision+recall}$

avec, $precision = \frac{\text{VP}}{\text{VP+FP}}$, $recall = \frac{\text{VP}}{\text{VP+FN}}$, VP le nombre de vrais positifs, VN le nombre de vrais négatifs, FP le nombre de faux positifs, FN le nombre de faux négatifs et N le nombre total de prédictions. La Tableau 3.3 résume les différents cas de prédictions.

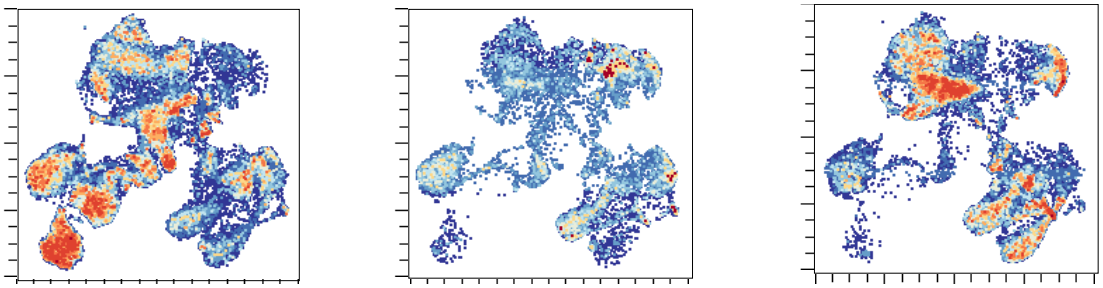
		STATUT RÉEL	
		Positif	Négatif
RÉSULTAT	Positif	VP *(vrais positifs)*	FP *(faux positifs)*
	Négatif	FN *(faux négatifs)*	VN *(vrais négatifs)*

TABLEAU 3.3. – Tableau représentant les différentes évaluations d'un *Random Forrest*.

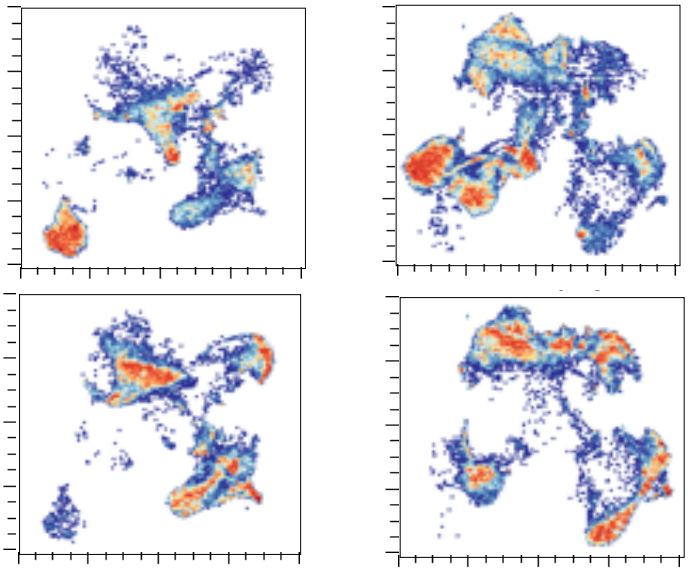
Dans un premier temps, nous avons construit un modèle de *Random Forest* avec un sélecteur *Sequential Forward Selection* [*sklearn.feature_selection.SequentialFeatureSelector* s. d.] afin de sélectionner seulement une partie, la plus importante pour la prédiction,



(a) UMAP globale et identification des clusters



(b) UMAP par état de tumeurs. A gauche, les tumeurs régressives, au centre les tumeurs stables et à droite les tumeurs évolutives.



(c) UMAP par traitements : cohorte Décitabine (en haut à gauche), Décitabine + immuno (en haut à droite), MEK+BCL-XL(en bas à gauche) puis MEK+BCL-XL + immuno (en bas à droite)

FIGURE 3.15. – UMAP représentant les cellules analysées par cytométrie en flux dans différents sous-groupes de tumeurs en fonction de leur comportement ou du traitement. En rouge les clusters très exprimés et en bleu les clusters sous exprimés.

des populations de cellules immunitaires analysées. La Figure 3.16 illustre l'évolution du score de prédiction en fonction du nombre de paramètres utilisés pour la prédiction. La prédiction consiste dans cette étude à classifier la tumeur « répondant » ou « non-répondante ». Nous pouvons voir qu'à un certain palier, ajouter des paramètres n'améliore pas la performance du modèle car les informations sont trop nombreuses pour être efficacement apprises. Ces études nous ont permis d'identifier que le meilleur compromis entre une bonne performance et un nombre de paramètres cohérent pour considérer leur combinaison comme étant une signature de prédiction consiste à choisir trois paramètres spécifiques :

— PD1/LT : la proportion de PD1 parmi les lymphocytes T ;
— Neutrophiles : la proportion de neutrophiles dans la tumeur ;
— PTK7/cDC2 : la proportion de PTK7 (tyrosine-protéine kinase de type 7, protéine membranaire et marqueur de pronostique pour certains cancers) exprimée dans les cellules dendritiques cDC2.

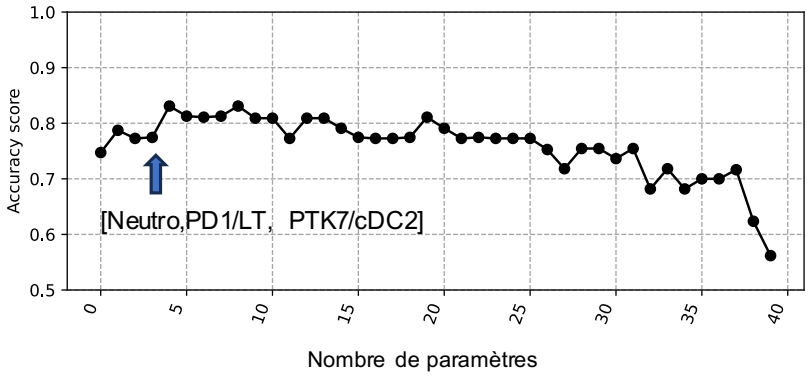


FIGURE 3.16. – Graphique représentant le score obtenu par le modèle en fonction du nombre de paramètres pris en compte.

Cette signature a ainsi été choisie pour créer un classificateur basé sur une forêt d'arbres décisionnels aléatoire (ou *Random Forest Classifier*). Ce modèle a été entraîné avec 80 % des données de notre étude pour ensuite être testé sur les 20 % restants. Les résultats sont résumés dans le Tableau 3.4, nous obtenons une très bonne performance du réseau pour la prédiction de la réponse au traitement avec un score de précision supérieur à 0.75.

Precision	Recall	F1-score	Accuracy
0.8	0.8	0.8	0.82

TABLEAU 3.4. – Tableau présentant les différentes métriques d'évaluation de la forêt d'arbres décisionnels entraînée pour prédire la réponse au traitement.

Par la suite, nous avons testé la robustesse de cette signature identifiée à partir de

nos données sur le modèle murin et de populations immunitaires spécifiques afin de déterminer s'il est possible de prédire la réponse des patients aux traitements. Cette signature a été testée sur trois bases de données patient libres d'accès à partir desquelles nous avons créé nos bases de données d'entraînement et de test :

— LIHC-TCGA accessible via UCSC Xenabrowserportal (https://xenabrowser.net/) ;
— LICA-FR accessible via ICGC Data Portal (https://dcc.icgc.org/) ;
— LIRI-JP accessible via ICGC Data Portal (https://dcc.icgc.org/).

Pour toutes ces données, il ne s'agissait pas de résultats de cytométrie en flux mais de séquençages ARN. Afin de déterminer la classe à laquelle appartient le patient, la survie sans récidive a été choisie comme critère de séparation entre tumeur répondante et non répondante. Ne s'agissant pas du même type de données que pour notre étude, la signature considérée gardait les mêmes populations de cellules immunitaires mais de manière moins spécifique :

— la proportion de PD1 globale et non PD1/LT ;
— Neutrophiles (inchangés) ;
— la proportion de PTK7 globale et non PTK7/cDC2.

L'entraînement et la validation (80 % / 20 %) ont été réalisés sur les bases de données LICA-FR et LIRI-JP et un test a été mené sur la base de données LIHC-TCGA. Les résultats sont répertoriés dans le Tableau 3.5. Le score obtenu après entraînement est assez élevé, ce qui signifie qu'un *Random Forest Classifier* est aussi capable de prédire une réponse au traitement sur des données patient. Encore plus intéressant, le score obtenu sur la base de données test montre que le modèle entraîné est capable de généraliser et de fonctionner sur de nouvelles données provenant de sources différentes. Si cette signature doit encore être travaillée et l'entraînement spécifié, ces résultats montrent la faisabilité d'extraire une signature probable de prédiction de réponse à des traitements pour les patients. Les cancers du foie sont très compliqués à diagnostiquer, et très peu de marqueurs fiables sont connus aujourd'hui pour prévenir du cancer du foie. Trouver une signature capable de prédire la réponse au traitement serait un atout très important pour le traitement de ce cancer.

	Entraînement/Validation	Test
Bases de données	LICA-FR et LIRI-JP	LIHC-TCGA
Nombre de données	363	280
Score	0.74	0.71

TABLEAU 3.5. – Tableau présentant les résultats obtenus avec un *Random Forest* entraîné et testé sur des données patient.

3.4.2.4. Conclusion de l'étude

Cette étude nous a permis de mettre en avant la large hétérogénéité des réponses à un traitement et entre différents traitements, qu'ils soient utilisés en monothérapie ou combinés avec de l'immunothérapie. Plus frappant encore, le large remaniement au niveau immunitaire s'avère très dépendant du traitement utilisé. De plus, l'apport de l'immunothérapie en combinaison avec un traitement oncologique peut-être discuté tant la différence en terme de réponse au traitement est importante en fonction du traitement auquel elle est associée. Finalement, des outils d'intelligence artificielle pourraient nous permettre de trouver des signatures spécifiques afin de prédire la réponse aux traitements des différentes tumeurs et permettraient de modifier le traitement au cours du temps pour améliorer son efficacité.

3.4.3. Combinaison d'un agent épigénétique à un inhibiteur RTK

3.4.3.1. Introduction à la problématique

La stratégie thérapeutique de ces dernières années contre le CHC a été dans un premier temps d'utiliser les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase (inhibiteurs de RTK) puis les immunothérapies combinées avec l'anti-VEGF (l'anticorps bloquant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). Une légère amélioration du pronostic a été observée, mais les effets secondaires restent nombreux. Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier comment nous pouvions conférer une meilleure efficacité aux inhibiteurs de RTK afin d'obtenir une réponse au traitement. L'avantage de travailler avec ces inhibiteurs est qu'ils sont déjà présents en clinique puisqu'ils sont utilisés en première ligne de traitement pendant une certaine période.

Ce sont les inhibiteurs de HDAC (détaillés en Section 3.4.1.2), traitement épigénétique, qui ont été choisis pour être combinés avec un inhibiteur de RTK afin d'avoir un effet épigénétique et espérer ainsi conférer une meilleure réponse à l'inhibiteur de RTK. L'avantage des inhibiteurs de HDAC est aussi leur forte présence en clinique pour d'autres types de cancers comme nous l'avons vu dans le Tableau 3.2.

D'autres combinaisons ont été testées par mes collègues et ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

Les tests de viabilité ont été réalisés sur quatre lignées cellulaires humaines de CHC. Pour chaque lignée et pour des concentrations différentes, les traitements sont appliqués et le pourcentage de viabilité est mesuré. Plus la viabilité (le taux de cellules encore vivantes) est faible et plus le traitement a été efficace puisqu'il a tué les cellules cancéreuses. La Figure 3.17 montre les résultats pour la combinaison que nous avons sélectionnée : l'inhibiteur de RTK Cabozantinib et l'inhibiteur de HDAC Romidepsin. Par la suite, cette combinaison sera nommée RomiCabo. Nous pouvons voir sur cette figure, que le traitement Cabozantinib seul n'a pas d'effet sur les lignées cellulaires. En revanche, la Romidepsin a déjà un effet sur les cellules. Lorsque nous combinons les deux traitements, la viabilité cellulaire de chaque lignée est drastiquement diminuée,

ce qui conforte le choix de notre combinaison. Mes collègues de l'IBDM ont identifié des mécanismes clés associés au traitement RomiCabo en combinant des approches biochimiques, biologiques et omiques.

FIGURE 3.17. – Heatmap représentant la viabilité cellulaire calculée sur 4 lignées cellulaires humaines (en abscisses). La viabilité a été mesurée pour les traitements seuls ou combinés et pour différentes concentrations (en ordonnées). Plus la viabilité est faible (et tend vers le rouge) et plus le traitement est efficace.

3.4.3.2. Protocole de l'étude in vivo

Après avoir identifié la combinaison RomiCabo comme étant un bon candidat sur les lignées cellulaires, nous avons testé cette combinaison sur notre modèle murin *Alb-R26*^{Met}. Pour cela, nous avons constitué deux cohortes. Pour la première cohorte composée de 5 souris, l'expérience comporte trois périodes distinctes : une première session de traitement pendant 27 jours, une période de repos de 85 jours, puis une seconde session de traitement de 21 jours. Pendant les sessions de traitement, les souris étaient injectées avec la Romidepsin (1 mg/kg) tous les 4 jours par injection intra-péritonéale et avec la Cabozantinib (10 mg/kg) tous les deux jours par voie orale. Cette cohorte était composée de souris ayant des tumeurs prénéoplasiques et aussi des tumeurs avancées, ce qui nous a permis de tester le traitement sur les différentes catégories de tumeurs.

Une seconde cohorte de 2 souris n'a reçu quant à elle qu'une seule session de traitement pour que nous puissions la comparer avec la première cohorte et déterminer l'impact d'une pause au cours d'un traitement.

Tous les 10 jours, les souris ont été imagées afin de connaître l'évolution du volume tumoral. La Figure 3.18 résume les différentes cohortes et le protocole suivi.

A l'issue des traitements, les tumeurs ont été disséquées et dissociées (avec le protocole décrit en Section 3.2) afin de réaliser une analyse des populations de cellules immunitaires par cytométrie en flux.

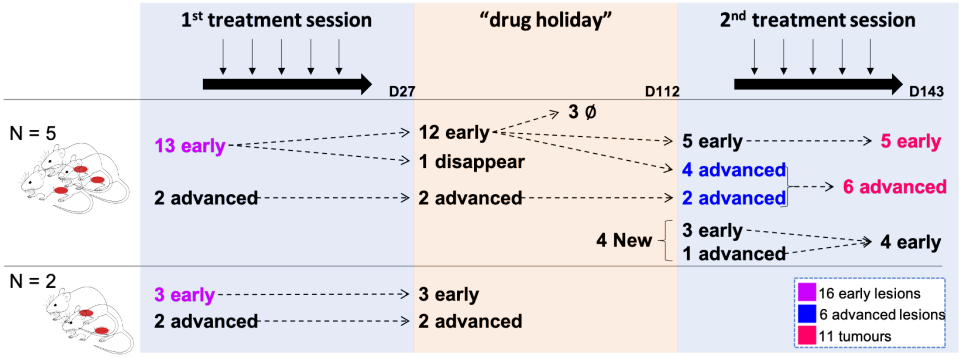
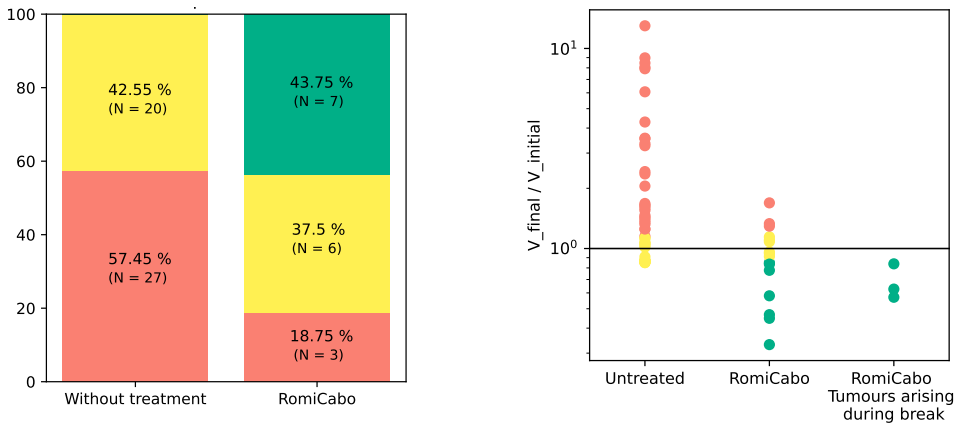


FIGURE 3.18. – Schéma du protocole de l'étude in vivo pour l'évaluation du traitement RomiCabo.

3.4.3.3. Résultats de l'étude in vivo

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 3.19a, le traitement RomiCabo entraîne une régression d'environ 44 % (7/16) des tumeurs prénéoplasiques et seulement 19 % d'entre elles continuent à progresser. Par opposition, pour des tumeurs non traitées, 57 % des tumeurs évoluent et 43 % restent stables. Par ailleurs, la progression du volume tumoral est significativement réduite par rapport aux tumeurs non traitées, comme l'illustre la Figure 3.19b.



(a) Histogramme représentant le pourcentage de tumeurs évolutives (en rouge), stables (en jaune) et régressives (en vert) sans traitement et avec la combinaison RomiCabo.

(b) Graphique représentant l'évolution de la réduction des tumeurs $V_{final}/V_{initial}$.

FIGURE 3.19. – Résultats de l'étude in vivo sur les tumeurs prénéoplasiques.

Sans traitement, 100 % des tumeurs avancées sont évolutives (Figure 3.20). Avec la combinaison RomiCabo, nous pouvons constater que seules 50 % des tumeurs continuent d'évoluer, tandis que 33 % d'entre elles répondent au traitement et régres-

sent.

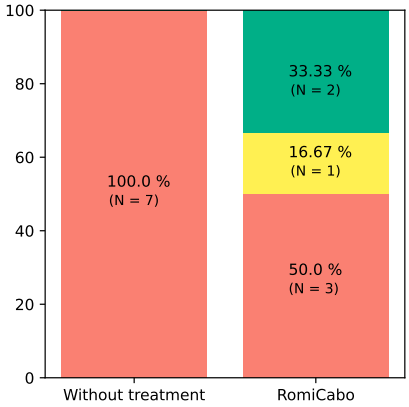


FIGURE 3.20. – Histogramme représentant le pourcentage de tumeurs évolutives (en rouge), stables (en jaune) et régressives (en vert) sans traitement et avec la combinaison de traitement RomiCabo sur les tumeurs avancées.

Des exemples de régression et d'évolution tumorales des deux catégories de tumeurs sont représentés en Figure 3.21.

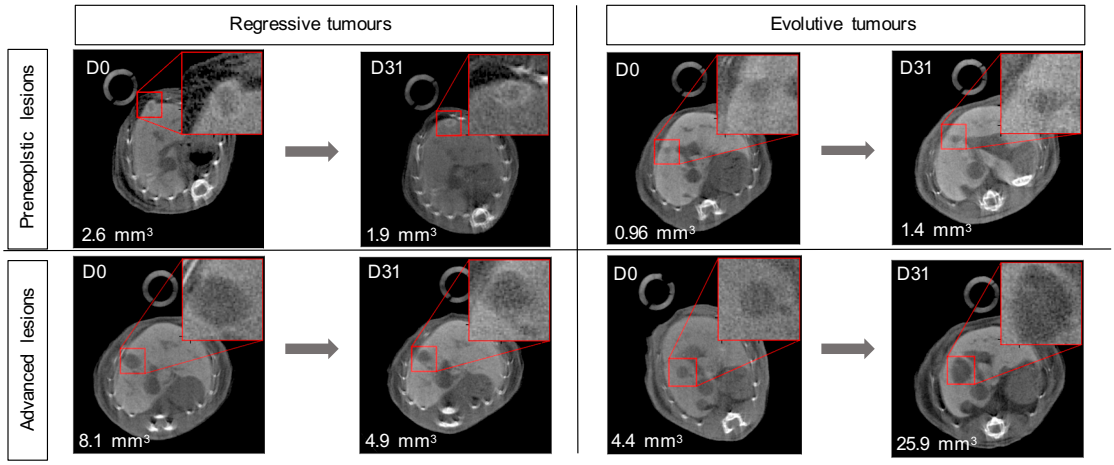


FIGURE 3.21. – Exemples de tumeurs régressives et évolutives pour les deux catégories de tumeurs.

Par ailleurs, nous avons aussi suivi au cours du temps et des différentes sessions 11 tumeurs dont 9 prénéoplasiques et 2 avancées. L'évolution de ces tumeurs est représentée sur la Figure 3.22. Après la « pause médicamenteuse », 64 % (7/11) de ces lésions évoluent (5 prénéoplasiques et 2 avancées). Au contraire, 36 % (4/11) des lésions prénéoplasiques sont encore régressives et l'une d'entre elles a complètement disparu. Il est tentant de penser que le traitement RomiCabo a instauré une réponse

intrinsèque dans ces lésions régressives, en induisant des effets anti-tumoraux même pendant la période sans traitement, ce qui a conduit à une stabilisation des tumeurs au cours du temps, bien qu'elles soient toujours présentes dans le foie.

Après la pause, une deuxième session de traitement a été réalisée pendant 32 jours. Au début de cette deuxième session de traitement, parmi les 11 tumeurs, 5 étaient des lésions prénéoplasiques et 6 étaient devenues avancées. Après ce deuxième traitement, 36 % (4/11) des tumeurs ont régressé, ce qui indique que leur réponse au traitement RomiCabo a été maintenue malgré la pause thérapeutique. De plus, 18 % (2/11) des tumeurs sont restées stables pendant le traitement, alors que 46 % (5/11) des tumeurs ont continué à évoluer, illustrant ainsi une proportion de tumeurs (3/11) qui étaient et sont restées résistantes au traitement par RomiCabo.

De plus, pendant la « pause médicamenteuse » 4 nouvelles tumeurs (3 lésions prénéoplasiques et 1 tumeur avancée) sont apparues chez 2 souris appartenant à la première cohorte. Toutes les tumeurs ont répondu au traitement par RomiCabo de la deuxième session (Figure 3.19b).

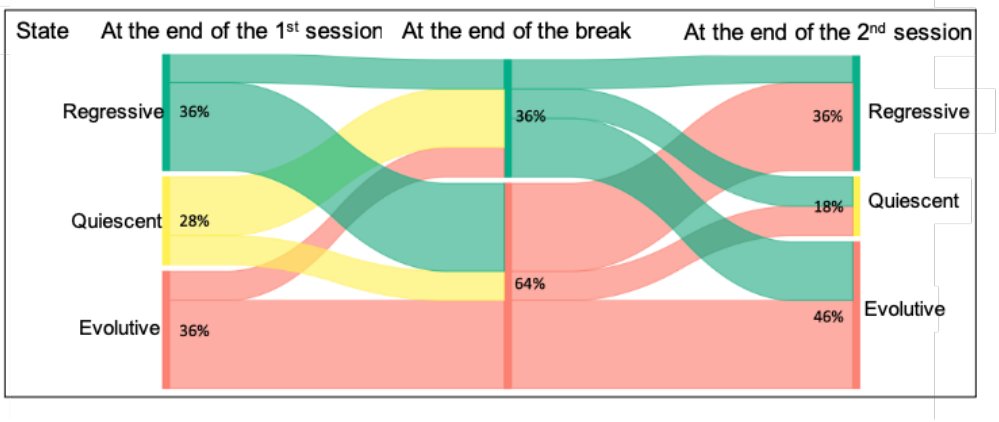


FIGURE 3.22. – Diagramme de Sankey représentant l'évolution des tumeurs au cours du temps. A gauche, l'état des tumeurs, après la première session de traitement, au milieu après la pause, et à droite, à la fin du protocole.

3.4.3.4. Conclusion de l'étude

L'ensemble de ces résultats illustre l'efficacité du traitement par RomiCabo sur un sous-ensemble de CHC précoces et avancés dans le modèle *Alb-R26^{Met}*, un modèle qui récapitule bien la large hétérogénéité du CHC que nous retrouvons aussi chez les patients. La combinaison d'un inhibiteur de RTK avec l'inhibiteur de HDAC Romidepsin semble être une piste thérapeutique intéressante afin de traiter un sous-type de CHC, que ce soit sur des tumeurs prénéoplasiques ou sur des tumeurs plus avancées. Par ailleurs, pour les tumeurs qui ne répondent pas, il serait intéressant de tester une autre combinaison (avec un autre inhibiteur de RTK ou autre type de traitement) comme option thérapeutique. De plus, les analyses menées avec la pause médicamenteuse

amènent à réfléchir sur la possibilité de faire des traitements par impulsion [FOO et al. 2009].

Ce chapitre nous a permis de mettre en avant l'importance de l'imagerie dans le cadre d'études précliniques sur des modèles animaux. Notamment pour l'étude du CHC, l'imagerie devient essentielle pour pouvoir détecter et suivre des tumeurs dans le foie. L'analyse des tumeurs prénéoplasiques est un axe d'étude important car le CHC est détecté très tardivement, ce qui rend le traitement plus compliqué. Mieux comprendre l'évolution des tumeurs et identifier des marqueurs sont un atout pour une meilleure prise en charge de ce cancer. Par ailleurs, les différents traitements que nous avons testés permettent de mettre en avant une large hétérogénéité de réponses sur notre modèle *Alb-R26*^{Met}, qui retranscrit la réalité que nous trouvons aussi chez les patients. Les traitements ont des impacts différents sur le remaniement et l'activation du système immunitaire. Comprendre et analyser ces différences est une voie importante qui permet d'adapter le traitement au cours du temps en fonction de la réponse du système immunitaire de chaque patient.

4. Chapitre 4. Caractérisation du détecteur XPAD3.2-C/AsGa et imagerie au K-edge

Sommaire

4.1. Caractéristiques du détecteur AsGa 116
4.1.1. Pixels hybrides et définition de l'électronique 117
4.1.1.1. Définition des pixels hybrides 117
4.1.1.2. ASIC XPAD3.2 117
4.1.1.3. Calibration des seuils en énergie 119
4.1.2. Protocole de calibration du détecteur 120
4.1.2.1. Calibration au ras-du-bruit 121
4.1.2.2. Calibration à une énergie donnée 121
4.1.3. Caractérisation du détecteur 125
4.1.3.1. Estimation de la valeur du pas de DACL en énergie . . . 126
4.1.3.2. Estimation de la valeur du pas d'ITH en énergie 128
4.1.4. Comparaison à l'état de l'art 129
4.2. Introduction à la tomographie spectrale 130
4.2.1. Formalisme spectral 130
4.2.2. Imagerie au K-edge par soustraction 133
4.2.3. Description de l'algorithme ProMeSCT 135
4.2.4. Apport pour l'in-vivo 136
4.3. Preuves de concept avec le détecteur AsGa 137

Dans ce chapitre, nous allons décrire le détecteur XPAD3.2-C/AsGa, détecteur à pixels hybrides d'arséniure de gallium, qui a été acquis au cours de ma thèse auprès de la société Cegitek. Nous en détaillerons sa caractérisation puis, après une introduction à l'imagerie spectrale, nous présenterons les différentes preuves de concept réalisées et l'apport que ces données spectrales pourraient avoir pour l'imagerie in vivo.

4.1. Caractéristiques du détecteur AsGa

Dans cette section, nous allons détailler les caractéristiques du détecteur XPAD3.2-C/AsGa composé d'un chip de 120 × 80 pixels hybridés à un capteur pixellisé d'arséniure de gallium de 1 mm d'épaisseur.

4.1.1. Pixels hybrides et définition de l'électronique

4.1.1.1. Définition des pixels hybrides

Comme montré sur la Figure 4.1, un pixel hybride est composé d'un capteur à semi-conducteur, ici en arséniure de gallium, relié par une micro-bille en alliage métallique à son électronique de lecture implantée dans un chip électronique ou *ASIC* (pour *Application-Specific Integrated Circuit*). Lorsqu'un rayon X interagit dans le capteur par effet photoélectrique, les photoélectrons créés induisent la création de paires électron-trou en proportion de l'énergie déposée. Les charges créées (en l'occurence des ions positifs dans la Figure 4.1) sont collectées par l'électronique de lecture au travers de la microbille qui est conductrice, grâce à l'application d'une tension de polarisation de quelques volts appliquée à la diode semi-conductrice.

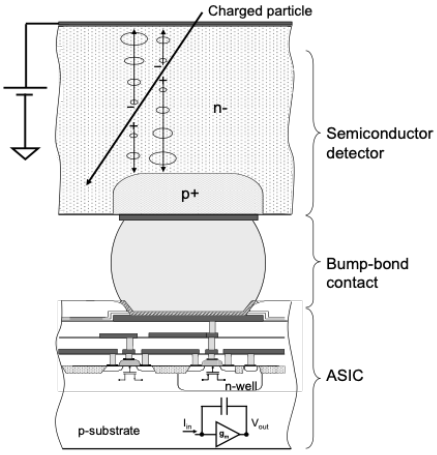


FIGURE 4.1. – Schéma d'un pixel hybride.

4.1.1.2. ASIC XPAD3.2

L'électronique de lecture possède une partie analogique et une autre, numérique (Figure 4.2). La partie analogique est composée d'un amplificateur de charges, un convertisseur tension-courant et d'un discriminateur permettant de comparer la charge collectée au seuil fixé. En effet, comme discuté au Chapitre 2, un avantage de la caméra XPAD est de pouvoir fixer un seuil en énergie pour sélectionner les photons. Le seuil est donné en énergie mais est converti en courant pour pouvoir le comparer à la charge collectée en sortie du convertisseur tension-courant. La partie numérique quant à elle permet d'incrémenter un compteur pour chaque détection de photon supérieur au seuil en énergie imposé par le comparateur.

Les différents ASIC XPAD3 ont une linéarité en gain permettant d'assurer le réglage du seuil jusqu'à une certaine énergie. L'efficacité du seuillage en fonction de l'énergie est une sigmoïde (Figure 4.3), sur laquelle on observe qu'au-delà d'une certaine énergie, un plateau de la courbe en S est atteint. Par exemple, l'efficacité du seuillage

du chip XPAD3.2-S est linéaire jusqu'à 60 keV. Au-delà, elle présente plus de 10 % de non-linéarité d'écart par rapport à une réponse linéaire.

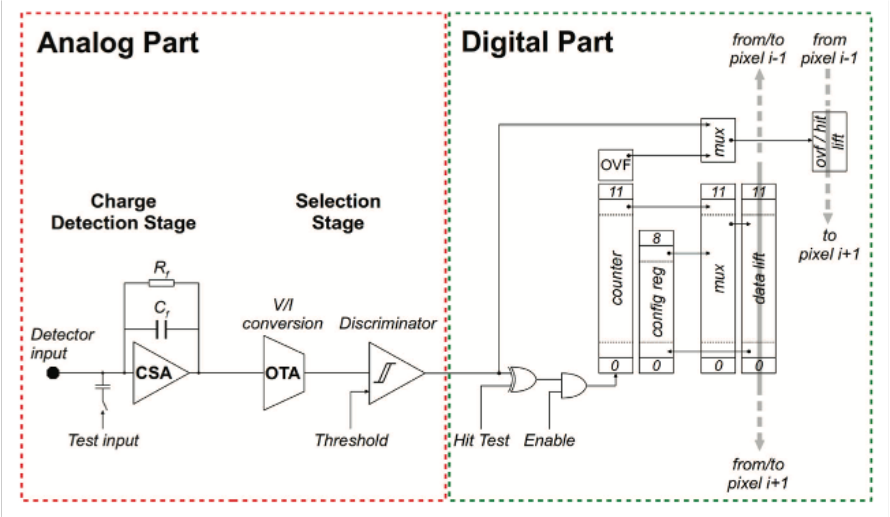


FIGURE 4.2. – Schéma du circuit électronique.

Le détecteur à pixels d'AsGa est basé sur le chip XPAD3.2-C, qui est différent du chip XPAP3.2-S exploité par la caméra XPAD à pixels de silicium utilisée pour les études longitudinales. Le chip XPAD3.2-S collecte des trous (ions positifs) tandis que le chip XPAD3.2-C collecte des électrons. Les différentes caractéristiques de ces deux circuits sont résumées dans le Tableau 4.1.

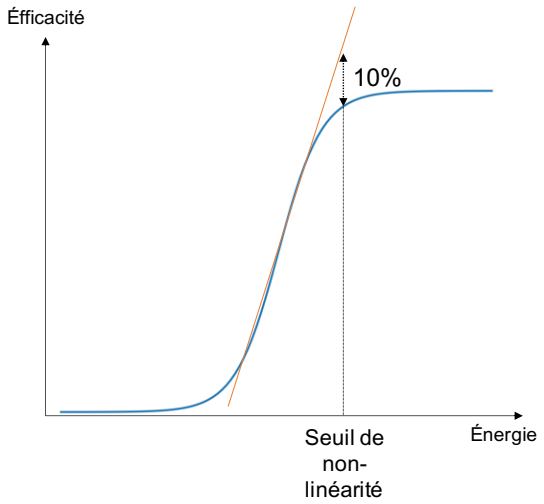


FIGURE 4.3. – Courbe de linéarité de la chaîne analogique.

Pour le chip XPAD3.2-C, la non-linéarité apparaît pour une énergie supérieure

	XPAD3.2-S	XPAD3.2-C
Nombre de pixels	9 600	
Taille de pixel	130 × 130 μm^2	
Temps de lecture	1 ms	
Mode de sélection	1 seuil	
Profondeur du compteur	12 bits + 1 bit d'overflow	
Taux de comptage par pixel	1.6 × 10^6 photons/s	
Polarité	collection de trous	collection d'électrons
Consommation électrique	40 μW/pixel	
Bruit électronique	100 e$^-$ rms	
Non-linéarité	10 % jusqu'à 17 700 e$^-$	10 % jusqu'à 19 500 e$^-$
Résolution du seuil	135 e$^-$ rms	110 e$^-$ rms
Dispersion du seuil	75 e$^-$ rms	60 e$^-$ rms

TABLEAU 4.1. – Tableau récapitulatif des caractéristiques des chips XPAD3-S et XPAD3.2-C [BUTON et al. 2014] et [CHANTEPIE 2008].

qu'avec le chip XPAD3.2-S (19500 e– au lieu de 17700 e–). Le nombre de paires électron-trou créées dépend du matériau semi-conducteur. Ainsi, l'énergie nécessaire à la création d'une paire électron-trou se monte à 3.62 eV dans le silicium, 4.2 eV dans l'arséniure de gallium ou encore 4.4 eV dans le tellurure de cadmium. L'énergie à partir de laquelle l'efficacité du seuil présente une non-linéarité de 10 % se monte à 64 keV (17700 e– x 3.62 eV) pour le chip XPAD3.2-S hybridé à des pixels en silicium et 82 keV (19500 e– x 4.2 eV) pour le chip XPAD3.2-C hybridé à des pixels en arséniure de gallium. L'avantage de l'AsGa couplé au chip XPAD3.2-C est de pouvoir réaliser des imageries avec un seuil suffisamment haut pour l'étalonner au K-edge de l'or qui se situe à 80.7 keV avec une efficacité de détection suffisante de 40 % pour 1 mm d'épaisseur d'AsGa (ce qui ne serait pas possible avec des pixels de silicium de 500 μm d'épaisseur, leur efficacité étant pratiquement nulle en deçà de 30 keV).

4.1.1.3. Calibration des seuils en énergie

Afin de déterminer le seuil en énergie du discriminateur, plusieurs convertisseurs numériques-analogiques (ou *Digital to Analog Converter*) (DAC) peuvent être réglés pour chaque pixel :

— ITH (pour *Intensity Threshold*) : codé sur 8 bits (256 pas de réglages), ce DAC

permet un réglage global autour d'une énergie commune à tous les pixels du chip

— DACL (pour *Digital to Analog Converter Local*) : codé sur 6 bits (64 pas de réglage propre à chaque pixel du chip) il permet d'ajuster le seuil indépendament pour chaque pixel. Cela permet de rattraper les différences de gain et la dispersion du comparateur de courant entre les pixels.

— ITUNE : codé sur 6 bits, ce DAC règle la valeur en énergie des pas de DACL et ITH.

Sur les 6 bits qui codent les DACL, les bits de poids fort qui ont un plus grand impact sur la variation du seuil. La Figure 4.4 illustre les sauts en termes de taux de comptage lors du basculement des bits de poids fort. Ce paramètre induit une incertitude sur le seuil fixé.

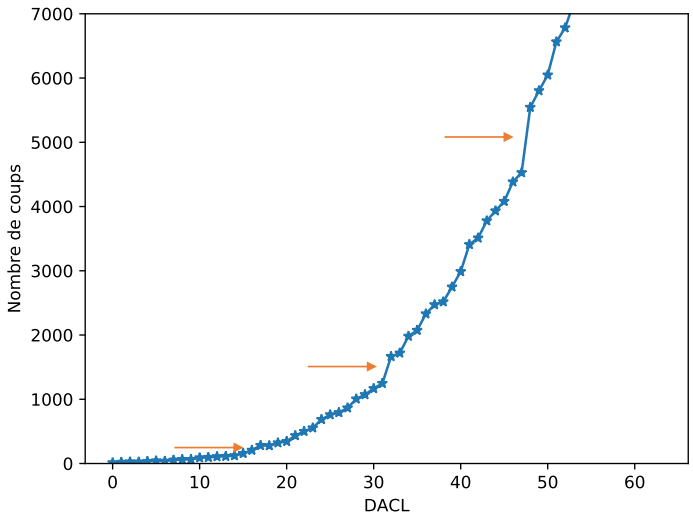


FIGURE 4.4. – Taux de comptage pour un pixel du détecteur XPAD3.2 AsGa lors d'un scan DACL derrière un filtre d'argent. On note le saut au passage du DACL entre 16 et 17, puis entre 31 et 32 et entre 47 et 48 (au niveau des flèches) correspondant au basculement du 5ème puis 6ème bits et 5ème et 6ème bits ensemble, respectivement.

4.1.2. Protocole de calibration du détecteur

Que ce soit pour réaliser des images au ras-du-bruit ou faire des calibrations au K-edge d'un matériau donné, nous devons tout d'abord étalonner le détecteur, c'est-à-dire régler le seuil à l'énergie souhaitée pour chaque pixel.

Le seuil est donné par l'équation suivante :

$$seuil = (\text{ITH} - \text{DACL}) \times \text{ITUNE} \tag{4.1}$$

et décroît lorsque le DACL augmente et/ou que l'ITH dominue.

Pour régler le seuil, nous devons donc, à ITUNE fixé, trouver la valeur d'ITH et celles des DACL appropriées à chaque pixel. Pour cela, nous commençons par réaliser un scan ITH, *i.e.* une prise de données en faisant varier la valeur d'ITH pas à pas, pour une valeur de DACL fixée à 32 pour tous les pixels. Une fois la valeur d'ITH optimale trouvée, on réalise un scan DACL à la valeur de l'ITH trouvée, et on récupère les valeurs des DACL de chaque pixel correspondant à l'énergie souhaitée.

A la fin du protocole, nous obtenons deux fichiers de calibration :

— une calibration globale qui répertorie les valeurs des DAC globaux ITH et ITUNE
— une calibration locale qui contient la table de calibration, *i.e.* la valeur de DACL de chaque pixel

4.1.2.1. Calibration au ras-du-bruit

Lors de l'utilisation du scanner en mode standard d'absorption, le détecteur est calibré au ras-du-bruit électronique, soit à environ 8 keV. Cela signifie que l'on cherche la valeur en énergie du seuil la plus petite possible pour laquelle le détecteur ne compte pas lorsque la source à rayons X est éteinte. Diminuer ce seuil impliquerait de compter du bruit en plus de nos mesures.

La calibration au ras-du-bruit est entièrement automatisée (protocole de calibration propiétaire de la société Cegitek) et est réalisée environ une fois par mois (ou au début de chaque expérience impliquant un suivi longitudinal) car la réponse des pixels peut varier avec le temps ou la température.

La calibration consiste à réaliser un scan ITH afin de trouver la valeur d'ITH pour laquelle plus de la moitié des pixels sont actifs, *i.e.* comptant un nombre non nul de photons. A cette valeur d'ITH optimale, un scan DACL permet ensuite de fixer le seuil à deux pas de DACL au-dessus du bruit (donc deux pas au-dessous du seuil pour lequel le pixel est activé).

4.1.2.2. Calibration à une énergie donnée

En tomographie spectrale, nous avons également besoin d'étalonner le détecteur à une énergie donnée. Une méthode pour réaliser cet étalonnage serait d'utiliser un faisceau monochromatique à l'énergie voulue. Or cela nécessite de prendre des mesures sur une source de lumière synchrotron (au synchrotron SOLEIL sur le plateau de Saclay ou à l'ESRF à Grenoble par exemple). Pour s'affranchir de cette contrainte, nous avons développé une méthode de calibration au K-edge de matériaux d'intérêt (iode, baryum, or, etc.) utilisant le faisceau polychromatique délivré par le tube à rayons X du prototype PIXSCAN-FLI et filtré par ces mêmes matériaux d'intérêt.

K-edge d'un matériau Chaque matériau possède un coefficient d'atténuation par effet photoélectrique qui dépend de l'énergie des rayons X. Comme illustré sur la Figure 4.5, ce coefficient diminue avec l'énergie. Cependant, nous pouvons remarquer sur cette figure que le baryum présente un brisque accroissement de ce coefficient (ce sursaut du coefficient d'atténuation existe aussi pour le calcium mais à une énergie plus faible qui n'apparaît pas sur ce graphique). Ce saut, appelé K-edge, se produit à une énergie précise, *i.e.* 37.4 keV pour le baryum, correspondant à l'énergie de liaison des électrons de la couche K de l'atome. Lorsque le photon a une énergie inférieure à cette énergie de liaison, la probabilité d'interaction entre le photon et un électron chute brutalement puisqu'il ne peut plus ioniser les électrons de la couche K mais uniquement ceux des couches L et M de densité bien plus faibles. C'est pour cela que le coefficient d'atténuation photoélectrique augmente brusquement dès que l'énergie de rayons X permet d'ioniser les électrons de la couche K.

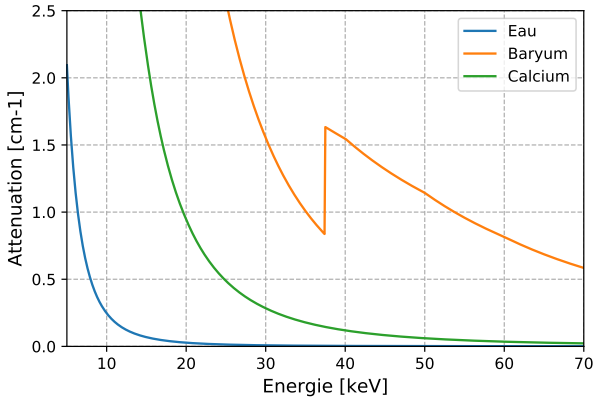
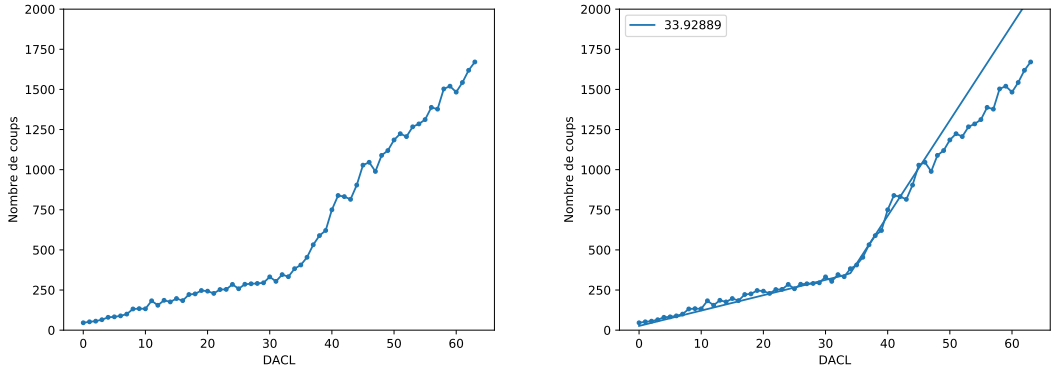


FIGURE 4.5. – Coefficient d'atténuation photoélectrique des matériaux en fonction de l'énergie. Pour le baryum, nous pouvons noter le saut (K-edge) à l'énergie de 37.4 keV correspondant à l'énergie de liaison des électrons sur la couche K de baryum.

Afin de calibrer à une énergie donnée, nous allons exploiter le K-edge du coefficient d'atténuation photoélectrique des matériaux. En plaçant un filtre constitué par un matériau de K-edge connu, nous cherchons tout d'abord une valeur d'ITH optimale pour cette énergie. En partant de la valeur d'ITH de la calibration au ras-du-bruit, on ajoute autant de pas d'ITH (nous verrons à la Section 4.1.3.2 comment ce pas a été calculé) qu'il est nécessaire pour atteindre l'énergie recherchée. Ensuite nous réalisons un scan DACL pour fixer la valeur du seuil de chaque pixel. Une courbe de scan DACL d'un pixel placé derrière un filtre d'iode composé d'Ioméron 350 est présentée en Figure 4.6a. A partir de cette courbe, on cherche la cassure correspondant au changement de pente du scan DACL. En effet, l'allure de la courbe de réponse d'un pixel est composée d'une pente, d'un point de cassure correspondant à l''énergie du K-edge du filtre, puis d'un accroissement concave. Le point de cassure est défini par le point d'intersection entre la droite d'équation $b_1 x + c_1$ et la parabole d'équation

$a_2x^2 + b_2x + c_2$. Les paramètres b_1, c_1, a_2, b_2 et c_2 sont estimés par une minimisation des moindres carrés et leurs domaines de variations peuvent être ajustés par l'expérimentateur. Par exemple, pour le pixel de la Figure 4.6b, nous pouvons voir que la valeur de DACL correspondant à la cassure a été estimée à 33.9. Etant donné que nous devons attribuer une valeur entière au DACL, c'est la valeur arrondie la plus proche qui sera prise en compte pour cela. Pour ce pixel, une calibration à la valeur de DACL 34 correspondra ainsi à une énergie de 33.2 keV, qui correspond à l'énergie du K-edge de l'iode.



(a) Avant la minimisation

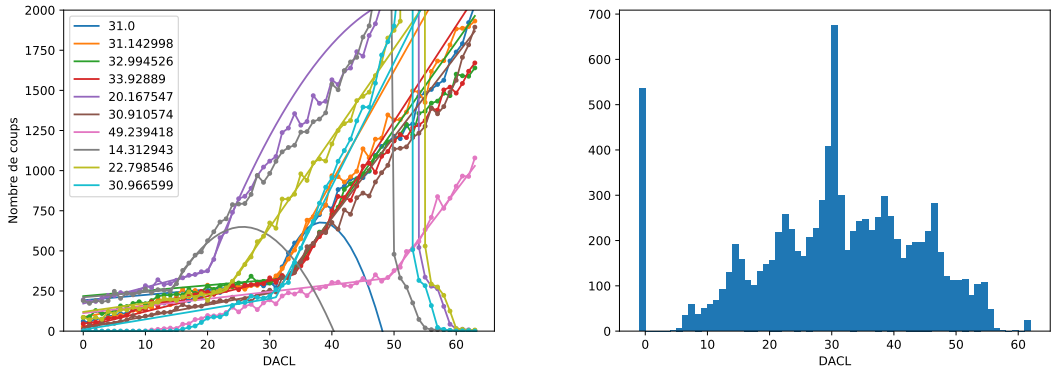
(b) Après la minimisation permettant de détecter la cassure

FIGURE 4.6. – Courbes représentant le scan DACL d'un pixel réalisé derrière un filtre d'iode composé d'Ioméron 350 (a) avant et (b) après la minimisation permettant de détecter la cassure correspondant à l'énergie du K-edge de l'iode (33.2 keV).

La valeur de DACL de chaque pixel est ainsi déterminée. Comme représenté sur la Figure 4.7a, une majorité des valeurs de DACL sont centrées autour de 32 car la valeur d'ITH choisie a été optimisée de telle sorte que les valeurs de DACL soient centrées pour pouvoir calibrer un maximum de pixels. Cependant, nous pouvons tout de même voir une hétérogénéité de la réponse de chaque pixel, avec des valeurs de DACL aux extrémités (inférieures à 14 ou supérieures à 49). Nous pouvons aussi observer cette hétérogénéité sur la Figure 4.7b, qui illustre les différentes valeurs de DACL obtenues pour une calibration réalisée au K-edge de l'iode.

L'objectif d'une calibration à une énergie donnée est de pouvoir calibrer un maximum de pixels. Cependant, il nous est impossible d'avoir 100% des pixels correctement ajustés. Certains d'entre eux vont être en dehors de la plage permise par la valeur d'ITH choisie et aucune cassure ne pourra être trouvée. Dans ce cas, nous allons masquer ces pixels dans les fonds noirs (comme nous l'avons déjà vu à la Section 2.1.6.2 concernant les pixels défaillants).

Par ailleurs, nous avons aussi des pixels pour lesquels une cassure est détectée mais qui n'est pas correcte. Nous pouvons détecter ces pixels en analysant l'histogramme



(a) Scans DACL de plusieurs pixels voisins sur le chip.

(b) Histogramme des DACL de tous les pixels du chip.

FIGURE 4.7. – Graphique représentant (a) les valeurs de DACL de plusieurs pixels voisins sur le chip et (b) l'hétérogénéité de réponse des différents pixels.

du taux de comptage d'un fond blanc, une fois les valeurs de calibration attribuées aux DACL des pixels. Si tous nos pixels sont calibrés au même seuil, nous devrions obtenir une gaussienne. Or, comme nous pouvons le voir sur la Figure 4.8, nous avons des pixels qui ne comptent pas ou très peu. Ces derniers sont mal calibrés et vont être masqués.

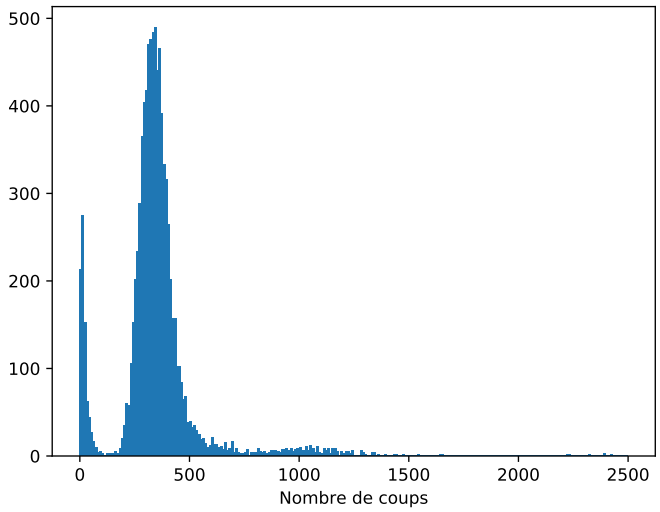


FIGURE 4.8. – Histogramme du nombre de coups pour une image de fond blanc obtenue pour la calibration au K-edge de l'iode.

Ces pixels mal calibrés peuvent par exemple correspondre aux pixels pour lesquels la cassure trouvée correspond à l'énergie maximale du spectre de source, lorsque le

comptage devient nul, comme nous pouvons le voir sur la Figure 4.9.

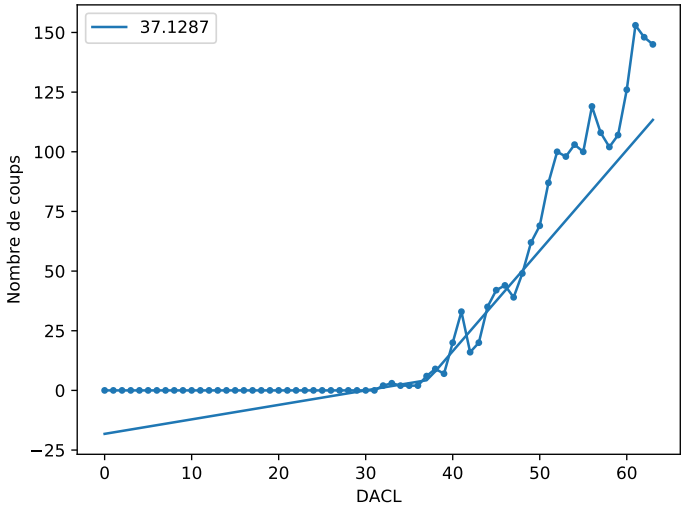


FIGURE 4.9. – Scan DACL d'un pixel pour lequel le fit trouvé n'est pas correct car il ne correspond pas au K-edge mais à la fin du spectre de source.

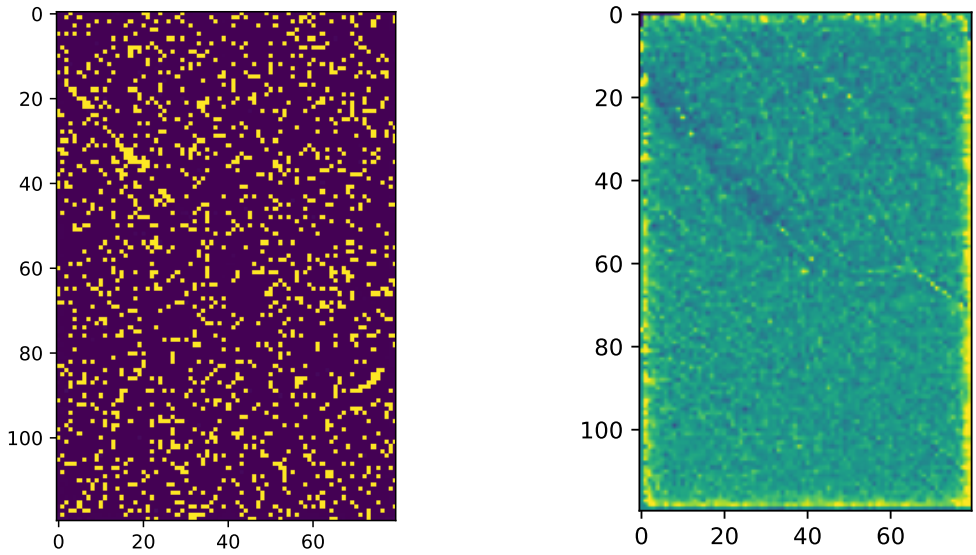
Nous pouvons aussi noter des pixels qui comptent plus que les autres et qui correspondent aux pixels doubles. En effet, un anneau de garde composé de pixels deux fois plus grands borde la matrice de pixels du chip. Les pixels correctement calibrés sont ceux dont le comptage se monte à $\pm 3\sigma$ de la moyenne comptée par les pixels d'un fond blanc.

Finalement, à la fin du protocole de calibration, nous avons les deux fichiers de calibration qui nous permettent de fixer les seuils à l'énergie voulue. Une image de la cartographie de pixels n'ayant pas pu être calibrés, ainsi que d'une image de fond blanc obtenue après calibration au K-edge de l'iode sont montrées en Figure 4.10. Nous pouvons voir sur le fond blanc (Figure 4.10b) que l'image obtenue est plutôt homogène, seule une trace en haut à gauche apparaissant qui correspond à un alignement de pixels défaillants.

Par ailleurs, je recense dans le Tableau 4.2 les résultats des différentes calibrations réalisées sur le détecteur XPAD3.2-C/AsGa et utilisées au cours de ce travail.

4.1.3. Caractérisation du détecteur

La tomographie spectrale, qui sera explicitée par la suite telle que nous l'avons implémentée, va se baser sur des scans réalisés à différentes énergies. Nous avons vu dans la section précédente comment calibrer à une énergie connue correspondant au K-edge d'un filtre métallique, or nous ne pouvons pas trouver des matériaux pour toutes les énergies. Nous pourrons modifier le seuil en énergie en modifiant les valeurs de DACL ou d'ITH. Afin de connaître à quelle énergie est réglé le seuil du comparateur,



(a) Cartographie des pixels non calibrés (en jaune) pour une calibration à l'iode du détecteur AsGa.

(b) Image d'un fond blanc obtenu à l'issu de la calibration à l'iode et après interpolation des pixels masqués.

FIGURE 4.10. – Résultats de la calibration au K-edge de l'iode du détecteur XPAD3.2-C/AsGa avec (a) la cartographie des pixels non calibrés (en jaune) et (b) une image de fond blanc obtenue après estimation du comptage des pixels masqués par interpolation bilinéaire des comptages des pixels voisins.

nous devons ainsi connaître les pas de DACL et d'ITH, *i.e.* la variation du seuil en énergie lorsque nous augmentons/diminuons d'un pas les valeurs de DACL ou d'ITH.

4.1.3.1. Estimation de la valeur du pas de DACL en énergie

Afin de déterminer l'énergie correspondant au pas de DACL, nous avons réalisé des calibrations à des énergies de K-edge connues et assez proches. Nous avons utilisé des filtres d'argent (25.5 keV), d'iode (33.2 keV) et de baryum (37.4 keV). Pour une valeur d'ITUNE fixée à 70, une valeur d'ITH optimale a été fixée afin de permettre de réaliser les calibrations des 3 matériaux à cette valeur d'ITH tout en faisant en sorte d'inclure un maximum de pixels calibrables dans cette plage d'énergie.

Après avoir déterminé les valeurs de DACL pour chaque filtre, nous calculons la différence des valeurs de DACL obtenues pour chaque pixel entre les calibrations (Figure 4.11). En connaissant l'écart théorique entre les énergies des K-edges des différents matériaux utilisés comme filtres, nous pouvons ainsi déduire la valeur du pas de DACL en énergie. Le Tableau 4.3 résume les différentes valeurs de pas de DACL qui ont été estimées. Finalement, pour des énergies proches de 30 keV, la valeur du pas de DACL est d'environ 1.11±0.41 keV comme nous pouvons le voir sur la Figure 4.12.

	Iode	Baryum	Or
Matériau	Ioméron 350 (iode à 350 mg/mL)	Poudre de sulfate de baryum	625 μm de feuilles d'or
K-edge	33.2 keV	37.4 keV	80.7 keV
Source	70 keV - 500 μA	70 keV - 500 μA	150 keV - 500 μA
Temps d'exposition	1 000 ms	800 ms	1 500 ms
ITUNE	70	70	70
ITH	66	66	106
Nombre de pixels correctement calibrés	8 248	8 227	8 299
Fraction des pixels correctement calibrés	85.9 %	85.7 %	86.4 %

TABLEAU 4.2. – Tableau récapitulatif des différentes calibrations réalisées.

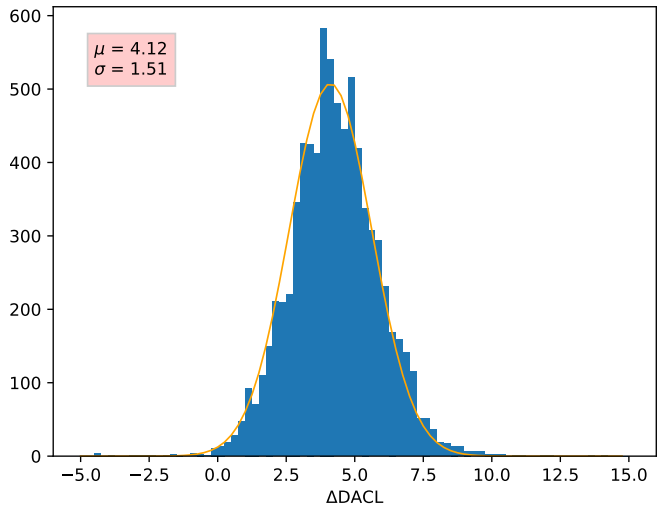


FIGURE 4.11. – Histogramme des différences de valeurs de DACL entre les calibrations à l'iode et au baryum.

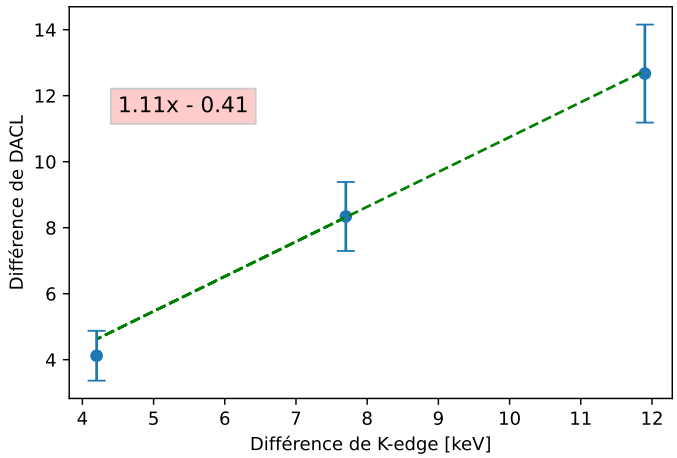


FIGURE 4.12. – Graphique de la différence de valeurs de DACL en fonction de la différence d'énergie des K-edges permettant d'estimer la valeur du pas de DACL.

4.1.3.2. Estimation de la valeur du pas d'ITH en énergie

La valeur du pas d'ITH en énergie a été calculée de manière similaire. À une valeur d'ITUNE fixe (toujours 70), nous avons utilisé la calibration à l'iode. Puis en conservant les valeurs de DACL, des scans ITH sont réalisés avec des filtres d'argent et de baryum afin de voir apparaître les signatures des K-edges de l'argent et du baryum. La différence des valeurs d'ITH entre les différentes calibrations nous permet de connaître la valeur du pas d'ITH en énergie (Tableau 4.3). À ces énergies, nous avons un pas d'ITH semblable au pas de DACL, soit 1.06±0.19 keV (Figure 4.13).

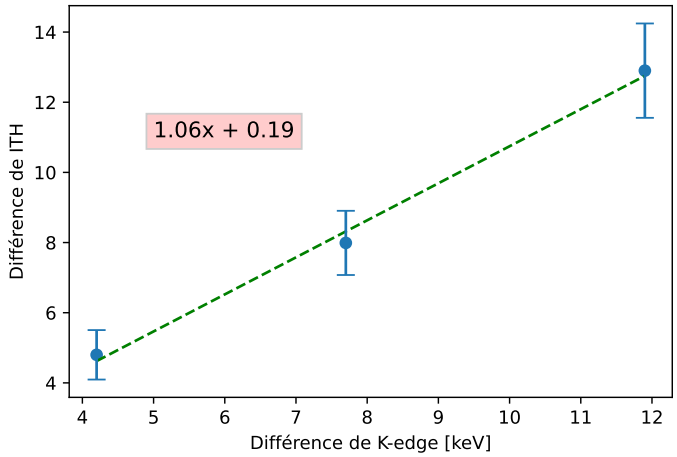


FIGURE 4.13. – Courbe de calcul du pas de ITH.

	Entre argent et iode	Entre iode et baryum	Entre argent et baryum
Différence d'énergie	7.7 keV	4.2 keV	11.9 keV
Différence des valeurs de DACL	8.34 ± 2.09	4.12 ± 1.51	12.67 ± 2.97
Valeurs du pas de DACL	1.08 ± 0.27 keV	0.98 ± 0.36 keV	1.06 ± 0.25 keV
Différence des valeurs d'ITH	7.99 ± 1.83	4.80 ± 1.41	12.90 ± 2.69
Valeurs du pas d'ITH	1.04 ± 0.24 keV	1.14 ± 0.34 keV	1.08 ± 0.23 keV

TABLEAU 4.3. – Tableau récapitulatif des pas de DACL et ITH calculés.

4.1.4. Comparaison à l'état de l'art

Maintenant que nous avons décrit le détecteur et sa caractérisation, nous allons voir où il se positionne dans l'état de l'art actuel. Le Tableau 4.4 résume les différents détecteurs à pixels hybrides disponibles sur le marché.

Entreprise	ASIC	Matériau	Taille du pixel	Nombre de seuils
GE Healthcare	CERN DxCTA	CZT	$500 \times 500\ \mu m^2$	5
Mars Bioimaging	Medipix3	CdTE / CZT	$110 \times 110\ \mu m^2$	8
Philips	ChromAIX2	CZT	$500 \times 500\ \mu m^2$	5
Siemens	Actina	CdTe	$225 \times 225\ \mu m^2$	2
Dectris	Pilatus3	CdTe ou AsGa	$150 \times 150\ \mu m^2$	4
Cegitek	XPAD3.2	Si ou AsGa	$130 \times 130\ \mu m^2$	1

TABLEAU 4.4. – Tableau descriptif des caractéristiques des différents détecteurs à pixels hybrides [BALLABRIGA et al. 2021].

Mars Bioimaging, société implantée en Nouvelle-Zélande, utilise des pixels de tel-

lurure de zinc-cadmium ou CZT (pour Cadmium Zinc Tellurure) de 110 × 110 μm^2 hybridés à l'ASIC Medipix3 développé par la collaboration Medipix du CERN qui est doté de 8 seuils de discrimination. C'est le capteur avec le plus de seuils disponibles permettant ainsi d'acquérir des données dans plusieurs fenêtres d'énergie simultanément.

Philips (Philips Healthcare, Haïfa, Israel) a implanté le premier scanner spectral clinique à Lyon sur la plateforme d'imagerie du CERMEP (Centre d'Exploration et de Recherche Médicale par Emission de Positons) dans le cadre du projet européen H2020 SPCCT (*Spectral Photon-Counting Computed Tomography*). Ce prototype est composé du chip ChromAIX2, qui possède 5 seuils de discrimination par pixel, hybridé à un capteur de CZT avec des pixels de 500 × 500 μm^2.

Notre détecteur, assemblé par la société Cegitek, est composé de pixels d'AsGa de $130 \times 130 \mu^2$ hybridés au chip XPAD3.2-C, qui offre une taille de pixel très intéressante par rapport à l'état de l'art, sa limitation étant l'unique seuil discriminant de disponible.

4.2. Introduction à la tomographie spectrale

Après avoir défini les caractéristiques de notre détecteur, nous allons voir comment nous pouvons réaliser de l'imagerie spectrale.

4.2.1. Formalisme spectral

Une TDM classique d'absorption permet, après reconstruction, d'obtenir une image tomographique des coefficients d'atténuation et donc d'avoir une imagerie de contraste essentiellement entre l'air, les tissus mous et les os. L'algorithme de reconstruction est développé pour un faisceau monochromatique, mais les TDM sont quant à elles acquises sous faisceau polychromatique, ce qui induit des biais dans la reconstruction, en particulier des artefacts de durcissement de faisceau. Pour augmenter ces contrastes et obtenir différentes informations, l'idée est de scanner un même objet à différentes énergies. C'est donc l'objectif de la tomographie spectrale : observer un objet à différentes énergies afin d'en extraire des caractéristiques spectrales.

Le principe de tomographie spectrale a été introduit en 1976 par Alvarez et Macovski [ALVAREZ et al. 1976], qui proposent d'utiliser en plus de l'intensité du faisceau de photons transmis, l'énergie des photons qui le constituent. Comme nous l'avons vu au Chapitre 1, la reconstruction en tomographie d'absorption permet de reconstituer une image des coefficients d'atténuation μ d'un objet à l'aide des mesures modélisées par la loi de Beer-Lambert :

$$\mathrm{I} = \int_0^{\infty} \mathrm{I}_0(\mathrm{E}) \exp\left(-\int_L \mu(\mathrm{E},\mathrm{x})\, dx\right) d\mathrm{E} \tag{4.2}$$

Par ailleurs, aux énergies des rayons X utilisés en préclinique, nous avons vu que les interactions des photons dans la matière étaient dues aux effets Compton et photoélectrique. Ainsi nous pouvons décomposer le coefficient d'atténuation tel que :

$$\mu(\mathrm{E,x}) = \mu_C(\mathrm{E,x}) + \mu_{ph}(\mathrm{E,x}) \tag{4.3}$$

avec μ_C le coefficient d'atténuation dû à l'effet Compton et μ_{ph} le coefficient d'atténuation dû à l'effet photoélectrique.

Une autre possibilité est de décomposer le coefficient d'atténuation de l'objet comme étant une somme des coefficients d'atténuation relatifs à différents matériaux :

$$\mu(\mathrm{E,x}) = \sum_{k=1}^{n} \mathrm{a}_k(x)\mu(\mathrm{E})_k \tag{4.4}$$

avec $\mathrm{a}_k(\mathrm{x})$ les concentrations spatiales de chaque matériau et $\mu(\mathrm{E})_k$ leur coefficient d'atténuation. L'objectif de la tomographie spectrale est donc de trouver les coefficients $\mathrm{a}_k(\mathrm{x})$ pour obtenir la décomposition en matériaux de notre objet en utilisant une information spectrale.

Deux approches permettent de réaliser des tomographies spectrales. Afin de récupérer l'information spectrale d'un objet, il faut soit le scanner avec différentes énergies et donc modifier le spectre de la source de rayons X, soit sélectionner les photons arrivant sur le détecteur en fonction de leur énergie.

Les différentes méthodes qui seront listées par la suite ont été recensées dans les articles So et al.[So et al. 2021] et de Garnett [Garnett 2020].

Modification du spectre de source

En premier lieu, la méthode la plus utilisée en clinique est le « CT multi-énergie ». Cela consiste à placer deux sources de rayons X à 90° l'une de l'autre, auxquelles on applique des tensions différentes. Leurs détecteurs respectifs placés en face des sources correspondantes permettent ainsi au cours d'une rotation d'obtenir deux acquisitions à des spectres d'énergie différents.

Une autre méthode, appelée *kV-switching*, consiste en l'utilisation d'un tube à rayons X capable de changer très rapidement de tension. Ainsi, au cours d'une acquisition, pour chaque angle, la source commute entre deux énergies pour pouvoir acquérir les deux scans pour des spectres d'énergie différents en un seul tour et avec un seul détecteur.

Par ailleurs, il est aussi possible d'utiliser une source de rayons X pour laquelle le spectre est modifié à chaque rotation en modifiant la tension appliquée.

Enfin, une dernière méthode consiste à utiliser une source sur laquelle on positionne

un filtre permettant de diviser le spectre d'énergie en deux parties [EULER 2016].

Détection sélective des rayons X

Une seconde approche consiste à s'intéresser à la partie détecteur.
Une première méthode est d'avoir un détecteur à deux couches avec des matériaux différents. Une première couche va stopper et donc détecter les rayons de faible énergie, tandis que la seconde couche détectera les rayons de plus haute énergie qui auront réussi à traverser la première couche sans être arrêtés.
La seconde méthode, qui est celle que nous utiliserons, consiste à employer un détecteur à comptage de photons avec un ou plusieurs seuils en énergie. L'application d'un seuil permet ainsi de détecter uniquement les photons dont l'énergie est supérieure au seuil.

Les différentes méthodes d'acquisition [GREFFIER et al. 2023] sont illustrées en Figure 4.14.

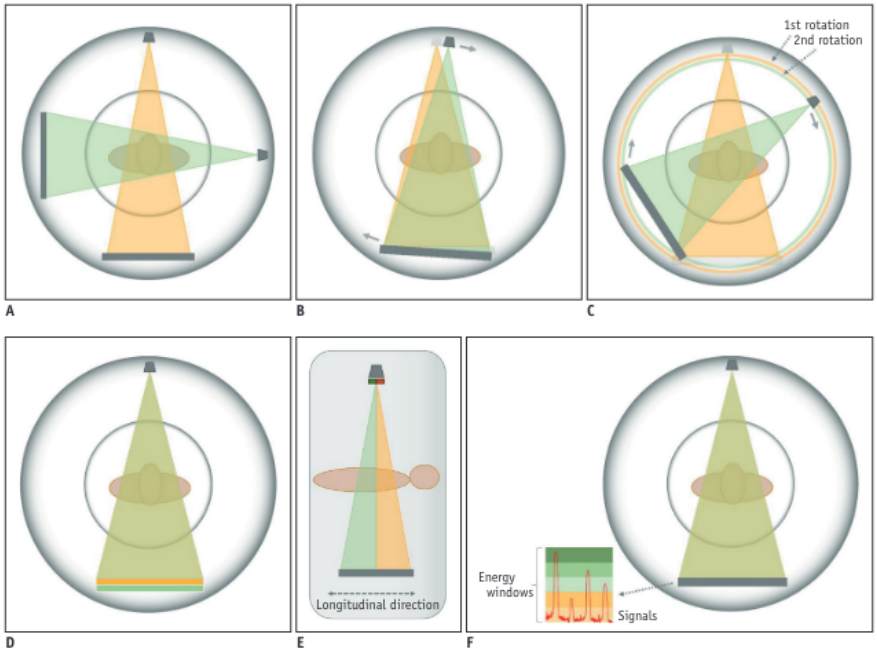


FIGURE 4.14. – Schéma représentant les différentes méthodes d'acquisition pour la tomographie spectrale [SO et al. 2021] : (A) CT multi-énergies, (B) *kV-switching*, (C) Une seule source modifiée à chaque rotation, (D) Détecteur double couche, (E) Filtre de division de spectre de source et (F) Détecteur à comptage de photons.

4.2.2. Imagerie au K-edge par soustraction

La méthode de tomographie spectrale utilisée avec nos détecteurs est l'imagerie de soustraction au K-edge. Comme nous l'avons vu en Section 4.1.2, les caméras XPAD3.2 sont composées de pixels hybrides qui peuvent être calibrés à des seuils aux énergies des K-edges de matériaux utilisés comme filtre. Or, le K-edge d'un agent de contraste permet aussi d'obtenir une imagerie spectrale en effectuant des scans dans des fenêtres d'énergie situées de part et d'autre du K-edge de l'agent de contraste que l'on veut imager [RIEDERER 1977].

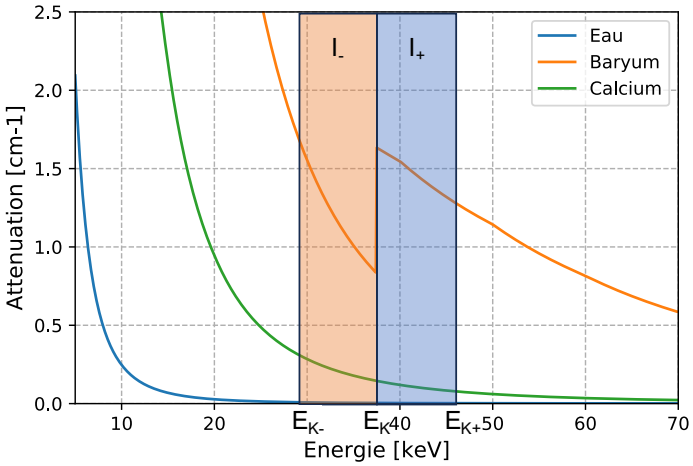


FIGURE 4.15. – Représentation schématique des deux fenêtres d'énergie utilisées pour la soustraction au K-edge du baryum.

Comme représenté sur la Figure 4.15, nous avons besoin d'informations dans deux fenêtres d'énergie, ce qui représente l'acquisition de 3 scans à des seuils différents avec un détecteur mono-seuillé :

— le premier scan est réalisé à l'énergie du K-edge E_K de l'agent de contraste dont on cherche à obtenir l'image ;
— le deuxième scan est réalisé en fixant le seuil en dessous de l'énergie du K-edge : $E_K- = E_K - \Delta E$;
— le troisième scan est réalisé en fixant le seuil au dessus de l'énergie du K-edge : $E_K+ = E_K + \Delta E$;

avec ΔE la différence en énergie entre les seuils calculés à partir de la valeur des pas de DACL ou d'ITH en énergie.

Pour chaque scan, le seuil fixé va permettre de ne compter que les photons dont l'énergie est supérieure à ce seuil. Ainsi, nous avons un flux de photons pour chacun des scans de la forme :

$$\begin{aligned}
\mathrm{I}[\mathrm{E}_K] &= \int_{E_K}^{E_{max}} \mathrm{I}_0(\mathrm{E}) \exp\left(-\int_D \mu(\mathrm{E,x})\,dx\right) d\mathrm{E} \\
\mathrm{I}[\mathrm{E}_{K-}] &= \int_{E_{K-}}^{E_{max}} \mathrm{I}_0(\mathrm{E}) \exp\left(-\int_D \mu(\mathrm{E,x})\,dx\right) d\mathrm{E} \\
\mathrm{I}[\mathrm{E}_{K+}] &= \int_{E_{K+}}^{E_{max}} \mathrm{I}_0(\mathrm{E}) \exp\left(-\int_D \mu(\mathrm{E,x})\,dx\right) d\mathrm{E}
\end{aligned} \tag{4.5}$$

avec E_{max} l'énergie maximum des photons émis pas la source pour les caractéristiques choisies, D la trajectoire du faisceau, $\mathrm{I}_0(\mathrm{E})$ le spectre d'énergie émis par la source de rayons X et $\mu(\mathrm{E,x})$ le coefficient d'atténuation linéique.

Ainsi, pour nos deux fenêtres d'énergie, nous pouvons estimer le flux de photons :

$$\begin{aligned}
\mathrm{I}_- = \mathrm{I}[\mathrm{E}_{K-}] - \mathrm{I}[\mathrm{E}_K] &= \int_{E_{K-}}^{E_K} \mathrm{I}_0(\mathrm{E}) \exp\left(-\int_D \mu(\mathrm{E,x})\,dx\right) d\mathrm{E} \\
\mathrm{I}_+ = \mathrm{I}[\mathrm{E}_K] - \mathrm{I}[\mathrm{E}_{K+}] &= \int_{E_K}^{E_{K+}} \mathrm{I}_0(\mathrm{E}) \exp\left(-\int_D \mu(\mathrm{E,x})\,dx\right) d\mathrm{E}
\end{aligned} \tag{4.6}$$

Nous reconstruisons l'image d'absorption dans les deux fenêtres d'énergie ainsi calculées en appliquant : $-\log \frac{I}{I_0}$ pour chaque fenêtre. Dans la fenêtre haute en énergie, nous obtenons ainsi une augmentation du coefficient d'atténuation pour le matériau recherché. En soustrayant les volumes reconstruits dans chaque fenêtre d'énergie, on obtient ainsi l'image spectrale :

$$\mu_{spectrale}(x) = \mu_+(x) - \mu_-(x) \tag{4.7}$$

Pour les zones contenant le matériau recherché nous aurons donc des valeurs positives car $\mu_+(x) > \mu_-(x)$ alors que pour les autres matériaux, les valeurs seront négatives.

La qualité de l'image spectrale et de la séparation entre le matériau recherché et le reste, dépend du choix de la largeur de la fenêtre d'énergie ΔE. En effet, en augmentant ΔE nous augmentons la statistique mais nous diminuons le contraste inhérent au K-edge. À l'inverse, un ΔE trop petit aura pour effet de diminuer le rapport signal sur bruit car la statistique sera plus faible [He et al. 2012]. Une précédente étude menée avec les détecteurs XPAD3.2 a montré que des plages de valeurs de 1.5 à 4.5 keV permettaient une bonne identification de l'iode [Cassol, Dupont et al. 2016].

La qualité de l'image est aussi dépendante du nombre de seuils discriminant disponibles par pixel. Pour un détecteur possédant un unique seuil comme le XPAD3.2-C/AsGa, chaque scan est indépendant. L'estimation du scan dans la fenêtre en énergie correspond donc à la soustraction de deux grands nombres mesurés indépendamment pour un obtenir : N1-N2 $\pm \sqrt{\mathrm{N1+N2}}$. La variance explose, entraînant du bruit dans l'image, ce qui est la grande limitation des détecteur mono-seuil. Dans le cas d'un détecteur à plusieurs seuils, les scans seuillés ne sont plus indépendants les uns des autres. La soustraction dans la fenêtre en énergie devient une mesure poissonnienne :

N1-N2 $\pm \sqrt{|\text{N1-N2}|}$.

L'algorithme ProMeSCT, qui sera décrit par la suite, a le grand avantage de ne pas devoir estimer des scans dans des fenêtres d'énergie, mais d'utiliser seulement des scans mono-seuillés, ce qui évite l'augmentation artificielle de variance décrite plus haut. C'est donc un algorithme qui permet en quelque sorte de réhabiliter les détecteurs mono-seuillés par rapport aux détecteurs multi-seuillés, même si les détecteurs multi-seuillés feront toujours mieux en terme de dose, puisque tous les scans peuvent être obtenus en une seule passe.

Afin de limiter la dose avec des détecteurs mono-seuillés, la parade est d'utiliser une mosaïque de pixels réglés sur des seuils différents [KRONLAND-MARTINET 2015], mais au détriment de la résolution spatiale puisque la taille du pixel composite est un multiple de la taille du pixel (3 × 3 par exemple). On obtient ainsi plusieurs scans en une seule passe, mais ces scans restent malheureusement indépendant les uns des autres (chaque pixel effectue une mesure indépendante et voit des photons différents) et donc on a toujours N1-N2 $\pm\sqrt{\text{N1+N2}}$.

4.2.3. Description de l'algorithme ProMeSCT

La reconstruction tomographique spectrale par soustraction du K-edge se réalise en plusieurs étapes, avec tout d'abord la reconstruction puis la séparation en matériaux [RIEDERER 1977], [CASSOL BRUNNER et al. 2013]. Une autre méthode consiste à faire l'inverse : d'abord séparer les matériaux et mesurer leur contribution dans l'espace des sinogrammes puis reconstruire chaque sinogramme de matériau en 3D [SCHLOMKA 2008], [DUCROS et al. 2017]. L'algorithme ProMeSCT (pour *Proximal Metric Agorithm for Spectral CT*) décrit par Tairi et al. [TAIRI et al. 2021] permet de résoudre ces deux problèmes avec un algorithme itératif permettant simultanément la séparation en base de matériaux et la reconstruction 3D : ProMeSCT fait partie des approches dites « *one-step* ». Cela est réalisé grâce à la minimisation d'un problème inverse. L'algorithme prend en compte le spectre de source polychromatique, l'efficacité du détecteur ainsi que la physique des interactions rayonnement-matière. Ainsi l'algorithme est capable de reconstruire, quantifier et séparer différents constituants en une seule étape. Les performances obtenues sont meilleures en termes de convergence de l'algorithme grâce à l'utilisation d'une métrique spécifique à la problématique de la TDM. Par ailleurs, les différents résultats obtenus montrent que les méthodes développées sont assez robustes aux perturbations qui peuvent se produire lors des acquisitions tels que les bruits sur les images.

L'algorithme ProMeSCT a été validé dans un premier temps sur données simulées, puis sur des données acquises avec le prototype PIXSCAN-FLI [TAIRI 2019]. La Figure 4.16 illustre les résultats obtenus avec l'algorithme ProMeSCT en comparaison avec d'autres algorithmes de reconstruction en décomposition de matériaux. Les données ont été acquises avec un fantôme composé de 6 eppendorff contenant deux agents différents avec des concentrations différentes d'iode à 11, 20 et 40 mg/mL et d'argent à 11, 20 et 40 mg/mL. Cinq acquisitions ont été réalisées à 22, 25.5 (K-edge de l'argent), 29, 33.2 (K-edge de l'iode) et 36.7 keV.

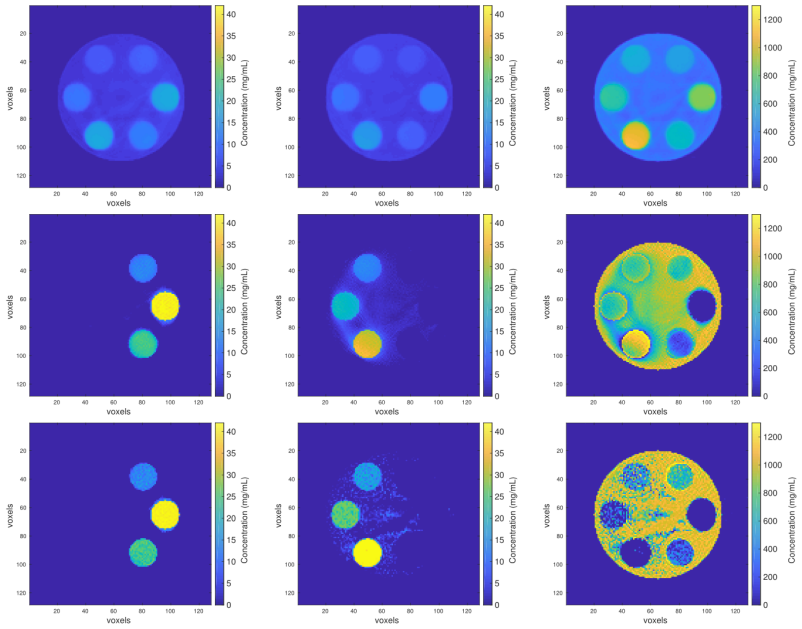


FIGURE 4.16. – Résultats de la reconstruction et de la décomposition en base de matériaux correspondant à l'iode, l'argent et l'eau (à gauche au milieu et à droite respectivement) avec l'algorithme *Forward-Backward* (ligne du haut), FISTA (ligne du milieu) et ProMeSCT (ligne du bas) [TAIRI et al. 2021].

Nous pouvons voir que l'algorithme ProMeSCT permet une meilleure séparation des composants mais aussi une meilleure quantification de la concentration.

4.2.4. Apport pour l'in-vivo

La tomographie spectrale préclinique permet de quantifier la distribution en concentration d'agents de contraste.

Dans le cas de nos études sur le cancer du foie, nous utilisons des nanoparticules de baryum pour marquer le foie et augmenter son contraste par absorption. En faisant de la tomographie spectrale, nous pourrions ainsi quantifier la distribution de concentration du baryum dans le foie. Les endroits plus concentrés en baryum s'interpréteraient comme des zones présentant un taux de macrophages plus élevé, et par soustraction nous aurions aussi une segmentation des tumeurs car elles ne concentre pas d'agent de contraste.

Par ailleurs, l'imagerie spectrale ouvre aussi la porte a des imageries à plusieurs agents de contraste [PANTA et al. 2018], [SYMONS et al. 2017], par exemple avec l'utilisation du baryum et de l'iode pour imager le foie et le système sanguin en même temps. Ces deux matériaux étant complexes à distinguer en tomographie d'absorption standard, la tomographie spectrale permettrait leur séparation et la quantification de leur distribution de concentration.

Avec un détecteur tel que le mono-chip XPAD3.2-C/AsGa, qui possède une bonne efficacité de détection à haute énergie, l'étude autour des nanoparticules d'or peut aussi être un enjeu intéressant pour l'imagerie in vivo avec de plus en plus d'anticorps qui peuvent être fixés sur l'or [MOGHISEH et al. 2018], [PICKFORD SCIENTI et al. 2021].

Finalement, la tomographie spectrale ouvre la voie à une imagerie plus fonctionnelle que la tomographie d'absorption standard, qui permettra une meilleure visualisation et donc possiblement un meilleur diagnostique.

4.3. Preuves de concept avec le détecteur AsGa

Après avoir décrit les caractéristiques du détecteur XPAD3.2-C/AsGa ainsi que les principes de la tomographie spectrale, nous allons présenter dans cette section les résultats obtenus en tant que preuve de concept réalisée avec ce détecteur mono-chip.

Les tests ont été réalisés sur un fantôme de 1 mm de diamètre composé de 3 inserts, comme montré sur la Figure 4.17.

FIGURE 4.17. – Illustration du fantôme utilisé pour les expériences.

La première expérience a consisté à séparer l'iode et le baryum, deux matériaux utilisés comme agents de contraste pour l'imagerie in vivo et dont les énergies des K-edges sont proches (33.2 keV pour l'iode et 37.4 keV pour le baryum). Le fantôme a ainsi été rempli d'une solution d'iode à 40 mg/mL, une solution d'iode de 80 mg/mL et une solution de nanoparticules de baryum. La reconstruction en tomographie d'absorption standard réalisée au ras-du-bruit est présentée en Figure 4.18. Afin de s'assurer que la reconstruction soit correcte, une bille en acier est placée en haut du fantôme, sa forme après reconstruction attestera d'une bonne estimation de la géométrie du détecteur.

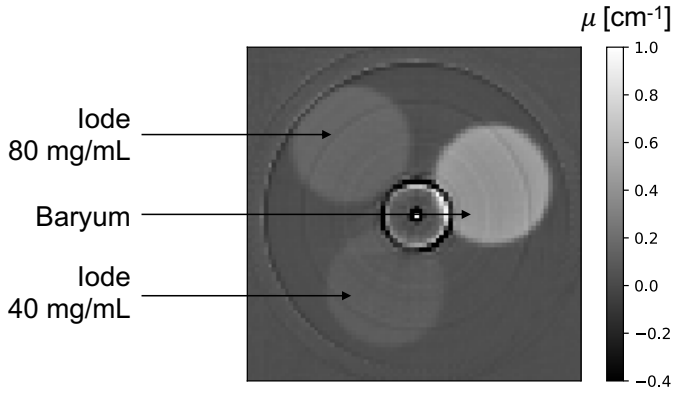


FIGURE 4.18. – Reconstruction tomographie du fantôme contenant deux solutions d'iode (à 40 et 80 mg/mL) et une solution de baryum.

Après avoir réalisé la calibration du détecteur au K-edge de l'iode et du baryum, 6 acquisitions ont été réalisées avec les seuils réglés :

— à l'énergie du Kedge de l'iode et à ± 3 ITH,
— à l'énergie du K-edge du baryum et à ± 3 ITH.

La source était réglée à 60 kVp et 500 μA avec un filtre de 0.6 mm d'aluminum. Une durée d'exposition de 500 ms nous permet d'obtenir environ 15 000 coups dans les fonds blancs avec le seuil réglé au K-edge de l'iode et 11 000 coups dans les fonds blancs avec le seuil réglé au K-edge du baryum. La Figure 4.19 montre les différents histogrammes des fonds blancs obtenus pour les différents réglages des seuils. Plus les seuils sont réglés à une énergie élevée (dans cet exemple, le seuil le plus haut correspond à la calibration au K-edge du baryum + 3 pas d'ITH) et plus la moyenne du taux de comptage est faible et la distribution des taux de comptage ressérée.

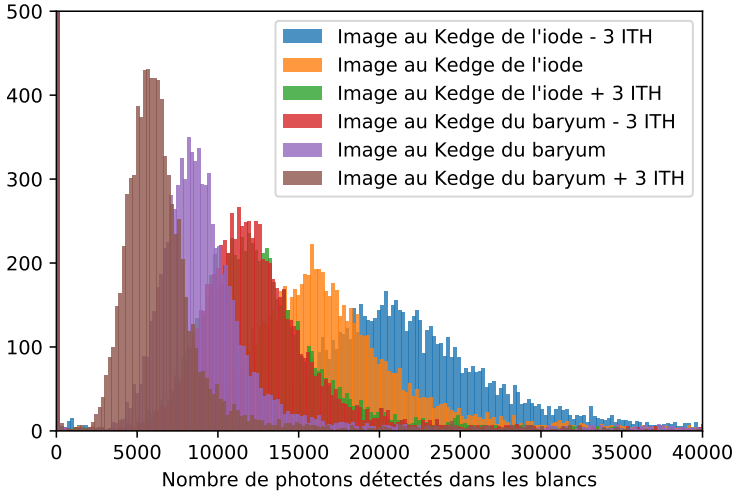
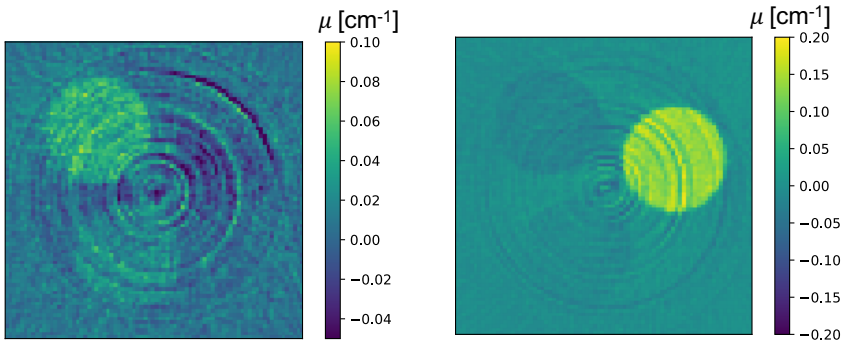


FIGURE 4.19. – Histogrammes des taux de comptages dans les fonds blancs pour les différentes calibrations.

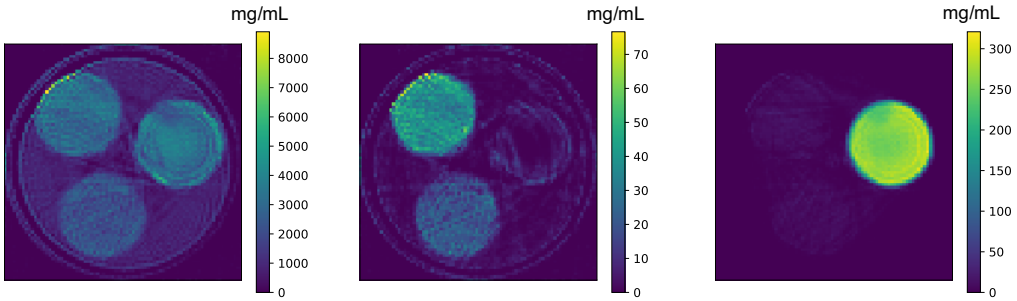
La Figure 4.20a présente les résultats pour la soustraction au K-edge des deux images tomographiques reconstruites pour les fenêtres d'énergie au dessus et en dessous des K-edges de l'iode et du baryum et la Figure 4.20b présente les résultats obtenus avec l'algorithme ProMeSCT.

Les résultats nous montrent la séparation des deux matériaux malgré leurs K-edge proches. Sur les données provenant de la soustraction au K-edge, des artefacts circulaires sont toujours présents malgré le pré-traitement des données pour éliminer les pixels ne comptant pas uniformément. Les résultats obtenus avec l'algorithme ProMeSCT sont quant à eux moins bruités car l'algorithme utilise les scans mono-seuillés et évite ainsi l'augmentation artificielle de variance lors de la soustraction des scans dans des fenêtres d'énergie. Par ailleurs, l'algorithme ProMeSCT nous permet d'avoir une quantification des matériaux. Sur la cartographie de l'iode, nous pouvons voir une estimation des concentrations. Ces estimations sont d'environ 37.9 mg/mL et 20.3 mg/mL, calculées sur une région d'intérêt dans le fantôme. Ces concentrations sont plus faibles qu'attendues (80 et 40 mg/mL) mais respectent le facteur deux entre les deux solutions. Cette sous-estimation peut être due à une connaissance partielle de la réponse du détecteur. En effet, afin de réaliser les séparations des matériaux et leur quantification, l'algorithme doit connaître en entrée la réponse spectrale du système, or pour l'AsGa, la réponse du détecteur n'a pas encore été modélisée en détail et n'est connue que partiellement, en particulier pour ce qui concerne le partage de charges entre les pixels d'AsGa.

La deuxième expérience inclut l'or, un matériau dont l'énergie du K-edge est très élevée (80.7 keV). Le fantôme est constitué d'une solution d'iode de 350 mg/mL, une solution de nanoparticules de baryum et d'une feuille d'or enroulée sur elle-même (Figure 4.21).



(a) Cartographie des différents éléments (à gauche l'iode et à droite le baryum) après soustraction au K-edge



(b) Cartographie des différents éléments et quantification obtenues avec l'algorithme ProMeSCT : à gauche la cartographie de l'eau, au centre la cartographie de l'iode et à droite la cartographie du baryum

FIGURE 4.20. – Résultats des tomographies spectrales obtenues (a) par soustraction au K-edge de l'iode (à gauche) et du baryum (à droite) et (b) avec l'algorithme ProMeSCT pour l'iode (à gauche) et du baryum (à droite). Les images représentent une moyenne de plusieurs coupes tomographiques pour une meilleure visualisation des résultats.

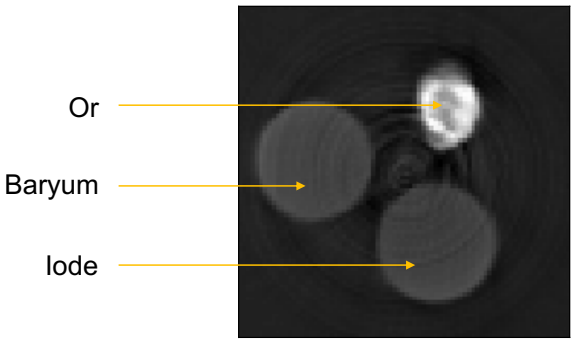


FIGURE 4.21. – Fantôme composé d'une solution de baryum, une solution d'iode et une feuille d'or enroulée sur elle-même.

Neuf acquisitions ont été réalisées avec les seuils réglés :
— à l'énergie du K-edge de l'iode et à ± 3 pas d'ITH,
— à l'énergie K-edge du baryum et à ± 3 pas d'ITH,
— à l'énergie K-edge de l'or et à ± 7 pas de DACL.

Jusqu'à présent nous avions préféré changer les valeurs d'ITH plutôt que celles de DACL afin de ne pas augmenter l'hétérogénéité entre les pixels et éviter de perdre des pixels en atteignant des valeurs de DACL supérieures à 63 ou inférieures à 1. Cependant, autour de la calibration au K-edge de l'or, nous avons modifié les valeurs des DACL car, à ces énergies, la valeur du pas d'ITH en énergie n'était pas suffisamment fiable pour obtenir des calibrations en dessous ou au-dessus du K-edge de l'or permettant d'obtenir des images au K-edge concluantes.

La Figure 4.22a montre les résultats pour les soustractions au K-edge. Nous pouvons observer une bonne séparation des différents composants : l'iode, le baryum et l'or ont des valeurs positives dans leur canal respectif. En revanche, dans le canal de l'iode, nous pouvons observer du baryum toujours présent. Cela peut s'expliquer par le fait que les seuils en énergie ne soient pas parfaitement calibrés aux valeurs souhaitées, notamment pour les pixels au seuil du K-edge de l'iode + 3 pas de ITH. Si des pixels ont finalement une énergie plus élevée que souhaité, ces pixels peuvent être réglés au-dessus du K-edge du baryum et ainsi réhausser le coefficient d'atténuation du baryum dans la fenêtre la plus haute. Lors de la soustraction, le baryum apparaît ainsi en positif au lieu d'être en négatif pour les images autour du K-edge de l'iode, comme nous l'observons dans nos données. D'autre part, dans le canal du baryum on observe des artefacts de durcissement de faisceau provenant de la feuille d'or. Avec l'algorithme ProMeSCT, les images sont moins bruitées comme observé à la précédente expérience. Les résultats sont similaires, pour le canal de l'iode, nous avons un signal du baryum qui persiste. La quantification de la concentration estimée pour l'iode est de 198.9 mg/mL, à la place des 350 mg/mL attendue, qui s'explique une nouvelle fois par une connaissance imparfaite de la modélisation du détecteur. En revanche, pour l'or nous pouvons voir que la séparation est possible et l'algorithme ProMeSCT permet de la placer dans le bon canal, l'efficacité de l'AsGa nous permet donc de réaliser de la tomographie spectrale avec des matériaux possédant un K-edge élevé. Le très faible signal de l'iode et du baryum dans le canal de l'or peut être assimilé a du bruit, un nombre plus élevé d'itérations de ProMeSCT pourrait permettre de supprimer ce signal.

Les différentes preuves de concept réalisées suite à la caractérisation du détecteur nous ont permis de confirmer la faisabilité de la tomographie spectrale avec ce nouveau détecteur. A basse énergie, pour l'iode et le baryum, la séparation se fait correctement et l'algorithme ProMeSCT nous permet d'obtenir des quantifications de la concentration de ces différentes matériaux. Une limite à cette quantification demeure en la connaissance encore imparfaite de la réponse des pixels d'AsGa en terme de partage de charges, ce qui génère des incertitudes systématiques dans les estimations de la concentration. Nous avons aussi montré que nous pouvions utiliser le détecteur

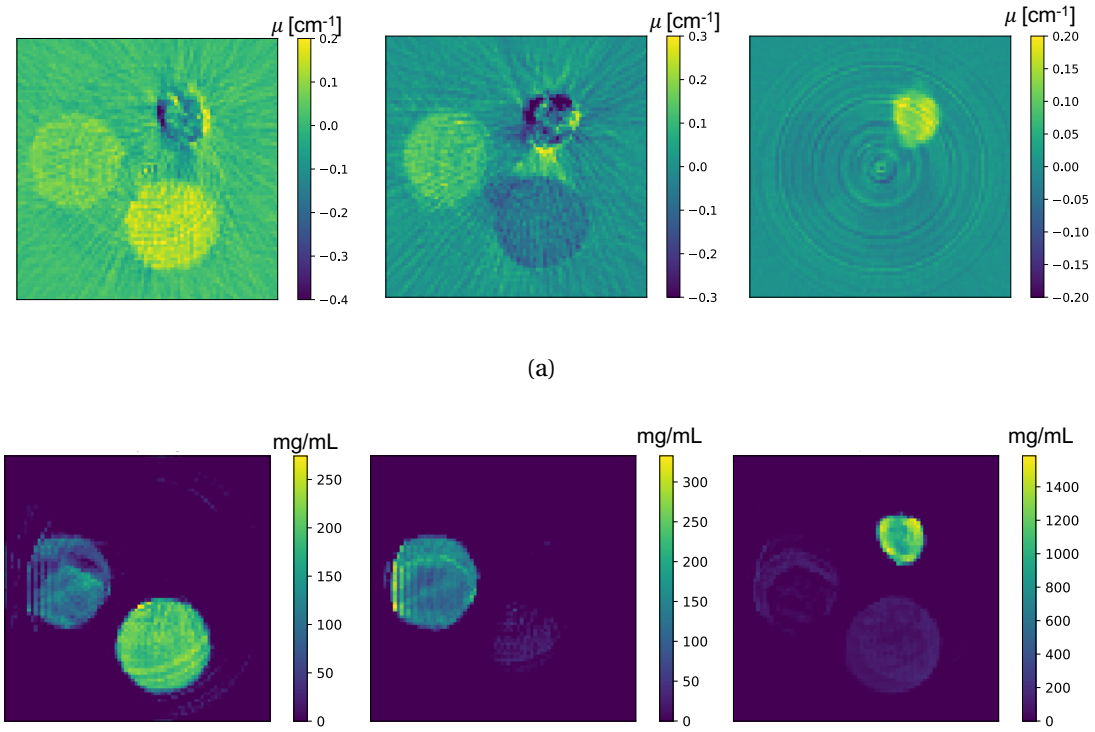


FIGURE 4.22. – Résultats des tomographies spectrales obtenus (a) par soustraction au K-edge de l'iode (à gauche), du baryum (au centre) et de l'or (à droite) ou (b) avec l'algorithme ProMeSCT. Les images représentent une moyenne de plusieurs coupes tomographiques pour une meilleure visualisation des résultats.

XPAD3.2-C/AsGa à plus haute énergie et notamment au K-edge de l'or, un matériau de plus en plus utilisé sous forme de nanoparticules. Cependant, à haute énergie nous sommes à la limite de la linéarité de l'amplificateur de charges du chip et donc les calibrations se font moins précises. Par ailleurs, pour une meilleure caractérisation du détecteur et des calibrations plus fiables pour des meilleures qualités d'images, des faisceaux mono-énergétique amélioreraient grandement la connaissance du détecteur. Par la suite, la fabrication d'un module de détection entier composé de 6 chips XPAD3.2-C juxtaposés permettra de mettre en application in vivo les résultats obtenus avec le détecteur mono-chip. Les capteurs d'AsGa étant produits à Tomsk en Sibérie, la fabrication de ce module de détection a malheureusement été empêchée en raison des sanctions imposées à la Russie suite à l'invasion de l'Ukraine par la Russie. Des alternatives sont recherchées, notamment en Finlande où se sont réfugiés les fabriquants des capteurs d'AsGa.

Conclusion

Dans un contexte interdisciplinaire entre la physique et la biologie, le travail de cette thèse a permis de mettre en application l'utilisation de l'imagerie préclinique pour des problématiques biologiques. Les différents axes du projet DePIcT introduits au début de ce manuscrit ont pu être traités au cours de ma thèse.

Plusieurs études longitudinales ont été menées, à l'aide du prototype PIXSCAN-FLI, afin de suivre l'évolution des tumeurs du foie (CHC) chez la souris avec le modèle murin *Alb-R26*^{Met} et de répondre à différentes problématiques. La première nous a mené à identifier les différences cellulaires et moléculaires des tumeurs prénéoplasiques (au stade précoce de l'évolution tumorale) en fonction de leur évolution dans le temps grâce à des analyses de cytométrie en flux et de séquençage d'ARN. Cet axe d'étude est important car le CHC est détecté très tardivement, ce qui rend le traitement plus compliqué. Mieux comprendre l'évolution des tumeurs et identifier des marqueurs sont un atout pour une meilleure prise en charge de ce cancer. Les autres études nous ont permis de comparer le remaniement du système immunitaire lorsque ce dernier est soumis à des traitements agissant avec des mécanismes différents. Cette large hétérogénéité de réponse au traitement dans notre modèle illustre très bien l'hétérogénéité des patients. Une combinaison de traitements constitués d'un inhibiteur de HDAC et d'un inhibiteur de RTK a montré une efficacité interessante pour le traitement du CHC sur notre modèle. Par ailleurs, mieux appréhender les réponses aux traitements et le remaniement immunitaire associé permet par la suite d'adapter au mieux les traitements, combinés ou non, proposés aux patients.

Une partie de mon travail de thèse a été d'améliorer l'analyse et le traitement des données. Les études se sont portées sur la prise en compte du mouvement respiratoire de la souris afin de limiter les artefacts ainsi que sur la segmentation automatique des tumeurs du foie sur les volumes reconstruits. La preuve de concept de cette première étude nous a permis de mettre en évidence la possibilité de détecter les images correspondant à une même phase du cycle respiratoire de la souris. Un travail supplémentaire pour implémenter cette étude dans la reconstruction des images nous permettrait de limiter les effets du mouvement respiratoire. Concernant la seconde étude, des approches d'apprentissage profond (DL) développées et entraînées grâce à une base de données issue de nos différentes acquisitions nous ont montré la possibilité de segmenter automatiquement les tumeurs du foie. En revanche, les petites tumeurs étant très difficiles à détecter, la précision du modèle entraîné montre des limites pour leur segmentation. De même que la large hétérogénéité des tumeurs en termes de contraste ou de forme rend complexe la généralisation du modèle. Une plus

grande base de données avec différentes tumeurs pourrait améliorer les performances du modèle de DL.

Enfin, l'acquisition d'un nouveau détecteur XPAD3.2-C/AsGa m'a permis de le caractériser et de réaliser des preuves de concept en tomographie spectrale. Doté de pixels hybrides avec un seuil de détection en énergie réglable, ce détecteur possède une meilleure efficacité de détection que le XPAD3.2-S/Si. Nous avons pu montrer que la séparation par soustraction au K-edge de l'iode et du baryum était réalisable, tout comme la séparation de l'or qui possède un K-edge très élevé. L'algorithme ProMeSCT nous permet, en plus de la séparation des composants, d'estimer la concentration des différents matériaux. Cependant, une meilleure connaissance du détecteur, en particulier de l'importance du partage de charges, est nécessaire afin de mieux modéliser la réponse de ce dernier pour améliorer les résultats obtenus par l'algorithme. Malgré cela, les résultats préliminaires obtenus avec ce détecteur sont encourageants pour le développement de la tomographie spectrale dans un contexte préclinique avec des agents de contraste à base d'iode ou de baryum. L'acquisition d'une barrette de détecteur composée de six chips permettra par la suite de réaliser une preuve de concept sur le petit animal.

A l'issue de ma thèse, le prototype PIXSCAN-FLI a été déplacé eu Centre Européen de la Recherche en Imagerie MÉDicale à Marseille. Il pourra ainsi être utilisé pour divers projets afin de continuer de mettre en avant les avantages de ce micro tomodensitomètre à comptage de photons ainsi que le développement de la tomographie spectrale.

Bibliographie

[] *10x Genomics*. en. Library Catalog : www.10xgenomics.com. URL : https://www.10xgenomics.com/ (cf. p. 93).

[] *Abbexa - Antibodies, Proteins, ELISA kits*. en. Text. Archive Location : United Kingdom Library Catalog : www.abbexa.com Publisher : Abbexa.com. URL : https://www.abbexa.com/ (cf. p. 93).

[Ali20] Omar Ibrahim ALIRR. « Deep learning and level set approach for liver and tumor segmentation from CT scans ». en. In : *Journal of Applied Clinical Medical Physics* 21.10 (2020), p. 200-209. ISSN : 1526-9914. DOI : 10.1002/acm2.13003 (cf. p. 85).

[AM76] R E ALVAREZ et al. « Energy-selective reconstructions in X-ray computerised tomography ». en. In : *Physics in Medicine and Biology* 21.5 (sept. 1976), p. 733-744. ISSN : 00319155. DOI : 10.1088/0031-9155/21/5/002. URL : https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/21/5/002 (cf. p. 130).

[AKB15] Asra ASLAM et al. « Improved Edge Detection Algorithm for Brain Tumor Segmentation ». en. In : *Procedia Computer Science* 58 (2015), p. 430-437. ISSN : 18770509. DOI : 10.1016/j.procs.2015.08.057. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877050915021687 (cf. p. 72).

[Aus+22] Rudy AUSSEL et al. « ShIVA – A user-friendly and interactive interface giving biologists control over their single-cell RNA-seq data ». en. In : (2022) (cf. p. 98).

[Bal+21] R. BALLABRIGA et al. « Photon Counting Detectors for X-Ray Imaging With Emphasis on CT ». In : *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences* 5.4 (juill. 2021). Conference Name : IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences, p. 422-440. ISSN : 2469-7303. DOI : 10.1109/TRPMS.2020.3002949 (cf. p. 129).

[BK04] Julia F. BARRETT et al. « Artifacts in CT : Recognition and Avoidance ». en. In : *RadioGraphics* 24.6 (nov. 2004), p. 1679-1691. ISSN : 0271-5333, 1527-1323. DOI : 10.1148/rg.246045065. URL : http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.246045065 (cf. p. 44).

[Bol+13] Hanne BOLL et al. « Comparison of Fenestra LC, ExiTron nano 6000, and ExiTron nano 12000 for Micro-CT Imaging of Liver and Spleen in Mice ». en. In : *Academic Radiology* 20.9 (sept. 2013), p. 1137-1143. ISSN : 10766332. DOI : 10.1016/j.acra.2013.06.002. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1076633213002705 (cf. p. 64).

[Bru+21] Jordi BRUIX et al. « Systemic treatment of hepatocellular carcinoma : An EASL position paper. » eng. In : *Journal of hepatology* 75.4 (oct. 2021). Place : Netherlands, p. 960-974. ISSN : 1600-0641 0168-8278. DOI : 10.1016/j.jhep.2021.07.004 (cf. p. 88).

[But+14] C. BUTON et al. « Comparison of three types of XPAD3.2/CdTe single chip hybrids for hard X-ray applications in material science and biomedical imaging ». en. In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 758 (sept. 2014), p. 44-56. ISSN : 01689002. DOI : 10.1016/j.nima.2014.04.067. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016890021400480X (cf. p. 55, 119).

[Cas+16] Franca CASSOL, M DUPONT et al. « Characterization of the imaging performance of a micro-CT system based on the photon counting XPAD3/Si hybrid pixel detectors ». en. In : *Biomedical Physics & Engineering Express* 2.2 (fév. 2016), p. 025003. ISSN : 2057-1976. DOI : 10.1088/2057-1976/2/2/025003. URL : https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2057-1976/2/2/025003 (cf. p. 49, 134).

[Cas+19] Franca CASSOL, Loriane PORTAL et al. « Tracking Dynamics of Spontaneous Tumors in Mice Using Photon-Counting Computed Tomography ». en. In : *iScience* 21 (nov. 2019), p. 68-83. ISSN : 25890042. DOI : 10.1016/j.isci.2019.10.015. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2589004219303943 (cf. p. 88).

[Cas+13] Franca CASSOL BRUNNER et al. « First K-Edge Imaging With a Micro-CT Based on the XPAD3 Hybrid Pixel Detector ». en. In : *IEEE Transactions on Nuclear Science* 60.1 (fév. 2013), p. 103-108. ISSN : 0018-9499, 1558-1578. DOI : 10.1109/TNS.2012.2217753. URL : http://ieeexplore.ieee.org/document/6329459/ (cf. p. 135).

[Cha08] Benoıt CHANTEPIE. « Étude et réalisation d'une électronique rapide à bas bruit pour un détecteur de rayons X à pixels hybrides destiné à l'imagerie du petit animal ». fr. Thèse de doct. 2008 (cf. p. 55, 119).

[DPS21] Mats DANIELSSON et al. « Photon-counting x-ray detectors for CT ». en. In : *Physics in Medicine & Biology* 66.3 (fév. 2021), 03TR01. ISSN : 0031-9155, 1361-6560. DOI : 10.1088/1361-6560/abc5a5. URL : https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6560/abc5a5 (cf. p. 58).

[Dav65] C. M. DAVISSON. *Interaction of -RADIATION with Matter*. T. 1. Conference Name : Alpha-, Beta- and Gamma-ray Spectroscopy Pages : 37 ADS Bibcode : 1965abgs.conf...37D. Jan. 1965. URL : https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1965abgs.conf...37D (cf. p. 30).

[Del+07] P. DELPIERRE et al. « PIXSCAN : Pixel detector CT-scanner for small animal imaging ». en. In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 571.1-2 (fév. 2007), p. 425-428. ISSN : 01689002. DOI : 10.1016/j.nima.2006.10.126. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168900206019243 (cf. p. 49).

[Di +09] Luca DI TOMMASO et al. « The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma ». en. In : *Journal of Hepatology* 50.4 (avr. 2009), p. 746-754. ISSN : 01688278. DOI : 10.1016/j.jhep.2008.11.014. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827808007812 (cf. p. 97).

[Duc+17] Nicolas DUCROS et al. « Regularization of nonlinear decomposition of spectral x-ray projection images ». en. In : *Medical Physics* 44.9 (sept. 2017), e174-e187. ISSN : 00942405. DOI : 10.1002/mp.12283. URL : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mp.12283 (cf. p. 135).

[Dup14] Mathieu DUPONT. « Tomographie spectrale à comptage de photons : développement du prototype PIXSCAN et preuve de concept ». fr. Thèse de doct. 2014 (cf. p. 40, 58).

[El 22] Ouafaa EL BARGHMI. *Développement et évaluation d'une méthode de segmentation au- tomatique par apprentissage profond dans le cadre d'une étude in vivo sur l'hépatocarcinome cellulaire*. Rapp. tech. 2022 (cf. p. 80).

[Eul16] André EULER. « Initial Results of a Single-Source Dual-Energy Computed Tomography Technique Using a Split-Filter : Assessment of Image Quality, Radiation Dose, and Accuracy of Dual-Energy Applications in an In Vitro and In Vivo Study. » In : *Investigative radiology* (2016). DOI : 10.1097/rli.0000000000000257 (cf. p. 132).

[Eva55] Robley EVANS. *The atomic nucleus*. 1955 (cf. p. 30).

[Fan+17] Yannan FAN, Maria ARECHEDERRA et al. « A phosphokinome-based screen uncovers new drug synergies for cancer driven by liver-specific gain of nononcogenic receptor tyrosine kinases. » eng. In : *Hepatology (Baltimore, Md.)* 66.5 (nov. 2017). Place : United States, p. 1644-1661. ISSN : 1527-3350 0270-9139. DOI : 10.1002/hep.29304 (cf. p. 89).

[Fan+15] Yannan FAN, Sylvie RICHELME et al. « Tissue-Specific Gain of RTK Signalling Uncovers Selective Cell Vulnerability during Embryogenesis ». en. In : *PLOS Genetics* 11.9 (sept. 2015). Sous la dir. de Nadia DAHMANE, e1005533. ISSN : 1553-7404. DOI : 10.1371/journal.pgen.1005533. URL : https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1005533 (cf. p. 89).

[FDK84] L. A. FELDKAMP et al. « Practical cone-beam algorithm ». en. In : *Journal of the Optical Society of America A* 1.6 (juin 1984), p. 612. ISSN : 1084-7529, 1520-8532. DOI : 10.1364/JOSAA.1.000612. URL : https://opg.optica.org/abstract.cfm?URI=josaa-1-6-612 (cf. p. 38, 43, 59).

[FM09] Jasmine FOO et al. « Evolution of Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapies during Continuous and Pulsed Administration Strategies ». en. In : *PLoS Computational Biology* 5.11 (nov. 2009). Sous la dir. de Donna K. SLONIM, e1000557. ISSN : 1553-7358. DOI : 10.1371/journal.pcbi.1000557. URL : https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1000557 (cf. p. 115).

[Gar] Christian GARING. *Ondes., 2, Ondes électromagnétiques, exercices ... - Christian Garing - Editions Ellipses*. fr. Leslibraires.fr. URL : https://www.leslibraires.fr/livre/322395-ondes-2-ondes-electromagnetiques-exercices--christian-garing-editions-ellipses (cf. p. 26).

[Gar20] Richard GARNETT. « A comprehensive review of dual-energy and multi-spectral computed tomography ». en. In : *Clinical Imaging* 67 (nov. 2020), p. 160-169. ISSN : 08997071. DOI : 10.1016/j.clinimag.2020.07.030. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899707120302928 (cf. p. 131).

[GJ23] Muriel Jeremia GOMES et al. « Photon-Counting Detectors in Computed Tomography : A Review ». en. In : *Journal of Health and Allied Sciences NU* 13.02 (avr. 2023), p. 147-152. ISSN : 2582-4287, 2582-4953. DOI : 10.1055/s-0042-1749180. URL : http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0042-1749180 (cf. p. 58).

[Gre+23] Joël GREFFIER et al. « Spectral CT imaging : Technical principles of dual-energy CT and multi-energy photon-counting CT ». en. In : *Diagnostic and Interventional Imaging* 104.4 (avr. 2023), p. 167-177. ISSN : 22115684. DOI : 10.1016/j.diii.2022.11.003. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211568422002212 (cf. p. 132).

[Gul+22] Sidra GUL et al. « Deep learning techniques for liver and liver tumor segmentation : A review ». en. In : *Computers in Biology and Medicine* 147 (août 2022), p. 105620. ISSN : 00104825. DOI : 10.1016/j.compbiomed.2022.105620. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010482522004127 (cf. p. 85).

[He+12] Peng HE et al. « Optimization of K-edge imaging with spectral CT : Optimization of K-edge imaging ». en. In : *Medical Physics* 39.11 (oct. 2012), p. 6572-6579. ISSN : 00942405. DOI : 10.1118/1.4754587. URL : http://doi.wiley.com/10.1118/1.4754587 (cf. p. 134).

[Hes+19] Mohammad Hesam HESAMIAN et al. « Deep Learning Techniques for Medical Image Segmentation : Achievements and Challenges ». en. In : *Journal of Digital Imaging* 32.4 (août 2019), p. 582-596. ISSN : 0897-1889, 1618-727X. DOI : 10.1007/s10278-019-00227-x. URL : http://link.springer.com/10.1007/s10278-019-00227-x (cf. p. 77).

[Hol06] Robin HOLLIDAY. « Epigenetics : a historical overview. » eng. In : *Epigenetics* 1.2 (juin 2006). Place : United States, p. 76-80. ISSN : 1559-2308 1559-2294. DOI : 10.4161/epi.1.2.2762 (cf. p. 99).

[HGW85] W. L. HSIAO et al. « Effects of 5-azacytidine on the progressive nature of cell transformation. » eng. In : *Molecular and cellular biology* 5.7 (juill. 1985). Place : United States, p. 1800-1803. ISSN : 0270-7306 1098-5549. DOI : 10.1128/mcb.5.7.1800-1803.1985 (cf. p. 99).

[Joh+10] S. M. JOHNSTON et al. « Phase-selective image reconstruction of the lungs in small animals using micro-CT ». en. In : San Diego, California, United States, mars 2010, 76223G. DOI : 10.1117/12.844359. URL : http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.844359 (cf. p. 69).

[Jon+06] Pim A. de JONG et al. « Estimation of Cancer Mortality Associated with Repetitive Computed Tomography Scanning ». en. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173.2 (jan. 2006), p. 199-203. ISSN : 1073-449X, 1535-4970. DOI : 10.1164/rccm.200505-810OC. URL : https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.200505-810OC (cf. p. 67).

[KW22] Md Gulam Musawwir KHAN et al. « Advances in the Current Understanding of How Low-Dose Radiation Affects the Cell Cycle ». en. In : *Cells* 11.3 (jan. 2022), p. 356. ISSN : 2073-4409. DOI : 10.3390/cells11030356. URL : https://www.mdpi.com/2073-4409/11/3/356 (cf. p. 67).

[Kho+09] R KHOURY et al. « A geometrical calibration method for the PIXSCAN micro-CT scanner ». en. In : *Journal of Instrumentation* 4.07 (juill. 2009), P07016-P07016. ISSN : 1748-0221. DOI : 10.1088/1748-0221/4/07/P07016. URL : https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-0221/4/07/P07016 (cf. p. 59).

[Kho08] Rana KHOURY. « PIXSCAN : Micro-tomodensitomètre à pixels hybrides pour le petit animal ». Thèse de doct. 2008 (cf. p. 50).

[KN29] O. KLEIN et al. « Über die Streuung von Strahlung durch freie Elektronen nach der neuen relativistischen Quantendynamik von Dirac ». In : *Zeitschrift fur Physik* 52.11-12 (nov. 1929), p. 853-868. DOI : 10.1007/BF01366453 (cf. p. 31).

[Kno00] Glenn F. KNOLL. *Radiation detection and measurement*. en. 3rd ed. New York : Wiley, 2000. ISBN : 978-0-471-07338-3 (cf. p. 29).

[Kro15] Carine KRONLAND-MARTINET. « Développement de la tomographie intravitale au K-edge avec la caméra à pixels hybrides XPAD3 ». fr. Thèse de doct. 2015 (cf. p. 56, 135).

[Li+14] Xiang LI et al. « Contrast agents for preclinical targeted X-ray imaging ». en. In : *Advanced Drug Delivery Reviews* 76 (sept. 2014), p. 116-133. ISSN : 0169409X. DOI : 10.1016/j.addr.2014.07.013. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X14001549 (cf. p. 64).

[Man+16] Julia G. MANNHEIM et al. « Comparison of small animal CT contrast agents : Comparison of small animal CT contrast agents ». en. In : *Contrast Media & Molecular Imaging* 11.4 (juill. 2016), p. 272-284. ISSN : 15554309. DOI : 10.1002/cmmi.1689. URL : http://doi.wiley.com/10.1002/cmmi.1689 (cf. p. 64).

[Mat+59] H R MATURANAT et al. « What the Frog's Eye Tells the Frog's Brain ». en. In : *PROCEEDINGS OF THE IRE* (1959) (cf. p. 73).

[MP43] MCCULLOCH et al. « A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity ». en. In : (1943) (cf. p. 73).

[MG79] James D. MCGHEE et al. « Specific DNA methylation sites in the velocity of the chicken P-globin genes ». In : *Nature* 280 (1979) (cf. p. 99).

[Mog+18] Mahdieh MOGHISEH et al. « Spectral Photon-Counting Molecular Imaging for Quantification of Monoclonal Antibody-Conjugated Gold Nanoparticles Targeted to Lymphoma and Breast Cancer : An *In Vitro* Study ». en. In : *Contrast Media & Molecular Imaging* 2018 (déc. 2018), p. 1-9. ISSN : 1555-4309, 1555-4317. DOI : 10.1155/2018/2136840. URL : https://www.hindawi.com/journals/cmmi/2018/2136840/ (cf. p. 137).

[Moh+19] Gomathi MOHAN et al. « Recent advances in radiotherapy and its associated side effects in cancer—a review ». en. In : *The Journal of Basic and Applied Zoology* 80.1 (déc. 2019), p. 14. ISSN : 2090-990X. DOI : 10.1186/s41936-019-0083-5. URL : https://basicandappliedzoology.springeropen.com/articles/10.1186/s41936-019-0083-5 (cf. p. 67).

[Mor13] Delphine MORELE. *Zoom incorporation in the micro-CT scanner PIXSCAN geometric calibration and new helical calibration*. Rapp. tech. 2013 (cf. p. 59).

[Nie+23] Maciej NIEWADA et al. « Immune checkpoint inhibitors combined with tyrosine kinase inhibitors or immunotherapy for treatment-naıve metastatic clear-cell renal cell carcinoma—A network meta-analysis. Focus on cabozantinib combined with nivolumab ». en. In : *Frontiers in Pharmacology* 13 (mars 2023), p. 1063178. ISSN : 1663-9812. DOI : 10.3389/fphar.2022.1063178. URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.1063178/full (cf. p. 101).

[Pan+07a] Patrick PANGAUD, S. BASOLO et al. « First results of XPAD3, a new photon counting chip for X-ray CT-scanner with energy discrimination ». en. In : *2007 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record*. ISSN : 1082-3654. Honolulu, HI, USA : IEEE, oct. 2007, p. 14-18. ISBN : 978-1-4244-0922-8 978-1-4244-0923-5. DOI : 10.1109/NSSMIC.2007.4436281. URL : http://ieeexplore.ieee.org/document/4436281/ (cf. p. 49).

[Pan+07b] Patrick PANGAUD, Stephanie BASOLO et al. « XPAD3 : A new photon counting chip for X-ray CT-scanner ». en. In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 571.1-2 (fév. 2007), p. 321-324. ISSN : 01689002. DOI : 10.1016/j.nima.2006.10.092. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168900206018894 (cf. p. 49, 55).

[Pan+18] R.K. PANTA et al. « Element-specific spectral imaging of multiple contrast agents : a phantom study ». en. In : *Journal of Instrumentation* 13.02 (fév. 2018), T02001-T02001. ISSN : 1748-0221. DOI : 10.1088/1748-0221/13/02/T02001. URL : https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-0221/13/02/T02001 (cf. p. 136).

[Par+85] C. S. PARKINS et al. « Repair in mouse lung for up to 20 fractions of X rays or neutrons ». en. In : *The British Journal of Radiology* 58.687 (mars 1985), p. 225-241. ISSN : 0007-1285, 1748-880X. DOI : 10.1259/0007-1285-58-687-225. URL : http://www.birpublications.org/doi/10.1259/0007-1285-58-687-225 (cf. p. 67).

[PGM96] Françoise PEYRIN et al. « Introduction à l'imagerie tomographique 2D et 3 D reposant sur une propagation en ligne droite . Cas de la tomographie par rayon X, par émission et par ultrasons ». fr. In : (1996) (cf. p. 44).

[PD21] Oliver L. P. PICKFORD SCIENTI et al. « An Overview of X-ray Photon Counting Spectral Imaging (x-CSI) with a Focus on Gold Nanoparticle Quantification in Oncology ». en. In : *Journal of Imaging* 8.1 (déc. 2021), p. 4. ISSN : 2313-433X. DOI : 10.3390/jimaging8010004. URL : https://www.mdpi.com/2313-433X/8/1/4 (cf. p. 137).

[Pio+17] Igor PIOTROWSKI et al. « Carcinogenesis induced by low-dose radiation ». en. In : *Radiology and Oncology* 51.4 (nov. 2017), p. 369-377. ISSN : 1581-3207. DOI : 10.1515/raon-2017-0044. URL : https://www.sciendo.com/article/10.1515/raon-2017-0044 (cf. p. 67).

[Pol07] Jean-Philippe POLI. « Structuration automatique de flux télévisuels ». fr. Thèse de doct. 2007 (cf. p. 74).

[Por18] Loriane PORTAL. « Étude de la tomographie à comptage de rayons X avec des pixels hybrides en Si et en CdTe et application au suivi longitudinal du carcinome hépatocellulaire chez la souris ». fr. Thèse de doct. 2018 (cf. p. 65, 75).

[Rie77] S J RIEDERER. « Selective iodine imaging using K-edge energies in computerized x-ray tomography. » In : (1977). DOI : 10.1118/1.594357 (cf. p. 133, 135).

[Rit08] Simon RIT. « Prise en compte du mouvement respiratoire pour la reconstruction d'images tomodensitome triques ». Thèse de doct. 2008 (cf. p. 68).

[RN20] Intisar RIZWAN I HAQUE et al. « Deep learning approaches to biomedical image segmentation ». en. In : *Informatics in Medicine Unlocked* 18 (2020), p. 100297. ISSN : 23529148. DOI : 10.1016/j.imu.2020.100297. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235291481930214X (cf. p. 77).

[RFB15] Olaf RONNEBERGER et al. *U-Net : Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation*. en. arXiv :1505.04597 [cs]. Mai 2015. URL : http://arxiv.org/abs/1505.04597 (cf. p. 78).

[RB59] William Moy Stratton RUSSELL et al. *The Principles of Humane Experimental Technique*. en. Google-Books-ID : j75qAAAAMAAJ. Methuen, 1959 (cf. p. 63).

[Sch08] J P SCHLOMKA. « Experimental feasibility of multi-energy photon-counting K-edge imaging in pre-clinical computed tomography ». In : (2008). DOI : 10.1088/0031-9155/53/15/002 (cf. p. 135).

[] *sklearn.feature_selection.SequentialFeatureSelector*. en. Library Catalog : scikit-learn.org. URL : https://scikit-learn/stable/modules/generated/sklearn.feature_selection.SequentialFeatureSelector.html (cf. p. 106).

[SN21] Aaron SO et al. « Spectral Computed Tomography : Fundamental Principles and Recent Developments ». en. In : *Korean Journal of Radiology* 22.1 (2021), p. 86. ISSN : 1229-6929, 2005-8330. DOI : 10.3348/kjr.2020.0144. URL : https://kjronline.org/DOIx.php?id=10.3348/kjr.2020.0144 (cf. p. 36, 131, 132).

[SB08] Miho M. SUZUKI et al. « DNA methylation landscapes : provocative insights from epigenomics ». en. In : *Nature Reviews Genetics* 9.6 (juin 2008), p. 465-476. ISSN : 1471-0056, 1471-0064. DOI : 10.1038/nrg2341. URL : https://www.nature.com/articles/nrg2341 (cf. p. 99).

[Sym+17] Rolf SYMONS et al. « Photon-counting CT for simultaneous imaging of multiple contrast agents in the abdomen : An *in vivo* study ». en. In : *Medical Physics* 44.10 (oct. 2017), p. 5120-5127. ISSN : 00942405. DOI : 10.1002/mp.12301. URL : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mp.12301 (cf. p. 136).

[23] *Système de référence en anatomie*. fr. Page Version ID : 206712806. Août 2023. URL : https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Syst%C3%A8me_de_r%C3%A9f%C3%A9rence_en_anatomie&oldid=206712806 (cf. p. 62).

[TH15] Abdel Aziz TAHA et al. « An Efficient Algorithm for Calculating the Exact Hausdorff Distance ». en. In : *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 37.11 (nov. 2015), p. 2153-2163. ISSN : 0162-8828, 2160-9292. DOI : 10.1109/TPAMI.2015.2408351. URL : http://ieeexplore.ieee.org/document/7053955/ (cf. p. 81).

[Tai19] Souhil TAIRI. « Développement de méthodes itératives pour la reconstruction en tomographie spectrale ». fr. Thèse de doct. 2019 (cf. p. 135).

[Tai+21] Souhil TAIRI et al. « ProMeSCT : A Proximal Metric Algorithm for Spectral CT ». en. In : *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences* 5.4 (juill. 2021), p. 548-558. ISSN : 2469-7311, 2469-7303. DOI : 10.1109/TRPMS.2020.3036028. URL : https://ieeexplore.ieee.org/document/9248005/ (cf. p. 135, 136).

[95] « Terminology of nodular hepatocellular lesions ». In : *Hepatology* 22.3 (1995), p. 983-993. ISSN : 0270-9139. DOI : https://doi.org/10.1016/0270-9139(95)90324-0. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0270913995903240 (cf. p. 94).

[18] *Tube à rayons X*. 2018. URL : https://www.google.com/url?sa=i&url=http%3A%2F%2F (cf. p. 33).

[Vil19] Augusto VILLANUEVA. « Hepatocellular Carcinoma. » eng. In : *The New England journal of medicine* 380.15 (avr. 2019). Place : United States, p. 1450-1462. ISSN : 1533-4406 0028-4793. DOI : 10.1056/NEJMra1713263 (cf. p. 88).

[VC18] Perrine VUAGNAT et al. « Immunothérapies anti-checkpoints : aspects fondamentaux ». fr. In : *MISE AU POINT* (2018) (cf. p. 102).

[Yus] Paul YUSHKEVICH. *ITK-SNAP*. URL : www.itksnap.org (cf. p. 71).

[Zha+20] Jian ZHANG et al. « Segmenting Purple Rapeseed Leaves in the Field from UAV RGB Imagery Using Deep Learning as an Auxiliary Means for Nitrogen Stress Detection ». en. In : *Remote Sensing* 12.9 (avr. 2020), p. 1403. ISSN : 2072-4292. DOI : 10.3390/rs12091403. URL : https://www.mdpi.com/2072-4292/12/9/1403 (cf. p. 78, 80).

ANNEXES

A. Protocole de dissociation cellulaire des tumeurs du foie

1. Surgically remove the tumor under the primary culture hood using the binocular and put it in a 10cm dish
2. Cut the tumor in 3 pieces : 1 piece put immediately in a 1 well of 24 wells plate in CO-ind 5 % FBS + P/S (1 ml/well) keep on ice, 1 piece in PFA and the last piece freeze at -80°C
3. Collect small tumor piece with the medium + mix of enzyme in a 2 ml round tube (Volume total = 1 ml)
   — Medium = CO-independent 5 %FBS + P/S
   — Collagenase 4 : 0.75 mg/ml (stock at 20 mg/ml dilution 1/27)
   — DNase I : 25 µg/ml (stock at 10 mg/ml dilution 1/400)
4. Cut a 1ml tip, pipet up and down with a 1 ml cut tip 4-8X then incubate 5 min at 37°C (Bain Marie)
5. Pipet up and down with a 200 µl tip
6. Incubate for 15 minutes at 37°C, every 5 min pipette
7. Filter samples on a 70 μm cell strainer in a new 2ml Eppendorf tube, pay attention to put the filter on the center of the tube and do a pressure
8. Wash the filter with 1 ml FACS Buffer (2 % FBS, 2mM EDTA, PBS), gently mix the tube
9. Let the cells for 5 min on ice
10. Centrifuge at 4°C for 5 min at 1000 min-1
11. Remove the supernatant
12. Resuspend the pellet with 1ml of ACK during 1 minute at 4°C for the lyse of red cells
13. Centrifuge at 4°C for 5 minutes at 1000 min-1
14. Resuspend in 500 µl of 2.4.G2 (diluted 1 :10 in FACS Buffer) or in FACS buffer. Keep cells on ice
15. Count the cells in trypan blue
16. The dilution in trypan blue depends on the size of the tumor : put in an 1,5 ml Eppendorf tube 10 µl of cells + 40 µl of FACS buffer + 50 µl of trypan blue (dilution 1/10)
17. Place 20 µl of this mix in a counting slide and use automated cell counter TC20 Biorad to count cells
18. Put cells in a 1,5ml Eppendorf tube on ice until FACS process.

Products :

CO-independent medium ref 11580536 (FischerScientific)
Collagenase IV ref C1538-500MG (Sigma Aldrich)
DNase I ref 11284932001 (Sigma Aldrich)
ACK Lysis buffer ref A1049201 (ThermoFischerScientific)
GentleMACS Tubes ref 130-093-237 (Miltenyi)

B. Protocole de dissociation des noyaux

Miltenyi Biotec

Nuclei Extraction Buffer

Order no. 130-128-024

Contents

1. Description
   - 1.1 Principle of the Nuclei Extraction Buffer
   - 1.2 Background information
   - 1.3 Applications
   - 1.4 Reagent and instrument requirements
2. Protocol
   - 2.1 Sample, equipment, and reagent preparation
   - 2.2 Nuclei extraction protocol
   - 2.3 Labeling for microscopic or flow cytometric analysis of nuclei samples

1. Description

This product is for research use only.

Components	100 mL Nuclei Extraction Buffer
Size	For 25 extractions.
Storage	Store protected from light at 2–8 °C. Do not freeze. The expiration date is indicated on the label.

1.1 Principle of the Nuclei Extraction Buffer

Tissue samples from various sources and species can be dissociated into single nuclei suspensions by combining mechanical tissue dissociation and cell lysis. The tissue sample is added to a gentleMACS™ C Tube together with the Nuclei Extraction Buffer and RNase inhibitor. The sample is dissociated using the gentleMACS Dissociator.
After dissociation, the sample is applied to a filter to remove any remaining larger particles from the single-nuclei suspension. Nuclei are collected by centrifugation and the nuclei pellet is resuspended and filtered again.

1.2 Background information

The Nuclei Extraction Buffer and the corresponding gentleMACS Program have been optimized for a gentle, rapid, and effective generation of single-nuclei suspensions from fresh and frozen tissue samples. This reliable and standardized protocol enables the recovery of high yield single-nuclei suspensions that can be used for a wide variety of studies including proteomic analysis, FACS analysis, and single-nuclei gene expression analysis.

1.3 Applications

- Dissociation of fresh, frozen (including flash-frozen and OCT embedded) tissue samples from various tissues and species into single-nuclei suspensions for subsequent molecular analyses.
- The provided protocol has been validated for a wide range of tissues, including brain, liver, heart, lung, pancreas, spleen and kidney, as well as tumor tissues including human melanoma, breast, pancreatic, colon and prostate cancer and grafted mouse tumors.

1.4 Reagent and instrument requirements

- Centrifuge
- MACS® SmartStrainers (70 µm) (# 130-098-462)
- MACS SmartStrainers (30 µm) (# 130-098-458)
- gentleMACS™ Octo Dissociator (# 130-095-937), gentleMACS Octo Dissociator with Heaters (# 130-096-427)
- gentleMACS C Tubes (# 130-093-237, # 130-096-334)
- RNase-Inhibitor (e.g. murine RNase Inhibitor from New England Biolabs)
- (Optional) Eppendorf® LoBind® Tubes 5 mL

Additional requirements for working with mouse brain

- MACS SmartStrainers (100 µm) (# 130-098-463)

Additional requirements for microscopic or flow cytometric analysis of single-nuclei suspensions (refer to protocol 2.3)

- Nuclei staining dye, e.g. 7-AAD Staining Solution (# 130-111-568), DAPI Staining Solution (# 130-111-570), or DRAQ5 Staining Solution (# 130-117-343).
- (Optional) Cell sorter, e.g. MACSQuant® Tyto® Sorter (# 130-103-931)

2. Protocol

▲ For details on the use of the gentleMACS Dissociators, refer to the gentleMACS Dissociators user manuals.

▲ Please make sure that your gentleMACS Octo Dissociator runs with the latest software update. The **4C_nuclei_1** program is included in the Miltenyi program folder from software version GM_V02.H21 (gentleMACS Octo Dissociator with Heaters) or GM_V02.R11 (gentleMACS Octo Dissociator) onwards. The latest software update can be requested under **https://www.miltenyibiotec.com/lp/2018/gentlemacs-software-update.html**.

▲ Pipette gently and slowly during all nuclei resuspension steps to minimize alteration of the extracted nuclei.

Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68, 51429 Bergisch Gladbach, Germany
Phone +49 2204 8306-0, Fax +49 2204 85197
macsde@miltenyi.com
www.miltenyibiotec.com

140-006-145.02

2.1 Sample, equipment, and reagent preparation

▲ Pre-cool centrifuge, buffers, and consumables with sample contact (e.g. gentleMACS C Tube and SmartStrainers) at 4 °C.

▲ **Note:** It is recommended to pre-cool the C Tube containing prepared lysis buffer overnight at 4 °C. Ideally, perform all nuclei extraction steps in a cold room.

Preparation of lysis buffer

Per extration add RNase inhibitor (final concentration 0.2 U/µL) to pre-cooled 4 mL Nuclei Extraction Buffer.

Preparation of resuspension buffer

Prepare an appropriate amount of resuspension buffer, e.g. PBS with 0.1% BSA and 0.2 U/µL RNase inhibitor. Store at 4 °C. Per extraction the following volumes of resuspension buffer are recommended:

Amount/type of tissue	Resuspension buffer
up to 50 mg	1.5 mL
50–100 mg	3 mL
100–200 mg	6 mL
Mouse brain hemisphere	8 mL

Table 1: Overview of resuspension volumes.

▲ **Note:** It is strongly recommended to adjust the nuclei concentration to < 5×10^6/mL to avoid nuclei aggregation.

▲ **Note:** When working with tissues with high intrinsic RNase activity (e.g. pancreas), the RNase inhibitor concentration can be increased in both prepared lysis and resuspension buffer, in order to prevent RNA degradation.

▲ **Note:** If only DNA-based downstream applications are to be performed, RNase inhibitor can be left out.

▲ **Note:** Some genomic applications require the use of different resuspension buffer to ensure optimal performance. Please, follow the recommendations of the genomic application provider.

Preparation of tissue sample

Resect tissue and cut into pieces of up to 200 mg. To store tissue, freeze them on dry ice or use liquid nitrogen.

▲ **Note:** It is recommended to cut tissue before freezing. If frozen tissue pieces are > 200 mg, cut them without letting samples thaw.

▲ **Note:** In minor cases, e.g. kidney, it is recommended to cut up the tissue into pieces of < 50 mg to ensure complete dissociation.

▲ **Note:** When working with OCT-embedded tissue, remove excess OCT without letting samples thaw.

2.2 Nuclei extraction protocol

▲ Please consider that optimal extraction performance depends on starting material (tissue type, amount of starting material) and downstream application and might require protocol optimization.

▲ Work fast until tissue is dissociated and keep samples on ice at all steps.

▲ Volumes given below are for up to 200 mg tissue per extraction.

1. Add 2 mL ice-cold lysis buffer to each pre-cooled gentleMACS C Tube.
2. Transfer tissue pieces to the gentleMACS C Tube containing lysis buffer and directly proceed the following steps until samples are dissociated.

   ▲ **Note:** Do not let frozen sample thaw before dissociation as endogenous RNase might degrade RNA.
3. Close gentleMACS C Tube and place it on the gentleMACS Dissociator.

   ▲ **Note:** Close C Tube tightly beyond the first resistance.
4. Run gentleMACS Program **4C_nuclei_1** on the gentleMACS Dissociator.
5. After termination of the program, detach C Tube from the gentleMACS Dissociator and place the C Tube immediately on ice.

   ▲ **Note:** Depending on tissue type, additional 5-10 minutes incubation on ice after dissociation might be needed to optimize cell lysis. Over-lysis should be avoided as it could lead to nuclei aggregation and nuclei damage.
6. Apply nuclei suspension to a MACS SmartStrainer (70 µm) placed on a 15 mL tube.

   ▲ **Note:** For brain samples, use a MACS SmartStrainer (100 µm).

   ▲ **Note:** To increase nuclei recovery, the use of low binding tubes is recommended at this and all following steps.
7. Wash MACS SmartStrainer with 2 mL ice-cold lysis buffer.

   ▲ **Note:** Alternatively, for maximum cell recovery, rinse used C Tube with ice-cold lysis buffer before adding to the MACS SmartStrainer.
8. Discard MACS SmartStrainer and centrifuge nuclei suspension at 300×g at 4 °C for 5 minutes. Carefully aspirate supernatant completely.
9. Resuspend nuclei pellet with ice-cold resuspension buffer by slowly and gently pipetting the sample up and down for 10 times.
10. Apply nuclei suspension to a MACS SmartStrainer (30 µm) placed on a 15 mL tube.

    ▲ **Note:** When working with myelin-rich brain, a myelin removal step is strongly recommended to remove myelin debris.
11. Collect nuclei suspension and proceed immediately with downstream application, e.g., single nuclei RNA seq or nuclei sorting.

    ▲ **Note:** In case debris amount is still too high for downstream application, purify the nuclei suspension by using a cell sorter, e.g. MACSQuant Tyto.

2.3 Labeling for microscopic or flow cytometric analysis of nuclei samples

1. Add 7-AAD (final concentration of 0.525 µg/mL) or DAPI (final concentration of 0.25 µg/mL) Staining Solution or DRAQ5 (10 µM) Staining Solution to a small fraction of the nuclei suspension. Mix by inverting gently.
2. Incubate 5 minutes at 4 °C.
3. Load sample on a hemocytometer or on a flow cytometer, e.g. MACSQuant Analyzer.
4. Analyze sample according to manufacturer's recommendation.

Refer to **www.miltenyibiotec.com** for all data sheets and protocols. Miltenyi Biotec provides technical support worldwide. Visit www.miltenyibiotec.com for local Miltenyi Biotec Technical Support contact information.

Unless otherwise specifically indicated, all Miltenyi Biotec products and services are for research use only and not for diagnostic or therapeutic use.

140-006-145.02

Legal notices

Limited product warranty

Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG and/or its affiliate(s) warrant this product to be free from material defects in workmanship and materials and to conform substantially with Miltenyi Biotec's published specifications for the product at the time of order, under normal use and conditions in accordance with its applicable documentation, for a period beginning on the date of delivery of the product by Miltenyi Biotec or its authorized distributor and ending on the expiration date of the product's applicable shelf life stated on the product label, packaging or documentation (as applicable) or, in the absence thereof, ONE (1) YEAR from date of delivery ("Product Warranty"). Miltenyi Biotec's Product Warranty is provided subject to the warranty terms as set forth in Miltenyi Biotec's General Terms and Conditions for the Sale of Products and Services available on Miltenyi Biotec's website at www.miltenyibiotec.com, as in effect at the time of order ("Product Warranty"). Additional terms may apply. BY USE OF THIS PRODUCT, THE CUSTOMER AGREES TO BE BOUND BY THESE TERMS.
THE CUSTOMER IS SOLELY RESPONSIBLE FOR DETERMINING IF A PRODUCT IS SUITABLE FOR CUSTOMER'S PARTICULAR PURPOSE AND APPLICATION METHODS.

Technical information

The technical information, data, protocols, and other statements provided by Miltenyi Biotec in this document are based on information, tests, or experience which Miltenyi Biotec believes to be reliable, but the accuracy or completeness of such information is not guaranteed. Such technical information and data are intended for persons with knowledge and technical skills sufficient to assess and apply their own informed judgment to the information. Miltenyi Biotec shall not be liable for any technical or editorial errors or omissions contained herein.
All information and specifications are subject to change without prior notice. Please contact Miltenyi Biotec Technical Support or visit www.miltenyibiotec.com for the most up-to-date information on Miltenyi Biotec products.

Licenses

This product and/or its use may be covered by one or more pending or issued patents and/or may have certain limitations. Certain uses may be excluded by separate terms and conditions. Please contact your local Miltenyi Biotec representative or visit Miltenyi Biotec's website at www.miltenyibiotec.com for more information.
The purchase of this product conveys to the customer the non-transferable right to use the purchased amount of the product in research conducted by the customer (whether the customer is an academic or for-profit entity). This product may not be further sold. Additional terms and conditions (including the terms of a Limited Use Label License) may apply.
CUSTOMER'S USE OF THIS PRODUCT MAY REQUIRE ADDITIONAL LICENSES DEPENDING ON THE SPECIFIC APPLICATION. THE CUSTOMER IS SOLELY RESPONSIBLE FOR DETERMINING FOR ITSELF WHETHER IT HAS ALL APPROPRIATE LICENSES IN PLACE. Miltenyi Biotec provides no warranty that customer's use of this product does not and will not infringe intellectual property rights owned by a third party. BY USE OF THIS PRODUCT, THE CUSTOMER AGREES TO BE BOUND BY THESE TERMS.

Trademarks

autoMACS, gentleMACS, MACS, MACSQuant, the Miltenyi Biotec logo, and NeuroBrew are registered trademarks or trademarks of Miltenyi Biotec and/or its affiliates in various countries worldwide. All other trademarks mentioned in this publication are the property of their respective owners and are used for identification purposes only.

Copyright © 2021 Miltenyi Biotec and/or its affiliates. All rights reserved.